

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

INDUCCIÓN DE LOS GENES *Cyp6a2* Y *Cyp6g1* DE *D. melanogaster*
CRUZAS E Y BE EN LARVAS EXPUESTAS A SULFORAFANO

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

GERARDO VÁZQUEZ GÓMEZ



DIRECTORA DE TESIS:
M. en C. IRMA ELENA DUEÑAS GARCÍA



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), el laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, así como en el laboratorio de Biología Molecular del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, unidad Zacatenco del IPN y fué financiado por el proyecto No. 61 del programa PAPCA de la FES Iztacala, UNAM.

Dedicatorias

A mi abuelo Agustín: que jamás vió este trabajo, pero su estrella lo iluminó desde su concepción hasta su culminación, y desde el lugar donde él esté su estrella siempre iluminará mi camino.

A mi abuela Florentina: por ser más que una abuela, esa que te cuenta historias en una tarde lluviosa, o te prepara el clásico atole, te dedico éste trabajo por ser el cántaro donde deposito todas mis dolencias, que escucha todas mis penas y ser la cobija que calienta mi alma cuando esta tiene frío.

A mi madre: “raíz fuerte” y a mi padre “duro como el roble, pero sensible como la ceniza al viento”, que a pesar de tener el mundo aplastándonos y asfixiándonos, nunca faltó su fuerza y fortaleza para moverlo un poquito y permitir el paso del aire y poder respirar.

A mis hermanos: Rorro, Diana, Richi y Marco, que nunca hemos encontrado la forma de hablarnos y comprendernos, pero sé que en esas risas de sábado en la noche recordando al ritmo de la música nuestra infancia y bromeando a cerca del futuro y en ese abrazo sincero está todo el cariño que nunca nos hemos podido demostrar con palabras.

Agradecimientos

A la UNAM por ser cuna de mis sueños.

Al Dr. Elías Piedra Ibarra: porque un profesor.... nunca logra saber dónde termina su influencia.

A mi directora de tesis: M. en C. Irma Elena Dueñas García, a la M. en C. Laura Castañeda Partida, a la M. en C. María Eugenia Heres Pulido y a todos los integrantes del laboratorio de Genética Toxicológica, por brindarme todas las facilidades y su apoyo para la realización de este trabajo.

Al Dr. César Flores Jefe del laboratorio de Fisiología Vegetal: por permitirme realizar mi tesis en ese laboratorio.

A la M. en C. Josefina Vázquez Medrano, al M. en C. Rafael Quintanar y al Dr. Ignacio Peñaloza: por haberme brindado más que su conocimiento y apoyo para la realización de esta tesis, me brindaron su sincera amistad. A ellos les estaré eternamente agradecido.

Y a todo el personal de la UBIPRPO por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

¿Qué busco?
Esa es una buena pregunta.
He tratado muchas veces
de buscar a Dios
a la justicia
e incluso el amor.
Soy un pobre diablo
que anda
entre el cielo y el infierno.
Soy una gente
que lo quiere todo
y que no ha alcanzado nada.
He buscado durante meses o años,
busco
la justicia, el pan, la comida
la sal, la mujer
para darme cuenta
de que no es necesario buscar,
la vida se encargará de colocarme
frente a todo lo que busco.
El día que lo haga, me quedaré callado.

Gerardo V.

Índice

1. Abreviaturas	7
2. Resumen	9
3. Genética Toxicológica	11
4. Metabolismo de los xenobióticos	12
5. Citocromos P450 (P450s)	13
6. Actividades de los P450s	16
7. Localización y Regulación de los P450s	17
8. P450s en <i>Drosophila melanogaster</i>	18
9. Fenobarbital (FB)	19
9.1. FB como inductor de enzimas metabolizadoras de xenobióticos: P450s	20
9.2. Inducción de los P450s en líneas de <i>Drosophila melanogaster</i> por FB	21
10. Sulforafano	23
10.1. Brócoli como la mayor fuente de SF	24
10.2. Modulación del Metabolismo Xenobiotico Mediado por Sulforafano SF	26
10.3. La vía Keap-1-Nrf2	30
11. Objetivos	31
12. Hipótesis	32
13. Materiales y Métodos	33
13.1. Bioensayos	33
13.2. Diseño de oligonucleótidos	35
13.3. Ensayos moleculares	35
13.3.1. Prueba de oligonucleotidos	35
13.3.2. Determinación de niveles de transcripción en cruza	36
14. Resultados	37
15. Discusión	44
15.1 <i>Cyp6g1</i>	44
15.2 <i>Cyp6a2</i>	45
16. Conclusiones	47
17. Referencias	48

1. Abreviaturas

Ah: Aril hidrocarbano

AKR: Aldo-cetoreductasa

ARE/EpRE: Elementos de respuesta a antioxidantes

CAR: Receptor Constitutivo de Androston

CO: Monóxido de carbono

DDT: 1, 1, 1-tricloro-2,2-bis (4-clorifenil) etano

DNA: Ácido desoxiribonucleico

FB: Fenobarbital

GR: Glutación reductasa

GRP: Glucorafanin

GSH: Glutación

GST's: Glutación S transferasas

GSTM1: Glutación S tranferasa M1

HCA's: Aminas heterocíclicas

HR: Humedad relativa

ITC's: Isotiocianatos

mRNA: RNA mensajero

MX: Metabolismo xenobiótico

NAD[P]H: Nicotin Adenil Dinucleotido Fosfato

Nrf2: (*Erythroid-derived 2*)-like 2

P450s: Citocromos P450

PhIP: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol pirimidina

REL: Retículo endoplásmico liso

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RT-PCR: Reverso transcriptción acoplada a reacción en cadena de la polimerasa,

RXR: Receptor retinoide X

SF: Sulforafano

SMART: Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas en Ala

TE: Transposón

UDP: Glucoronil transferasa

UV: Luz ultravioleta

XRE: Elementos de respuesta a xenobióticos

2. Resumen

El hombre está expuesto a xenobióticos que pueden ser tóxicos y/o genotóxicos. Éstos pueden ser metabolizados o bioactivados por los citocromos P450 (P450s), presentes en la Fase I del Metabolismo Xenobiótico desde procariontes hasta vertebrados. Al comparar las secuencias de estos genes entre humanos y *Drosophila melanogaster* se concluyó que algunas familias son exclusivas para cada especie, pero también se encontró que había familias en común.

La familia CYP6 de *Drosophila melanogaster* y CYP3 de mamíferos al tener la misma especificidad por sustrato se encuentran agrupadas dentro del mismo clan. El Fenobarbital (FB), es un fármaco utilizado para controlar trastornos del sistema nervioso, se ha demostrado que es un cancerígeno potencial que requiere ser activado por P450s, por otro lado, existe una amplia variedad de sustancias presentes en los alimentos con efecto antimutagénico y/o anticancerígeno, dentro de las cuales destaca el isotiocianato sulforafano (SF), presente en las brasicáceas (brócoli), al cual se le atribuyen propiedades quimioprotectoras en contra del cáncer.

Algunos reportes sugieren que induce la Fase II del metabolismo xenobiótico y que inhibe la Fase I. En el presente trabajo se compararon los niveles de transcripción de los P450s *Cyp6a2* y *Cyp6g1*, en larvas de *Drosophila melanogaster* (cruza BE y E) tratadas con Sulforafano o Fenobarbital mediante PCR semicuantitativo en el cual se utilizó al transcrito de un isógeno de actina como control constitutivo. Demostrando que el Sulforafano disminuye los niveles de transcripción de *Cyp6a2*.

Abstract

Human beings are exposed to xenobiotic compounds which can be toxic or genotoxic. These can be eliminated or biotransformed by Cytochromes P450 (P450s) an enzymatic complex present in Phase I of the Xenobiotic Metabolism present in prokaryotic organisms to vertebrates. When human and *Drosophila melanogaster* P450s gene sequences are compared it can be concluded that some families are exclusive for each species, but also that they share families in common.

The *Drosophila melanogaster* CYP6 family and the CYP3 family of mammals have the same substrat specificity and thus are grouped in the same clan. Phenobarbital (PB), a synthetic drug used to treat conditions of the nervous system has been shown to be a potential carcinogenic that requires to be activated by P450s.

On the other hand, there is a wide variety of compounds present in the diet which show antimutagenic and anticarcinogenic effect. One of such compounds is Sulforaphane (SF), an isothiocyanate present in Brassicaceas (broccoli) which some experimental evidences show that has chimioprotective effect against cancer.

Some reports suggest it induces Phase II and inhibits Phase I of the Xenobiotic Metabolism. In this work we compared the transcriptional levels of *Drosophila Cyp6a2* and *Cyp6g1* P450 genes in larvae of the ST and HB crosses exposed to SF and PB using semiquantitative PCR and actine isogene as constitutive control. SF showed to decrease the transcriptional levels of *Cyp6a2*.

3. Genética Toxicológica

La Genética Toxicológica es una ciencia esencialmente multidisciplinaria, que pretende establecer la correlación entre la exposición a agentes xenobióticos y la inducción de alteraciones genéticas, tanto en las células germinales como en las células somáticas de los organismos, identifica y analiza la acción de un grupo de agentes tóxicos que son capaces de interactuar con el material genético (agentes genotóxicos) y define a partir de ello los efectos que las toxinas ambientales producen sobre la integridad genética de los seres vivos.

El comienzo de la Genética Toxicológica se sitúa en 1927 cuando Herman Müller demostró que las radiaciones ionizantes son capaces de producir alteraciones genéticas en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) y definió a las mutaciones como los cambios en la cantidad, cualidad y/o arreglo de los genes (Vogel, 1991).

Müller también desarrolló técnicas cuantitativas para medir la proporción de mutaciones inducidas, y llamó la atención de la comunidad científica al sugerir que las radiaciones podrían producir cambios en las células somáticas de los tejidos, y que en las que se dividen activamente podrían producirse distintos tipos de cáncer, incluyendo las leucemias.

La importancia de la Toxicología Genética fue reconocida alrededor de 1969, cuando se empezó a relacionar el incremento de los productos químicos fabricados por el humano, con consecuencias genéticas. Simultáneamente se empezó a observar una relación entre los mutágenos y los cancerígenos, lo que incrementó la importancia de esta disciplina en la determinación de los efectos adversos en la salud que pueden producir los compuestos genotóxicos, dada su capacidad de ocasionar mutaciones hereditarias, o infertilidad cuando afectan a las células germinales o bien producir muerte celular y cáncer cuando afectan a las células somáticas (Vogel, 1991).

4. Metabolismo de los xenobióticos

El metabolismo xenobiótico (MX) es un fenómeno en el que puede darse tanto la activación como la eliminación de agentes xenobióticos. En la mayoría de los casos los xenobióticos son bioinactivados, pero en otros pueden causar cambios fisiológicos y bioquímicos como consecuencia de la desintoxicación deficiente y/o la reacción de los metabolitos intermediarios con los constituyentes celulares, lo cual produce desde daño celular hasta la muerte del organismo (Rodríguez-Arnaiz, 2004). Las toxinas que afectan al material hereditario (genotoxinas) pueden ser divididas en dos tipos: las llamadas directas que afectan *per se* al material hereditario como el agente alquilante metil metanosulfonato (MMS) y las que requieren ser activadas metabólicamente para dañar al DNA, denominadas pretóxicos o promutágenos como es el caso del fenobarbital (FB), que es utilizado para controlar trastornos del sistema nervioso, o el insecticida DDT con efecto genotóxico y que ha sido utilizado de manera indiscriminada.

Los compuestos genotóxicos, para ser excretados, requieren de la biotransformación que puede darse en Fase I y que involucra 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 y es catalizada principalmente por el sistema enzimático de los citocromos P450 (P450s). La Fase II del MX consiste de la conjugación con aminoácidos (ácido glutámico o glutatión) de los metabolitos generados en la primera Fase catalizada fundamentalmente por las glutatión transferasas para facilitar su transporte y eliminación (Rodríguez-Arnaiz, 2004). Cuadro 4.

Cuadro 4. Algunas reacciones en las diferentes fases del metabolismo xenobiótico.

Reacción	Enzima	Sustrato
Fase I Funcionalización		
Oxidación	(P450s)	Alcanos, alquenos, aminas
Oxidación	Alcohol deshidrogenasa	Alcoholes
Reducción	P450s	Grupos azo y nitro
Hidrólisis	Esterasas	Ésteres
Fase II Conjugación con:		
Agua	Epóxido-hidrolasa	Époxidos
Glutación	Glutación-transferasa	Electrofílicos
Ácido glucorónico	Glucoronil-transferasa	Fenoles, tioles, aminas
Ácido acético (Acetil-CoA)	N-acetiltransferasas	Aminas

5. Citocromos P450 (P450s)

Tanto en la desintoxicación como en la activación, la hidroxilación depende del sistema P450s (Sistema de Monooxigenasa o Sistema de Oxidasa de Función Mixta), porque en estas enzimas un átomo de una molécula de oxígeno es reducido a agua y el otro es usado para oxidar al sustrato (Rockstein, 1978; Haugen, 1981; Frank y Fogleman, 1992; Boucher *et al.*, 1996); este sistema enzimático está localizado en los microsomas (fracción subcelular) del REL de hepatocitos y otras células. A su vez, cada P450 es un sistema de multicomponentes ligado a membrana, según descubrieron Omura y Sato (1964), el cual involucra al menos a dos proteínas:

1. P450 (hemoproteína que se caracteriza por tener una absorbancia de cerca de 450 nm después de la reducción con CO).
2. NADPH-citocromo P450 reductasa, así como oxígeno molecular y NADPH (Vogel, 1991; Frank y Fogleman, 1992; Gandhi *et al.*, 1992; Fuchs *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1992).

Los P450s metabolizan compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos, aminos biogénicas, prostaglandinas y vitaminas, así como xenobióticos tales como los metabolitos de la dieta, drogas, pesticidas o contaminantes ambientales (González *et al.*, 1991), metabolitos de plantas y cancerígenos (Gandhi *et al.*, 1992), además de conferir resistencia a insecticidas en insectos (Cariño *et al.*, 1992). Estos sustratos son enzimáticamente modificados por una de las siguientes reacciones: hidroxilación alifática, hidroxilaciones aromáticas, alqueno epoxidaciones, O-dialquilaciones; N-hidroxilaciones, N-desalquilaciones o deshalogenación oxidante (Rockstein, 1978).

Como hemoproteínas, los P450s ligan el Fe^{2+} del grupo hemo por puentes de tiolato (uniones cisteína-cisteína mediante sus grupos tiol o sulfhidrilo -SH) presentes en un dominio cisteinil de 26 residuos muy conservados cerca del carboxil terminal (Hobbs *et al.*, 1986; González y Gelboin, 1992) (Figura 5).

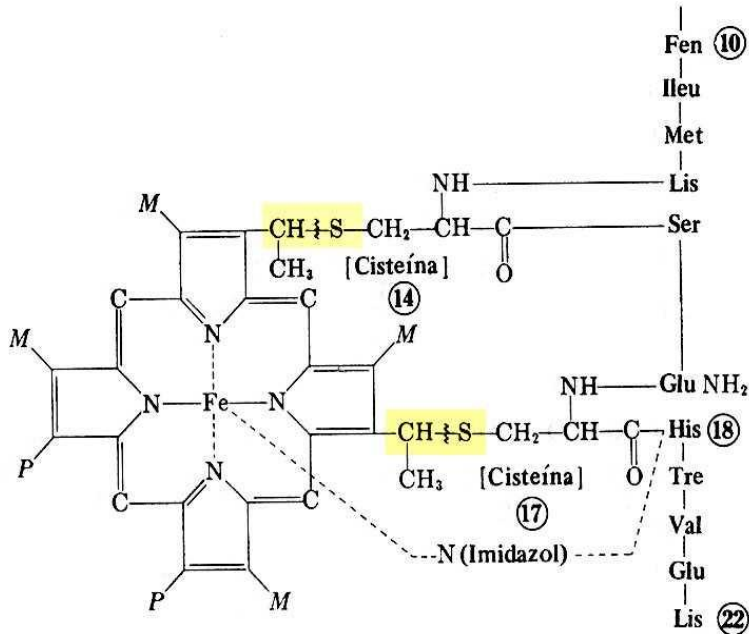


Figura 5. Citocromo P450 y su grupo hemo por puentes tiol (-SH) de cisteína (tomado de Burke, 1971).

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 P450 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 P450s 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 P450-ferroso-sustrato es mediada por la NADPH-P450 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 P450 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 b₅ 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 P450s férrico.
- 7) Disociación del complejo P450s-sustrato: la enzima regresa a su estado inicial con la liberación del producto (Figura 5.1).

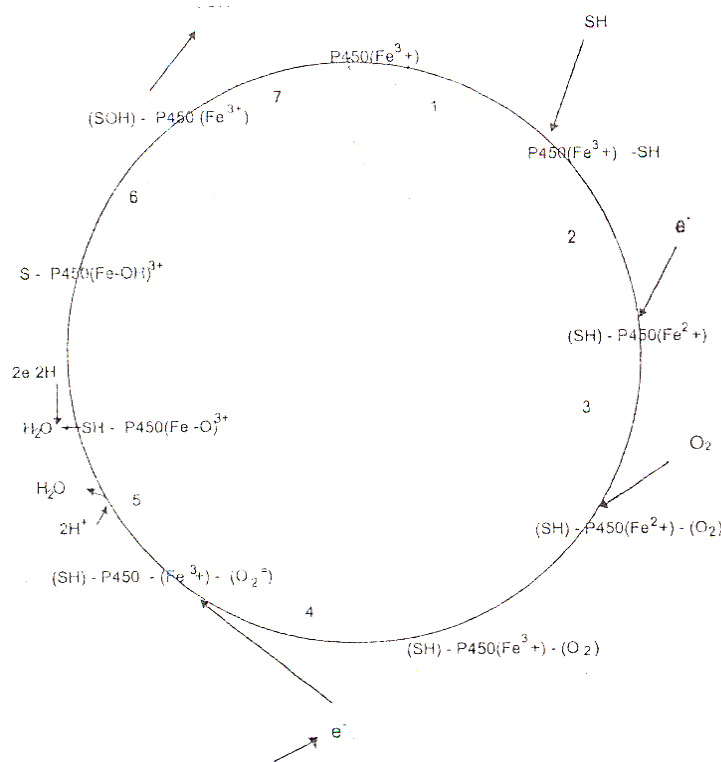


Figura 5.1. Ciclo catalítico mediado por los P450s (Tomado de Rodríguez-Arnáiz, 2004).

6. Actividades de los P450s

El sistema P450s 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 P450s 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.

7. Localización y Regulación de los P450s

En eucariontes los P450s se encuentran orientados hacia el interior del retículo endoplásmico liso (REL) así como en las mitocondrias (Rodríguez-Arnáiz, 2004).

En los insectos, los P450s 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 vegetales y de productos químicos sintéticos como los insecticidas. En larvas los P450s se expresan en el tubo digestivo, en los cuerpos grasos y en el aparato reproductivo, en los adultos en los tubos de Malpighi (Feyereisen, 1999).

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 de la expresión de los P450s aparece como una respuesta adaptativa al estrés ejercido por los agentes xenobióticos. Los fenómenos de inducción e inhibición de los P450s están muy relacionados con la regulación de la expresión génica. Los mecanismos de inducción son el resultado de la activación transcripcional, postranscripcional y postraducciona l ejercida por diversos agentes químicos (Rodríguez-Arnáiz, 2004).

8. P450s en *Drosophila melanogaster*

La secuencia de 120 Mb del genoma de *D. melanogaster* ha revelado la presencia de aproximadamente 13,600 genes, algunos de los cuales son miembros de grandes superfamilias, como receptores transmembranales, proteinquinas, peptidasas, etc. (Adams *et al.*, 2000). La superfamilia citocromo P450s está integrada por 84-94 miembros en *D. melanogaster* (Adams *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2000).

Las proteínas P450s son nombradas con base en la identidad de su secuencia de aminoácidos con otros P450s. El sistema de nomenclatura introducido originalmente por Nebert *et al.*, (1987), propone que los miembros de una familia presentan identidad >40% en la secuencia de aminoácidos y que los miembros de una subfamilia tienen de identidad >55% (Nelson *et al.*, 1996). El prefijo CYP es usado para designar a un P450, seguido por un número característico de la familia, una letra para designar a la subfamilia y un número para el gen individual. Los genes P450 se describen en itálicas, mientras que el mRNA, el cDNA y las enzimas con mayúsculas, (ejemplo: gen *Cyp4c3* y proteína CYP4C3 en *D. melanogaster*). Este sistema de nomenclatura diferencia a los P450s con base en la similitud de sus secuencias y no tiene correlación con sus especificidades enzimáticas o con la evolución de sus familias: para relacionar los P450s de diferentes familias con base en sus propiedades, sin considerar el grado de similitud en sus secuencias se ha propuesto un sistema de clasificación en clanes. Muchos P450s agrupados en clanes fueron descritos por la especificidad de sus sustratos, divergencia evolutiva, tejido o localización subcelular, etc; por ejemplo, todos los P450s expresados en la mitocondria pueden ser agrupados dentro de un mismo clan. Este sistema de clasificación podría ayudarnos a comprender los roles generales de los P450s, principalmente porque el número actual de P450s se incrementa rápidamente, haciendo cada vez más difícil su estudio. En el Cuadro 8, se muestran a los P450s agrupados en clanes, resultando interesante que la familia CYP3 de mamíferos y CYP6 de insectos se encuentran dentro del mismo clan. Este hallazgo nos permitiría extrapolar, con reservas, los resultados de los análisis de expresión génica basados en el modelo de *D. melanogaster* hacia mamíferos como el humano.

Cuadro 8. P450s agrupados en clanes.

Nombre del clan	Familias miembros del clan
CYP2	CYP1, CYP2, CYP17, CYP18, CYP21
CYP3	CYP3, CYP5, CYP6, CYP9, CYP30
CYP4	CYP4, CYP29, CYP31, CYP32, CYP37
CYP7	CYP7, CYP8
Mitocondrial	CYP10, CYP11, CYP12, CYP24, CYP27, CYP44
<i>C. elegans</i>	CYP14, CYP23, CYP33, CYP34, CYP35, CYP36

Tomado de Plant., 2003

9. Fenobarbital (FB)

El fenobarbital (FB) es un barbitúrico lipofílico de origen sintético y corresponde químicamente a la clase de los ureidos cíclicos (Figura 9). En medicina se usa como sedante y anticonvulsivo. Hace más de 35 años se reportó por primera vez que el FB incrementa la capacidad metabólica de los hepatocitos (Zelko y Negishi, 2000). Induce la proliferación del REL, la síntesis y la actividad de enzimas que metabolizan otras drogas disminuyendo su actividad farmacológica en forma manifiesta (Beckman, 1984). La eliminación de drogas barbitúricas es estimulada por enzimas de hidroxilación asociadas con el REL, lo cual puede ser demostrado inyectando el sedante FB a una rata. Uno de los efectos más sorprendentes es el rápido aumento en el nivel de enzimas desintoxicantes de barbitúricos en el hígado, acompañado por una dramática proliferación del REL (Becker *et al.*, 2000). Hoy día se sabe que el FB activa numerosos genes que codifican enzimas metabolizadoras de xenobióticos, como los P450s (Fase I del metabolismo) (Zelko y Negishi, 2000) y transferasas (Fase II del metabolismo) (Nims *et al.*, 1997). De hecho, el FB mismo es metabolizado, mediante hidroxilación por los P450s (Tredger *et al.*, 2002).

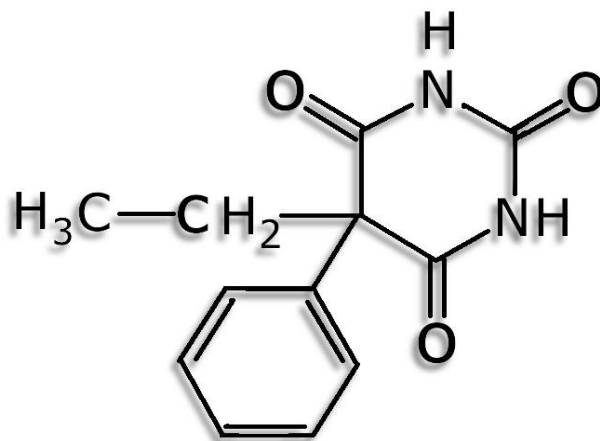


Figura 9. Molécula de fenobarbital (FB)
(Tomado de Graf y Singer, 1992).

9.1. FB como inductor de enzimas metabolizadoras de xenobióticos: P450s

El FB es un potente inductor de enzimas P450s y REL; después de la inducción con FB hasta $\frac{2}{3}$ o incluso $\frac{3}{4}$ del total de los fosfolípidos hepáticos se localizan en el retículo liso junto con los P450s ligados a su membrana (DePierre y Ernster, 1980). Por lo tanto, el FB ha sido utilizado en experimentos para dilucidar las características y propiedades (estructura, actividad enzimática, etc.) de los P450s. También ha sido eficaz en el estudio del metabolismo y farmacocinética de diferentes sustancias como: nicotina, lidocaína, colesterol y sus metabolitos, clonazepan y diazepam (anticonvulsivos de benzodiazepina), perfiles de regulación de la expresión génica mediante microarreglos (Hamadeh *et al.*, 2002) y con la técnica de "RT-PCR" de acuerdo con Pan *et al.*, 2000. También, la inhibición e inducción de actividad enzimática de diversas vías metabólicas, activación de promutágenos y cancerígenos, ensayos de toxicidad de supuestos agentes genotóxicos (incluido el FB), análisis de secuencia de genes de *P450s*, y estudio de receptores nucleares. Por otro lado, Hällström *et al.* (1982) probaron la efecto del FB en la expresión de los citocromos P450 en la cepa resistente a insecticida Hikone-R de *D. melanogaster* (que tiene una actividad de P450s alta) y en cepas susceptibles, utilizando el promutágeno DMN. Sus resultados muestran que:

- a). El efecto de DMN fue mayor en la cepa resistente que en las susceptibles
- b). la inducción con FB aumentó la toxicidad de DMN en las cepas susceptibles pero no en la cepa resistente.

De la misma manera, Graf y Singer (1992) utilizando el ensayo SMART en ala de *D. melanogaster*, demostraron que la actividad de ciertos promutágenos se incrementa de dos a cuatro veces cuando se usa la craza de bioactivación elevada (hembras Oregon-*flare* y machos *mwh*) o cuando las larvas son pretratadas por 24 h con FB a 10 y 20 mM. Sin embargo, este tratamiento experimental con FB en la craza estándar (hembras *flare* y machos *mwh*) arrojó resultados indecisos sobre la genotoxicidad del FB. De la misma manera, Castañeda (2002) valoró en larvas de 48 h de *D. melanogaster* el efecto genotóxico del FB, demostrando que éste no sólo es un inductor de la expresión de los genes involucrados en el metabolismo xenobiótico, sino que también confirmó su efecto genotóxico.

9.2. Inducción de los P450s en líneas de *Drosophila melanogaster* por FB

La línea Oregon *flare* fue construida por Frölich y Würigler en 1989 y presenta los cromosomas 1 y 2 de la línea Oregon R(R) resistente al DDT. El cromosoma 2 acarrea la mutación dominante Rst(2)DDT, localizada en la región 43E,(2-65) y se cree que provoca la expresión constitutiva de una proteína CYP6G1 que es inductora de los genes *Cyp6a8* y *Cyp6a9* en el cromosoma 1 y *Cyp6a2* en el cromosoma 2 (Dueñas 2002). Esta mutación es reportada en *FlyBase* como sinónimo de *Cyp6g1* la cual aparentemente se ha reportado no solo en líneas resistentes de laboratorio sino también en líneas silvestres (Daborn *et al.*, 2002).

La extensa literatura sobre genes *P450s* en *D. melanogaster* sugiere que un gran número de citocromos de este tipo están involucrados en conferir resistencia a insecticidas, (French *et al.*, 2004; Bogwitz *et al.*, 2005); sin embargo, un número de genes *P450s* diferentes son capaces de conferir resistencia en selecciones hechas en laboratorio (Festucci *et al.*, 2005; Pedra *et al.*, 2004). Recientes estudios con cepas colectas muestran que un solo gen *Cyp6g1* está siempre con un alto nivel de transcripción en cepas de *D. melanogaster* resistentes al DDT (Daborn *et al.*, 2002). Estudios recientes de microarreglos en diferentes cepas de *D. melanogaster*, sometidas a diferentes regímenes de selección en laboratorio, demostraron que la sobretranscripción de una gran variedad de genes *P450s* puede ser derivada de aplicaciones repetidas de DDT (LeGoff *et al.*, 2003). Este gen relacionado con cepas resistentes a DDT no solo confiere esta resistencia, sino a una amplia gama de agentes como neonicotinoides, reguladores del crecimiento, insecticidas carbamato y organofosforados entre otros (Daborn *et al.*, 2001; Pyke *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2006). Todas estas cepas acarrean la inserción de un elemento móvil *Accord* (transposon TE) en el extremo terminal 5' del gen *Cyp6g1*. Debido a que el mecanismo exacto por el cual la inserción *Accord* (TE) regula la transcripción de *Cyp6g1* aún no ha sido descrito, quedando aún varias preguntas sin contestar por ejemplo: ¿cuándo es normalmente transcrito *Cyp6g1*? ¿Cuáles son los patrones de expresión asociados con la resistencia? ¿Cómo es que el TE *Accord* causa una sobretranscripción de *Cyp6g1*? ¿Cuál es el rol normal de CYP6G1 en *D. melanogaster*?, entre otras.

Muchas enzimas P450s son conocidas por ser esenciales en la protección de organismos en contra de xenobióticos. En insectos la participación de enzimas P450s en la resistencia a insecticidas o toxinas de plantas ya ha sido demostrada (Daborn *et al.*, 2002; Brandt *et al.*, 2002; Scott y Wen, 2001; Wilson, 2001; Feyereisen, 1999; Berge *et al.*, 1998., Scott *et al.*, 1998), no obstante altos niveles de resistencia aún no han sido explicados. Hasta la fecha solo tres enzimas P450s asociadas a resistencia han mostrado ser capaces de metabolizar insecticidas, CYP6A1 (Andersen *et al.*, 1994; Andersen *et al.*, 1997; Sabourault *et al.*, 2001), CYP12A1 (Guzov *et al.*, 1998) y CYP6A2, esta última ha mostrado metabolizar insecticidas ciclodinos y organofosforados, pero no ha sido claramente demostrado que sea capaz de metabolizar el DDT (ffrench *et al.*, 2004).

El locus de *Cyp6a2* de *Drosophila* está localizado en el brazo derecho del cromosoma 2 en la posición 43A1-2 Dunkov *et al.* (1996, 1997) describen que tratamientos con FB llevan a un rápido aumento en el nivel de mRNA de *Cyp6a2* y a una producción alta de la proteína CYP6A2. Por otro lado, Maitra *et al.*, 1996 demostraron que la expresión de *Cyp6a2* es más alta en la cepa resistente a DDT (91-R) que en la susceptible (91-C) de *D. melanogaster*. Existen diferentes sustancias que inducen a los genes de la familia CYP6 en *D. melanogaster*, y sólo esta familia CYP6 (inducida por FB) ha sido ampliamente caracterizada en *D. melanogaster* (Amichot *et al.*, 1998; Saner *et al.*, 1996).

10. Sulforafano

El sulforafano [*(R)*-1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)butane] (SF) es un isotiocianato (ITC) derivado del brócoli (*Brassica oleracea* var. itálica), que Zhang y sus colaboradores, de la Universidad John Hopkins, Baltimore, en Estados Unidos, aislaron en el año de 1992 y ha ganado mucha atención como un agente potencial quimiopreventivo contra el cáncer (Zhang *et al.*, 1992).

El SF, liberado de su precursor el glucorafanin (GRP) por hidrólisis con la mirosinasa (tioglucósido hidrolasa [EC 3:2:3:1]) (Figura 10), induce la Fase II del MX involucrado en la desintoxicación de muchos cancerígenos y de especies reactivas de oxígeno (ROS), protegiendo contra el daño en el DNA (Paolini *et al.*, 2004). Además de sus ventajas conocidas, el efecto anticancerígeno se debe también a que inhibe la Fase I del MX (Talalay y Fahey, 2001; Conaway *et al.*, 2002; Hecht, 2005).

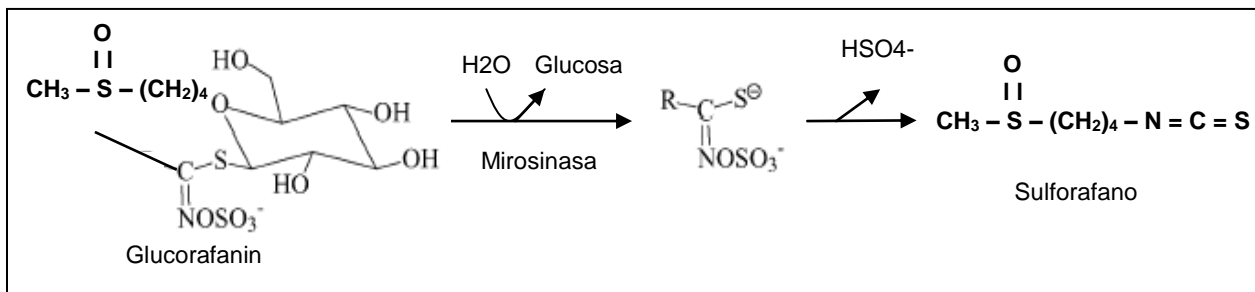


Figura 10. La conversión de glucorafanin a sulforafano por hidrólisis mediante la mirosinasa (modificado de Zhang, 2004)

El SF reduce la incidencia y la propagación del cáncer en ratas (Jackson y Singletary, 2004), protege a las células epiteliales del pigmento retinal en humanos (Gao y Talalay, 2004) y tiene efecto antioxidante en las células del músculo liso en ratas (Fahey *et al.*, 1997). Jackson y Singletary (2004), demostraron que induce la Fase II del MX, la detención del ciclo celular y la apoptosis en células de cáncer de colon, además inhibe tumores mamarios provocados químicamente en ratas. Singh *et al.*, (2004) demostraron que el SF induce apoptosis en células humanas cultivadas de cáncer de próstata, reflejando una reducción de 50% en el volumen del tumor. También detiene la progresión del ciclo celular y quizá afecta otras funciones celulares,

entre las cuales destaca la de ser un potente inductor de la proteína Nrf2, que es un factor de transcripción con dominio de cierre de leucina que regula la activación de un gen maestro denominado ARE/EpRE (Jong *et al.*, 2005).

Los efectos protectores de los vegetales crucíferos, pueden estar dados por el genotipo GSTM1. Estudios epidemiológicos que asocian el consumo de brócoli con menor riesgo de cáncer han concluido que individuos con uno o dos alelos GSTM1 y al menos uno sin delección, tienen una mayor protección contra el cáncer en comparación con los individuos que tienen en los dos alelos la delección en GSTM1 (Joseph *et al.*, 2004; Spitz *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004). Es de notarse que algunos estudios realizados en Asia en donde el consumo de crucíferas es predominante, han reportado lo contrario, es decir que los individuos con delección en dos alelos GSTM1 adquieren mayor protección (London *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001; Fowke *et al.*, 2003).

Las glutatión transferasas son enzimas díméricas, que catalizan la conjugación de glutatión (GSH) con dos xenobióticos, incluyendo ITC's y compuestos endógenos, facilitando su metabolismo y excreción.

Las GST's del citosol son derivadas de al menos 17 subunidades, incluidas en 7 clases: alpha (GSTA1-A5), mu (GSTM1-M5), omega (GSTO1, O2), pi (GSTP1) theta (GSTT1, T2), sigma (GSTS1) y zeta (GSTZ1). Aproximadamente 50% de la población humana, sin importar la raza, tiene una delección en el gen GSTM1 (Joseph *et al.*, 2004; Spitz *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004).

10.1. Brócoli como la mayor fuente de SF

La molécula de glucosinolato comprende dos partes: una parte glicon que no varía y una cadena lateral aglicon, derivada de aminoácidos, que puede variar dependiendo del glucosinolato. Aunque se han descrito alrededor de 120 diferentes estructuras de cadenas laterales, relativamente pocas pueden encontrarse en crucíferas de la dieta (Figura 10.1). Algunos de los

glucosinolatos más frecuentes son el 3-butenil y el 4-pentenil; sus formas hidroxiladas son encontradas predominantemente en repollos chinos y brócoli (*B. rapa* y *B. oleracea*); 3-metilpropil, 3-metilsulfinilpropil, 2-propenil y 4-metilsulfinilbutil en *B. oleracea*, como repollos, coliflor y brócoli. El berro (*Rorippa spp*) es la mayor fuente de feniletil glucosinato.

Mientras todos estos glucosinolatos producen ITC's, las propiedades fisicoquímicas de estos ITC's dependen de las características de sus cadenas laterales. Además de darle propiedades al sabor. La estructura de la cadena lateral también afecta la proporción de GSTM1, mediadoras de la conjugación con el GSH.

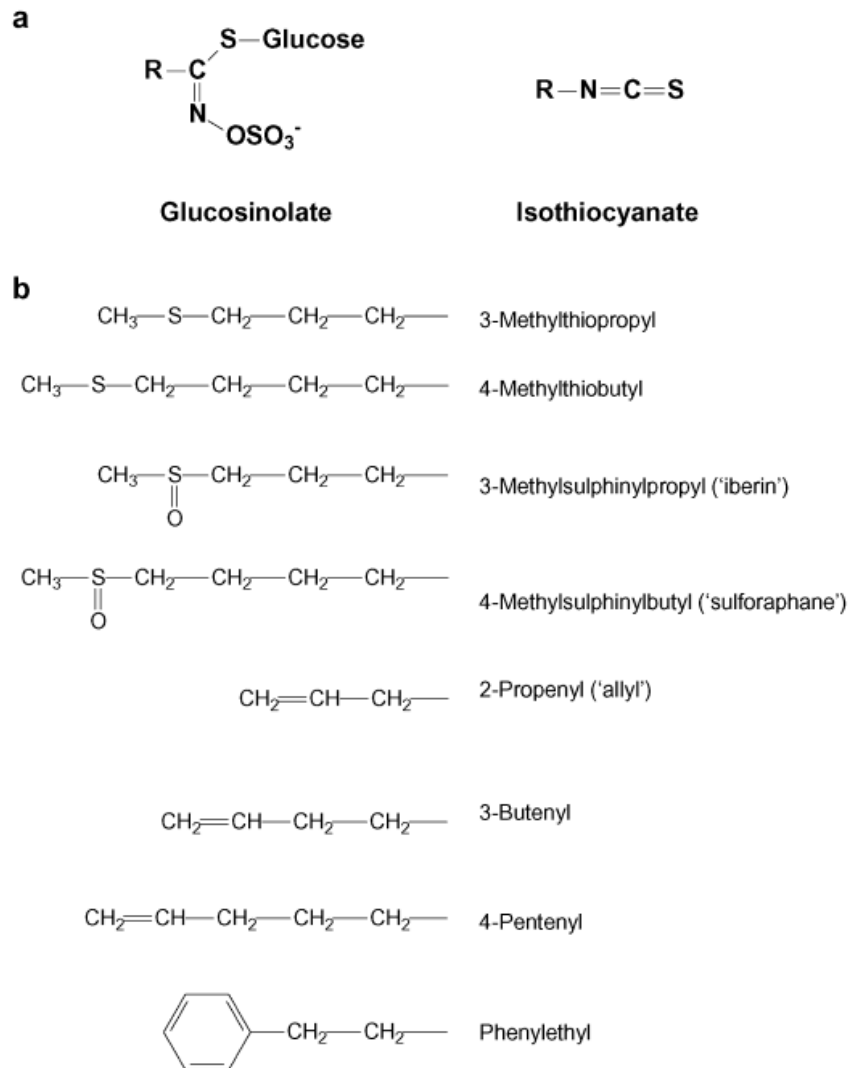


Figura 10.1 (a) Estructura química general de los glucosinolatos e isotiocianatos, donde R representa la cadena lateral variable. (b) ejemplos de algunas estructuras de cadenas laterales (R) de glucosinolatos e isotiocianatos

10.2. Modulación del Metabolismo Xenobiotico Mediado por Sulforafano SF

Virtualmente todos los alimentos y los cancerígenos ambientales son sujetos al Metabolismo Xenobiotico, una vez que éstos entran al cuerpo humano. El proceso enzimático ocurre principalmente a través de la oxidación, así como de una reducción e hidrólisis de menor rango, lo cual hace que las moléculas químicas sean más hidrofílicas. Este evento fisiológico es denominado Fase I del MX y es principalmente catalizado por las P450s. Como una consecuencia los procancerígenos son usualmente transformados en intermediarios altamente reactivos que pueden unirse a moléculas como el DNA, el RNA y las proteínas. Actualmente sólo 57 P450s han sido identificados en humanos, basándose en similitudes en sus secuencias de DNA y algunas funciones proteicas (Nelson *et al.*, 1993).

La Fase I del MX comienza cuando los ligandos se unen con el hidrocarburo aril (Ah) y receptores; estos complejos son transportados hacia el núcleo para unirse con los elementos de respuesta xenobiótica (XRE, del inglés *Xenobiotic Responsive Element*) ubicados río arriba de los genes P450s (Hankinson, 1995).

Las enzimas de la Fase I típicamente catalizan reacciones de oxidación y reducción, que hacen a los cancerígenos más solubles en agua, pero al mismo tiempo son capaces de activar compuestos de especies electrofílicas las cuales pueden dañar al DNA.

Existen datos que demuestran que el SF puede inhibir la formación de aductos en el DNA y carcinogénesis química, a través de la alteración de los niveles de ciertas isoformas de P450s en roedores (Yang *et al.*, 1994; Zhang y Talalay, 1994). Por ejemplo, el SF disminuye las actividades enzimáticas en hepatocitos de ratas asociados con los CYP1A1 y 2B1/2 (Maheo *et al.*, 1997). En hepatocitos humanos tratados con SF la expresión del mRNA así como los niveles de la actividad de CYP1A2 no fueron afectada, sin embargo para CYP3A4, el citocromo de mayor abundancia en el hígado humano, estos parámetros se mostraron fuertemente disminuídos (Maheo *et al.*, 1997). Estas observaciones demuestran que tanto en humanos como en ratas, el SF

puede causar inhibición enzimática de algunos, pero no todos los P450s. Además de la habilidad del SF para inhibir las enzimas de la Fase I, se suma la capacidad de inhibir la formación de aductos en el DNA. Estudios de antimutagénesis *in vitro*, demuestran que el SF es un potente inhibidor de mutagenicidad inducida por las aminas heterocíclicas (HCA's, por sus siglas en inglés) (Shishu y Kaur, 2003). La exposición a HCA's derivadas de carne cocinada han sido implicadas con la etiología de ciertos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de colon, próstata y seno. El total de la ingestión por individuo de 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol (PhIP), una de las aminas más abundantes, puede ser mayor a 10 mg por día (Spitz, 2000; Wang *et al.*, 2004). Tratamientos con SF (1-10 μ M) reducen significativamente los niveles de aductos PhIP-DNA en células HepG2 de humanos (Bacon *et al.*, 2003). El SF también incrementa el nivel de desintoxicación de PhIP en células HepG2 de humanos. Esta protección no fue atribuida a la modulación de los niveles del CYP1A2 porque el SF no reduce los niveles de este citocromo, se sugiere que fue debido a la inducción de enzimas de desintoxicación de la Fase II y la inhibición de la Fase I, sin embargo la correlación entre estos dos mecanismos no siempre se ha demostrado claramente (Figura 10.2).

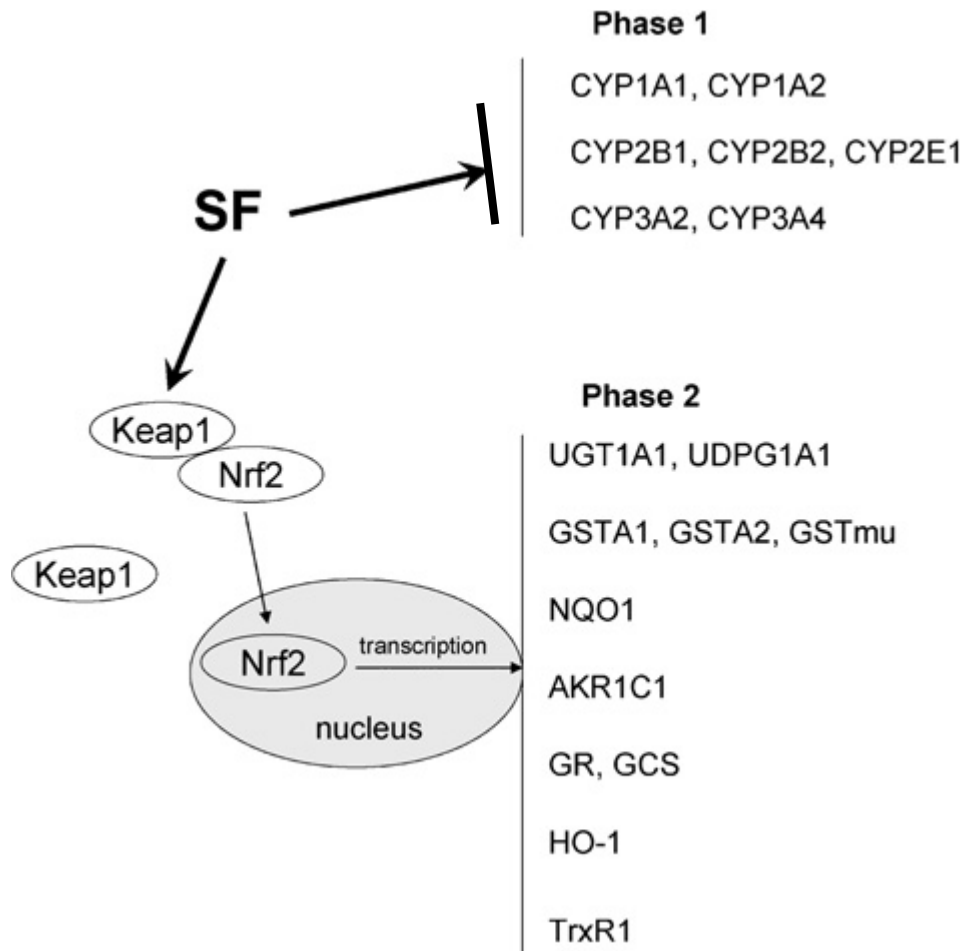


Figura 10.2. Modelo en el que el SF modula los mecanismos quimioprotectores de las células alterando la expresión de enzimas metabolizadoras de la Fase I y II del MX. El SF suprime algunas enzimas de la Fase I y activa enzimas de la Fase II a través del factor de transcripción Nrf2, el cual es responsable de múltiples procesos de desintoxicación relacionados con la respuesta celular antioxidante (modificado de Juge *et al.*, 2007)

fácilmente excretados por el cuerpo, previniendo posibles reacciones con el DNA. Aunque las enzimas de la Fase II han sido tradicionalmente conocidas en su función de catalizar la conjugación de ligandos endógenos, GSH y ácido glucoronico con substratos endo y xenobióticos, esta clasificación es ampliada para incluir proteínas que catalizan una gran variedad de reacciones que confieren citoprotección en contra de la toxicidad de electrófilos y especies reactivas de oxígeno (ROS)

El SF ha recibido mucha atención desde la pasada década cuando fue descubierto por ser el mayor inductor natural de las enzimas de la Fase II del MX en animales y humanos (Talalay., 2000; Zhang *et al.*, 1992; Prochaska *et al* 1992). *In vitro* el SF es un potente inductor de la

quinona reductasa (NAD[P]H: quinona oxidoreductasa NQO1), la glutatión S-transferasa (GST) y la UDP-glucuronosiltransferasa, por mencionar algunas (Figura 10.2).

La modulación de la expresión de los genes involucrados en la Fase II y la actividad enzimática mediada por el SF ha sido determinada en líneas celulares de diferente origen. El más utilizado ha sido en células HepG2 de hepatoma de hígado en humanos y Hepa1c1c7 en ratas, ya que el carcinoma hepatocelular es el tipo más común de cáncer de hígado y la cuarta en causas de muerte a nivel mundial. Por ejemplo, el SF y el GSH conjugados incrementan significativamente los niveles de mRNA de UGT1A1 y GSTA1 en células HepG2 y HT29 (Basten *et al.*, 2002). Cuando fueron expuestas células Hepa1c1c7 a diferentes concentraciones de SF por 24 h, la inducción de NQO1 se triplicó sobre el control con una concentración de SF 25 μ M (Matusheski, y Jeffery, 2001). Se han reportado respuestas dependientes e independientes del tiempo debidas al SF, pero los niveles de inducción y/o tipo de enzima de la Fase II del MX varían con las líneas celulares, como lo menciona un estudio en el cual comparan el efecto del SF 25 μ M sobre la actividad enzimática de GST, NQO1, aldo-cetoreductasa (AKR) y glutatión reductasa (GR), en 7 líneas celulares de mamíferos bien establecidas: HepG2, MCF7, MDA-MB-231, LNCaP, HeLa y HT-29 (Jiang *et al.*, 2003). Dosis no tóxicas de SF causaron un incremento entre 11 y 17 veces en los niveles de la proteína NQO1 (Bonnesen, 2001).

El efecto del SF sobre la modulación de las enzimas de la Fase II del MX, también ha sido extensamente estudiado en cáncer de próstata, donde el SF muestra una inducción significativa en la expresión de las enzimas de la Fase II del MX y un aumento en la actividad de células de próstata en humanos: LNCaP, MDAPCa2a, MDAPCa2b, PC-3 y TSU-Pr1 tratadas con SF 0.1-15 μ M (Brooks *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2003).

El SF es activo no sólo en células cancerígenas, sino también en sus homólogas normales y en líneas celulares no transformadas. Por ejemplo, niveles altos de la proteína NQO1 fueron detectados en la línea celular RL34 de epitelio de rata, cuya respuesta fenotípica al SF refleja lo observado en hígado de roedores (McMahon *et al.*, 2003). El SF también induce la expresión de las isoformas de GSTA1/2 y NQO1 en hepatocitos de ratas (Maheo *et al.*, 1997), los mRNA de las enzimas UDPG1A1 y los GSTA1 en hepatocitos humanos (Bacon *et al.*, 2003). Como otros ITC's ha demostrado ser inductor de la actividad enzimática de la Fase II del MX en células de mamífero *in vitro* y por otro lado se ha encontrado la misma respuesta en la inducción de estas enzimas en tratamientos *in vivo*. En ratas y ratones se administró por 4-5 días altas

concentraciones de SF (arriba de 1000 $\mu\text{mol/kg}$ por día) incrementando la actividad de las enzimas de la Fase II del MX, estos resultados fueron registrados en hígado, pulmón, glándulas mamarias, páncreas, estómago, intestino delgado y colon (Posner *et al.*, 1994; Gerhauser, 1997; Matusheski y Jeffery, 2001; Keck *et al.*, 2002). Estos resultados son evidencia de que una dieta que contenga determinadas dosis de SF puede modular el sistema enzimático del MX, modificando el balance del metabolismo de los carcinogénicos hacia la detoxificación, y este cambio puede ser un importante mecanismo de la actividad quimioprotectora del SF.

10.3. La vía Keap-1-Nrf2

La inducción de las enzimas de la Fase II por moléculas como el SF, involucra a elementos de respuesta a antioxidantes de activación *cis* como lo es [ARE 5'-(G/A)TGA(G/C)nnnGC(G/A)-3'] una región específica de unión al promotor, la cual se encuentra flanqueando la región 5' de los genes de la Fase II del MX y de genes involucrados en mecanismos antioxidantes (Rushmore, 1991). La transcripción de los genes ARE es regulada por lo menos en parte por el factor nuclear (Nrf2, del inglés *Erythroid-derived 2)-like 2*), el cual bajo condiciones normales es secuestrado en el citoplasma por la proteína Keap1 (del inglés, *Kelch-like ECH-associated protein 1*); en células expuestas a inductores tales como estrés oxidativo y ciertos agentes quimioprotectores, se favorece la disociación del complejo Keap1 y Nrf2 permitiendo que Nrf2 entre al núcleo, se una a

AREs y favorezca la transcripción de los genes antioxidantes y desintoxicantes de la Fase II del MX (Figura 10.2) (Jeong *et al.*, 2006). El SF es un inductor potente de la acumulación en el núcleo del factor Nrf2. Además, el SF puede reaccionar con proteínas tiol para formar aductos tionoacil, modificar la relación Nrf2-Keap y la degradación de Nrf2 (Jakubikova *et al.*, 2006). Así, el SF interviene en numerosos procesos celulares que se muestran en el Cuadro 10.3.

Cuadro 10.3. Vías o procesos celulares en los cuales el SF puede intervenir (Juge *et al.*, 2007).

-
-
1. Eliminación de ROS
 2. Inducción de apoptosis
 3. Regulación del ciclo celular
 4. Modificación de histonas
 5. Modulación de la inflamación
 6. Inhibición de la angiogénesis y la metástasis
-

11. Objetivos

Como ya se mencionó, el efecto del FB, no es sólo el de ser inductor de la expresión de los genes involucrados en el metabolismo xenobiótico, sino que también se ha confirmado su efecto genotóxico tanto en insectos como en mamíferos. Por otro lado, se han realizado estudios tanto a nivel genotípico como fenotípico donde demuestran el efecto protector del SF, sin embargo los mecanismos por el cual el SF interviene en procesos celulares de protección no han sido descritos en su totalidad. Dado estas circunstancias queremos incorporar evidencias moleculares que demuestren que el SF modula el Metabolismo Xenobiótico y la forma en que lo hace es inhibiendo algunas isoformas de P450s entre ellas a *Cyp6a2* y *Cyp6g1* para esto se planteó como:

Objetivo general: Diseñar y estandarizar una metodología que nos permita determinar el nivel de inducción o inhibición de los genes *Cyp6a2* y *Cyp6g1* mediante la administración de SF (8.9 mM) y FB (12 mM) éste último como testigo inductor de P450s en larvas de dos cruza Estándar (E) y Bioactivación Elevada (BE) de *D. melanogaster*, diferentes en la expresión de P450s.

Objetivos particulares: Sintetizar cDNA, amplificarlo mediante RT-PCR a fin de comparar los niveles de transcripción con un gen control de expresión constitutiva (actina), mediante PCR semicuantitativo de los genes *Cyp6a2*, *Cyp6g1* de *D. melanogaster*.

12. Hipótesis

- En larvas de la crucea BE los niveles de transcripción para los genes *Cyp6a2* y *Cyp6g1*, se mantendrán constantes independientemente del tratamiento (SF o FB) o la edad (72 - 96h).
- Al tratar larvas de la crucea E con FB, éste inducirá la transcripción de los genes de *Cyp6a2* y de *Cyp6g1*.
- Por otro lado, en larvas de la crucea E tratadas con los testigos solventes los niveles de transcripción de *Cyp6a2* y de *Cyp6g1* se mantendrán basales.

13. Materiales y Métodos

13.1. Bioensayos

i. Mantenimiento de las líneas.

Las líneas utilizadas para los bioensayos fueron *flare* (*flr³/TM3, Bd^s*), Oregon-*flare* (ORR (1); ORR (2); *flr³/TM3, Bd^s*) y *multiple wing hairs* (*mwh/ mwh*). Para el mantenimiento de las mismas se trasvasaron cada 10 días en frascos de vidrio de 250 mL. con 5 g de hojuela de papa y 20 mL de solución conservadora (Dueñas *et al.*, 2001). Asimismo, en este periodo se revisaron marcadores, para cada una de las líneas, con el propósito de mantener las líneas.

ii. Tratamientos en las cruzas

Se aislaron hembras vírgenes para realizar las cruzas E y BE en frascos de vidrio de 250 mL. (Dueñas *et al.*, 2001) por 72 h. La craza E se efectuó con hembras vírgenes *flare* y machos *mwh/ mwh*. La craza BE se efectuó con hembras vírgenes Oregon-*flare* y machos *mwh/mwh*. La colecta de huevos se realizó en frascos de 250 mL estériles a los que se les agregó levadura fresca de uso comercial previamente activada con sacarosa y agua corriente. En este medio se colocaron los organismos de las cruzas, durante 8 h a 25°C y 60% de humedad relativa (HR) y en completa oscuridad. Se sacaron los adultos de los frascos y estos últimos se mantuvieron a 25°C y 60% de HR, hasta completar 72 ± 4 h después de la colecta de huevos.

Una porción del total de larvas de 72 ± 4 h sin tratar (S/T), de ambas cruzas, se congeló inmediatamente con hielo seco como grupo testigo y se guardó a -70 °C; se colocó en partes iguales y por triplicado, en tubos de ensayo con 0.5 g de medio instantáneo para *D. melanogaster* (DIM, Carolina Supply Co) pulverizado e hidratado en 2 mL de los diferentes tratamientos: (1) 2 mL de agua desionizada (testigo H₂O); (2) 2 mL de una solución de FB (12 mM) (CAS-No. 50-06-6) disuelto en agua desionizada (testigo inductor de P450s) (3) 2 mL. de una solución que contenía 5.5 µl de DMSO (CAS-No. 67-85-5), Tween 80 (CAS-No. 9005-65-6) 5% y etanol (CAS-No 64-17-5) al 5% (1:1) que fue la mezcla disolvente [DMSO/Tw80-OH] y (4) 2 mL de

una solución de SF (8.9 mM), (CAS-No.142825-10-3, 99% de pureza) disuelto en la mezcla [DMSO/Tw80-OH] (1:1). Se mantuvieron durante 24 h a 25°C y 60% de HR como se muestra en la figura 13.1. hasta cumplir 96 ± 4 h de vida; transcurrido este lapso se congelaron inmediatamente con hielo seco y se guardaron a -70°C . Se realizaron tres réplicas por tratamiento, las cuales se mezclaron para estandarizar el efecto de la variación individual.

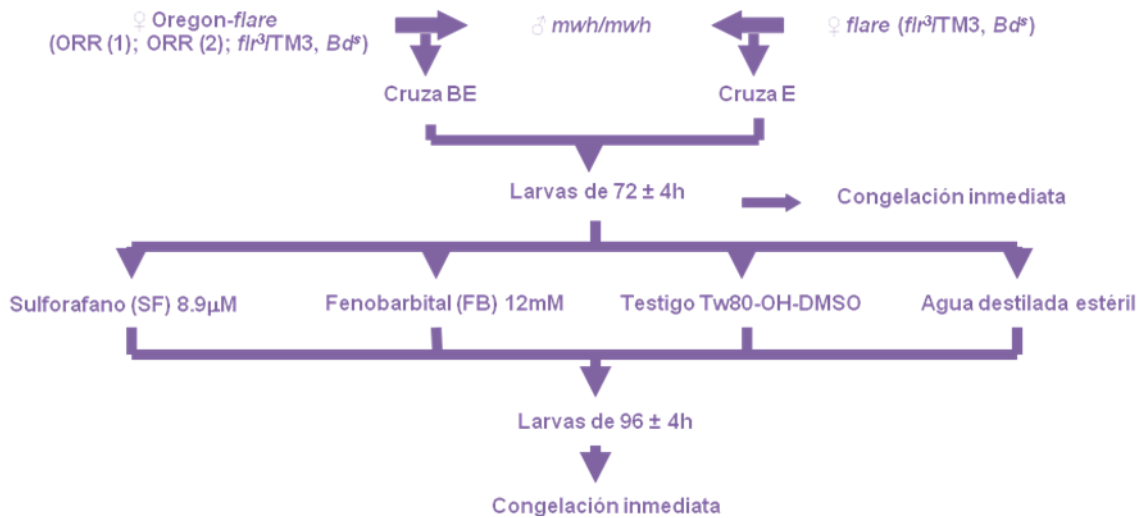


Figura 13.1 Diseño experimental para el tratamiento en cruza

13.2. Diseño de oligonucleótidos

Se buscaron las secuencias para los genes *Cyp6a2*, *Cyp6g1* y *actina* para *D. melanogaster* en el sitio NCBI¹, así como las secuencias homólogas para cada uno de los genes mediante el programa BLAST presente en el sitio NCBI; posteriormente las secuencias con alto grado de identidad se recuperaron en formato FASTA, con las cuales se realizó un alineamiento múltiple, mediante el programa CLUSTAL W², con el propósito de encontrar zonas conservadas y utilizarlas para realizar el diseño de oligonucleótidos para cada una de las secuencias.

13.3. Ensayos moleculares

13.3.1. Prueba de oligonucleotidos

Con el propósito de estandarizar la técnica se procesaron larvas de tercer estadio de *D. melanogaster* Canton^s sin tratamiento alguno. Se les extrajo el RNA total mediante la técnica de Logemann *et al.*, (1987), se sintetizó el cDNA mediante RT-PCR (con *oligos* universales dT GAGA 3' y SMART 5') y reverso transcriptasa *Super Script II* (Invitrogen CAT No.18064-014). Posteriormente el cDNA se amplificó mediante PCR usando los *oligos* específicos previamente diseñados para cada uno de los tres genes. La amplificación se hizo bajo las siguientes condiciones de PCR: a) *actina*: 95°C 5 min., 95°C 40 seg., 58°C 50 seg., 72°C 1.5 min. 72°C 5 min. b) *Cyp6g1*: 95°C 5 min., 95°C 40 seg., 50°C 50 seg., 72°C 1.5 min. 72°C 5 min. c) *Cyp6a2*: 95°C 5 min., 95°C 40 seg., 50°C 50 seg., 72°C 1.5 min. 72°C 5 min. Los ciclos de amplificado para los tres genes fué de 30. Los fragmentos amplificadas fueron purificados y ligados en el plásmido pDrive (QUIAGEN CAT No. 1016790) y con éste se transformaron células de *E. coli* competentes. Posteriormente se realizó la extracción de los plásmidos (mediante *miniprep*) y se realizó la secuenciación con BigDye terminator version 3.1 sequencing kit Part. No. 4336917 y

¹ www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene –

² <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

en el equipo 3100 genetic analyzer de Applied Biosystems en un soporte de polimero DT3100 pop6 con 50cm de longitud³, para asegurar que las secuencias clonadas correspondieran a los genes *Cyp6a2*, *Cyp6g1* y *actina*.

13.3.2. Determinación de niveles de transcripción en cruzas

Se extrajo el RNA total, mediante el Quit TRIZol (Invitrogen, CAT No. 15596-018), se sintetizó y se amplificó el cDNA total mediante RT-PCR con oligos específicos diseñados para cada uno de los genes de interés. Los cDNA resultantes se amplificaron mediante PCR semicuantitativo con el objeto de determinar los niveles de transcripción de los genes *Cyp6a2*, *Cyp6g1* comparándolos con un gen de expresión constitutiva en este caso fué *actina*. Este procedimiento se realizó para cada uno de los genes de interés en cada una de las muestras de larvas de las dos cruzas con los diferentes tratamientos.

³ M. en C. Alejandro Monzalvo Reyes, Biología Molecular, UBIPRO. FES-I.

14. Resultados

En este trabajo se planteó diseñar una metodología que nos permitiera mostrar las relaciones que tienen los agentes xenobióticos con la expresión del material genético, en este caso se trabajó con un compuesto natural presente en vegetales de consumo humano al que se le atribuyen efectos de quimioprotección en contra del cáncer, se plantea que la manera en que este compuesto protege es actuando a nivel de la regulación génica, inhibiendo la transcripción de algunas enzimas y favoreciendo la transcripción de otras. La metodología diseñada para este fin arrojó los siguientes resultados:

En la Figura 14 se muestra el resultado del alineamiento múltiple mediante el programa CLUSTAL W para el gen *Cyp6a2*, se muestra la manera en que se utilizan las zonas con alto nivel de identidad dentro de las secuencias utilizadas para el alineamiento, una vez localizadas estas zonas se procede a realizar el diseño de los oligonucleótidos tanto Forward (5' ó F) como Reverse (3' ó R) sobre estas zonas. Así mismo se puede observar la secuencia completa de nuestro fragmento que consta de 690pb. De esta manera se realizó el diseño de los oligonucleótidos para el resto de los genes de interés, en cuadro 14 se presenta el diseño de los *oligonucleótidos* para cada uno de los genes con su respectiva temperatura media de fusión (Tm) y tamaño de fragmento.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

AAB36782      -----TACGCAAAATGTTTGTCTAATATACCTGTTGATCGCGATCTCC 44
U78088       -----TACGCAAAATGTTTGTCTAATATACCTGTTGATCGCGATCTCC 44
M88009       GCGAAACGGGAGCAGCTACGCAAAATGTTTGTCTAATATACCTGTTGATCGCGATCTCC 180
S51248       GCGAAACGGGAGCAGCTACGCAAAATGTTTGTCTAATATACCTGTTGATCGCGATCTCC 76
NM_078904    -CGAAAAGGGAGCAGCTACGCAAAATGTTTGTCTAATATACCTGTTGATCGCGATCTCC 59
BT015971     GCGAAAAGGGAGCAGCTACGCAAAATGTTTGTCTAATATACCTGTTGATCGCGATCTCC 95
AY397730     -----ATGTTTGTCTAATATACCTGTTGATCGCGATCTCC 36
AY489265     GCGAATCGGGAGGAGCTACGCAAAATGTTTGTCTAATATACCTGTTGATCGCGATCTCC 71
                ***** * *****

                F ----->

AAB36782      TCGCTTTTGGCCTACTTGTACCACCGCAACTCAACTACTGGAATCGCCGCGGCGTGCCA 104
U78088       TCGCTTTTGGCCTACTTGTACCACCGCAACTCAACTACTGGAATCGCCGCGGCGTGCCA 104
M88009       TCGCTTTTGGCCTACTTGTACCACCGCAACTCAACTACTGGAATCGCCGCGGCGTGCCA 240
S51248       TCGCTTTTGGCCTACTTGTACCACCGCAACTCAACTACTGGAATCGCCGCGGCGTGCCA 136
NM_078904    TCGCTTTTGGCCTACTTGTACCACCGCAACTCAACTACTGGAATCGCCGCGGCGTGCCA 119
BT015971     TCGCTTTTGGCCTACTTGTACCACCGCAACTCAACTACTGGAATCGCCGCGGCGTGCCA 155
AY397730     TCGCTTTTGGCCTACTTGTACCACCGCAACTCAACTACTGGAATCGCCGCGGCGTGCCA 96
AY489265     TCGCTTTTGGCCTACTTGTACCACCGCAACTCAACTACTGGAATCGCCGCGGAGTGCCC 131
                ***** * *****

AAB36782      CACGATGCTCCTCACCCACTGTATGGCAACATGGTCGGGTTCCGGAAGAACCGGGTGATG 164
U78088       CACGATGCTCCTCACCCACTGTATGGCAACATGGTCGGGTTCCGGAAGAACCGGGTGATG 164
M88009       CACGATGCTCCTCACCCACTGTATGGCAACATGGTCGGGTTCCGGAAGAACCGGGTGATG 300

```

S51248 CACGATGCTCCTCACCCACTGTATGGCAACATGGTCGGGTCCGGAAGAACCGGGTGATG 196
NM_078904 CACGATGCTCCTCACCCACTGTATGGCAACATGGTCGGGTCCGGAAGAACCGGGTGATG 179
BT015971 CACGATGCTCCTCACCCACTGTATGGCAACATGGTCGGGTCCGGAAGAACCGGGTGATG 215
AY397730 CACGATGCTCCTCACCCACTGTATGGCAACATGGTCGGGTCCGGAAGAACCGGGTGATG 156
AY489265 CACGATGCTCCGACCCACTGTATGGCAACATGGTCGGGTCCGGAAGTACCGGGTGATG 191

AAB36782 CACGACTTCTTCTACGACTACTACAACAAGTACCGGAAGAGCGGCTTCCCTTCGTGGGC 224
U78088 CACGACTTCTTCTACGACTACTACAACAAGTACCGGAAGAGCGGCTTCCCTTCGTGGGC 224
M88009 CACGACTTCTTCTACGACTACTACAACAAGTACCGGAAGAGCGGCTTCCCTTCGTGGGC 360
S51248 CACGACTTCTTCTACGACTACTACAACAAGTACCGGAAGAGCGGCTTCCCTTCGTGGGC 256
NM_078904 CACGACTTCTTCTACGACTACTACAACAAGTACCGGAAGAGCGGCTTCCCTTCGTGGGC 239
BT015971 CACGACTTCTTCTACGACTACTACAACAAGTACCGGAAGAGCGGCTTCCCTTCGTGGGC 275
AY397730 CACGACTTCTTCTACGACTACTACAACAAGTACCGGAAGAGCGGCTTCCCTTCGTGGGC 216
AY489265 CACGACTTCTTCTACGACTACTACAACAAGTACCGGAAGAGCGGCTACCCCTTCGTGGGC 251

AAB36782 TTTTACTTTCTGCACAAGCCGGCCGCCTTCATCGTGGACACCCAGCTGGCCAAGAATC 284
U78088 TTTTACTTTCTGCACAAGCCGGCCGCCTTCATCGTGGACACCCAGCTGGCCAAGAATC 284
M88009 TTTTACTTTCTGCACAAGCCGGCCGCCTTCATCGTGGACACCCAGCTGGCCAAGAATC 420
S51248 TTTTACTTTCTGCACAAGCCGGCCGCCTTCATCGTGGACACCCAGCTGGCCAAGAATC 316
NM_078904 TTTTACTTTCTGCACAAGCCGGCCGCCTTCATCGTGGACACCCAGCTGGCCAAGAATC 299
BT015971 TTTTACTTTCTGCACAAGCCGGCCGCCTTCATCGTGGACACCCAGCTGGCCAAGAATC 335
AY397730 TTTTACTTTCTGCACAAGCCGGCCGCCTTCATCGTGGACACCCAGCTGGCCAAGAATC 276
AY489265 TTTTACTTTCTGCACAAGCCGGCCGCCTTCATCGTGGACACTCAGCTGGCCAAGAATC 311

AAB36782 CTGATCAAGGATTTCTCGAATTTGCCGATCGTGGCCAGTTTCACAACGGGCGCGACGAC 344
U78088 CTGATCAAGGATTTCTCGAATTTGCCGATCGTGGCCAGTTTCACAACGGGCGCGACGAC 344
M88009 CTGATCAAGGATTTCTCGAATTTGCCGATCGTGGCCAGTTTCACAACGGGCGCGACGAC 480
S51248 CTGATCAAGGATTTCTCGAATTTGCCGATCGTGGCCAGTTTCACAACGGGCGCGACGAC 376
NM_078904 CTGATCAAGGATTTCTCGAATTTGCCGATCGTGGCCAGTTTCACAACGGGCGCGACGAC 359
BT015971 CTGATCAAGGATTTCTCGAATTTGCCGATCGTGGCCAGTTTCACAACGGGCGCGACGAC 395
AY397730 CTGATCAAGGATTTCTCGAATTTGCCGATCGTGGCCAGTTTCACAACGGGCGCGACGAC 336
AY489265 CTGATCAAGGACTTCTCCAACCTTCGCCGATCGCGGCCAGTTCCACAACGGGCGGAGACGAT 371

AAB36782 CCGCTCACGCAGCACCTGTTCAACCTGGACGAAAGAAGTGAAGGACATGCGCCAGAGG 404
U78088 CCGCTCACGCAGCACCTGTTCAACCTGGACGAAAGAAGTGAAGGACATGCGCCAGAGG 404
M88009 CCGCTCACGCAGCACCTGTTCAACCTGGACGAAAGAAGTGAAGGACATGCGCCAGAGG 540
S51248 CCGCTCACGCAGCACCTGTTCAACCTGGACGAAAGAAGTGAAGGACATGCGCCAGAGG 436
NM_078904 CCGCTCACGCAGCACCTGTTCAACCTGGACGAAAGAAGTGAAGGACATGCGCCAGAGG 419
BT015971 CCGCTCACGCAGCACCTGTTCAACCTGGACGAAAGAAGTGAAGGACATGCGCCAGAGG 455
AY397730 CCGCTCACGCAGCACCTGTTCAACCTGGACGAAAGAAGTGAAGGACATGCGCCAGAGG 396
AY489265 CCGCTCACGCAGCACCTGTTCAACCTGGACGAAAGAAGTGAAGGACATGCGCCAGGCG 431

AAB36782 CTGACGCCGACTTTCACCTCGGGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTGATCAAGGTG 464
U78088 CTGACGCCGACTTTCACCTCGGGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTGATCAAGGTG 464
M88009 CTGACGCCGACTTTCACCTCGGGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTGATCAAGGTG 600
S51248 CTGACGCCGACTTTCACCTCGGGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTGATCAAGGTG 496
NM_078904 CTGACGCCGACTTTCACCTCGGGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTGATCAAGGTG 479
BT015971 CTGACGCCGACTTTCACCTCGGGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTGATCAAGGTG 515
AY397730 CTGACGCCGACTTTCACCTCGGGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTGATCAAGGTG 456
AY489265 CTGACGCCACGTTTCACCTCGGGCAAGATGAAGTTCATGTTCCCGACGGTGATCAAGGTG 491

AAB36782 TCTGAGGAGTTCGTCAAGGTGATCACGGAGCAGGTGCCCGCCGCCAGAACGGCGCTGTG 524
U78088 TCTGAGGAGTTCGTCAAGGTGATCACGGAGCAGGTGCCCGCCGCCAGAACGGCGCTGTG 524
M88009 TCCGAGGAGTTCGTCAAGGTGATCACGGAGCAGGTGCCCGCCGCCAGAACGGCGCTGTG 660
S51248 TCCGAGGAGTTCGTCAAGGTGATCACGGAGCAGGTGCCCGCCGCCAGAACGGCGCTGTG 556
NM_078904 TCTGAGGAGTTCGTCAAGGTGATCACGGAGCAGGTGCCCGCCGCCAGAACGGCGCTGTG 539
BT015971 TCTGAGGAGTTCGTCAAGGTGATCACGGAGCAGGTGCCCGCCGCCAGAACGGCGCTGTG 575
AY397730 TCCGAGGAGTTCGTCAAGGTGATCACGGAGCAGGTGCCCGCCGCCAGAACGGCGCTGTG 516
AY489265 TCCGAGGAGTTCGTCAAGGTGATCACGGAGCAGGTGCCCGCCGCCAGAACGGAGCTGTG 551
** *****

AAB36782 CTCGAGATCAAGGAGCTGATGGCCAGGTTACCACCGATGTGATTGGCACCTGTCGCTTC 584
U78088 CTCGAGATCAAGGAGCTGATGGCCAGGTTACCACCGATGTGATTGGCACCTGTCGCTTC 584
M88009 CTCGAGATCAAGGAGCTGATGGCCAGGTTACCACCGATGTGATTGGCACCTGTCGCTTC 720
S51248 CTCGAGATCAAGGAGCTGATGGCCAGGTTACCACCGATGTGATTGGCACCTGTCGCTTC 616

```

NM_078904      CTCGAGATCAAGGAGCTGATGGCCAGGTTACCACCGATGTGATTGGCACCTGTGCCTTC 599
BT015971      CTCGAGATCAAGGAGCTGATGGCCAGGTTACCACCGATGTGATTGGCACCTGTGCCTTC 635
AY397730      CTCGAGATCAAGGAGCTGATGGCCAGGTTACCACCGATGTGATTGGCACCTGTGCCTTC 576
AY489265      CTCGAGATCAAGGAGCTGATGGCCAGGTTACCACCGATGTGATTGGCACCTGTGCCTTC 611
*****

AAB36782      GGCATTGAGTGTAAACACGCTGCGCACCCCTGTCAGTGATTTCCGCACCATGGGACAGAAG 644
U78088        GGCATTGAGTGTAAACACGCTGCGCACCCCTGTCAGTGATTTCCGCACCATGGGACAGAAG 644
M88009        GGCATTGAGTGTAAACACGCTGCGCACCCCTGTCAGTGATTTCCGCACCATGGGACAGAAG 780
S51248        GGCATTGAGTGTAAACACGCTGCGCACCCCTGTCAGTGATTTCCGCACCATGGGACAGAAG 676
NM_078904      GGCATTGAGTGTAAACACGCTGCGCACCCCTGTCAGTGATTTCCGCACCATGGGACAGAAG 659
BT015971      GGCATTGAGTGTAAACACGCTGCGCACCCCTGTCAGTGATTTCCGCACCATGGGACAGAAG 695
AY397730      GGCATTGAGTGTAAACACGCTGCGCACCCCTGTCAGTGATTTCCGCACCATGGGACAGAAG 636
AY489265      GGCATTGAGTGTAAACACGCTGCGCACCCCTGTCAGTGATTTCCGCACCATGGGACAGAAG 671
*****

AAB36782      GTGTTACCCGATATGCGCCACGGGAAACTGCTGACCATGTTTCGTGTTTCAGCTTTCCCAAG 704
U78088        GTGTTACCCGATATGCGCCACGGGAAACTGCTGACCATGTTTCGTGTTTCAGCTTTCCCAAG 704
M88009        GTGTTACCCGATATGCGCCACGGGAAACTGCTGACCATGTTTCGTGTTTCAGCTTTCCCAAG 840
S51248        GTGTTACCCGATATGCGCCACGGGAAACTGCTGACCATGTTTCGTGTTTCAGCTTTCCCAAG 736
NM_078904      GTGTTACCCGATATGCGCCACGGGAAACTGCTGACCATGTTTCGTGTTTCAGCTTTCCCAAG 719
BT015971      GTGTTACCCGATATGCGCCACGGGAAACTGCTGACCATGTTTCGTGTTTCAGCTTTCCCAAG 755
AY397730      GTGTTACCCGATATGCGCCACGGGAAACTGCTGACCATGTTTCGTGTTTCAGCTTTCCCAAG 696
AY489265      GTGTTACCCGATATGCGCCACGGGAAACTGCTGACCATGTTTCGTGTTTCAGCTTTCCCAAG 731
*****

                                  ← R
AAB36782      CTGGCCAGCAGGTTGAGAATGCGCATGATGCCCGAGGACGTTCCACCAGTTCTTCATGCGC 764
U78088        CTGGCCAGCAGGTTGAGAATGCGCATGATGCCCGAGGACGTTCCACCAGTTCTTCATGCGC 764
M88009        CTGGCCAGCAGGTTGAGAATGCGCATGATGCCCGAGGACGTTCCACCAGTTCTTCATGCGC 900
S51248        CTGGCCAGCAGGTTGAGAATGCGCATGATGCCCGAGGACGTTCCACCAGTTCTTCATGCGC 796
NM_078904      CTGGCCAGCAGGTTGAGAATGCGCATGATGCCCGAGGACGTTCCACCAGTTCTTCATGCGC 779
BT015971      CTGGCCAGCAGGTTGAGAATGCGCATGATGCCCGAGGACGTTCCACCAGTTCTTCATGCGC 815
AY397730      CTGGCCAGCAGGTTGAGAATGCGCATGATGCCCGAGGACGTTCCACCAGTTCTTCATGCGC 756
AY489265      CTGGCCAGCAGGTTGAGAATGCGCATGATGCCCGAGGACGTTCCACCAGTTCTTCATGCGC 791
*****

```

Figura.14. Alineamiento múltiple (CLUSTAL W) de algunas secuencias reportadas en bancos de información genética del gen *Cyp6a2*.de *D.melanogaster*, se muestran las secuencias utilizadas para el diseño de los oligonucleotidos.

Cebador	Secuencia	Tm °C	Fragmento
<i>Cyp6a2</i> F	ATGTTTGTCTAATATACCTGTTGATC	50	690 pb
<i>Cyp6a2</i> R	CATGAAGAACTGGTGGACGTCCTC		
<i>Cyp6g1</i> F	CAAGATGTTACCTTCACCGTAG	50	724 pb
<i>Cyp6g1</i> R	CCAGATCCGAAGGTTGATATGCCATG		

Cuadro. 14. Diseño de oligonucleótidos y Tm experimental

Actina F

CAGGTCATCACCATTTGGTCAAT

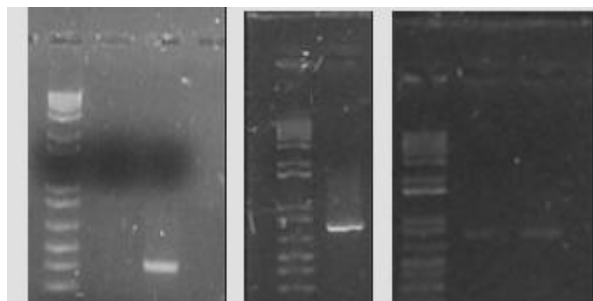
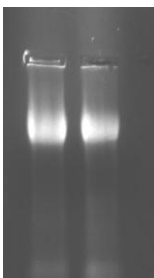
58

420 pb

Actina R

TAGAAGCACTTGCGGTGCACAATGGAG

Un elemento muy importante en la RT-PCR es el RNA debido a que a partir de éste se sintetiza el cDNA que servirá de molde para las amplificaciones, si este no es de buena calidad los resultados en la amplificación mediante PCR pueden ser malinterpretados o erróneos, por tal motivo se procuró que la integridad del RNA fuera la mejor posible, como evidencia de esto se muestra la fotografía de RNA total de larvas de tercer estadio de la línea Canton^S (silvestre) de *D. melanogaster* Figura 14.2, asimismo, se muestran las amplificaciones de cada uno de los fragmentos para genes de interés a partir de DNA genómico (Figura 14.3. a, b, c), allí se puede observar que el tamaño de los amplicones corresponde a los esperados, sin embargo, con el tamaño de los fragmentos no podemos asegurar que los amplicones resultantes corresponden a los esperados, es por esta razón que se procedió a insertar nuestros fragmentos obtenidos a un vector de clonación con el propósito de secuenciar nuestros fragmentos



⇒ 28s.

⇒ 5s.



Figura.14.2 RNA total de *D. melanogaster* Canton^s. Gel desnaturalizante de agarosa 1%

Figura 14.3. Separación electroforética de los fragmentos de: a) *actina*, b) *Cyp6a2* y c) *Cyp6g1*. Gel de agarosa 1%

En la (Figura 14.4.). Se puede observar la dirección de los insertos de los genes *actina* *Cyp6a2* y *Cyp6g1* dentro del vector de clonación pDrive. Al comparar el resultado de la secuenciación de cada uno de nuestros fragmentos con las secuencias reportadas en bancos de información genética podemos confirmar si estas corresponden o no a lo esperado. Con los resultados obtenidos de este análisis se elaboró un cuadro comparativo (Cuadro 14.1.) donde se muestra que la identidad de nuestras secuencias con las reportadas es de más del 85% correspondiendo a más del 95% del total de la secuencia.



Figura 14.4. Dirección de los insertos de los fragmentos de genes problema y control en el plásmido pDrive

Acceso	Descripción	QC	Valor E	Im
XR_0338873.1	RNAm proteína actina de <i>Mus musculus</i> (LOC666979)	93%	0.0	98%
AC154824.2	Secuencia completa del cromosoma 13 de <i>Mus musculus</i>	93%	0.0	98%
NM_001097810 .1	RNAm de la proteína LOC100037088 de <i>Xenopus laevis</i>	93%	0.0	98%
BC021796.1	RNAm de actina, cDNA clona MGC:228612 IMAGE:4218945 de <i>Mus musculus</i>	93%	0.0	98%

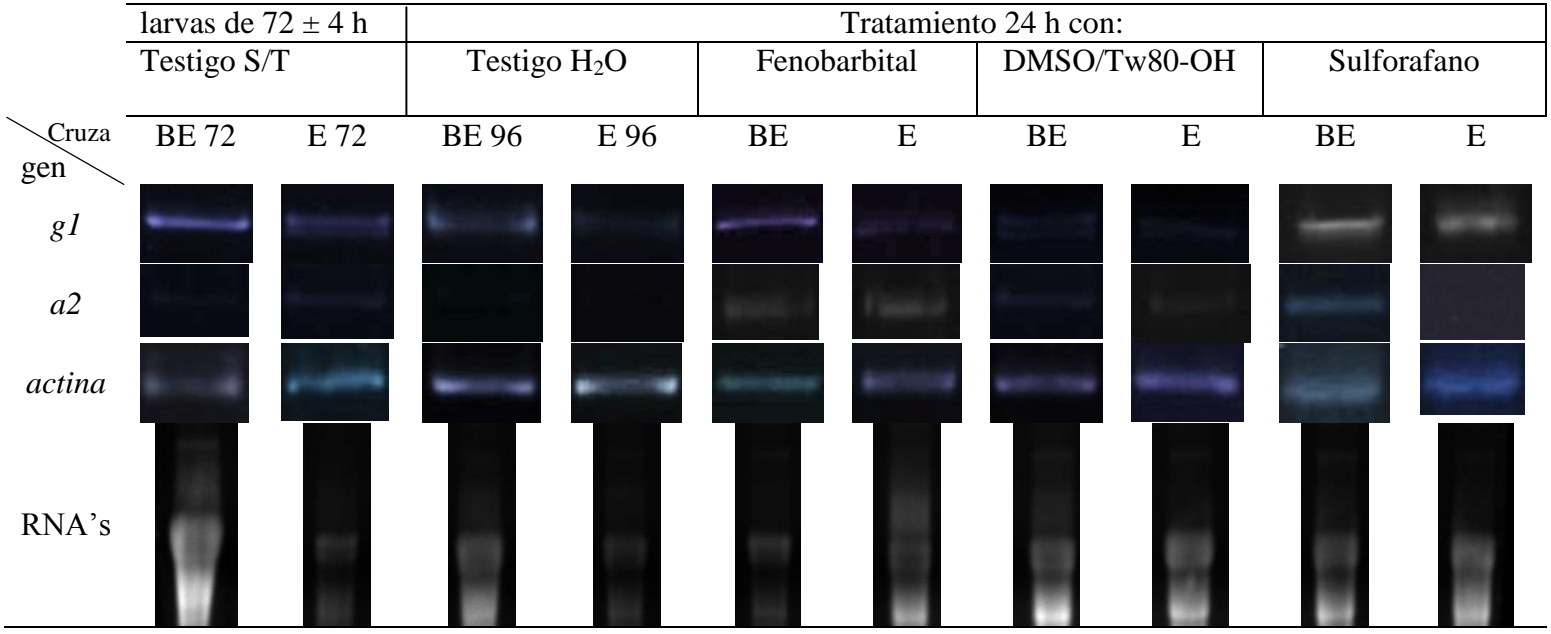
Cuadro 14.1. Comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en los bancos de información.

<i>Drosophila melanogaster</i> (<i>D. m</i>)				
BT015971.1	Inserto completo RHO9818, cDNA de <i>D. m</i>	98%	0.0	99%
NM_078904.1	RNAm del Citocromo P450-6a2 CG9438-R (<i>Cyp6a2</i>) de <i>D.m</i>	98%	0.0	99%
AC008340.5	Secuencia completa de la clona BACR07J20, región 42D-42E, cromosoma 2R de <i>D. m</i>	98%	0.0	99%
AY081960.1	RNAm de la proteína CYP6G1 de <i>D. m</i>	85%	0.0	95%
AY060770.1	cDNA (<i>GH23342</i>) <i>D. m</i>	85%	0.0	95%
NM_136899.2	RNAm (<i>Cyp6g1</i>) de <i>D. m</i> <i>Cyp6g1</i> CG8453-RA	85%	0.0	95%
BT023908.1	Inserto de cDNA de <i>D. m</i> <i>GH17321</i>	85%	0.0	95%

Donde, QC es el porcentaje de similitud de la secuencia obtenida con las reportadas, el valor E nos indica la posibilidad de que la semejanza de las secuencias comparadas se deba al azar y Im nos indica el porcentaje de parecido con respecto al tamaño del fragmento.

Los resultados obtenidos en la primera etapa de la metodología fueron favorables, esto permitió continuar con la segunda etapa que implicó el análisis de el efecto del Sulforafano sobre la regulación génica de las enzimas que intervienen en el metabolismo xenobiótico en organismos que diferían en la expresión de P450s los resultados obtenidos de este análisis se muestran en el cuadro 14.2 donde se puede apreciar los niveles de transcripción de *Cyp6a2* y *Cyp6g1* comparados contra los de un gen de expresión constitutiva, se muestra como el Sulforafano y Fenobarbital afecta la transcripción de *Cyp6a2* y *Cyp6g1* en organismos en donde la expresión de P450s es inducible.

Cuadro 14.2. Comparación de transcritos de los genes *Cyp6g1* y *Cyp6a2* contra el testigo *actina*. Se demuestra la presencia e intensidad de las bandas para cada tratamiento y cruza (ver Métodos).



15. Discusión

En la primera parte del trabajo, que implicó la estandarización de las técnicas moleculares así como el diseño de oligonucleótidos en la cepa Canton^S, se amplificó exitosamente el gen *actina* (testigo de expresión constitutiva) a partir del cDNA, confirmando la presencia de su RNAm. Los genes *Cyp6a2* y *Cyp6g1* no se pudieron amplificar a partir de ese cDNA, (fotografías de geles no mostrados). Esto se puede explicar por tres razones, i) a que son genes regulados (inducibles) y carecían de un inductor en el medio de cultivo. ii) que los genes fueran inactivos, presentando *D. melanogaster* Canton^S esta condición como lo menciona (Brun *et al.*, 1996) y a que el protocolo se estandarizó con esta cepa. iii) a que el diseño de los oligonucleótidos fuera incorrecto. Para descartar esta última posibilidad se procedió a utilizar el DNA genómico, a partir del cual sí se amplificaron los tres genes, lo que se pudo constatar por el tamaño del fragmento amplificado (Figura 14.3 a, b, c) y por los resultados obtenidos de la secuenciación de los fragmentos clonados en el vector de clonación pDrive, realizando la comparación de estas secuencias obtenidas con las reportadas en los bancos de genes NCBI¹ obteniendo una identidad de más de 95% (Cuadro 14.1). Todo lo anterior indicó que el diseño de los oligonucleótidos y la estandarización del protocolo fueron correctos.

15.1 *Cyp6g1*

De acuerdo a los resultados mostrados en el Cuadro 14.2, asumimos que:

- i) Si la condición normal del gen es la observada en Canton^S,(silvestre) ausencia de transcritos (datos no mostrados), pareciera ser que *Cyp6g1* es un gen constitutivo para ambas cruzas ya que no importó que líneas fueron utilizadas, el tratamiento, ni la edad de las larvas, siempre se encontró un aumento en la transcripción de este gen. Sin embargo, en la craza E los niveles de transcripción aunque se encuentran elevados los niveles de transcripción no son mayores que los del gen de expresión constitutiva actina. Este aumento en la transcripción de *Cyp6g1* podría explicarse por la presencia de un elemento móvil *Accord* (retrotransposon) ubicado 291 pb río arriba

¹ NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene -

del sitio de inicio de la transcripción, el cual se ha asociado a la sobreexpresión de este gen (Chung *et al.*, 2006; Daborn *et al.*, 2002).

- ii) Si lo observado en la craza E representa los niveles basales de expresión de este gen, entonces en la línea la expresión del gen *Cyp6g1* estaría reprimido como lo propone Brun y su grupo en 1996. Por lo tanto, la presencia del retrotransposon sería exclusiva de BE y esto explicaría la condición constitutiva e inducible de las cruzas utilizadas. Para poder discernir entre estas dos posibilidades se tendrían que amplificar los transcritos de otra línea de *D. melanogaster* que se considere silvestre para la expresión de los P450s por ejemplo *mwh*, en las mismas condiciones de amplificado utilizadas en la craza E o tratar de amplificar el elemento *Accord* en larvas con las mismas características y en las mismas condiciones para comprobar su presencia.

Por otro lado el tratamiento con SF no parece inhibir la expresión de este citocromo, si consideramos que Juge *et al.*, 2007 menciona que el sulforafano puede inhibir la transcripción de algunas isoformas de P450s pero no de todas, si este fuera el caso esta isoforma no se ve afectada por la administración de sulforafano por otro lado Chung *et al.*, 2006; Daborn *et al.*, 2002 mencionan la presencia de un elemento móvil que le confiere la característica de ser constitutivo a este gen, por lo tanto la expresión de este gen no se vera afectada ante el tratamiento suministrado.

15.2 *Cyp6a2*

Como se observa en el cuadro 14.2, la expresión de *Cyp6a2* es constitutiva para la craza BE no así para la craza E. en las larvas de 72 ± 4 h sin tratamiento alguno (testigo S/T) se observa la expresión del gen en ambas cruzas al igual que *Cyp6g1*, lo cual puede ser explicado si consideramos que a esta edad el nivel de expresión de P450s es alto y disminuye conforme aumenta la edad de las larvas (Graf, 1995) y a que están relacionados con el metabolismo de hormonas de crecimiento y otras moléculas importantes para el desarrollo larvario (Feyereisen, 1999). Por otro lado en las larvas de la craza E de 96 ± 4 h (testigo H₂O) disminuye la

transcripción del gen ya que no se encontraron transcritos bajo estas condiciones de amplificado. Se confirma la inducción de este gen por el FB, coincidiendo con los trabajos de Dunkov *et al.*, 1996, 1997, quien describe un aumento en los niveles de mRNA de *Cyp6a2* en *D. melanogaster*. Inesperadamente el testigo DMSO/Tw80-OH (1:1) indujo la expresión de este gen, aunque no de igual manera que el FB. Esto podría ser explicado si consideramos los reportes que proponen que DMSO altera muchas funciones celulares y en consecuencia podría presentarse una inducción de isoformas de P450s debido a los metabolitos resultantes de estas alteraciones (Nuno *et al.*, 2003). Con respecto al SF en la cruce E no se observan transcritos lo cual es interesante porque SF fue disuelto en DMSO/Tw80-OH (1:1) y aunque este último induce la expresión de P450s la mezcla SF + DMSO/Tw80-OH (1:1) no lo hizo, lo que indica que el SF inhibe la expresión de este gen. Éste pertenece a la misma tribu que el CYP3 de mamíferos, el cual se ha reportado que es inhibido por esta molécula en hepatocitos humanos; además el CYP3A4 que es P450 de mayor abundancia en el hígado humano muestra una fuerte disminución con el SF (Maheo *et al.*, 1997).

Por otro lado Dueñas (2002) menciona una relación entre *Cyp6a2* y *Cyp6g1*, este último funcionando como un inductor de *Cyp6a2* En los resultados obtenidos de este trabajo se muestra que estos dos genes son totalmente independientes.

16. Conclusiones

1. El diseño de los *oligonucleótidos* fue correcto ya que la comparación de las secuencias obtenidas contra las reportadas en GeneBank fue de más de 95%. Esto permitió evaluar los niveles de transcripción de los genes *Cyp6g1* y *Cyp6a2*, comparados con el gen *actina* (expresión constitutiva), bajo las diferentes condiciones experimentales en larvas de tercer estadio de las cruza E y BE de la prueba SMART en ala de *D. melanogaster*.
2. La craza BE presentó expresión constitutiva de ambos genes.
3. En la craza E, la expresión del gen *Cyp6a2* fue modulada por los diferentes tratamientos.
4. Se comprobó el efecto inductor de los genes *Cyp6g1* y *Cyp6a2* en *D. melanogaster*.
5. La mezcla DMSO/Tw80-OH(1:1) indujo la expresión de *Cyp6a2*; con base en las referencias se asume que esta inducción fue generada por el DMSO.
6. Se presentan evidencias de que el SF modula la Fase I del MX, no inhibió la expresión de *Cyp6g1* pero afecta a *Cyp6a2*. Para probar esa hipótesis es necesario determinar su papel en la inducción de algunos genes que participan en la Fase II.

17. Referencias

- Adams, M.D. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-2195.
- Amichot, M., Brun, A., Cuany, A., De Souza, G., Le Mouél, T., Bride, J.M., Babault, M., Salaün, J. P., Rahmani, R. y Bergé, B. (1998). Induction of cytochrome P450 activities in *Drosophila melanogaster* strains susceptible or resistant to insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **121**, 311-319.
- Andersen, J. F., Utermohlen, J. G. y Feyereisen, R. (1994) Expression of house fly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticidemetabolizing P450 system. *Biochemistry*. **33**, 2171–2177.
- Andersen, J. F., Walding, J. K., Evans, P. H., Bowers, W. S. y Feyereisen, R. (1997) Substrate specificity for the epoxidation of terpenoids and active site topology of house fly cytochrome P450 6A1. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 156–164.
- Bacon, J. R., Williamson, G., Garner, R. C., Lappin, G., Langouet, S. y Bao, Y. (2003) Sulforaphane and quercetin modulate PhIP-DNA adduct formation in human HepG2 cells and hepatocytes. *Carcinogenesis*. **24**, 1903 – 1911.
- Basten, G. P., Bao, Y. and Williamson, G. (2002) Sulforaphane and its glutathione conjugate but not sulforaphane nitrile induce UDP-glucuronosyl transferase (UGT1A1) and glutathione transferase (GSTA1) in cultured cells. *Carcinogenesis*. **23**, 1399 – 1404.
- Becker, W., Kleinsmith, L. y Hardin, J. (2000). The world of the cell. 4th. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company. USA. Pp: 878.
- Beckman, H. (1984). Farmacología terapéutica clínica. ED. Interamericana, México. pp: 78-86.
- Berge, J. B., Feyereisen, R. y Amichot, M. (1998) Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **353**, 1701–1705.
- Bogwitz, M. R., Chung, H., Magoc, L., Rigby, S., Wong, W. y O’Keefe M. (2005) *Cyp12a4* confers lufenuron resistance in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 12807–12812.
- Bonnesen, C., Eggleston, I. M. y Hayes, J. D. (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 Res.* **61**, 6120 – 6130.
- Boucher, J.L., Delaforge, M., Salaun, J. P., Pinot, F., Durst, F., Pflieger, P. y Mioskowski, C. (1996). *In vitro* hydroxylation and epoxidation of some isomeric lauric acid analogs by rat liver microsomes. Identification of metabolites and effects of clofibrates or phenobarbital pretreatment. *Drug Metabolism and Disposition*. **24**, 462-468.

- Brandt, A., Scharf, M., Pedra, J., Holmes, G., Dean, A., Kreitman, M. y Pittendrigh, B. (2002) Differential expression and induction of two *Drosophila* cytochrome P450 genes near the Rst(2) DDT locus. *Insect Mol. Biol.* **11**, 337–341.
- Brooks, J. D., Paton, V. G. y Vidanes, G. (2001) Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **10**, 949–954.
- Brun, A., Cuany, A., Le Mouel, T., Bere, J. y Amichot, A. (1996). Inducibility of the *Drosophila melanogaster* Cytochrome P450 Gene, *CYP6A2*, by Phenobarbital in Insecticide Susceptible or Resistant Strains. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26**, 697-703.
- Burke, J. D. (1971). *Biología celular*. Nueva editorial Interamericana, S. A. de C.V. 1ª ed. pp:298.
- Cariño, F.A., Koener, J.F., Plapp, F.W. y Feyereisen, R. (1992). Expression of cytochrome P450 gene CYP6A1 in the house fly, *Musca domestica*. *American Chemical Society.* 30-40.
- Castañeda-Partida L. (2002). Valoración genotóxica del acetato de plomo y la dimetilnitrosamina (DMN) en *Drosophila melanogaster* pretatadas con fenobarbital, mediante la prueba SMART. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 116 pp.
- Chung, H., Bogwitz, M. R., Mc Cart, C., Adrianopoulos, A., Richard, H., French, C., Batterham, P. y Daborn, J. (1996) *Cis*-Regulatory Elements in the *Accord* Retrotransposon Result in Tissue-Specific Expression of the *Drosophila melanogaster* Insecticide Resistance Gene *Cyp6g1*. *Genetics.* **175**, 1071-1077.
- Conaway, C. C., Yang, Y. M. y Chung, F. L. (2002). Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents. their biological activities and metabolism in rodents and humans. *Curr. Drug Metab.* **3**, 233–255.
- Daborn, P. J., Boundy, S. Yen, J. L., Pittendrigh, B. y French-Constant, R. H. (2001) DDT resistance in *Drosophila* correlates with *Cyp6g1* over-expression and confers cross-resistance to the neonicotinoid imidacloprid. *MolGenet Genomics* **266**: 556–563.
- Daborn, P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson, T.G. y French-Constant, R.H. (2002) A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*, **297**, 2253-2256
- DePierre, J. W. y Ernster, L. (1980). Topology of drug-metabolizing enzymes in the membrane of the endoplasmic reticulum. En: Coon, M.J. *et al.* *Microsomes, drug oxidations and chemical carcinogenesis*. Academic Press, Inc. New York. Vol I y II.
- Dueñas, G. I. E., Heres, M. E., Castañeda, P. L. y Graf U. (2001). Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *DIS.* **88**: 166.

- Dueñas-García, I. E. (2002). Efecto mutagénico y recombinogénico de la p-fenilendiamina y la o-fenilendiamina, mediante la prueba de mutación somática en alas de *Drosophila melanogaster* cruzas E y AB. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM. pp 79.
- Dunkov, B. C., Rodríguez-Arnaiz, R., Pittendrigh, B., Ffrench-Constant, R. H. Y Feyereisen, R. (1996). Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. *Molecular & General Genetics*. **251**, 290-297.
- Dunkov, B. C., Guzov, V. M., Mocelin, G., Shotkoski, F., Brun, A., Amichot, M., Ffrench-Constant, R. H. y Feyereisen, R. (1997) The *Drosophila* cytochrome P450 gene *Cyp6a2*: structure, localization, heterologous expression, and induction by phenobarbital. *DNA Cell Biol.* **16**, 1345–1356.
- El-Masri, H. A. y Portier, C. J. (1998). Physiologically based pharmacokinetics model of primidone and its metabolites phenobarbital and phenylethylmalonamide in humans, rats, and mice. *Drug Metabolism and Disposition*. **26**, 585-594.
- Fahey, J. W., Zhang, Y. y Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 10367-72.
- Festucci-Buselli RA, Carvalho-Dias AS, de Oliveira-Andrade M, Caixeta-Nunes C, Li HM, y Stuart JJ. (2005) Expression of *Cyp6g1* and *Cyp12d1* in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol* **14**: 69–77.
- Feyereisen, R., (1999). Insect P450 Enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* **44**, 507-533.
- ffrench-Constant RH, Daborn PJ and Le Goff G. (2004) The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends. Genet.* **20**, 163–170.
- Fowke, J. H., Chung, F. L., Jin, F., Qi, D., Cai, Q., Conaway, C., Cheng, J. R., Shu, X. O., Gao, Y. T. y Zheng, W. (2003) Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. *Cancer Res.* **63**, 3980 – 3986.
- Frank, M.R. y Fogleman, J.C. (1992). Involvement of cytochrome P450 in host-plant utilization by Sonoran desert *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **89**, 11998-12002.
- Fuchs, S.Y., Spiegelman, V.S. y Belitsky, G.A. (1994). Inducibility of various cytochrome P450 isozymes by phenobarbital and some other xenobiotics in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Pharmacology*. **47**, 1867-1873.
- Gandhi, R., Varak, E. y Goldberg, M.L. (1992). Molecular analysis of a cytochrome P450 gene of family 4 on the *Drosophila* X chromosome. *DNA and Cell Biology*. **11**, 397-404.
- Gao, X. y Talalay, P. (2004). Induction of phase 2 genes by sulforaphane protects retinal pigment epithelial cells against photooxidative damage. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10446-10451.

Gerhauser, C., You, M., Liu, J., Moriarty, R.M., Hawthorne, M., Mehta, R. G., Moon, R. C. y Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.* **57**, 272 – 278.

Gonzalez, F. J y Gelboin, H. V. (1992). Human cytochromes P450: Evolution and cDNA-directed expression. *Ann. Rev. Biochem.*, **98**, 81-85.

Gonzalez, F., Crespi, Ch. y Gelboin, H. (1991). cDNA-expressed human cytochrome P450's: a new age of molecular toxicology and human risk assessment. *Mutat. Res.*, **247**, 113-127.

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

Graf, U. y Singer, D. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, **8**, 15-27.

Guzov, V. M., Unnithan, G. C., Chernogolov, A. A. y Feyereisen, R. (1998) CYP12A1, a mitochondrial cytochrome P450 from the house fly. *Arch. Biochem. Biophys.* **359**, 231–240.

Hällström, IP., Magnusson, J. y Ramel, C. (1982). Relation between the somatic toxicity of dimethylnitrosamine and a genetically determined variation in the level and induction of the cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, **92**, 161-168.

Hamadeh, H. H., Bushel, P. R., Jayadev, S., DiSorbo O., Sieber, S., Bennett, L., Li, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J. C., Blanchard, K., Paules, R. S. y Afshari, C. (2002). Prediction of compound signature using high density gene expression profiling. *Toxicological Sciences.* **67**, 232-240.

Hankinson, O. (1995) The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 307 – 340.

Haugen, D. A. (1981). Biphenyl metabolism by rat liver microsomes: regioselective effects of inducers, inhibitors and solvents. *Drug Metabolism and Disposition.* **9**, 212-218.

Hecht, S. S. (2005). Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab. Rev.* **32**, 395–411.

Hobbs, A. A., Mattschoss, L. A., May, B. K., Williams, K. E. y Elliott, W. H. (1986). The cDNA and protein sequence of a phenobarbital-induced chicken cytochrome P450. *J. Biol. Chem.*, **261**, 9444-9449.

Jackson, S. J. y Singletary, W. K. 2004. Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. *Carcinogenesis* **25**, 219-227.

Jakubikova, J., Sedlak, J., Bod_o, J. and Bao, Y. (2006) Effect of isothiocyanates on nuclear accumulation of NF-kappaB, Nrf2, and thioredoxin in caco-2 cells. *J.Agric. Food Chem.* **54**, 1656 – 1662.

Jenkins, A. T., Dash, H. A., Boundy, S., Halliwell, C. M. y ffrench-Constant, R. H. (2006) Methoxy-resorufin ether as an electrochemically active biological probe for cytochrome P450 O-demethylation. *Bioelectrochemistry* **68**, 67–71.

Jeong, W. S., Jun, M. y Kong, A. N. (2006) Nrf2: a potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds. *Antioxid. Redox Signal* **8**, 99 – 106.

Jiang, Z. Q., Chen, C., Yang, B., Hebbar, V. y Kong, A. N. (2003). Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers. *Life Sci.* **72**, 2243 – 2253.

Jong-Min Lee, Jiang Li, Delinda A. Johnson, Thor D. Stein, Andrew D Kraft, Marcus J Calkins, Rebekah J Jakel y Jeffer A Johnson. 2005. Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J.* **19**, 1061-1066.

Joseph, M. A., Moysich, K. B., Freudenheim, J. L., Shields, P.G., Bowman, E. D., Zhang, Y., Marshall, J. R. y Ambrosone, C. B. (2004) Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk. *Nutr. Cancer.* **50**, 206 – 213.

Keck, A. S., Staack, R. y Jeffery, E. H. (2002). The cruciferous nitrile crambene has bioactivity similar to sulforaphane when administered to Fischer 344 rats but is far less potent in cell culture. *Nutr. Cancer.* **42**, 233 – 240.

LeGoff, G., Boundy, S., Daborn, P. J., Yen, J. L., Sofer, L. y Lind R. (2003) Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect Biochem Mol Biol* **33**, 701–708.

Logemann, H., Schell, J. y Willmitzer, L. (1987). Improved Method for the Isolation of RNA from Plant Tissues. *Anal Biochem.* **15**, 16-20.

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

Maheo, K., Morel, F., Langouet, S., Kramer, H., Le Ferrec, E., Ketterer, B. y Guillouzo, A. (1997) Inhibition of cytochromes P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer Res.* **57**, 3649 – 3652.

Maitra, S., Dombrowski, S. M., Waters, L. C. y Ganguly, R. (1996). Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Gene.* **180**, 165-171.

Matusheski, N. V. y Jeffery, E. H. (2001). Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5743 – 5749.

McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M. y Hayes, J. D. (2003). Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 21592 – 21600.

N. Juge., R. F. Mithen y M. Traka. (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell. Mol. Life. Sci.* **64**, 1105-1127.

Nebert, D.W. (1987). The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **6**, 1-11.

Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, y I.C. Nebert, D.W. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.

Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, F. P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C. y Gotoh, O. (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNACell Biol.* **12**, 1 – 51.

N. Plant. (2003) *Molecular Toxicology*. BIOS Scientific Publishers. pp: 150

Nims, R. W., Prough, R. A., Jones, C. R., Stockus, D. L., Dragnev, K, H., Thomas, P. E. y Lubet, R. A. (1997). *In vivo* induction and *in vitro* inhibition of hepatic cytochrome P450 activity by the benzodiazepine anticonvulsants clonazepam and diazepam. *Drug Metabolism and Disposition.* **25**, 750-756.

Nuno, C., Santos, J., Figueira-Cohelo, J., Martins Silva., Carlota, Saldanha.(2003). multidisiplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, celular and malecular aspects. *Biochemical pharmacology* **65**, 1035-1041.

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

Pan, J., Xiang, Q. y Ball, S. (2000). Use of a novel real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the effects of cytokines on cytochrome P450 mRNA expression in mouse liver. *Drug Metabolism and Disposition.* **28**, 709-713.

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

Pedra, J. H., McIntyre, L. M., Scharf, M. E. y Pittendrigh, B. R. (2004) Genome-wide transcription profile of field- and laboratoryselected dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)-resistant *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 7034–7039.

Posner, G.H., Cho, C.G., Green, J. V., Zhang, Y. y Talalay, P. (1994) Design and synthesis of bifunctional isothiocyanate analogs of sulforaphane: correlation between structure and potency as inducers of anticarcinogenic detoxication enzymes. *J.Med. Chem.* **37**, 170-176.

Prochaska, H. J., Santamaria, A. B. y Talalay, P. (1992) Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2394 – 2398.

Pyke, F. M., Bogwitz, M. R., Perry, T., Monk, A., Batterham, P. y McKenzie, J. A. (2004) The genetic basis of resistance to diazinon in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* **121**, 13–24.

Rockstein, M. (1978). *Biochemistry of insects*. Academic Press. New York. USA. Pp: 649.

Rodríguez-Arnaiz R. (2004). *Metabolismo de las toxinas ambientales*. 1ª ed. Serie La Ciencia para Todos, Vol. 199. FCE, SEP, CONACYT. 112 pp.

Rubin, G.M., Yandell, M.D., Wortman, J.R., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C.R., Hariharan, I.K., Fortini, M.E., Li, P.W., Apweiler, R. y Fleischmann, W. (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-2215.

Rushmore, T. H., Morton, M. R. y Pickett, C. B. (1991). The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 11632-11639.

Sabourault, C., Guzov, V. M., Koener, J. F., Claudianos, C., Plapp, F. W. Jr y Feyereisen, R. (2001) Overproduction of a P450 that metabolizes diazinon is linked to a loss- of-function in the chromosome 2 ali-esterase (MdeltaE7) gene in resistant house fly. *Science*. **297**, 2253–2256.

Sakai, H., Park, S. y Kikkawa, Y. (1992). Differential oxidase activity of hepatic and pulmonary microsomal cytochrome P450 isozymes after treatment with cytochrome P450 inducers. *J. Biol. Chem.*, **187**, 1262-1269.

Saner, C., Weibel, B., Würzler, F.E. y Sengstag, Ch. (1996). Metabolism of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogaster* CYP6A2 enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.* **27**, 46-58.

Scott, J. G. y Wen, Z. (2001) Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag. Sci.* **57**, 958–967.

Scott, J. G., Liu, N. y Wen, Z. (1998) Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **121**,147–155.

Shishu y Kaur, I. P. (2003) Inhibition of mutagenicity of food-derived heterocyclic amines by sulforaphane a constituent of broccoli. *Indian, J. Exp. Biol.* **41**, 216 – 219.

Singh, A. V., Xiao, D., Lew, K. L., Dhir, R. y Singh, S. V. (2004). Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts *in vivo*. *Carcinogenesis*. **25**, 83-90.

Spitz, M. R., Duphorne, C. M., Detry, M. A., Pillow, P. C., Amos, C. I., Lei, L., de Andrade, M., Gu, X., Hong, W. K. y Wu, X. (2000) Dietary intake of isothiocyanates: evidence of a joint effect with glutathione S-transferase polymorphisms in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **9**, 1017 – 1020.

Talalay, P. y Fahey, J. W. (2001). Phytochemicals from cruciferous plant protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. *J. Nutr.* **131**, 3027–3033.

Talalay, P. (2000) Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors* **12**, 5 – 11.

Tijet N, Helvig C, Feyereisen R. (2001). The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene* **262**, 189-198

Tredger, J. M. y Stoll, S. (2002). Cytochromes P450: their impact on drug treatment. *Hospital pharmacist.* **9**, 167-173.

Vogel, E.W. (1991). Genotoxic Chemicals. An introduction into basic principles of Genetic Toxicology. Apuntes del Primer Taller Latinoamericano en Toxicología Genética en *Drosophila melanogaster*. Tlaxcala, México. Sin publicar.

Wang, L. I., Giovannucci, E. L., Hunter, D., Neubergh, D., Su, L. y Christiani, D. C. (2004) Dietary intake of cruciferous vegetables, glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Causes Control* **15**, 977 – 985.

Wilson, T. G. (2001) Resistance of *Drosophila* to toxins. *Annu. Rev. Entomol.* **46**, 545–571.

Yang, C. S., Smith, T. J. y Hong, J. Y. (1994) Cytochrome P-450 enzymes as targets for chemoprevention against chemical carcinogenesis and toxicity: opportunities and limitations. *Cancer Res.* **54**, 1982-1986.

Zelko, I. Y Negishi, M. (2000). Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **277**, 1090-2104.

Zhang, Y. (2004). Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat. Res.* **555**, 173-190.

Zhang, Y. y Talalay, P. (1994) Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Res.* **54**, 1976-1981.

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

Zhao, B., Seow, A., Lee, E. J., Poh, W. T., Teh, M., Eng, P., Wang, Y. T., Tan, W. C., Yu, M. C. y Lee, H. P. (2001) Dietary isothiocyanates, glutathione S-transferase -M1, -T1 polymorphisms and lung cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **10**, 1063 –1067.