



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DEL BRÓCOLI  
(*Brassica oleracea var. italica*) CON EL  
METILMETANOSULFONATO (MMS) EN LA  
PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN  
SOMÁTICA (SMART) EN ALA DE *Drosophila*  
*melanogaster* (CRUZA E Y BE)

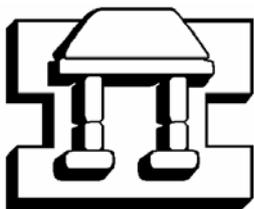
T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

PRESENTA:

VIRIDIANA VEGA CONTRERAS

DIRECTORA DE TESIS: M. en C. MA. EUGENIA ISABEL HERES Y PULIDO



IZTACALA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **DEDICATORIA**

*Quiero agradecerte a ti mi mejor amigo, por acompañarme  
en todos los momentos de mi vida, por tu amor  
incondicional y por que gracias a ti hoy he llegado hasta  
aquí.*

**GRACIAS DIOS**

## **DEDICATORIA**

*A ti mamá por que tu gran ejemplo, tu esfuerzo y tu valentía me impulso para superarme día con día enseñándome que los éxitos se pueden lograr cuando se tiene seguridad en si mismo, por darme un hogar feliz, por hacer de mi la mujer que ahora soy, por darme la vida y amor incondicional y sobre todo por que este trabajo lo forjamos las dos, pero principalmente por ser **MI MEJOR AMIGA, TE AMO.***

*A mi papá por ser el que inicio mi desarrollo profesional, por que tus consejos y tu amor me abrieron camino en la vida tanto personal como académica y simplemente por que **TE AMO.***

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis hermanos Liliana y Mauricio por que siempre me apoyaron, por estar a mi lado en los momentos más alegres de mi vida así como en los momentos difíciles.*

*A mis sobrinos, cuñados y a la familia Contreras por su apoyo y cariño.*

*A Oswaldo por su comprensión, paciencia y amor, por dejarme ser parte de tu vida, por confiar en mí, por ser un gran amigo y compañero, por escucharme siempre que te necesito, por darme tu apoyo el cual fue muy valioso para llegar a culminar este trabajo y sobre todo por que has llenado mi vida de momentos de alegría GRACIAS.*

*A mis mejores amigas Edith y Paty por darme momentos inolvidables que siempre atesorare en mi corazón, por darme su apoyo, cariño y confianza.*

*A todos mis amigos de la carrera Liliana, Claudia, Griselda, Sandra, Cristhian a todos los Roñas y los que me faltaron mil gracias por hacer muy agradable mi estancia en la Universidad.*

*A Ismael por tu gran amistad, por tu apoyo, por tus consejos pero sobre todo por escucharme cuando lo necesito.*

*A mi directora de tesis la M. en C. Maru Eugenia por que su profesionalismo y su dedicación a mi trabajo me dieron enriquecimiento tanto profesional como personal enseñándome a ir siempre mas allá de las metas establecidas además de iniciarme en el mundo de la Genética Toxicológica GRACIAS.*

*A las M. en C. Laura Castañeda P. e Irma Elena Dueñas G. por sus consejos, confianza y cariño, por enriquecer mi vida profesional y personal, por hacer mi estancia en el laboratorio muy agradable pero sobre todo por que ustedes junto con la Mtra. Maru fueron unas excelentes mamás académicas.*

*A todos mis compañeros de Laboratorio: Luis, Alejandra, Paty, Stephanie, Zoraya, Samantha, Juan Carlos y Diego quienes hicieron un ambiente muy agradable en el laboratorio.*

*Al M. en C. Ramón V. Moreno T. y al Dr. Elías Piedra Ibarra gracias por su tiempo, sus consejos y sus comentarios con los que se ha enriquecido este trabajo.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México mil gracias por darme formación académica permitiéndome ser parte de la mejor Universidad de América Latina.*

# ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Introducción	2
Brócoli	3
Metil metanosulfonato (MMS)	11
<i>Drosophila melanogaster</i>	16
Prueba de mutación y recombinación somática (SMART)	18
Objetivos e Hipótesis	20
Materiales y métodos	21
Diagrama metodológico	24
Resultados	25
Cl <sub>50</sub>	25
Prueba de mutación y recombinación somática (SMART)	26
Discusión	35
Conclusiones y Recomendaciones	48
Apéndice 1	49
Apéndice 2	51
Apéndice 3	56
Apéndice 4	59
Referencias	62

# ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRÁFICAS

Cuadro 1. Mecanismos de reparación en *Drosophila*

Cuadro 2. Ensayos genotóxicos

Cuadro 3. Resultados de SMART testigos brócoli y H<sub>2</sub>O (E y BE)

Cuadro 4. Resultados de SMART testigo H<sub>2</sub>O contra testigo brócoli, MMS y co- tratamientos (E y BE)

Cuadro 5. Resultados de SMART testigo MMS contra co-tratamientos (E y BE)

Cuadro 6. Contenido de compuestos químicos en el brócoli Figura 1. Brócoli

Figura 1. *Brassica oleracea* var. *italica*

Figura 2. Hidrólisis de los glucosinolatos a isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos por acción de la enzima mirosinasa

Figura 3. Fórmulas químicas de isotiocianatos

Figura 4. Metil metanosulfonato

Figura 5. Sistema de Reparación por Escisión de bases (BER)

Figura 6. *Drosophila melanogaster*

Figura 7. Interacción de los compuestos del brócoli con el MMS

Figura 8. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

Figura 9. Mancha *mwh*

Figura 10. Mancha *flr<sup>3</sup>*

Figura 11. Ala Serratia

Figura 12. Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigosis en los marcadores *+flr<sup>3</sup>/mwh+* de *Drosophila*

Gráfica 1. Cl<sub>50</sub> de *flr<sup>3</sup>* y Oregon-*flr<sup>3</sup>*

Gráfica 2. Frecuencia de manchas en cruza E

Gráfica 3. Frecuencia de manchas en cruza BE

Gráfica 4. Frecuencia de clones *mwh* por individuo, cruza E

Gráfica 5. Frecuencia de clones *mwh* por individuo, cruza BE

## ABREVIATURAS

**AA** ácido ascórbico

**AITC** alil-isotiocianato

**AP** sitios apurínicos/apirimídicos.

**BaP** benzo [a] pireno

**BE** cruza bioactivación elevada

**BER** sistema de reparación por escisión de bases

**CAs** aberraciones cromosómicas

**DSB** rompimientos dobles

**E** cruza estándar

**GB** glucobrasicin

**GRP** glucorafanin

**GS** glucosinolatos

**GSH** glutatión

**GST** glutatión -S- transferasa

**HR** humedad relativa

**HRR** reparación por recombinación de homólogos

**I3C** indol, 3-carbinol

**ITC** isotiocianatos

**MMR** reparación de desemparejamientos

**MMS** metil metanosulfonato

**NER** sistema de reparación por escisión de nucleótidos

**NHEJ** reparación por recombinación entre no homólogos

**PEITC** fenil isotiocianato

**ROS** especies reactivas de oxígeno

**SCEs** intercambio de cromátidas hermanas

**SF** sulforafano

**SSA** single strand annealing



## RESUMEN

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) es una mezcla compleja de químicos que interactúan en los procesos de inhibición o promoción del daño genotóxico. Existen controversias sobre la relación del brócoli con el metabolismo xenobiótico. Para contribuir al conocimiento de los efectos que esta mezcla compleja pudiera tener en eventos distintos al metabolismo xenobiótico se utilizó el metil metanosulfonato (MMS), agente alquilante directo, en la prueba en el ala de *D. melanogaster*. Larvas de  $72 \pm 4$  h de edad producto de las cruces estándar (E) y bioactivación elevada (BE) de *D. melanogaster* fueron alimentadas por 48 h (co-tratamiento crónico) con diferentes proporciones (0, 25, 50 y 100% p/p) de brócoli orgánicamente cultivado, crudo y liofilizado/Medio Instantáneo Carolina con MMS (0.5 mM), utilizando brócoli (100%) y agua como testigos negativos y uretano como testigo positivo de las cruces. El brócoli 100% no fue genotóxico, pero en los co-tratamientos con MMS de ambas cruces, se obtuvo un aumento significativo en la genotoxicidad en comparación con el tratamiento MMS, sin brócoli. Se propone que la vitamina C, en altas cantidades en el brócoli liofilizado, indujo los mecanismos de reparación del DNA, aumentado los sitios apurínicos (AP) y el efecto genotóxico del MMS. La acción alquilante directa del MMS se confirmó en ambas cruces. Se discute la pertinencia de ingerir brócoli de manera continua, como método de prevención para el cáncer, sin conocer a fondo su metabolismo.

## INTRODUCCIÓN

Se ha reportado que el incremento de frutas y vegetales en la dieta tiene influencia en la etiología y prevención del riesgo de cáncer (Keck y cols., 2003; Greenwald y cols., 2001; Vang y cols., 2001). Varios estudios epidemiológicos y de carcinogénesis animal han demostrado que vegetales de la familia *Brassicaceae*, en particular del género *Brassica*, tales como brócoli, coliflor y coles de Bruselas, poseen propiedades preventivas de cancerogénesis química debido a que reportan tener influencia en la actividad enzimática del metabolismo xenobiótico (Friedman, 1997). Sin embargo, la mezcla compleja brócoli ha mostrado efectos controvertidos en cuanto a la protección contra la genotoxicidad (Zhu y Loft, 2001, 2003; Greenwald y cols., 2001; Conaway y cols., 2000; London y cols., 2000; Verhoven y cols., 1997).

Para contribuir al conocimiento de los efectos que esta mezcla compleja pudiera tener en eventos distintos al metabolismo xenobiótico se utilizó el metil metanosulfonato (MMS), agente alquilante directo, en la prueba SMART en el ala de *Drosophila melanogaster*, asumiendo que al hacerlo en las cruces E y BE (niveles regulados y constitutivos de *CYP450* respectivamente), no habría diferencias en el daño genotóxico del MMS, con y sin brócoli (Keck y cols., 2003; Jeffery y cols., 2003; Petri y cols., 2003; Vang y cols., 2001; Greenwald y cols., 2001; Conaway y cols., 2000; Fahey y Talalay, 1999; Verhoeven y cols., 1997).

## Brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)



Figura. 1 *Brassica oleracea* var. *italica*  
([www.jardin-mundani.com/cruciferae/brecol1.jpg](http://www.jardin-mundani.com/cruciferae/brecol1.jpg))

El brócoli (Figura 1) es una herbácea perteneciente a la familia de las Brassicaceae, tiene hojas de color verde oscuro festonadas y su raíz es ramificada de rápido crecimiento, sus tallos son voluminosos con yemas florales hipertrofiadas (Ross y cols., 2000).

El brócoli se define químicamente como mezcla compleja (Friedman, 1997; Verhoeven y cols., 1997) en donde la interacción entre sus compuestos puede tener diferentes efectos de antagonismo o sinergia en relación con agentes cancerígenos (Jeffery y cols., 2003; Vang y cols., 2001; Verhoeven y cols., 1997), ya que se le relaciona con la capacidad de modificar la actividad enzimática de los *CYP450* (Apéndice 4). Keck y cols. (2003) probaron en hígado y colon de ratas F344 una dieta basada en 20% de brócoli hidrolizado (BH), equivalente a 0.16 mmol sulforafano (SF)/kg dieta y brócoli con glucosinolatos intactos (GS) equivalente a 2.2 mmol glucorafanin (GRP)/kg dieta y SF (5 mmol/kg dieta), por cinco días. El brócoli-GS fue más efectivo para inducir la quinona reductasa (enzima de desintoxicación de la fase II (Apéndice 4), con mayor efecto en el colon que en el hígado. Sin embargo la alteración en la activación y desactivación de los *CYP450* por acción del brócoli provocó un riesgo importante en la inducción de tumores en hígado y colon de rata, bajo dieta de este vegetal por siete días (Vang y cols., 1991). Kassie y cols. (1996) realizaron un estudio con jugos crudos de brócoli en el sistema que evalúa mutaciones puntuales en *Salmonella* TA98 y TA100, además estos jugos

inhibieron la reparación del daño en *E.coli* K-12 y tuvieron efectos clastogénicos en células de mamífero (aberraciones cromosómicas e ICH). Un 70-80% de la actividad genotóxica de esos jugos se debió a las fracciones que contienen isotiocianatos (ITC) u otros productos de los glucosinolatos (GS).

La mezcla compleja brócoli incluye metabolitos secundarios denominados GS (Won y Jeffery, 2001) los cuales constituyen de 70-100  $\mu\text{mol}$  por gramo de peso fresco y <1% son constituidos por indol glucosinolatos (Fahey y cols., 2001). Éstos son precursores de los ITC los cuales son liberados cuando la enzima mirosinasa entra en contacto con los GS al momento que el vegetal crudo o medio cocido es masticado o dañado (Verhoeven y cols., 1997; Fahey y Talalay, 1999). Por cada GS la mirosinasa libera una molécula de glucosa y de ácido sulfhídrico, además de tiocianatos y nitrilos (Figura 2) (Hrncirík y cols., 1998; Steinkellner y cols., 2001). Entre los glucosinolatos los más importantes son:

- Glucorafanin (GRP) (constituye el 50% del total de glucosinolatos, >1  $\mu\text{mol}$ /peso fresco de brócoli) precursor del sulforafano (SF) ( Tian y cols., 2005; Paolini y cols., 2004; Fahey y cols., 2001).
- Sinigrin precursor del alil isotiocianato (AITC) (Vang y cols., 2001).
- Glucobrasicin (GB) precursor del indol-3 carbinol (I3C) (Vang y cols., 2001).
- Gluconasturtin, precursor del fenetil isotiocianato (PEITC) (Vang y cols., 2001) (Figura 3).

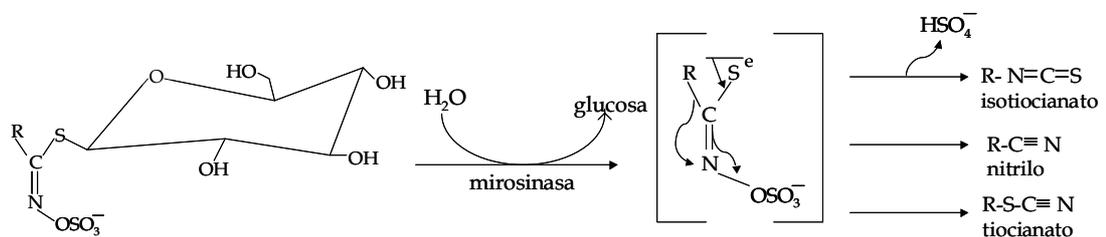


Figura 2. Hidrólisis de los glucosinolatos a isotiocianatos, tiocianatos y nitrilos por acción de la enzima mirosinasa (tomado de Fahey y cols., 2001)..

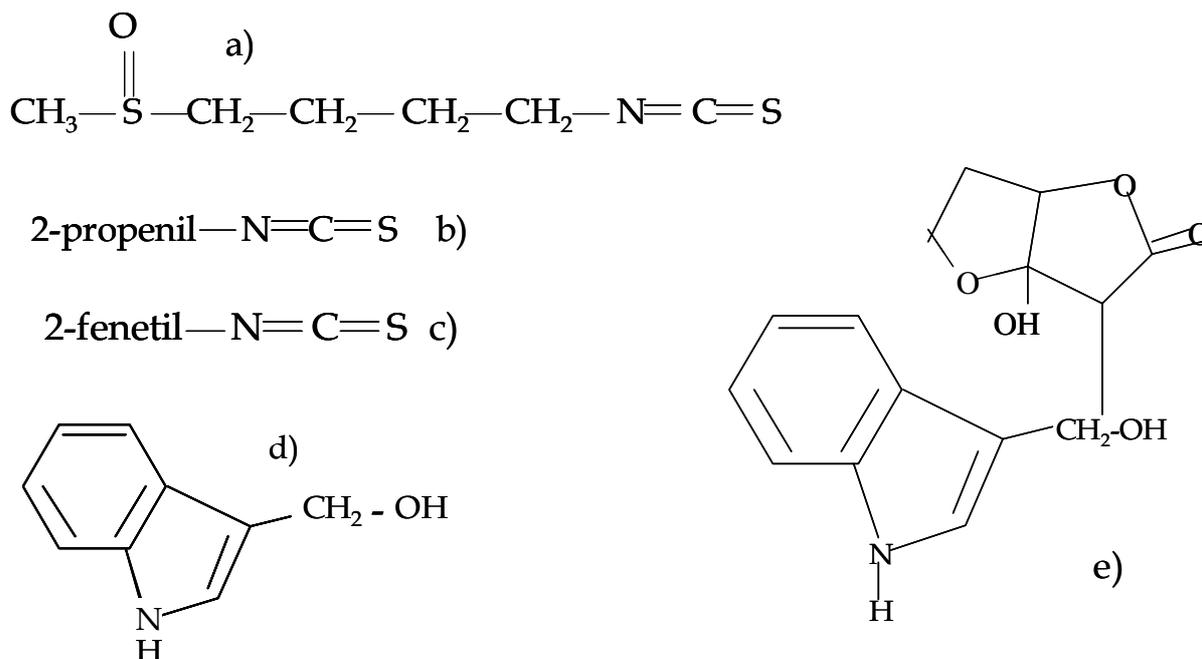


Figura 3. Fórmulas químicas de ITC donde: a) SF, b) AITC, c) PEITC d) I3C, e) ascorbigen (Tian y cols., 2005).

La acción de los GS se ve disminuida cuando el brócoli ha sido cocinado, debido a que son destruidos por el aumento de temperatura o porque se disuelven en el agua de cocimiento, lo que provoca la inactivación de la mirosinasa, o por eventos relacionados con el tiempo de cosecha y almacenamiento (Hsien y Chang, 2005; Fahey y cols., 2001; Conaway y cols., 2000).

Todos los ITC mencionados tienen influencia en la Fase I y II del metabolismo xenobiótico (Bolsterli, 2003), y han reportado cierta actividad mutagénica o promutagénica (Fahey y cols., 2001; Vang y cols. 2001; Won y Jeffery, 2001; Fahey y Talalay, 1999; Verhoeven y cols., 1997). El post-tratamiento con I3C (100 y 300 ppm dieta diaria durante 36 semanas) mostró tener un efecto quimiopreventivo en el cáncer de colon de ratón, inducido por el azoximetano (5 mg/kg de ratón inyección subcutánea por semana) (Joong Kim y cols., 2003). Verhoeven y cols. (1997) reportaron que el I3C induce la Fase I en el hígado de rata y específicamente el *CYP1A1* en el hígado de la trucha arcoiris. Este indol también induce los *CYP1A1* y *1A2* en ratas F344, por lo que puede actuar como promotor de cancerogénesis química (He y cols., 2000). McDanell y McLean (1988) reportaron que el indol-3-acetinol (I3A), el cual es

resultado de la unión entre el I3C y un nitrilo formado durante la hidrólisis de los glucosinolatos, forma compuestos N-nitrosos mutagénicos. El I3C puede condensarse espontáneamente bajo condiciones ácidas y formar un compuesto muy parecido en genotoxicidad a las dioxinas (Bjeldanes y cols., 1991); o reaccionar con el ácido ascórbico y formar ascorbigen (Figura 3) (Zhu y Loft, 2003).

El ascorbigen es uno de los mayores indoles derivados de los vegetales del género *Brassica*, el cual es producto de la interacción entre el GB y el ácido ascórbico (AA). Hrnčirik y cols. (2001, 1998) reportaron que 20-40% del total de GB presente en vegetal *Brassica* (25-142 mg/kg<sup>-1</sup>) es convertido por la acción descrita en ascorbigen y que esta conversión se incrementa cuando el pH disminuye; además encontraron que este indol es lábil a altas temperaturas, pero es estable en medio ácido. El ascorbigen aumenta la actividad de enzimas de la Fase I y II, y la posibilidad de cancerogénesis química (Bjeldanes y cols., 1991; Vang y cols., 1997).

El indol [3, 2-b] carbazol y el sulforafano (SF) administrado como pretratamiento por 24 h en células *LS-174*, reducen en menos de 20% el número de rompimientos simples producidos por el benzo [a] pireno (BaP) (Bonnesen y cols., 2001).

El SF tiene un efecto anticancerígeno que se reporta ampliamente en la literatura. Es un inductor del factor Nrf2 de transcripción que estimula la respuesta ARE (*antioxidant response element*) que coordina la transcripción de una amplia gama de genes relacionados con el estrés oxidativo y la Fase II del metabolismo xenobiótico (Apéndice 4) (Boelsterli, 2003; Morimitsu y cols., 2002). EL SF ( 0.1-1.5 μM) protege del daño por estrés oxidativo al inducir la glutatión transferasa (GST) en células humanas de cáncer de próstata (LNCaP, MDAPCa2a, MDA, Pca2b, PC-3 y TSU-Pr1) (Brooks y cols., 2001), de igual manera incrementa significativamente la actividad de quinona reductasa en el duodeno de rata en dosis de 7.1 mg/kg/día (Munday R. y Munday M., 2004). Además induce la hemo-oxigenasa, lo que disminuye la incidencia de tumores cancerígenos hasta en 60% en ratas hembras (Fahey y Talalay, 1999). También

induce la apoptosis, el arresto del ciclo celular e inhibe la Fase I, en células humanas de cáncer de próstata, de leucemia (LNCaP, de leucemia HL60/S y HL60/AR) y de mieloma (8226/S y 8226/DOX) (Zhang y Collaway, 2002). Sin embargo la ingesta regular de su precursor, el GRP ha sido cuestionada y contrastada con la ingestión del SF preparado en la industria farmacéutica (Kassie y cols., 1996).

El GRP puede activar la Fase I y generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Apéndice 4), como se ha demostrado en microsomas del pulmón de rata (120 y 240 mg/kg de rata por cuatro días). O bien, facilita la activación metabólica del B [a] P a la forma cancerígena, en levaduras. Por lo que Paolini y cols (2004) sugieren que la administración regular de GRP y de los vegetales que lo contienen podría aumentar el riesgo de cáncer, especialmente en fumadores.

Los isotiocianatos AITC y PEITC, han sido cuestionados por demostrar efectos genotóxicos en pruebas *in vivo* e *in vitro*, debido a su capacidad de generar ROS. En la prueba *in vivo* de reparación del ADN en *E.coli* (con PEITC y AITC en órganos de rata macho albino, dosis de 90 y 270 mg/kg de rata) se encontró que el AITC indujo efecto genotóxico significativo en hígado, pulmón y colon con la dosis baja y en todos los órganos con la dosis alta. El PEITC produjo con ambas dosis un efecto genotóxico, en más de un órgano. En la prueba *in vitro*, los AITC y PEITC (0.5-4 µg/ml) producen genotoxicidad debido a que inducen sustancias reactivas de ácido tio-barbitúrico (TRARS) en células humanas Hep G2. La desintoxicación de estos ITC depende de la conjugación con el glutatión, sin embargo se cree posible que los residuos intracelulares de glutatión se agotaran, por lo que es muy probable que los ITC aumentaran la producción de ROS y la genotoxicidad (Kassie y Knasmüller, 2000).

La acción antioxidante de otros componentes del brócoli, como las vitaminas C y E (Rench y cols., 2005; Vijayaraghavan y Panneerselvam, 2005) (Apéndice 3), se ven disminuidos debido al tiempo después de la cosecha y a la temperatura de almacenaje, entre otros factores (Podsdek, 2005). Estos antioxidantes exhiben efectos pro-oxidantes bajo algunas condiciones

experimentales (Fahey y Talalay, 1999). Por ejemplo el co-tratamiento con retinol (Vitamina A, 96  $\mu\text{M}$ ), causa un incremento significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y grandes en larvas de *D.melanogaster* (prueba SMART). En cultivo de células de Sertoli de rata Wistar (7  $\mu\text{M}$  retinol por 24 h), induce rompimientos dobles y sencillos al ADN como, consecuencia de la generación de radicales hidroxilo (Klamt y cols., 2003). En un estudio de 18,314 fumadores y trabajadores expuestos a asbestos, bajo suplementación de vitamina A en combinación con  $\beta$ -caroteno (25,000 IU, 30 mg por día respectivamente), durante cuatro años, se demostró que no disminuye el riesgo de padecer cáncer de pulmón, por lo contrario provocó enfermedades cardiovasculares (Ommen y cols., 1996). Sin embargo la vitamina A no tiene ningún efecto en el daño al ADN producido por agentes alquilantes directos, tal como el metil metanosulfonato (MMS) (D. Flora y cols., 1999).

En algunos trabajos la vitamina C actúa como pro-oxidante provocando un incremento en la actividad de reparación en el ADN (Rench y cols., 2005; Halliwell, 1999). También puede estimular ROS en prueba *in vitro* reduciendo  $\text{Fe}^{3+}$  al igual que promueve la oxidación de lípidos en el ADN y proteínas en prueba *in vitro* (Halliwell, 1999). El ácido ascórbico (AA) (25, 50 y 75 mM) en co-tratamiento con cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) induce un incremento significativo en la frecuencia de manchas en alas de *D.melanogaster*, debido al aumento de radicales libres producido por esta vitamina e incrementa la producción de radicales OH por  $\text{H}_2\text{O}_2$  vía la reacción de Fenton (Kaya y cols., 2002). Sin embargo este mismo autor (2003) reportó que el co-tratamiento de vitamina C (17 mM) con MMS (0.1 mM), etil metanosulfonato (EMS, 0.05 mM) o N-nitroso-N-eilurea (ENU, 0.01 mM) disminuye el efecto genotóxico inducido por los tres mutágenos.

El efecto genotóxico de la vitamina C ha sido relacionado con su administración en dosis altas. En la prueba *in vitro* de linfocitos con vitamina C en dosis altas (200  $\mu\text{M}$ ), no mostró un efecto protector al tratamiento con radiación ionizante, por lo contrario indujo rompimientos en el ADN (Green y cols., 1994). Konopacka y cols., (1998), encontraron en células de ratón pre-

tratadas con vitamina C (400, 50-10 mg/kg/día), que altas concentraciones de esta vitamina producen radicales hidroxilo por formación peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) vía la reacción de Fenton, al aumentar los niveles de radiación. De manera contraria Gregg y Takahashi (1998), encontraron una tendencia no significativa en el aumento de clastogenia por tratamiento con dosis alta de vitamina C (200 mg/kg de rata inyectada) y DXR (dexorubicin 90mg/kg de rata inyectada). Rensch y cols (2005) reportaron que el AA a dosis de 30 mg/kg de rata y el post-tratamiento con MMS, no reduce el daño producido, pero sí con dosis de 1 mg/kg de rata. Estos autores argumentan que el incremento en rompimientos en el ADN en tratamiento con la ciclofosfamida (CP) se debe a la estimulación de los mecanismos de reparación inducidos por el AA.

El  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) previene de la peroxidación de lípidos, al reducir estos radicales; sin embargo es de poca reactividad. Su oxidación es generada por el ascorbato (vitamina C) que a su vez es reducido por el GSH (Bolsterli, 2003), por lo que la administración combinada de estas vitaminas ha reportado disminuir el riesgo del daño oxidativo al ADN. Ahmad y cols. (2002) reportaron en cultivo de linfocitos humanos que las vitaminas C y E en mezcla previenen del daño cromosómico producido por la hidrocortisona y que su administración por separado contra los esteroides, induce genotoxicidad. Gregg y Takahashi (1998) reportaron en *Rattus norvegicus*, que las dosis de vitaminas C y E (200, 400 y 800 mg/kg) y su mezcla (100, 200 y 400 mg/kg) reducen el número de aberraciones cromosómicas inducidas por doxorubicin (DXR) (90 mg/kg) observado solamente en altas dosis de estas vitaminas y de su mezcla. Por otra parte la suplementación en altas dosis de vitamina C y E disminuye el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer en individuos de 65 años de edad (Morris y cols., 1998), y en pacientes con la enfermedad declarada, disminuye la oxidación de lipoproteínas y de fluido cerebroespinal (Kontush y cols., 2001). Konopacka y cols. (1998) encontraron que el efecto protector del daño en el ADN por radiación gama, con la mezcla de vitamina E y C se debe a que esta última dona un hidrógeno a la vitamina E regenerándola

y promoviendo así su acción antioxidante (Bolsterli, 2003). La vitamina E disminuye significativamente el número de rompimientos al ADN inducidos por el peróxido de hidrógeno en pre- tratamiento de células V79 de hámster, sin embargo no tiene efecto protector en los niveles de rompimientos inducidos por la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) y el MMS (Horváthova y cols., 1998).

El efecto de la hidrólisis de los glucosinolatos así como de las vitaminas contenidas en el brócoli pueden tener diferentes efectos de antagonismo o sinergia lo cual depende de diferentes factores: el sistema de prueba, el tejido, el tipo de cancerígeno, la concentración y el tiempo de prueba (Verhoeven y cols., 1997).

## Metil metanosulfonato (MMS)

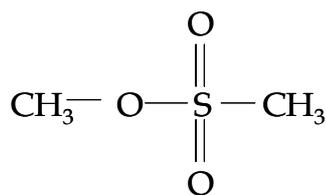


Figura 4. Metil metanosulfonato  
(Vogel, 1991)

El metil metanosulfonato (Figura 4) es utilizado como solvente, insecticida y agente quimioterapéutico. Es un alquilante mutagénico, que posee gran afinidad a centros nucleofílicos del ADN como el N7G. Debido a que el reactivo final del MMS es el ión metilo ( $\text{CH}_3^+$ ) tiene propiedades electrofílicas y un *s-value* alto ( $s > 0.83$ ). Tiene una vía de reacción alquilante  $\text{SN}_2$  y es de tipo monofuncional porque sólo dona un metilo a cualquier oxígeno o nitrógeno de las bases nitrogenadas, excepto el N1 de la pirimidinas y el N9 de las purinas que se unen a la d-ribosa (Jenkins y cols., 2005). El MMS es de tipo directo, porque no necesita ser metabolizado para inducir alquilaciones al ADN (Friedberg y cols., 1995) y produce un 9% de transiciones (Poltorasky y cols., 2005; Vogel, 1991).

De los aductos que forma el MMS 81-83% son en N7G, 10.4-11.3% en N3A, 1.8% en N7A, 0.6% en N3G, 0.3% en O<sup>6</sup>G y <1 en N3C (Jenkins y cols., 2005). La alquilación del oxígeno en los enlaces fosfodiéster produce fosfotriésteres en 1% (Friedberg y cols., 1995). El MMS puede inducir daño oxidativo (Rench y cols., 2005; Horváthova y cols., 1998). Se clasifica como un mutágeno relativamente débil (Tao y cols., 1993), posiblemente porque los aductos predominantes N7G y N3A no son mutagénicos por sí mismos, ya que puede ocurrir la replicación sin desemparejamientos. Producen sitios apurínicos/apirimídicos (AP) porque tiende a romperse espontáneamente el anillo en los C8 y C9, y hay labilidad de la unión glicosídica con el C1 de la d-ribosa. Estos sitios AP producen mutaciones cuando posteriormente se inserta una base incorrecta, o después de la replicación, si provocaron rupturas simples éstas se convierten en dobles (DSB por el inglés *double-strand breaks*) lo que provoca reparación por recombinación y unión de bandas. Además al abrirse el

anillo metilado (7 meG) inhibe la replicación y es potencialmente mutagénico (Jenkins y cols., 2005).

Se sabe que el sistema de reparación por escisión de bases (BER) interviene en la reparación de N7-meG y N3-meA, por lo que puede contribuir a determinar el umbral de respuesta genotóxica del MMS (Jenkins y cols., 2005; Warren y cols., 1999) (Figura 5).

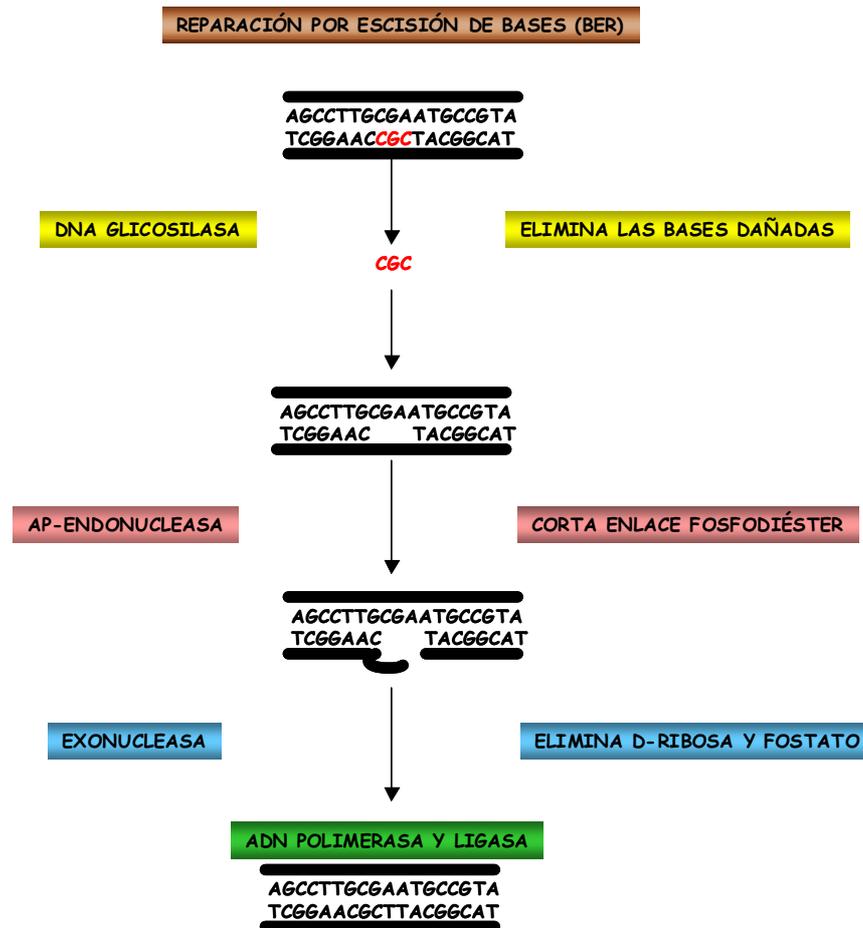


Figura 5. Sistema de reparación por escisión de bases (BER). El mecanismo de BER implica la escisión de una o hasta siete bases del ADN por acción de glicosilasas que rompen el enlace glucosídico entre el C1 de la desoxirribosa y el N1 de las pirimidinas o el N9 de las purinas. Eso provoca la formación de sitios AP que activan a AP-endonucleasas las cuales rompen un enlace azúcar-fosfato en los sitios 5' ó 3' cercanos al daño. Posteriormente exonucleasas (también nombradas dRpasas) eliminan los residuos del esqueleto azúcar-fosfato sin bases. Una vez que se ha eliminado la zona dañada, la ADN polimerasa sintetiza el segmento faltante (5'→3') y una ligasa une los extremos libres (Friedberg y cols., 1995)

Los daños del MMS también son reparados por alquiltransferasas. Existen tres sistemas principales que reparan los daños producidos por el MMS al N3 de la adenina (N3A): la reparación post-replicativa (recombinación de

homólogos (HRR) y la reparación por edición durante la replicación (Jenkins y cols., 2005). Sin embargo la apoptosis y los check points (puntos de chequeo) son otros sistemas de protección de la célula que son independientes del tipo de daño producido.

En *Drosophila melanogaster* se han reportado cinco principales mecanismos de reparación: escisión (BER y NER) y mecanismo de tolerancia al daño (SOS) en pre-replicación y en la post-replicación, ocurre la recombinación de homólogos (HRR), la SSA (*Drosophila* conference, 2006) y la eliminación por desemparejamiento (MMR) (De Buendía, 1998; Dusenbery y Smith, 1996) (Cuadro 1). Se ha reportado que las células son más sensibles al MMS durante la fase S del ciclo celular (Chang y cols., 2002).

En el 2004, Seidel y cols. reportaron que el MMS altera la expresión de los genes asociados con la apoptosis, lo que puede estar involucrado en la respuesta al estrés y la desintoxicación.

Glaab y cols. (1999), realizaron un estudio para determinar la citotoxicidad y respuesta mutagénica en células humanas por los daños provocado por el MMS, que puede modular al sistema de reparación MMR. Encontraron que la cito-toxicidad y la respuesta mutagénica medida por MMR, se debió a la formación de sitios AP.

Cuadro 1. Principales mecanismos de reparación en *Drosophila melanogaster* (datos de Luque-Cabrera y Herráez-Sánchez, 2001; Smith y Jones, 1999; Friedberg y cols., 1995).

Sistema de Reparación	Tipo de lesión reparada	Método de reparación
<b>Pre-replicativa</b>		
Sistema de reparación por escisión de bases (BER)	Daños por hidrólisis (pérdida o desaminación de base), oxidación por radicales libres de oxígeno, alquilación y derivados no voluminosos como la timina glicol, o-hidroxiguanina, etc.	Figura 5.
Sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER)	Alteraciones que causan distorsión en la doble hélice como los dímeros de timina o una base con un sustituyente voluminoso (psoraleno, cisplatino, acetamidofluoreno, etc.), el más importante contra el daño al ADN provocado por el humo de tabaco.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Reconocimiento de la lesión por unión de proteínas del complejo de reparación (gasto de ATP).</li> <li>2) La endonucleasa corta sólo una de las hebras de ADN a ambos lados del punto de mutación.</li> <li>3) La helicasa favorece la separación del oligonucleótido liberado.</li> <li>4) La DNA-pol realiza la elongación por el extremo 3'-OH (fase de síntesis).</li> <li>5) DNA ligasa une el extremo 3'OH recién sintetizado con el extremo 5'-P formado en el corte de la hebra original.</li> </ol>
Tolerancia a los defectos durante la síntesis o translesión	La mayoría de las mutaciones que se producen por daño al ADN durante la fase G1.	Este mecanismo realmente no repara del daño, lo que ocurre es que una ADN pol inserta un nucleótido incorrecto frente a una lesión y continua la síntesis.
<b>Post-replicativa</b>		
Reparación de desemparejamientos o corrección de errores (MMR: mismatch repair)	El origen de estos daños es múltiple, por ejemplo, por errores en la replicación, por translesión, por formación de	De manera general las proteínas de este mecanismo de reparación reconocen las bases incorrectamente apareadas, las eliminan o

	heterodúplex entre dos moléculas homólogas del ADN recombinantes o por desaminación de 5-metilcitosina.	bien un tramo de la hebra de ADN que los contiene. Participan BER o NER con intervención del DNA pol. $\delta$ y $\epsilon$ y sus cofactores RFC y PCNA.
Reparación por recombinación de homólogos (HRR)	Rompimientos en una o ambas hebras de ADN (SSB, DSB), provocados por radiación ionizante, ROS, etc.	HRR permite que una o dos aberturas sean llenadas por la proteína RecA que transfiere la banda complementaria del dúplex en la abertura.
Reparación por recombinación entre no homólogos (NHEJ)	Rompimientos dobles (DSB) en su mayoría después de la fase S, por defectos en la replicación en presencia de rompimientos simples.	De manera general después del reconocimiento del daño puede ocurrir una ligadura directa entre ambos segmentos no homólogos o producirse una deleción o inserción para encontrar el punto homólogo entre ambos segmentos.
Reparación SSA (single-strand annealing)	Rompimientos dobles entre no homólogos.	La recombinación es iniciada al encontrar un rompimiento doble sin necesidad de una región homóloga. El extremo de la hebra de ADN es degradado por una exonucleasa específica o desenrollando por la helicasa mostrando la hebra simple, repitiendo la secuencia. La región homóloga regresa a la forma heteroduplex y la 3' ssDNA (hebra simple ADN) es removida. La recombinación es completada por la síntesis de reparación y ligación.

## *Drosophila melanogaster*



Figura 6. *Drosophila melanogaster*

Comúnmente conocida como la mosca del vinagre o de la fruta (Figura 6), es uno de los organismos eucariontes más utilizados en investigaciones biológicas, particularmente en Genética y en Biología del desarrollo (Cullinton, 2000). Este organismo holometábolo presenta ciclos de vida de diez días a 25 ° C y genera numerosos individuos por generación (Apéndice 1). Es fácil de manipular, además 25.2% de sus proteínas son similares, en 80% de su secuencia, a las de mamíferos (Rubin y cols., 2000).

Se ha demostrado que *Drosophila melanogaster* tiene enzimas CYP450 similares a las encontradas en la fracción S9 del hígado de mamíferos. Danielson y cols. (1997, 1998), Hällström y cols. (1984) y Clark, (1982) han probado que la familia CYP6 de *D.melanogaster* muestra una fuerte homología con la familia CYP3 de vertebrados. Saner y cols. (1996) y Dunkov y cols. (1997) han caracterizado el gen CYP6A2 en *D. melanogaster* que es responsable del metabolismo xenobiótico en la cruzada HB del ensayo SMART en ala de *D. melanogaster*.

En la actualidad se cuenta con líneas construidas con marcadores genéticos específicos, para investigar *in vivo* los efectos de agentes químicos a los cuales se somete *D. melanogaster*. Los efectos pueden observarse morfológicamente por la aparición o pérdida de marcadores fenotípicos o bioquímicos en las células germinales y somáticas, en la prueba de letales recesivos ligados al sexo, y en alas u ojos respectivamente (Vogel y cols., 1999). Este eucarionte ha sido utilizado en la Genética Toxicológica debido a que presenta sensibilidad en la etapa de diferenciación celular, es decir, en las

células de los discos imagales, en las cuales los mutágenos pueden ser activados (Graf y cols., 1996) (Apéndice 2).

Debido a lo anterior y a que el MMS es un agente alquilante directo, se espera encontrar resultados similares en las larvas de las cruzas Estándar (E) y Bioactivación elevada (BE) de la prueba SMART.

Savina y cols. (2003) reportó en *Drosophila melanogaster* con la prueba de letales resesivos ligados al sexo, en tratamientos crónicos (pre-tratamiento de 12 h) a machos adultos, tratamiento a hembras (12 h) y larvas (pre-tratamiento crónico de 24 h), que el MMS a la concentración de 0.1 mM prácticamente no es genotóxico y que no afecta las funciones fisiológicas de los machos, es decir, no provoca esterilidad.

Heres-Pulido (2001) determinó que en la craza estándar (E) de la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART), en ala de *D. melanogaster* con un tratamiento agudo (2 h) en larvas de  $72 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$ , las hembras fueron más sensibles al daño producido por el MMS (2 mM).

## **Prueba de Mutación y Recombinación Somática**

La Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en el ala de *D. melanogaster* se utiliza para determinar la actividad mutagénica (mutaciones puntuales, deleciones, aneuploidías y recombinogénica provocada por agentes químicos en sistemas eucariontes *in vivo* (Spanó y cols., 2001) (Cuadro 2). Esta prueba ha demostrado ser eficaz al confirmarse con más de 400 agentes químicos, puros y en mezclas (Vogel y cols., 1999). *D. melanogaster* ha sido utilizada en la prueba SMART (Apéndice 2) en tratamiento crónico con MMS por 48 h (Hertzog-Santos y cols., 1999; Lehman y cols., 2000, entre otros), y en tratamiento agudo (Graf y cols., 1990).

Cuadro 2. Ensayos o pruebas genotóxicas utilizadas para el estudio del daño genético inducido en los diferentes niveles (modificado de Sánchez Lamar y cols., 2000).

#### **Nivel I. Ensayos para mutaciones génicas**

- Prueba de Ames (*Salmonella typhimurium*/ microsomas de mamífero).
- Prueba de mutaciones puntuales en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Letales recesivos ligados al sexo en *Drosophila melanogaster*.
- Prueba de mutación y recombinación somática en ojo y ala de *Drosophila melanogaster* (SMART).
- Prueba de mutación de los pelos estaminales de *Tradescantia*.

#### **Nivel II. Ensayos para mutaciones cromosómicas**

- Prueba citogenética *in vitro* en células de mamíferos.
- Prueba citogénica *in vivo* en ratones.
- Prueba de micronúcleos (ratones y células de ovario de Criceto Chino: CHO).
- Prueba de letales dominantes en ratones.
- Prueba de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster* (SMART): deleciones y aneuploidías.
- Prueba citogenética de las células merestimáticas de la raíz de *Vicia faba*.

#### **Nivel III. Ensayos para daño primario al ADN**

- Prueba de segregación mitótica en *Aspergillus nidulans*.
- Prueba de conversión génica y recombinación mitótica en *Saccharomyces cerevisiae*.
- Prueba de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster* (SMART).
- Prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) *in vitro* con células de mamíferos.

#### **Nivel IV. Otros ensayos**

- Prueba de la morfología de la cabeza del espermatozoide en ratones.
- Prueba de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster* (SMART): detección de recombinación mitótica.

Donde el Nivel I indica mutaciones génicas (cambio de uno o pocos pares de bases) como son las mutaciones de sustitución de pares de bases y las mutaciones de corrimiento de lectura; Nivel II, daños por aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas; Nivel III, alteración al ADN (formación de aductos) y Nivel IV, daño a los mecanismos de reparación del ADN.

## OBJETIVOS

### General

- Demostrar con el mutágeno MMS que la alimentación con brócoli no protege del daño provocado por este agente directo, ya que se ha reportado que esta crucífera tiene actividad anticancerígena-antigenotóxica por inducción de la Fase I y II de metabolismo xenobiótico, el cual no interviene en la reparación de alquilos en el ADN.

### Particulares

- Obtención de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) para el MMS con el fin de utilizar una concentración subtóxica (>50% sobrevivencia).
- Determinar si existe interacción entre el brócoli y el MMS mediante la prueba SMART en ala, cruzas E y BE.
- Asumiendo una mayor sensibilidad de las hembras a la acción del MMS, evaluar su respuesta en los co-tratamientos crónicos y en el testigo MMS.

## HIPÓTESIS

- El MMS es un agente alquilante directo entonces no se espera encontrar diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de manchas/individuo entre las cruzas E y BE tanto en los co-tratamientos como en el testigo MMS, ni entre ellos.
- Si el brócoli muestra actividad de protección al MMS, entonces se observarán diferencias estadísticamente significativas menores en las frecuencias de manchas en alas de *D. melanogaster* alimentadas con brócoli y tratadas con el MMS.
- Si las hembras de *D. melanogaster* tratadas crónicamente con MMS en SMART en ala presentan mayor sensibilidad, entonces el daño será estadísticamente significativo y mayor con respecto a los machos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Químicos y *B. olareacea* var. *italica*

El MMS (CAS 66-27-3, pureza 98%) se obtuvo de Sigma (St Luis, MO, EUA) y se disolvió en agua destilada. El Medio Instantáneo Carolina (DIM) se obtuvo de Carolina Biological Supply Co. (Burlington, North Carolina, EUA). El brócoli orgánicamente cultivado (1 kg) y refrigerado a  $-5^{\circ}\text{C}$  inmediatamente después de su recolección, fue donado por la empresa Mar Bran Co. de Irapuato, Guanajuato. Para los tratamientos, el brócoli congelado y crudo se cortó en trozos pequeños, se liofilizó en el equipo LabConco (Freeze Dry System/Freezore 4.5) al vacío  $10^{-3}$  MBAR por 72 h a  $-51^{\circ}\text{C}$ , se maceró congelado hasta pulverizarlo y se conservó en un sitio fresco y seco para su uso posterior.

### Obtención de las larvas de *D. melanogaster*

Se colectaron huevos de las cruzas E y BE de la prueba en ala de *D. melanogaster* (ver apéndice 2) en medio de levadura activada con solución de sacarosa, bajo condiciones de oscuridad, a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  y HR 60% durante 8 h. Tres días después, las larvas de  $72 \pm 4$  h de edad se retiraron del medio lavando con agua corriente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) y con la ayuda de un colador metálico de malla muy fina (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

### Tratamientos para determinar $CL_{50}$

Se realizaron tres experimentos independientes con tres réplicas por tratamiento con 20 larvas c/u de las líneas *flare* y *Oregon-flare* colocadas por separado en tubos de ensayo con 0.5 g de Medio Instantáneo Drosophila (DIM) y 2 ml (0, 0.03, 0.09, 0.18, 0.37, 0.75, 1.5, 3.0 y 6.0 mM) de MMS.

### Tratamientos para SMART en ala

Para SMART en ala se sometieron las larvas de  $72 \pm 4$  h de edad (tercer estadio) de las cruces E y BE a tratamientos crónicos (hasta llegar al estado de pupa) con diferentes proporciones de brócoli (0, 25, 50 y 100% p/p) en DIM, con 2 ml de MMS (0.5 mM), a un total de 2 g/vial, en tres experimentos independientes. Los testigos negativos fueron dos: uno sólo con brócoli y otro con medio DIM más agua destilada. Las diferencias entre las cruces E y BE en relación al metabolismo xenobiótico se comprobaron con uretano (20mM).

### Manchas en alas

Después de 10-12 días de haber colectado los huevos, los imagos que emergieron se colectaron en frascos viales con alcohol al 70%. Posteriormente se montaron las alas en solución de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato cloral y 50 ml de agua) para realizar preparaciones permanentes. Se analizaron 60 individuos por tratamiento (tamaño de muestra óptimo para la prueba) (Frei y Würigler, 1995).

Se revisaron las dos superficies de cada ala en un microscopio óptico a 40X, registrando el número y tipos de mancha o clones de células mutantes presentes (Graf y cols., 1984). En cada caso el tamaño de las manchas se determinó con base al número de células que presentan el fenotipo *mwh* o el *flr<sup>3</sup>*. Se reconocieron 3 categorías de manchas: (1) manchas *mwh* simples, (2) manchas *flr<sup>3</sup>* simples y (3) manchas gemelas (manchas que exhiben áreas *mwh* y *flr<sup>3</sup>* adyacentes por recombinación).

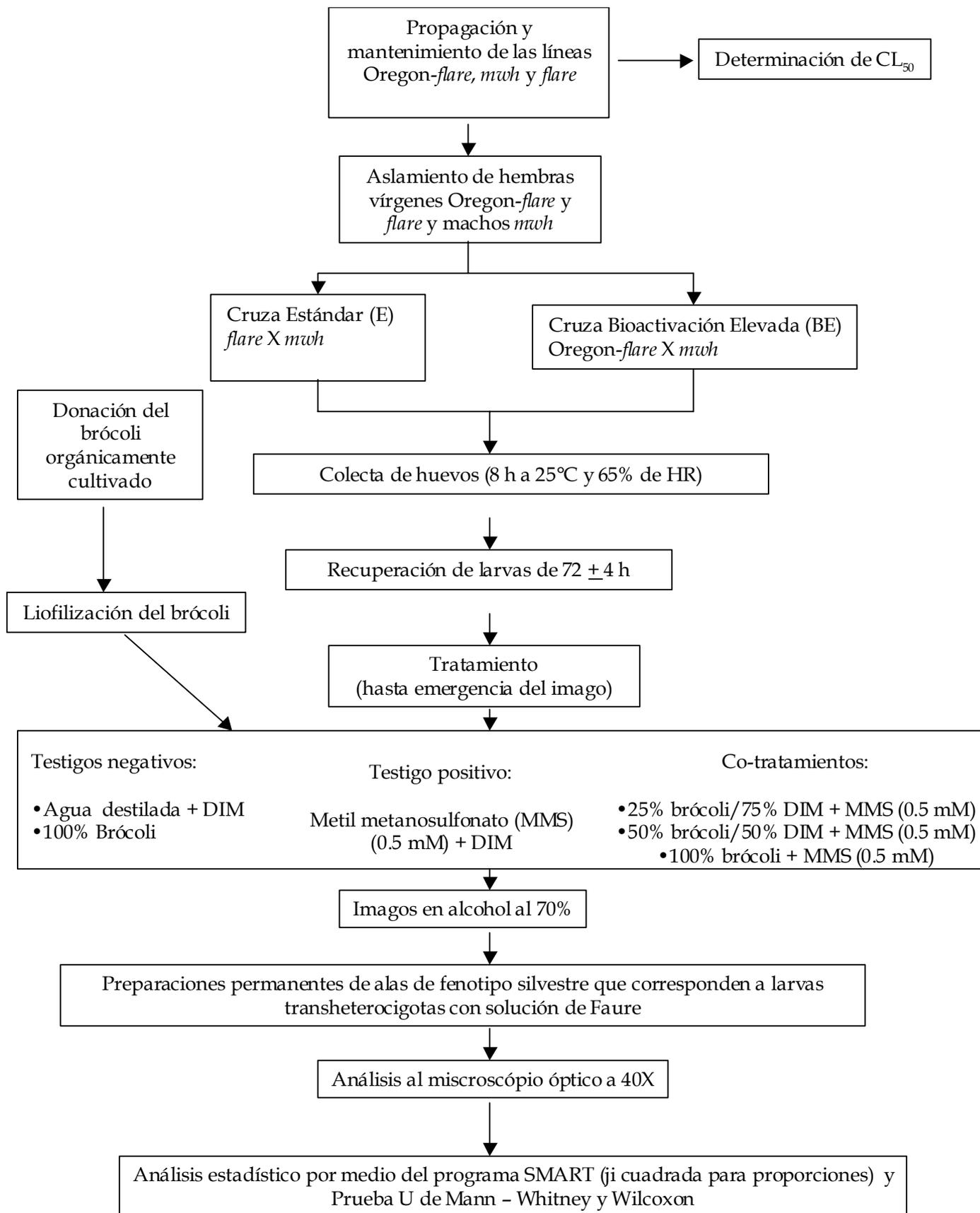
### Análisis estadístico para CL<sub>50</sub> y SMART

El criterio para definir sobrevivencia fue el de considerar vivas a las moscas que podían volar. Por medio del análisis de regresión polinomial entre concentración y mortalidad se determinó la CL<sub>50</sub> del MMS. Se asumió de acuerdo con los parámetros toxicológicos, que la ordenada al origen corresponde a la sensibilidad (o susceptibilidad) entre las líneas al MMS,

asimismo que la pendiente hace referencia a la potencia o la intensidad al daño provocado por el MMS sobre ambas líneas. Por el análisis estadístico ANOVA de un factor se analizaron las posibles diferencias entre la  $CL_{50}$  en las dos líneas, así como de la diferencia en la sensibilidad y la potencia entre los experimentos. Se utilizó la prueba estadística de ANOVA de dos factores para corroborar diferencias entre las concentraciones y los tres experimentos.

Para el análisis estadístico de SMART se utilizó el programa para PC SMART que evalúa estadísticamente las frecuencias de las manchas en las alas (Frei y Würgler, 1988). Para determinar la significancia estadística de la frecuencia de manchas por individuo se utiliza la regla de decisión múltiple, que realiza análisis estadístico basado en ji cuadrada, además se verificó que las diferencias cumplieran el valor de factor multiplicador ( $m$ ) que indica que para manchas gemelas y totales el valor comparado debe ser el doble ( $m= 2$ ) para que la diferencia sea significativa y en manchas gemelas y grandes el quíntuplo ( $m= 5$ ) (Frei y Würgler, 1988). Con el número y tamaño de los clones de *mwh* se calculó la frecuencia de inducción genotóxica por célula. Por medio de la frecuencia y el tamaño del clon *mwh* se demuestra indirectamente la acción alquilante directa del MMS, que se observa cuando hay una frecuencia estadísticamente significativa de clones grandes (33 a 64 células). En el caso de obtener resultados débiles o indecisos se optó por realizar el análisis con la prueba no paramétrica U de Wilcoxon-Mann-Whitney que considera la variabilidad individual (Frei y Würgler, 1995).

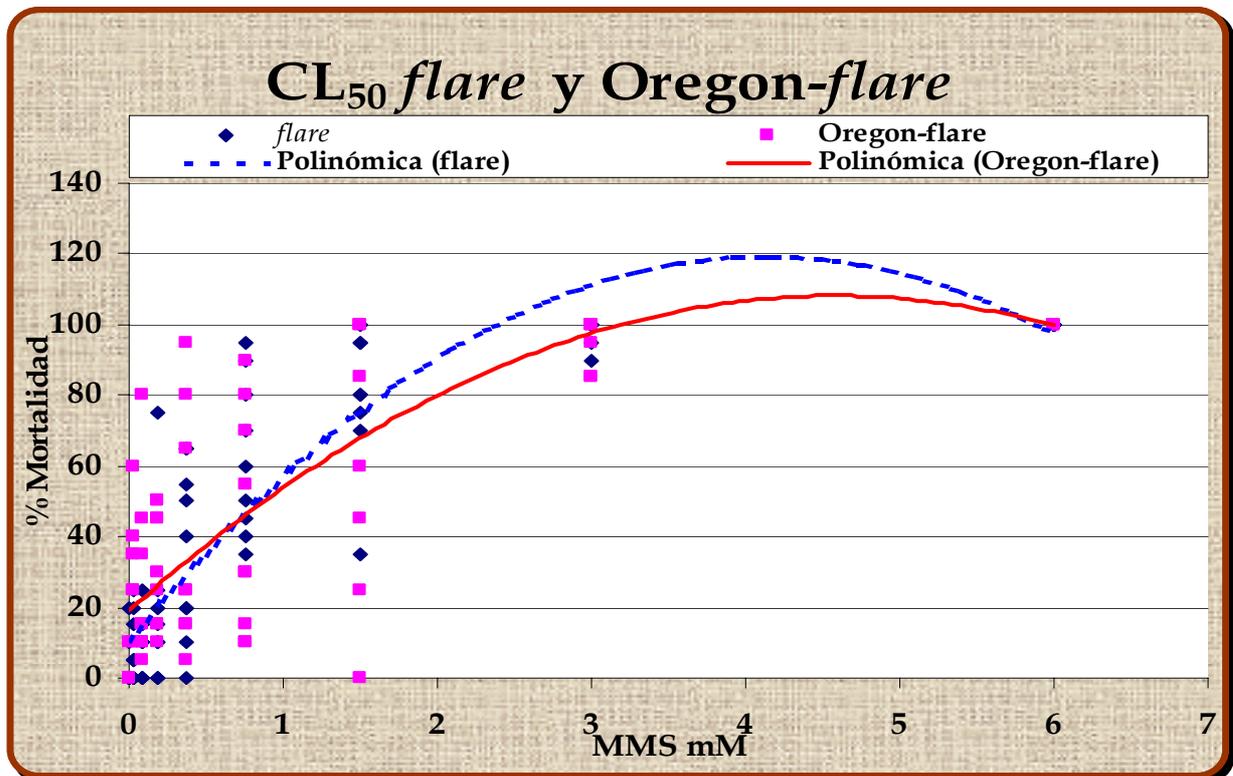
# METODOLOGÍA



## RESULTADOS

### CL<sub>50</sub>

En la gráfica 1 se muestran los resultados de mortalidad de la línea *flare* y Oregon-*flare*. Hay una relación polinómica de concentración respuesta, esto es, que a medida que aumenta la concentración la mortalidad asciende. El análisis de ANOVA de dos factores demostró que existen diferencias en las concentraciones de los tres experimentos independientes. Hay una gran dispersión antes de 1 mM en *flare* y de 1.5 mM en Oregon *flare*, lo cual explica que no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los experimentos, ni entre las líneas. La CL<sub>50</sub> calculada fue 0.9 mM para la línea Oregon-*flare* y 0.87 mM para la línea *flare*. Por medio del análisis estadístico ANOVA de un factor se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las CL<sub>50</sub> para las dos líneas mutantes (*flare* y Oregon-*flare*), de igual manera en la potencia y la sensibilidad ( $p>0.05$ ), por lo que la CL<sub>50</sub> para ambas líneas es de 0.9 mM. La CL<sub>40</sub> calculada fue de 0.5 mM de MMS, la cual se utilizó para la prueba SMART con el fin de disminuir la dispersión a dosis mas bajas además de tener un número mayor de individuos para la prueba.

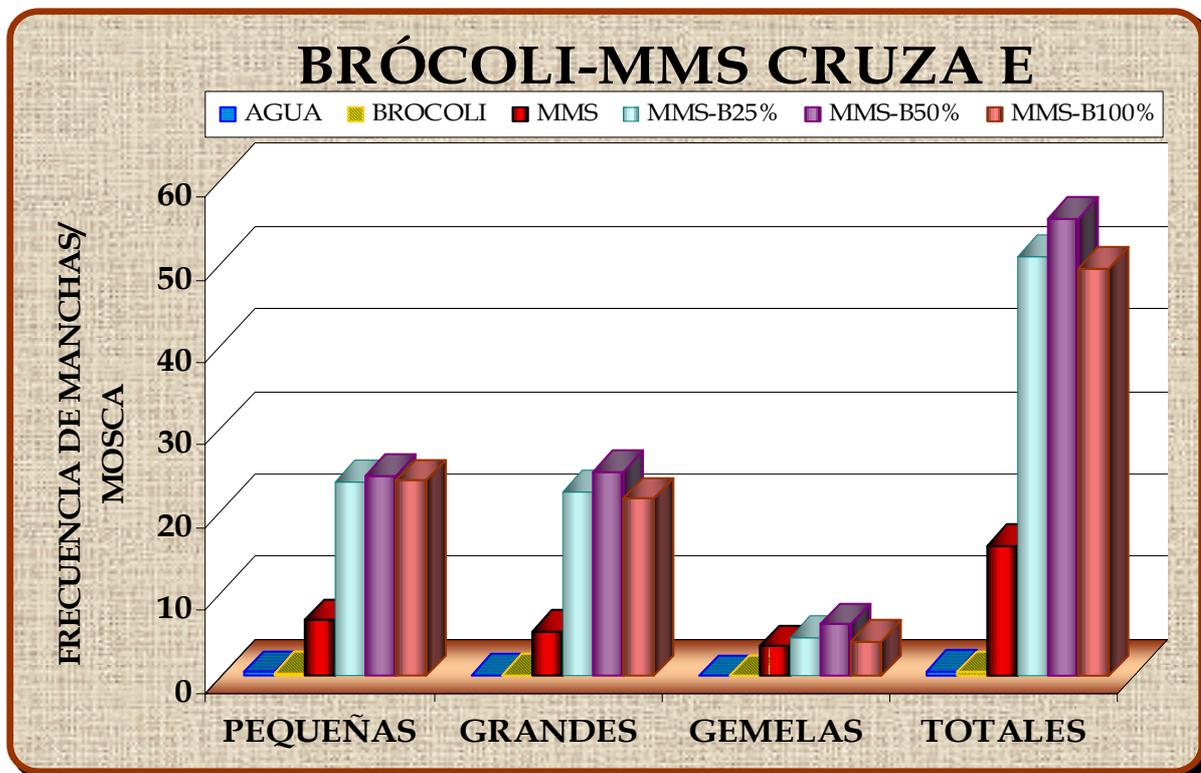


Gráfica 1. Correlación entre la mortalidad y el tratamiento con diferentes concentraciones de MMS de las líneas *flare* y *Oregon-flare*.

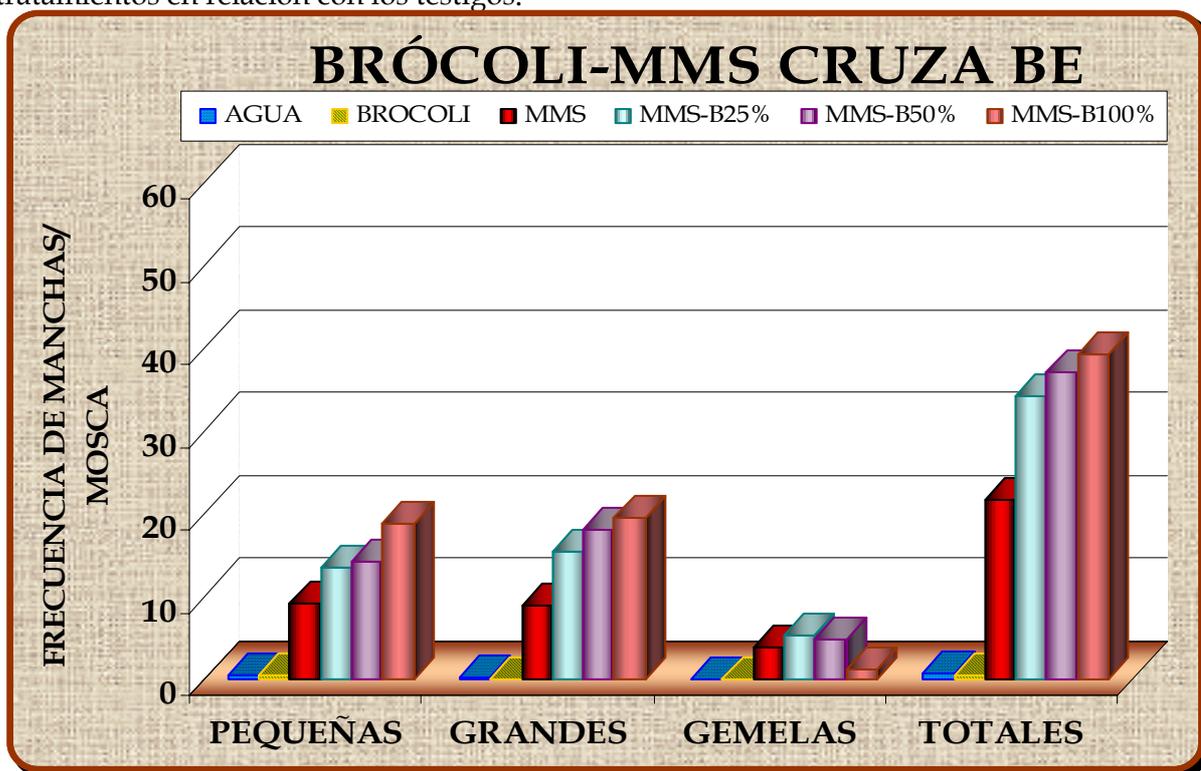
## SMART

### Frecuencia de Manchas

En las gráficas 2 y 3, se muestra el número de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales encontradas en los individuos sometidos a los diferentes tratamientos en las cruza E y BE. Estos resultados se contrastaron con el testigo histórico H<sub>2</sub>O para la cruza E y BE respectivamente, obtenido en el Laboratorio de Genética Toxicológica de la FES I, con los resultados de 33 experimentos independientes. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar al testigo brócoli con el H<sub>2</sub>O como tratamiento en BE, a diferencia de E en donde no se presentaron diferencias entre los testigos negativos (Cuadro 3).



Gráfica 2. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de los testigos negativos (agua y brócoli), del testigo positivo MMS y los co-tratamientos para la cruz E. Se observa un aumento significativo en la frecuencia de manchas de los co-tratamientos en relación con los testigos.



Gráfica 3. Frecuencia de manchas pequeñas, grandes, gemelas y totales de los testigos negativos (agua y brócoli), del testigo positivo MMS y los co-tratamientos para la cruz BE. Se observa un aumento significativo en la frecuencia de manchas de los co-tratamientos en relación con los testigos.

Cuadro 3. Resultados obtenidos con el ensayo del ala de *D. melanogaster*, se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca para los testigos brócoli y agua de BE y E, así como el diagnóstico estadístico de acuerdo con las pruebas ji cuadrada y U de Mann-Whitney-Wilcoxon y para SMART (Cruza E y BE).

Compuesto	No. de moscas	Manchas pequeñas (1-2 células) m= 2.00	Manchas grandes (>2 células) m= 5.00	Manchas gemelas m= 5.00	Manchas totales m= 2.00	Clones mwh
-----------	---------------	--	--------------------------------------	-------------------------	-------------------------	------------

Cruza E						
Brócoli 100%	120	0.42 (50)	0.08 (10)	0.02 (2)	0.52(62)	43
H <sub>2</sub> O	669 -	0.49 (325)	0.09 (59) -	0.02 (13)	0.59 (397) -	362
		-		i,ns		

Cruza BE						
Brócoli 100%	120	0.40 (48)	0.07 (8)	0.00 (0)	0.47 (56)	52
H <sub>2</sub> O	864	0.53 (460)-	0.12 (105)-	0.05 (40)+,*	0.70 (605)+,*	583

Diagnóstico estadístico acordado por Frei y Würzler (*Mutat. Res.*, **203** (1988) 297-308)  
 + = positivo; - = negativo; i = inconcluso. m = factor multiplicado.

Nivel de probabilidad :  $\alpha = \beta = 0.05$ . (Prueba estadística de una sola cola). Al lado se presenta el diagnóstico estadístico de la prueba de U Mann-Whitney-Wilcoxon con modificación para una cola. Donde **ns**, no significativo respecto al testigos brócoli; \* significativo con  $p \leq 0.05$  (Frei y Würzler, 1995, *Mutat. Res.*; **334**, 247-258).

En el Cuadro 4 se muestran las frecuencias de manchas / individuo, en las cruza E y BE en las que se contrastaron los testigos negativos agua y brócoli contra los co-tratamientos y el testigo MMS. Estos dos últimos fueron positivos respecto a los testigos negativos, con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

Cuadro 4. Resultados obtenidos con el ensayo del ala de *D. melanogaster*, se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca para cada tratamiento, así como el diagnóstico estadístico de acuerdo con las pruebas ji cuadrada y U de Mann-Whitney-Wilcoxon y para SMART (Cruza E y BE).

Compuesto	No. de moscas	Manchas pequeñas (1-2 células) m= 2.00	Manchas grandes (>2 células) m= 5.00	Manchas gemelas m= 5.00	Manchas totales m= 2.00	Clones mwh
-----------	---------------	---	---	----------------------------	----------------------------	------------

Cruza E						
H <sub>2</sub> O	669	0.49 (325)	0.09 (59)	0.02 (13)	0.59 (397)	362
Brócoli 100%	120	0.42 (50) -	0.08 (10)-	0.02 (2)-	0.52(62)-	43
MMS 0.5 mM	60	6.78 (407)+,*	5.38 (323)+,*	3.65 (219)+,*	15.82 (949)+,*	730
25% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	23.68 (1421)+,*	22.43 (1346)+,*	4.75 (285)+,*	50.87 (3052)+,*	2253
50% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	24.33 (1460)+,*	24.75 (1485)+,*	6.33 (380)+,*	55.42 (3325)+,*	2370
100% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	23.73 (1424)+,*	21.52 (1291)+,*	4.27 (256)+,*	49.52 (2971)+,*	1987

Cruza BE						
H <sub>2</sub> O	864	0.53 (460)	0.12 (105)	0.05 (40)	0.70 (605)	583
Brócoli 100%	120	0.40 (48) -	0.07 (8) -	0.00 (0) -	0.47 (56) -	52
MMS 0.5 mM	60	9.15 (549) +,*	8.88 (533)+,*	3.72 (223)+,*	21.75 (1305)+,*	1172
25% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	13.58 (815)+,*	15.37 (922)+,*	5.33 (320)+,*	34.28 (2057)+,*	1502
50% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	14.25 (855)+,*	18.07 (10.84)+,*	4.87 (292)+,*	37.18 (2231)+,*	1396

100% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	18.68 (1121)+,*	19.50 (1170)+,*	1.22 (73) +,*	39.40 (2364)+,*	1662
------------------------------------	----	--------------------	--------------------	------------------	--------------------	------

Diagnóstico estadístico acordado por Frei y Würgler (*Mutat. Res.*, **203** (1988) 297-308)

+ = positivo; - = negativo; i = inconcluso. m = factor multiplicado.

Nivel de probabilidad :  $\alpha = \beta = 0.05$ . (Prueba estadística de una sola cola). Al lado se presenta el diagnóstico estadístico de la prueba de U Mann-Whitney-Wilcoxon con modificación para una cola. Donde **ns**, no significativo respecto a los testigos agua y brócoli; \* significativo con  $p \leq 0.05$  (Frei y Würgler, 1995, *Mutat. Res.*; **334**, 247-258).

En el testigo negativo MMS se obtuvo una frecuencia de manchas totales por individuo de 15.82 para E y 21.75 para BE. Por medio de la prueba no paramétrica de U (Mann-Whitney-Wilcoxon) se demostró que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las cruzas.

Al comparar el testigo MMS con los co-tratamientos (brócoli 25%, 50% y 100% + MMS (Cuadro 5) se demostró un aumento estadísticamente significativo ( $p \leq 0.05$ ) en el número de frecuencia de manchas pequeñas, grandes y totales en E (gráfica 2). En BE no se presentó aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas grandes para ningún co-tratamiento y de igual manera ocurrió en manchas gemelas, pequeñas y totales para el co-tratamiento 25% brócoli + MMS. En ambas cruzas se obtuvo resultado negativo en manchas gemelas para el co-tratamiento 100% brócoli + MMS.

A pesar de las aparentes diferencias observadas en el número de frecuencia de manchas / mosca entre las cruzas, éstas no fueron estadísticamente diferentes al corroborarse con el programa SMART de una cola y la prueba de U (Mann-Whitney-Wilcoxon). Esto se hizo contrastando E con BE y viceversa, por ejemplo se tomaron los resultados del co-tratamiento 25% brócoli más MMS (0.5 mM) de BE como testigo y a los de la cruz E con el mismo co-tratamiento como tratamiento y así sucesivamente.

Cuadro 5. Resultados obtenidos con el ensayo del ala de *D. melanogaster*, se muestra la frecuencia y el número de manchas por mosca para el testigo MMS y los co-tratamientos, así como el diagnóstico estadístico de acuerdo con las pruebas ji cuadrada y U de Mann-Whitney-Wilcoxon y para SMART (Cruza E y BE).

Compuesto	No. de moscas	Manchas pequeñas (1-2 células) m= 2.00	Manchas grandes (>2 células) m= 5.00	Manchas gemelas m= 5.00	Manchas totales m= 2.00	Clones mwh
-----------	---------------	---	---	----------------------------	----------------------------	------------

Cruza E						
MMS 0.5 mM	60	6.78 (407)	5.38 (323)	3.65 (219)	15.82 (949)	730
25% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	23.68 (1421)+,*	22.43 (1346)+,*	4.75 (285)w, ns	50.87 (3052)+,*	2253
50% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	24.33 (1460)+,*	24.75 (1485)+,*	6.33 (380)w, ns	55.42 (3325)+,*	2370
100% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	23.73 (1424)+,*	21.52 (1291)+,*	4.27 (256) -	49.52 (2971)+,*	1987

Cruza BE						
MMS 0.5 mM	60	9.15 (549)	8.88 (533)	3.72 (223)	21.75 (1305)	1172
25% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	13.58 (815)w, ns	15.37 (922)w, ns	5.33 (320)w, ns	34.28 (2057)w, ns	1502
50% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	14.25 (855)w, s *	18.07 (10.84)w, ns	4.87 (292)w, s *	37.18 (2231)+, *	1396
100% Brócoli + MMS 0.5 mM	60	18.68 (1121)+, *	19.50 (1170)w, ns	1.22 (73) -, *	39.40 (2364)+, *	1662

Diagnóstico estadístico acordado por Frei y Würzler (*Mutat. Res.*, **203** (1988) 297-308) + = positivo; - = negativo; m = factor multiplicado. Nivel de probabilidad :  $\alpha = \beta = 0.05$ .

(Prueba estadística de una sola cola). Al lado se presenta el diagnóstico estadístico de la prueba de U Mann-Whitney-Wilcoxon con modificación para una cola. Donde **ns**, no significativo respecto al testigo MMS; \* significativo con  $p \leq 0.05$  (Frei y Würigler, 1995, *Mutat. Res*; **334**, 247-258).

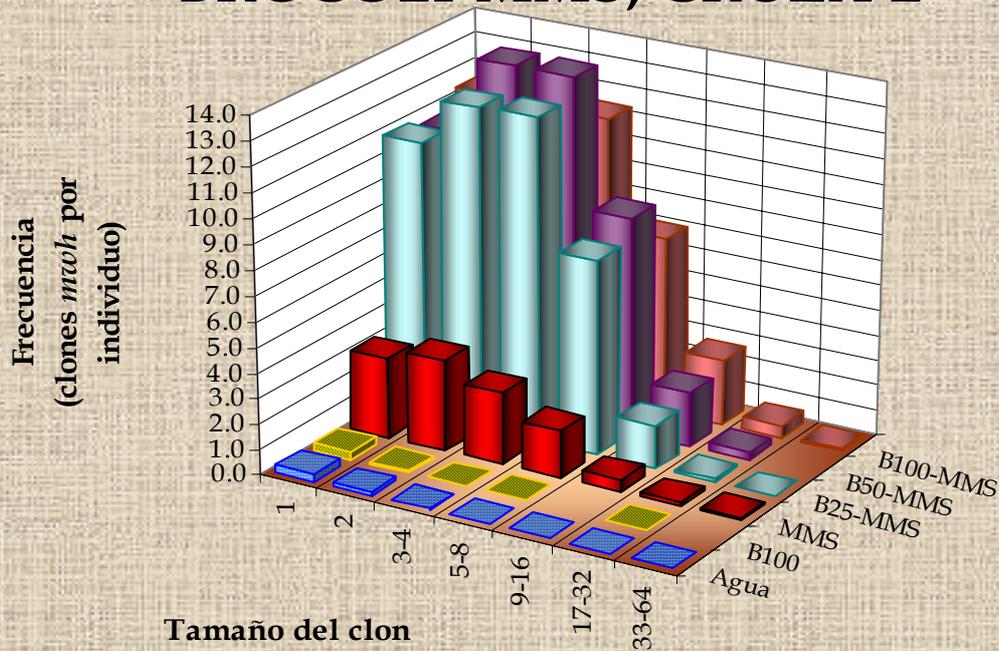
Por medio del uretano se comprobó que las cepas utilizadas en este trabajo poseen los marcadores genéticos en buen estado ya que se obtuvieron resultados estadísticamente mayores en la cruza BE, lo que demuestra su fuerte dependencia sobre la activación metabólica por parte de los CYPs como lo había descrito Frölich y Würigler (1990).

### Tamaño del clon *mwh*

La gráfica 4 muestra los resultados de la cruza E. En los co-tratamientos y en el testigo MMS se presentó mayormente una frecuencia de clones *mwh* de 1 a 16 células. Se observa que el número de divisiones por célula no sigue una distribución exponencial en los co-tratamientos ni en el testigo MMS, en contraste con los testigos agua y brócoli.

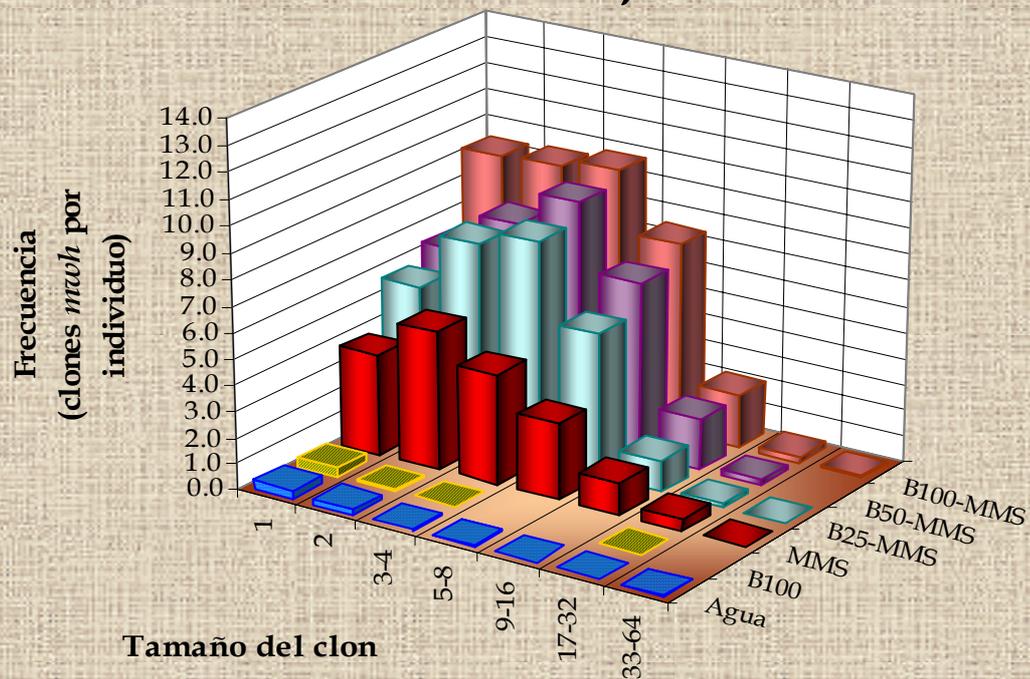
Los números de clones *mwh* para la cruza BE se muestran en la gráfica 5 y el Cuadro 5. El número de clones *mwh* para el testigo MMS y co-tratamientos está presente hasta 17 células/clon exceptuando el co-tratamiento de 50% brócoli+MMS. En esta cruza tampoco se observa una distribución exponencial en el número de divisiones por células en los co-tratamientos, como en el testigo MMS.

## BRÓCOLI-MMS, CRUZA E



Gráfica 4. Frecuencia de clones *mwh* por individuo, cruz E, a diferentes tamaños y a diferentes concentraciones (co-tratamientos y testigos). Se comprueba el efecto directo del MMS ya que la frecuencia de clones *mwh* está presente hasta los clones de 17 a 32 células.

## BRÓCOLI-MMS, CRUZA BE



Gráfica 5. Frecuencia de clones *mwh* por individuo, cruz BE, a diferentes tamaños y a diferentes concentraciones (co-tratamientos y testigos). Se comprueba el efecto directo del MMS ya que la frecuencia de clones *mwh* está presente hasta los clones de 17 a 32 células.

## Diferencia entre hembras y machos

Por medio de los datos obtenidos de la prueba SMART de una cola y del análisis estadístico de ANOVA 1 factor ( $p < 0.05$ ) se comprobó que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el número de manchas entre hembras y machos en el testigo MMS y los co-tratamientos. Además por la prueba de Ji cuadrada (prueba de independencia) se corroboró que para estos co-tratamientos crónicos no existen diferencias entre los sexos y los diferentes tratamientos con un nivel de significancia de  $p < 0.5$ .

# DISCUSIÓN

## CL<sub>50</sub>

Se ha demostrado por medio de la prueba SMART en ala que el MMS tiene una actividad genotóxica y tóxica en tratamiento crónico de 48 horas (Heres-Pulido, 2001; Rodríguez-Arnáiz y cols., 1996). Savina y cols. (2003) reportan que cuando la concentración de MMS es por arriba de 0.1 mM en tratamiento crónico, la actividad genotóxica aumenta y por lo tanto la probabilidad de muerte asciende. Sin embargo no existen trabajos previos para determinar la CL<sub>50</sub> del MMS en *Drosophila melanogaster*.

No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas de sensibilidad ni de potencia entre las líneas Oregon-*flare* y *flare*, porque el MMS es un agente alquilante directo y las diferencias de CYP450 entre las líneas mutantes, no juegan un papel en su metabolismo.

Se encontró dispersión similar entre ambas líneas y en cada uno de los tres experimentos independientes. Ésto puede ser causa de la respuesta individual citotóxica del MMS, el efecto genotóxico, y por los mecanismos de reparación (Dueñas y cols., 2005).

Por medio de los datos obtenidos para la CL<sub>50</sub> se determinó una concentración subtóxica (CL<sub>40</sub>) la cual permitió observar en la prueba SMART el daño producido por el MMS con una dispersión menor.

## SMART

### Testigos brócoli y agua

Como se esperaba las frecuencias de manchas en el testigo agua, que es la tasa de mutación espontánea para los marcadores *mwh* y *flr<sup>3</sup>*, coincidieron con las frecuencias registradas para el testigo histórico agua. Se encontraron resultados negativos entre el testigo agua y la mezcla compleja brócoli (100%) en la crusa E. En la crusa BE se encontró una disminución estadísticamente significativa en el número de manchas gemelas y totales, lo que coincide parcialmente con los resultados obtenidos por López (2004), quien obtuvo una

disminución en todos los tipos de manchas en la concentración de 50 y 100% con brócoli comercial en esta misma cruza. La similitud en la disminución de las manchas gemelas podría deberse a que en ambas muestras de brócoli se encuentran compuestos químicos antioxidantes que disminuyen la formación de rompimientos dobles en el ADN (DSBs) producto generalmente de ROS, los cuales pueden ser reparados por HRR (Vijayaraghavan y Panneerselvam, 2005, Bolsterli, 2003, Petri y cols., 2003, Fahey y Talalay, 1999; Halliwell, 1999, Blasiak and Kowalik, 1999, Friedberg y cols., 1995).

Es posible que la ausencia de diferencias en manchas pequeñas y grandes en BE con respecto a los resultados de López (2004) se deba al origen distinto de ambas muestras de brócoli ya que las condiciones de transportación, manipulación, así como de factores ambientales en el brócoli comercial fueron diferentes en ambas muestras. López utilizó una muestra adquirida en un centro comercial tal como la adquieren las personas para alimento, por el contrario en este trabajo se decidió usar brócoli crecido “orgánicamente”, recién cosechado y congelado inmediatamente después de su post-cosecha con el objetivo de mantener en lo posible los compuestos sin transformaciones químicas por temperatura o manipulación del vegetal. Podsedek (2005) reportó que después de 7 días y a 20 ° C el contenido de vitamina C desciende en un 44% de su contenido original, sin embargo a 4 ° C durante el mismo tiempo no hay pérdida de esta vitamina y solo un 20% se pierde después de 21 días. Este mismo autor reportó que la actividad antioxidante de las vitaminas, carotenoides y compuestos fenólicos son alterados por efecto de la temperatura, el tiempo y su manipulación.

### MMS

La ausencia de diferencias en la frecuencia de manchas entre las cruzas E y BE para el testigo MMS, se esperaba por que el MMS es un agente alquilante que induce alquilaciones de manera temprana en el desarrollo de la pupa debido a su acción directa (Jenkins y cols., 2005, Frei y Würigler, 1995) y por lo tanto no necesita la activación metabólica para inducir daños al ADN

(Rodríguez y cols., 1996; Friedberg y cols., 1995). Lo anterior también explica el que no existieran diferencias estadísticamente significativas entre E y BE en los co-tratamientos. La frecuencia de manchas en E es similar a la reportada por Rodríguez-Arnaiz y cols. (1996) en un número menor de individuos (288). Estos autores reportan que el MMS es recombinogénico en 67.2%, lo cual corrobora la presencia de manchas gemelas en este trabajo con frecuencias similares a las de ellos.

#### Co-tratamientos (brócoli 25, 50 y 100% + MMS)

En varios estudios se ha reportado la acción de compuestos puros de vegetales de la familia *Brassicaceae* como son los GS e ITC, que se relacionan con la activación / desactivación de las Fases I y II del metabolismo xenobiótico. Como ya se ha mencionado el brócoli es una mezcla compleja que forma parte de la dieta humana y que tiene un alto contenido de GS (Vang y cols., 2001; Verhoeven y cols., 1997; Won y Jeffery, 2001).

Debido a lo anterior se esperaba que no existieran diferencias en los co-tratamientos con respecto al testigo MMS. No obstante los resultados obtenidos en este trabajo indican que el brócoli interactúa sinérgicamente con el MMS produciendo un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas pequeñas y de grandes que se refleja en manchas totales en los co-tratamientos de E y de BE en los co-tratamientos 50% brócoli + MMS (manchas pequeñas, gemelas y totales) y en el co-tratamiento 100% en manchas pequeñas y totales. Sin embargo se observa una tendencia a incrementar la frecuencia de manchas en el co-tratamiento 25% brócoli + MMS en BE. En ambas cruces se encontró resultado negativo en el co-tratamiento 100% en manchas gemelas.

Para explicar los resultados descritos se consideraron los efectos e interacciones reportadas en la literatura para el brócoli intacto o de sus compuestos fitoquímicos y metabolitos.

La mirosinasa (Figura 7 [1]) un tioglucosido hidrolasa EC (3:2:3:1), que se activa por el corte o manipulación debe haber sido inhibida por la congelación

post-cosecha del brócoli, por lo que su acción sobre los GS debe haber ocurrido mayormente al liofilizar el brócoli y al añadir las soluciones (H<sub>2</sub>O y MMS). En contraste con lo reportado por Kassie y cols. (1996), este vegetal no mostró efecto genotóxico sobre los marcadores de SMART en ala, lo cual coincidió con López (2004) pero tampoco redujo la tasa de mutación espontánea.

Estudios previos han reportado que el PEITC y AITC contenidos en el brócoli (Figura 7 [2]), producen intercambio de cromátidas hermanas (SCEs) y aberraciones cromosómicas (Cas) en células de ovario de hámster chino (CHO) (Musk y cols., 1995), así como especies reactivas de oxígeno (ROS) en *E.coli*. (Kassie y Knasmüller, 2000). El I3C también ha reportado ser genotóxico debido a que induce la F I en hígado de rata y *CYP 1A1* en hígado de trucha arcoiris (Verhoeven y cols., 1997). Además genera compuestos N-nitrosos (McDanell y McLean 1988) y forma especies químicas muy parecidas en genotoxicidad a las dioxinas (Bjeldanes y cols., 1991; Vang y cols., 1997) (Figura 7 [4]). De la misma forma el GRP puede activar la Fase I y generar ROS, como se ha demostrado en microsomas del pulmón de rata o bien, facilitar la activación metabólica de B[a]P a la forma cancerígena, en levaduras. Por lo que la ingesta regular de GRP y de los vegetales que lo contienen podría aumentar el riesgo de cáncer (Paolini y cols. 2004).

En contraste su derivado el isotiocianato sulforafano (Figura 7 [3]) protege del daño por estrés oxidativo al inducir de la Fase II del metabolismo xenobiótico (Boelsterli, 2003; Morimitsu y cols., 2002), a la glutatión transferasa<sup>1</sup> (GST, β-glutamyl-cisteinglicina, Apéndice 4) en células humanas de cáncer de próstata (LNCaP, MDAPCa2a, MDA, Pca2b, PC-3 y TSU-Pr1) (Brooks y cols., 2001), incrementar significativamente la actividad de quinona reductasa en duodeno de rata (Munday R. y Munday M., 2004); e inducir la hemo-oxigenasa (Fahey y Talalay, 1999). Asimismo es un inductor del factor Nrf2 que estimula la respuesta ARE/EpRE (*antioxidant response element*) que coordina la

---

<sup>1</sup> El GST es un tripéptido que además de tener influencia en la Fase II es un importante antioxidante, reductante y captador de radicales. Es un co-sustrato de la familia de enzimas glutatión-S-transferasa (GSTs) y glutatión peroxidasa (GS-Px) (Boelsterli, 2002).

transcripción de una amplia gama de genes relacionados con el estrés oxidativo (Boelsterli, 2003). Sin embargo, a pesar de que el sulforafano induzca la GST, los ITC incluyendo a SF son eliminados via conjugación con glutatión (GSH) (Figura 7 [10]), por lo que es muy posible que al alimentar las larvas con los porcentajes descritos los contenidos intracelulares de este tripéptido se agotaran y una parte de los ITC con actividad genotóxica (PEITC y AITC) no fueran eliminados (Fahey y Talalay, 1999, London y cols., 2000 y Zhang y cols., 1995).

Por otro lado se ha reportado que la vitamina E disminuye los daños producidos por ROS (Vijayaraghavan y Panneerselvam, 2005) por lo que pudo contribuir a disminuir los probables efectos oxidativos producidos por PEITC y AITC. Sin embargo esta vitamina no tiene efecto protector contra los daños producidos por el MMS lo cual se ha comprobado en pre- tratamientos de células V79 de hámster (Horváthova y cols., 1998) (Figura 7 [8]).

Flora y cols. (1999) reportaron que los  $\beta$ -carotenos y la vitamina A no interaccionan con la reparación del daño al ADN producido por agentes alquilantes directos, por lo que se espera que estos componentes no hayan tenido participación en la respuesta de sinergia de los co-tratamientos.

Se ha reportado que la vitamina C induce daños al ADN en altas dosis además de actuar como pro-oxidante y producir un incremento en la actividad de reparación (Halliwell, 1999). Rensch y cols. (2005) reportaron en células de sangre de ratas *in vivo* que el daño provocado por el MMS al ADN es significativamente reducido en bajas dosis de vitamina C (1 mg vitamina C /kg ) pero no en altas dosis (30 mg/kg ). Estos autores argumentan que el aumento de rompimientos al ADN en altas dosis es consecuencia de la estimulación de la reparación por parte de la vitamina C. Gregg y Takahashi (1998) encontraron que con dosis altas de vitamina C en co-tratamiento con doxorubicin por 24 h en células de ratas, hay una tendencia no significativa de clastogenia. De manera similar Konopacka y cols., (1998), encontraron en células de ratón que el pre-tratamiento de esta vitamina en concentraciones altas (400, 50-10 mg/kg/día), con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) produce radicales hidroxilo vía la reacción de Fenton, al aumentar los niveles de radiación gama. También

se ha reportado que la vitamina C en dosis altas (200  $\mu$ M) no tiene efecto protector frente al tratamiento con radiación ionizante en células de linfocitos (Green y cols., 1994). Se sabe que la radiación ionizante produce mayor número de DSB que los agentes alquilantes. Se asume que el incremento de la frecuencia de manchas descrito en este trabajo con respecto al testigo MMS fue ocasionado por esta vitamina que estimula a las glicosilasas del sistema BER, debe haber provocado un elevado número de sitios apurínicos/apirimídicos (AP), y un aumento en el daño al ADN (Figura 7 [6]).

Lo anterior se apoya en Calleja y cols. (1999) quienes reportaron que el MMS induce mayor efecto genotóxico en el ADN debido a la sobre-expresión del gen N-alquilpurina-DNA glicosilasa (APDG) de células de ovario de hámster Chino (CHO), ya que aumenta la remoción de N-metilpurinas por la enzima APDG produciendo un mayor número de sitios AP. Por consiguiente también se producen bloqueos en la ADN polimerasa y se inhibe la síntesis del ADN en CHO.

Rehman y cols (1998), reportaron en individuos sanos bajo suplementación de hierro y AA (14mg/día hierro y 60 y 260 mg/día de vitamina C en células), que ésta mezcla aumenta el daño oxidativo al ADN, indicando un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer. El brócoli (Apéndice 3) contiene 0.61 mg de hierro y 40.1 mg de vitamina C los cuales pudieron interactuar, y ayudar en la repuesta sinérgica del brócoli con MMS. En contraste Cooke y cols. (1998) reportaron en células humanas (previa suplementación de 500 mg/día de vitamina C), que la inducción en la reparación por la vitamina C disminuye significativamente el daño al ADN producido por 8-oxo-2 -deoxiguanosina (lesión mutagénica *in vivo* por transversión G→T) que no produce el MMS. De igual forma Cooke y cols., (2003) y Lunec y cols., (2002), reportaron que la vitamina C promueve la reparación en el ADN vía NER en el daño producido por el aducto deoxicidina-glioxal (gdC) en células mononucleares de sangre de periferia *in vivo* y por 8-oxo-2 -deoxiguanosina los cuales no son producidos por el MMS.

El ácido ascórbico incrementa la producción de radicales OH en co-tratamiento con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) vía la reacción de Fenton (Kaya y cols., 2002). Aunque el MMS induzca daño oxidativo en baja proporción (Horváthova y cols., 1998) pudo adicionar su efecto con el del ácido ascórbico en la producción ROS (Rench y cols., 2005) (Figura 7 [6]).

Kaya y cols., (2003) reportó que el co-tratamiento de vitamina C (17 mM) con MMS (0.1 Mm), en *D.melanogaster* (40 individuos/tratamiento) disminuye el efecto genotóxico de este agente alquilante. Las diferencias de este trabajo con los resultados obtenidos por este autor pudieron deberse a la vitamina C (0.2005mg/0.5g de brócoli ,y tomando en cuenta que 10%< se pierde al transformarse en ascorbigen (Podsedeck, 2005). La concentración de MMS usada por Kaya y cols. (2003) se ha reportado como no genotóxica en tratamiento crónico (Savina y cols., 2003), en contraste la concentración del agente alquilante usada en este trabajo fue mayor (0.5 mM). Por otro lado en el presente trabajo se revisaron 60 individuos por concentración de brócoli con el testigo MMS, lo cual es necesario para obtener resultados desde el punto de vista estadístico (Frei y Würigler, 1995).

BER es uno de los sistemas de reparación más importantes para remover los daños provocados por el MMS (Jenkins y cols., 2005; Vogel, 1991). Recientemente Jenkins y cols. (2005) reportaron que BER contribuye a determinar el umbral genotóxico mediado por la reparación de los aductos formados por agentes alquilantes (AA) como es el MMS. Considerando que a altas concentraciones de vitamina C se estimula la reparación BER y dado que el brócoli contiene 40.1mg/100g de brócoli (Apéndice 3), 10%< se pierde al transformarse en ascorbigen (Podsedeck, 2005), corrobora el resultado del aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas por célula en los co-tratamientos brócoli + MMS para ambas cruas.

Con base en las referencias se propone el siguiente mapa metabólico para explicar la interacción del brócoli mezcla compleja con el MMS. En el cuadro 6 se explican los números que se encuentran en el mapa.

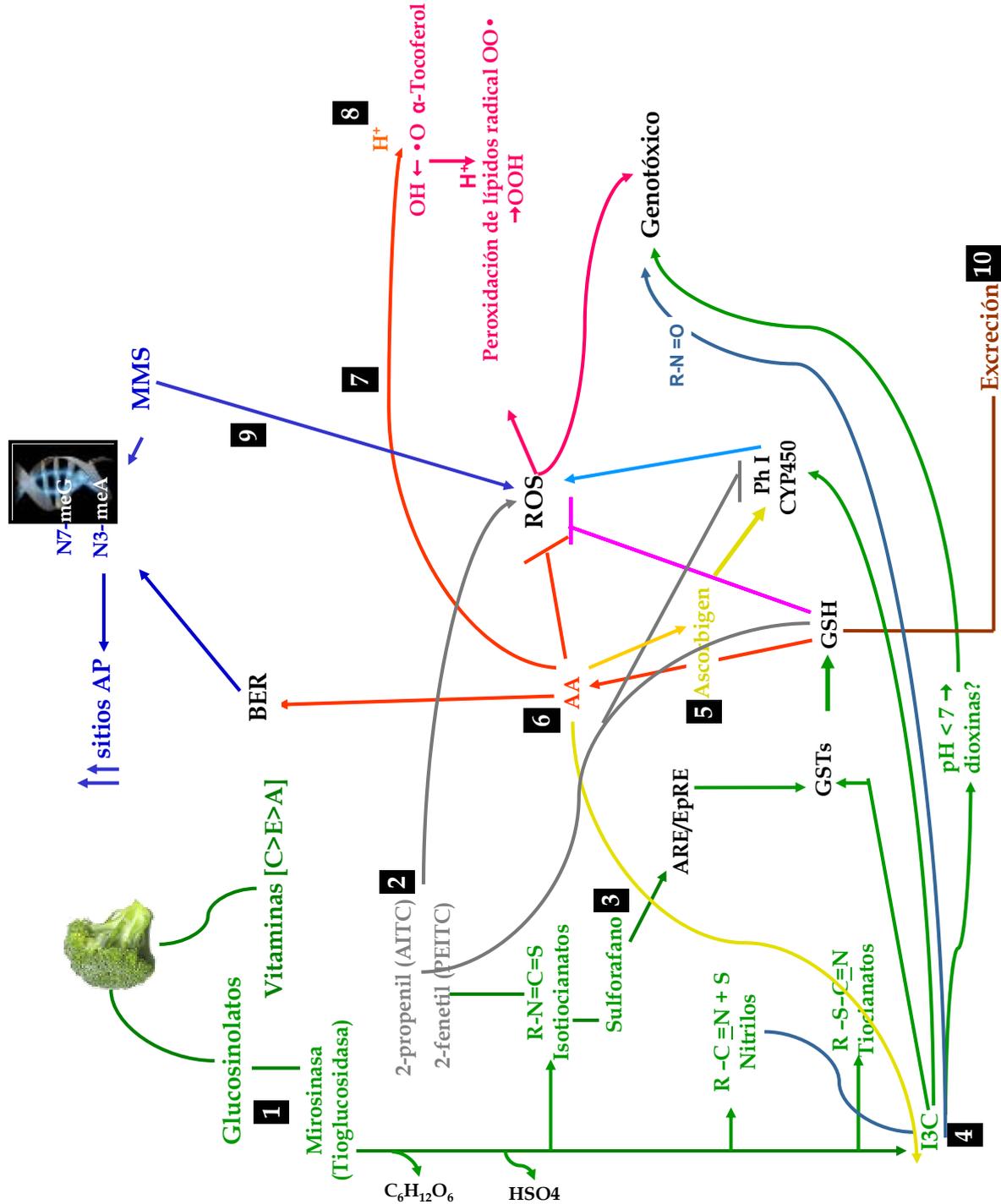


Figura 7. Interacción de los compuestos del brócoli con el MMS. Los números corresponden a la relación del compuesto en el metabolismo. Las líneas perpendiculares que se encuentran al final de una reacción significa inhibición.

Cuadro 6. Referencias del mapa metabólico de la Figura 7 de la interacción del brócoli con el MMS. Donde el guión (-) significa que en la referencia no se indica el sistema testigo.

Compuesto	Acción	Sistema testigo	Referencias
(1) Mirosinasa (tioglúsido glicohidrolasa EC 3:2:3:1)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cataliza la hidrólisis de los GS, al momento que el vegetal crudo o medio cocido es masticado o dañado.</li> <li>Por acción de esta enzima, de cada molécula de GS se libera una molécula de glucosa y de ácido sulfhídrico, tiocianatos y nitrilos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Brócoli</li> </ul>	Keck y cols., 2003; Steinkellner y cols., 2001; Conaway y cols., 2000; Fahey y Talalay, 1999; Hrnčířík y cols., 1998; Verhoeven y cols., 1997.
(2) AITC, PEITC	<ul style="list-style-type: none"> <li>AITC derivado del GS Sinigrin y PEITC del GS Glucobrasicin.</li> <li>Reportados como genotóxicos mediante la producción de ROS.</li> </ul> <p><u>En contraste:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>AITC: incrementa la (GST) .</li> <li>PEITC: inhibe la fase I y disminuye el CIP1A2 y CIP2E1.</li> </ul>	<p>-</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>En <i>Salmonella, E.coli</i> y cultivo de células de rata.</li> <li>Rata prueba <i>in vivo</i>.</li> <li>Hígado de rata <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>, en células humanas expresadas en <i>E.coli in vitro</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kassie y Knasmüller, 2000; Musk y cols., 1995.</li> <li>Munday y Munday, 2004.</li> <li>Verhoeven y cols., 1997.</li> </ul>
(3) Sulforafano	<ul style="list-style-type: none"> <li>Induce ARE (<i>antioxidant response element</i>).</li> <li>Aumenta la concentración de glutatión intracelular.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Células de hígado de rata RL34 <i>in vitro</i>.</li> <li>Células de cáncer de próstata Ln Lncap, MDAPCa2a, MDA, Pca2b, PC-3 y TSU-Pr1 en</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Morimitzu y cols., 2001; Kong y cols., 2001).</li> <li>Brooks y cols., 2001)</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incrementa la síntesis de GST</li> </ul>	<p>concentraciones de 0.1- 15 <math>\mu</math>M de sulforafano <i>in vitro</i>.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Células de mamífero <i>in vitro</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fahey y Talalay, 1999.</li> </ul>
(4) I3C	<ul style="list-style-type: none"> <li>Forma compuestos muy parecidos en genotoxicidad a las dioxinas.</li> <li>La unión del I3C con nitrilos durante la hidrólisis de los GS, forma compuestos N-nitrosos mutagénicos.</li> <li>Al reaccionar con el AA forma ascorbigen.</li> <li>Incrementa la concentración de GST .</li> <li>Incrementa la concentración de <i>CYP1A1</i>, <i>CYP1A2</i>, <i>CYP2B1</i>, <i>CYP3A</i>.</li> <li>Reporta inducir directamente a <i>CYP1A1</i> y <i>CYP1A2</i>.</li> </ul>	<p>-</p> <p>-</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Células de murino 1C1C7 <i>in vitro</i>.</li> <li>Hígado e intestino de rata <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.</li> <li>Hígado de rata.</li> <li>Ratas hembras F344 <i>in vivo</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vang y cols., 1997, Bjeldanes y cols., 1991.</li> <li>McDanell y McLean, 1998.</li> <li>Zhu y Loft, 2003.</li> <li>Fahey y cols., 2001, Verhoeven y cols., 1997.</li> <li>Steinkellner y cols., 2001.</li> <li>He y cols., 2000</li> </ul>
(5) Ascorbigen	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aumenta la actividad de enzimas de la Fase I y II.</li> <li>Induce la enzima aril hidrocarbon hidroxilasa de la Fase I, la enzima estadiol 2-hidroxilasa y 7-etoxiresorufin O-detilasa.</li> </ul>	<p>-</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hígado, en intestino delgado y grueso, de rata <i>in vivo</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vang y cols., 1997.</li> <li>Verhoeven y cols., 1997</li> </ul>
(6) Vitamina C (AA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Puede actuar como antioxidante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>En linfocitos humanos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Greenwald y cols., 2001; Halliwell, 1999.</li> </ul>

	<p>inhibiendo ROS.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El sodio ascorbato protege del daño producido por el malaoxon.</li> <li>• Induce daños al ADN en altas dosis, además de actuar como pro-oxidante produciendo un incremento en la actividad de reparación vía BER o NER. Ver discusión.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En linfocitos humanos.</li> <li>• Células mononucleares de sangre de periferia de ratón <i>in vivo</i>, en células humanas <i>in vivo</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blasiak y cols., 1999.</li> <li>• Halliwell, 1999; Cooke y cols., 2003; Lunec y cols., 2002.</li> </ul>
(7) Vitamina E y C.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La oxidación del <math>\alpha</math>-tocoferol (vitamina E), es generada por la vitamina C, por lo que la administración combinada de estas vitaminas se les ha relacionado con la actividad antioxidante.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linfocitos humanos <i>in vivo</i>, en células de ratón <i>in vivo</i>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Podsedek 2005; Bolsterli, 2003; Ahmad y cols., 2002; Konopacka y cols., 1998; Gregg y Takahashi, 1998; Niki y cols., 1995.</li> </ul>
(8) Vitamina E	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es una antioxidante liposoluble que es responsable del 20% de la actividad antioxidante en vegetales Brassica.</li> <li>• Previene del estrés oxidativo y actúa como antioxidante</li> </ul>	<p>-</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• en el curso crónico de enfermedad y quimioterapia en enfermos con lepra.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Podsedek, 2005</li> <li>• Vijayaraghavan y Panneerselvam, 2005</li> </ul>
(9) MMS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ha reportado inducir daño de tipo oxidativo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células V79 de hámster y en células humanas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Renc, y cols., 2005; Horváthová y cols., 1998.</li> </ul>
(10) Excreción	Los ITCs AITC,	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• London y cols., 2000 y Zhang y</li> </ul>

	PEITC, I3C y SF pudieron haber sido conjugados con el GSH, ya que se ha demostraron el GSH tiene mayor especificidad por esta conjugación.		cols., 1995.
--	---	--	--------------

Tamaño del clon *mwh*

De manera semejante a Rodríguez-Arnaiz y cols. (1996) se encontraron clones *mwh* de cinco y ocho células con el testigo MMS. La distribución exponencial del tamaño del clon involucra el número de ciclos de divisiones de las células imágales del ala en condiciones normales. La distribución exponencial se alteró por efecto del MMS en ambas cruzas, pero en los co-tratamientos muestra un efecto tardío, que aumenta significativamente la frecuencia de los clones de 1-4 células en todos los co-tratamientos de la cruz E y en el co-tratamiento 100% brócoli + MMS de BE. Esto podría explicarse con relación a dos eventos (1) que la acción de la vitamina C lleve tardíamente a los siguientes eventos: a) acción del MMS, b) inducción de la reparación por BER, c) formación de sitios AP y d) reparación por HRR; (2) que estos eventos ocurren con mayor incidencia en todos los co-tratamientos de la cruz E, con niveles regulados de CYP450 y sólo en el co-tratamiento 100% en BE, con niveles constitutivos y altos de CYP450. Esto último apunta hacia una interacción de CYP450 lo cual tendría que ser confirmado con otro tipo de estudios.

El encontrar clones *mwh* de manchas grandes (de 17-32 células) en MMS sólo y en los co-tratamientos (E y BE) indica que el MMS produjo alquilaciones de manera más temprana en el desarrollo de la larva. Por otra parte Seidel y cols. (2004), reportaron que el MMS altera la expresión de los genes asociados con la apoptosis, sin embargo esto no explica las diferencias entre las distribuciones de los co-tratamientos y el testigo MMS.

## Diferencias entre hembras y machos

A diferencia de lo reportado por Heres (2001) que en un tratamiento agudo con MMS 2 mM por 2 h, obtuvo como resultado que las hembras presentaban un mayor número mayor de manchas que los machos, en el presente trabajo se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el testigo MMS y los co-tratamientos. Se asume que esto se deba a las diferencias entre los tratamientos y la concentración.

Con base a lo anterior se propone lo siguiente para explicar los resultados:

Existen controversias en cuanto a la actividad genotóxica de los isotiocianatos PEITC, AITC e I3C. Se infiere que al inducir el sulforafano, el sistema ARE e incrementar la GST los isotiocianatos incluyendo este último fueron eliminados vía conjugación con glutatión. De ahí que el brócoli 100% fue inocuo. Para explicar el efecto sinérgico de los co-tratamientos con MMS, se propone que es resultado de la interacción con la vitamina C, que al inducir la glicosilasa del sistema BER, pudo provocar un mayor número de sitios AP, que son reparados por HRR, NEHJ, lo cual aumenta la genotoxicidad de los mutagenos (Luque-Cabrera y Herráez, 2001, Smith y Jones, 1999).

## CONCLUSIONES

- Se comprueba el efecto directo del MMS ya que no hay diferencias estadísticamente significativas en la potencia, sensibilidad y en la concentración letal media (Cl<sub>50</sub>) entre Oregon-flare y flare, de *D. melanogaster*, así como tampoco entre las cruzas E y BE, en los tratamientos con éste mutágeno.
- Sólo encontraron diferencias entre el testigo agua y brócoli en BE manchas gemelas que se reflejan en totales, pero no en grandes / pequeñas, así como en ningún tipo de mancha en cruce E por lo que la reducción en la tasa de mutación espontánea de los marcadores no fue confirmada con el brócoli orgánicamente cultivado, congelado (pos-cosecha) y liofilizado.
- Se demuestra que la alimentación con la mezcla compleja brócoli orgánicamente cultivado no protege del daño provocado por el MMS y que su interacción produjo un efecto sinérgico. Se concluye que esto sea resultado de uno de sus componentes, la vitamina C, por que en altas concentraciones ésta induce las glicosilasas del sistema BER, provocando un mayor número de sitios AP que al ser reparadas aumenta el daño genotóxico.
- No se encontraron diferencias entre las hembras y los machos en los co-tratamientos y en el testigo MMS, esto podría deberse a las diferencias entre el tratamiento agudo, crónico y las concentraciones.

## RECOMENDACIONES

Se propone evaluar al brócoli orgánicamente cultivado en co-tratamientos con concentraciones de 0, 25, 50 y 100% en *Drosophila melanogaster* con MMS (0.5mM) en la prueba de rompimientos dobles (DSB) y simples (SSB) en el ADN, así como evaluar el efecto de las concentraciones 25 y 50% con este mismo vegetal en la prueba SMART cruzas E y BE.

## APÉNDICE 1

### *Drosophila melanogaster*

Este insecto díptero presenta un ciclo de vida corto que va de 10 a 12 días a 25 ° C, con cuatro estadios que son: huevo, larva, pupa y adulto (figura 8). El desarrollo embrionario del huevo tarda aproximadamente 1 día. Durante el estadio larval la ingestión de alimento es continua, llegando a consumir de tres a cinco veces su peso, lo que hace que éste se incremente de 0.05 a 2.0 mg. Esta etapa dura alrededor de 4 días (Mitchel y Combes, 1984).

En la pupa ocurre la metamorfosis de *D. melanogaster* en donde se forman las estructuras adultas (antenas, ojos, alas etc) a partir de tejidos embrionarios llamados discos imagales. El par de discos imágales de las alas consisten en aproximadamente 30,000 células en la pupa temprana, cuando inicia la diferenciación del ala. Este estadio dura alrededor de cinco días, posteriormente el imago emerge del pupario (Graf, 1995; Mitchel y Combes, 1984).

El macho adulto alcanza la madurez sexual entre las seis y ocho horas después de haber emergido del pupario, mientras que la hembra tarda de diez a doce horas. La hembra fecundada puede depositar hasta 50-75 huevos en un día, posteriormente disminuye su producción.

## Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*

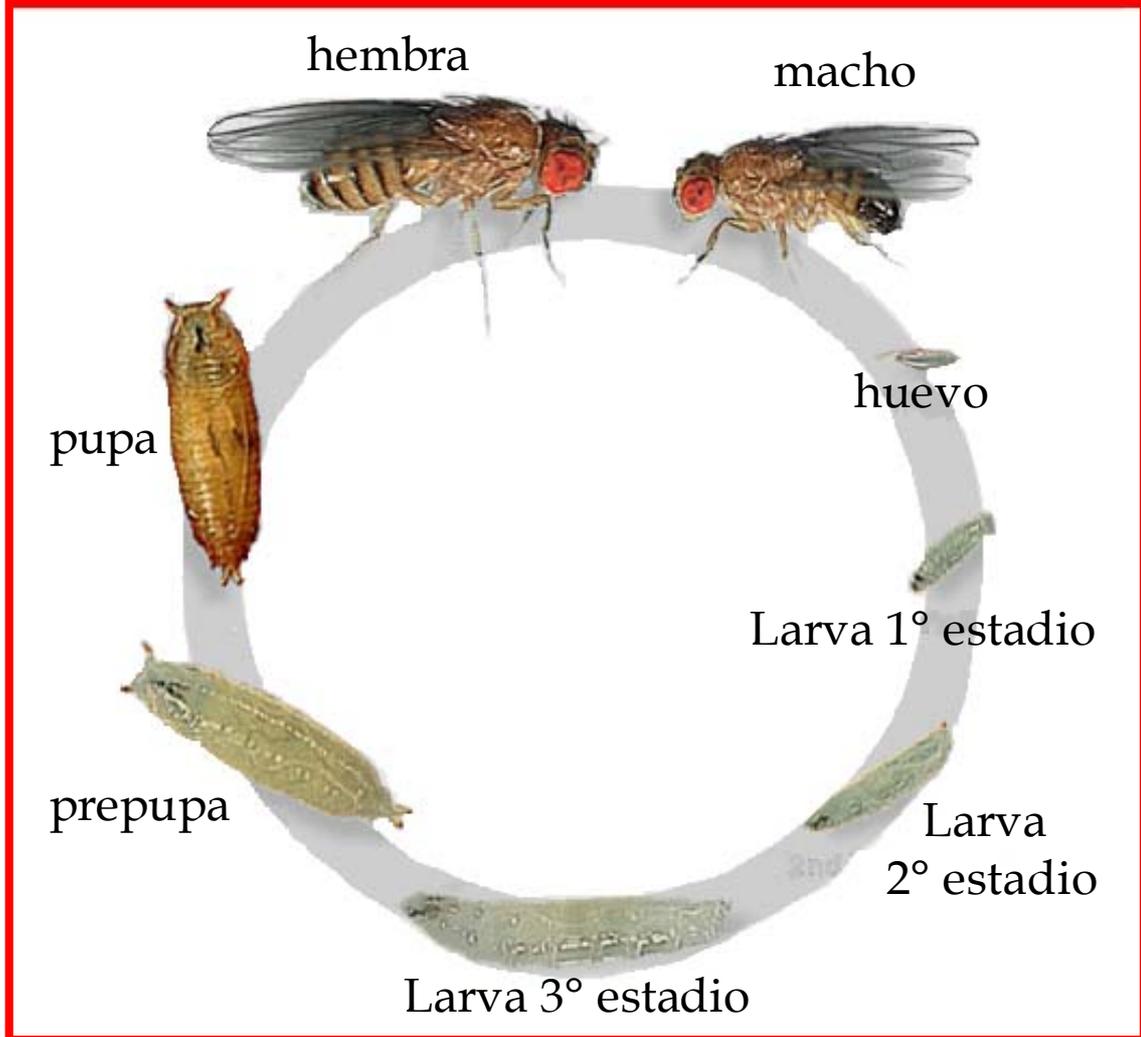


Figura 8. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*  
(modificado de [www.anatomy.unimelb.edu.au/.../life-cycle.jpg](http://www.anatomy.unimelb.edu.au/.../life-cycle.jpg))

## APÉNDICE 2

### Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en ala

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

Las manchas simples se observan como tricomas múltiples (*mwh*) o mal formados (*flr<sup>3</sup>*) que pueden indicar delección, mutación puntual y no disyunción. Las manchas gemelas indican recombinación por lo que se observan los dos tipos de marcadores *flr* y *mwh* (Graf, 1995).

Tomado en cuenta que *D. melanogaster* tiene genes similares al del humano (Culliton, 2000) esta prueba se utiliza para predecir la posible genotoxicidad y antigenotoxicidad en mamíferos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995; Sharpe y cols., 2002)

### Líneas y Marcadores

Para esta prueba se utilizan tres líneas de *D. melanogaster*: “multiple wing hairs” (*mwh/mwh*), “flare” (*flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>(S)</sup>*) y “Oregon-flare<sup>3</sup>” (OR (1); OR (2); *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>(S)</sup>*), con los siguientes marcadores:

*mwh* (*multiple wing hairs*) (Figura 9). Mutación homocigótica viable localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-0.3). En homocigosis este marcador produce tricomas múltiples por célula en lugar del tricoma único de la condición silvestre.

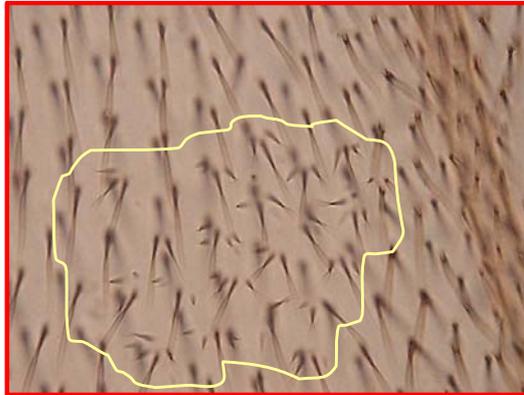


Figura 9. Mancha *mwh*. (B20-0). Concentración: MMS, experimento: 3, porta: 63, fecha de lectura: 18/03/05, Fecha de exp: 17/08/04, mosca 5, ala 10, cruza E, 100X.

*flr<sup>3</sup>* (*flare*) (Figura 10). Se caracteriza por una mutación que afecta la forma de los tricomas, localizada en el brazo izquierdo del cromosoma 3 (3-38.8) y es homocigota letal (Graf, 1994). Se mantiene la heterocigosis por efecto de un cromosoma balanceador.



Figura 10 . Mancha *flr<sup>3</sup>*. (D0-24). Concentración: MMS, experimento: 3, porta: 63, fecha de lectura: 18/03/05, Fecha de exp: 17/08/04, mosca 1, ala 2, cruza E, 100X.

*Bd<sup>S</sup>* (*Beaded-Serratia*) (Figura 11). Este marcador dominante se localiza en el cromosoma 3 (3-92.5), es homocigoto letal y se identifica por muescas en el borde de las alas (Osaba y cols., 1999).

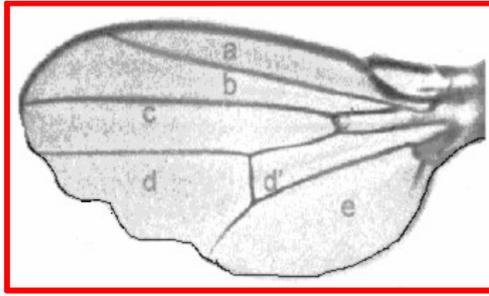


Figura 11. Ala Serratia

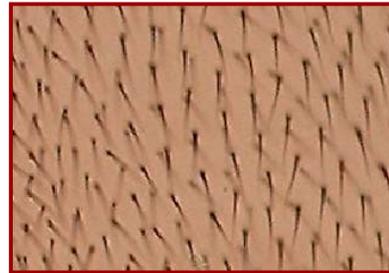
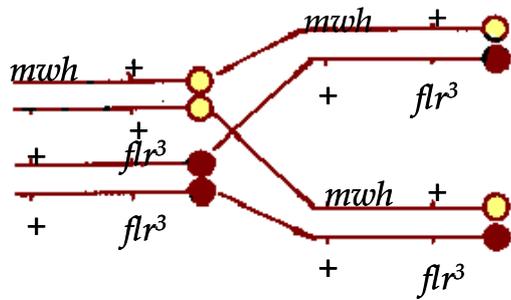
En (3LR) TM3 (Inversión (3 left. right) Third Multiple 3). Cromosoma balanceador con tres inversiones, dos paracéntricas (L y R) y una pericéntrica (L+R), que impide la formación de nuevos arreglos cromosómicos originados por recombinación produciendo así individuos heterocigotos para los marcadores letales como es el caso de *flr<sup>3</sup>* y Oregon-*flr<sup>3</sup>* (Graf y cols., 1996).

OR (R) ("de Oregon resistant"). La línea Oregon-*flr* también posee el marcador *flr<sup>3</sup>* en carácter heterocigoto. El cromosoma 2 acarrea la mutación dominante Rst (2) DDT localizada en la región 43E, (2-64.5), que provoca la expresión constitutiva de una proteína inductora de los genes *Cyp* (*Cyp6a8* y *Cyp6a9* del cromosoma 1 y *Cyp6a2* del cromosoma 2). Los genes *Cyp* se expresan en las enzimas del complejo enzimático CYP450. Esta mutación confiere en consecuencia, no sólo resistencia al DDT e insecticidas organofosforados en larvas y adultos, sino también el incremento general en el metabolismo xenobiótico (Saner y cols., 1996).

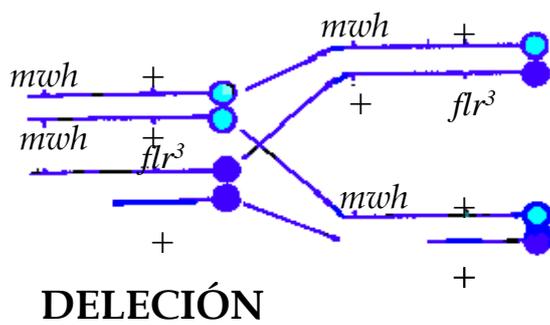
### **Cruzas Estándar (E) y Bioactivación elevada (BE)**

La craza E tiene niveles regulados de CYP450. Para esta craza se usan hembras de la línea *flare* (*flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>*) y machos de la línea *multiple wing hairs* (*mwh/mwh*). La craza BE tiene altos niveles constitutivos de CYP450. Para ésta se usan hembras de la línea Oregon-*flare* (OR (1); OR (2); *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>*) y machos *mwh*. Cada una de estas cruzas produce dos tipos de genotipos: transheterocigotos *mwh flr<sup>3+</sup>/mwh<sup>+</sup>flr<sup>3</sup>* en craza E y en craza BE ORR(1)+; ORR(2)/+; *mwh, flr<sup>3+</sup>/mwh<sup>+</sup>,flr<sup>3</sup>* con alas de fenotipo silvestre; y heterocigoto *mwh flr<sup>3+</sup>/mwh<sup>+</sup>flr<sup>3+</sup>* TM3 *Bd<sup>S</sup>* para E y ORR(1)/+; ORR(2)/+; *mwh, flr<sup>3+</sup>/TM3, Bd<sup>S</sup>* para craza BE, con alas de fenotipo Serratia. Por pérdida de heterocigosis (Figura 12) se detectan los daños ocasionados por mutágenos como el MMS

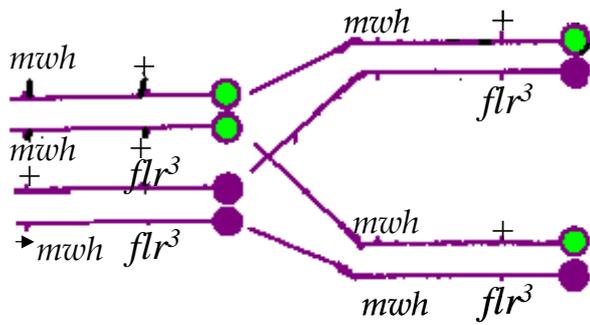
(Graf y cols., 1996). En las moscas con alas silvestre transheterocigotas se pueden producir daños como mutaciones y recombinación, mostrándose como manchas simples y gemelas. En las heterocigotas con alas Serratia, sólo se observan manchas simples causadas por mutaciones (Graf y cols., 1984).



**Normal**

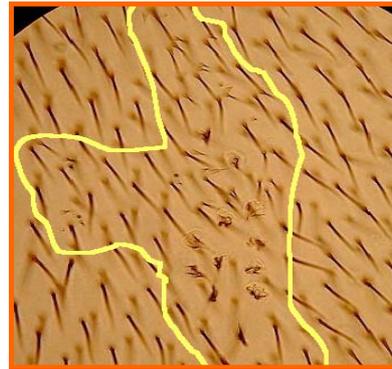
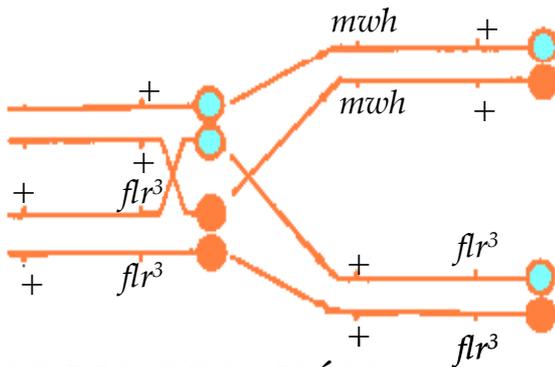


**Mancha sencilla**



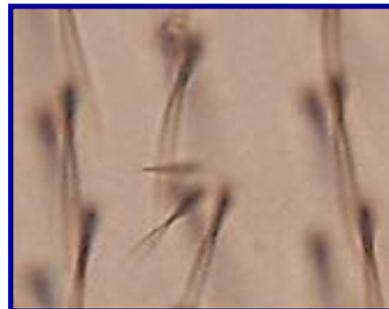
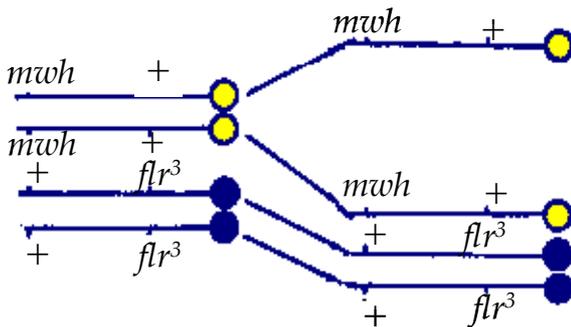
**Mancha sencilla**

### MUTACIÓN PUNTUAL



**Mancha gemela**

### RECOMBINACIÓN



**Mancha sencilla**

### NO-DISYUNCIÓN

Figura 12. Eventos que ocasionan la pérdida de heterocigosis en *Drosophila melanogaster*.

## APÉNDICE 3

Cuadro 7. Contenido del brócoli orgánicamente cultivado, obtenidos de Mar Bran Co. Irapuato, Guanajuato.

**Brócoli, muestra congelada, cocinado, hervido, secado, sin SAL**

**NDB No:11095**

**Contenido: 100 g**

**Peso en gramos (porción): 100.00g**

**Refuse: 0%**

**Fecha: 1/3/2006 9:16**

Nutriente	Unidad	Valor
Agua	G	90.72
Energía	Kcal	28
Energía	Kj	117
Proteína	g	3.10
Lípidos Totales (grasa)	g	0.11
Ceniza	g	0.71
Carbohidratos, por diferencia	g	5.36
Fibra, total dieta	g	3.0
Total de azúcar	g	1.44
Calcio, Ca	mg	51
Fierro, Fe	mg	0.61
Magnesio, Mg	mg	20
fosforo, P	mg	55
Potasio, K	mg	180
Sodio, Na	mg	24
Zinc, Zn	mg	0.30
Cobre, Cu	mg	0.043
Manganeso, Mn	mg	0.325
Selenio, Se	mcg	1.9
Vitamina C, total ácido ascórbico	mg	40.1
tiamina	mg	0.055
riboflavina	mg	0.081
Niacina	mg	0.458
Ácido Pantoténico	mg	0.274
Vitamina B-6	mg	0.130
Total Folato	mcg	30
Ácido Fólico	mcg	0
Folato, comestible	mcg	30
Folato, DFE	mcg_DFE	30
Vitamina B-12	mcg	0.00
Vitamina A, IU	IU	1118
Vitamina A, RAE	mcg_RAE	56
Retinol	mcg	0
Vitamina E (alfa-tocoferol)	mg	1.32

Vitamina K (filoquinona)	mcg	99.5
Ácidos grasos, totales saturados	g	0.018
4:0	g	0
6:0	g	0
8:0	g	0
10:0	g	0
12:0	g	0
14:0	g	0
16:0	g	0.016
18:0	g	0.002
Ácidos grasos, totales monoinsaturados	g	0.008
16:1 indiferenciado	g	0
18:1 indiferenciado	g	0.008
20:1	g	0
22:1 indiferenciado	g	0
Ácidos grasos, total polinsaturados	g	0.055
18:2 indiferenciado	g	0.013
18:3 indiferenciado	g	0.042
18:4	g	0
20:4 indiferenciado	g	0
20:5 n-3	g	0
22:5 n-3	g	0
22:6 n-3	g	0
Colesterol	mg	0
Triptofano	g	0.032
Treonina	g	0.101
Isoleucina	g	0.121
Leucina	g	0.145
Lisina	g	0.156
Metionina	g	0.037
Cisteina	g	0.022
Fenilalanina	g	0.094
Tirosina	g	0.070
Valina	g	0.142
Arginina	g	0.161
Histidina	g	0.055
Alanina	g	0.131
Ácido Aspartico	g	0.236
Ácido Glutámico	g	0.417
Glicina	g	0.105
Prolina	g	0.127
Serina	g	0.111
Alcohol, etilico	g	0

Cafeina	mg	0
Teobromina	mg	0
Beta Caroteno	mcg	663
Alpha Caroteno	mcg	15
Beta Criptoxantina	mcg	1
Licopeno	mcg	0
Luteina + zeaxantina	mcg	1498
Vitamina E, agregados	mg	0

## APÉNDICE 4

### Metabolismo Xenobiótico

El ser humano está sujeto a la exposición de sustancias químicas extrañas llamadas xenobióticos, tales como medicamentos, conservadores de alimentos o contaminantes ambientales. El Metabolismo Xenobiótico es un mecanismo de protección de las células que cuenta con dos vías para la eliminación de los agentes extraños. Cuando éstos son liposolubles requieren ser biotransformados a una forma hidrosoluble excretable (Manahan, 2003).

La transformación metabólica consiste en dos fases. En la fase I ocurre la reacción de hidroxilación, catalizada por miembros de una clase de enzimas denominadas monooxigenasas o especies de citocromo P450 (CYP450).

En la fase II los compuestos hidroxilados u otros, producidos en la fase I, se convierten por acción de enzimas específicas, en diferentes metabolitos polares, por conjugación con el ácido glucurónico, sulfato, acetato, glutatión y ciertos aminoácidos o por metilación.

En ciertos casos, las reacciones metabólicas de la fase I convierten los xenobióticos inactivos a agentes reactivos capaces de unirse covalentemente a biomoléculas importantes (DNA, RNA y proteínas) (Murray y cols., 1992). En diversos estudios se han utilizado agentes químicos, que provocan daños al ADN, con el fin de investigar acerca de los diferentes mecanismos, como el metabolismo xenobiótico, que producen el daño a esta molécula. Estos agentes pueden ser de tipo directo como el metil metanosulfonato (MMS), la mitomicina C (MMC) o el clorambucil (CLA); otros necesitan de la activación metabólica del compuesto, como es el caso del N-dimetilnitrosamina (NDMA) o el uretano (etil-carbamato) (Rodríguez-Arnaiz y cols., 1996).

## Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dando una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Esto lo hace reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Rodríguez y cols., 2001).

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo es reducido en agua por acción del complejo citocromo-oxidasa (citocromo A+a3), de la cadena respiratoria mitocondrial. Los intermediarios de esta reacción ( $e^-$ ,  $H^+$ ,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH$  y  $H_2O$ ), quedan unidos al sitio activo del citocromo-oxidasa y no difunden al resto de la célula en condiciones normales. La molécula de  $O_2$ , genera por su reducción parcial a las siguientes especies reactivas:

$O_2^-$ = anion superóxido

$OH$ = radical hidroxilo

$H_2O_2$ = peróxido de hidrógeno

$O_2$ = oxígeno

El peróxido de hidrógeno tiene capacidad de generar  $OH$  en presencia de metales como el hierro, por lo que se le considera como ROS (Rodríguez y cols., 2001; Boelsterli, 2003).

Los ROS son producidos continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (incluyendo catalizador-enzimático en transferencia de electrones en la mitocondria, durante procesos oxidativos de CYP y de otros procesos enzimáticos (oxidación xantina, ciclooxigenasa). Son componentes normales de las células y tejidos, existiendo una poza de ROS particular en cada estirpe celular. Al elevarse o disminuir las concentraciones fisiológicas de ROS puede acarrear importantes alteraciones funcionales como por ejemplo, el cáncer (Boelsterli, 2003).

Los ROS colisionan con moléculas oxidándolas, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. En el caso de lípidos (ácidos grasos polinsaturados), se dañan las estructuras ricas en ellas como las membranas celulares y las lipoproteínas. En la primera se altera la permeabilidad provocando la muerte celular y en la segunda, la oxidación de LDL. La oxidación lipídica por ROS, se debe a una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina, lo que se conoce como “peroxidación lipídica”. En las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos y como consecuencia se forma entrecruzamiento de cadenas peptídicas, fragmentación de proteínas y formación de grupos carbonilos impidiendo sus actividades (transportadores iónicos de membrana, receptores y mensajeros celulares, etc). En el ADN, los ROS producen bases modificadas, lo que genera mutaciones y carcinogénesis, por una parte, o la pérdida de expresión por daño al gen específico (Rodríguez y cols., 2001).

## REFERENCIAS

Ahmad S., A. Hoda and M. Afzal. 2002. Additive action of vitamins C and E against hydrocortisone induced genotoxicity in human lymphocyte chromosomes. *International Journal Vitamin Nutrient Research* **72**:204-209.

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

Blasiak J. and J. Kowalik. 1999. Protective action of sodium ascorbate against the DNA-damaging effect of malaoxon. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **65**:110-118.

Boelsterli U.A., 2003. Mechanistic toxicology. Taylor and Francis. Great Britain. 93-147.

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

Brooks D. J., U. G. Paton and G. Vidanes. 2001. Induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* **10**: 949-954.

Calléja F., J. G. Jansen, H. Vrieling, F. Laval and A. A. Van Zeeland. 1999. Modulation of the toxic and mutagenic effects induced by methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells by overexpression of the rat N-alkylpurine-DNA glycosylase. *Mutation Research* **425**:0185-194.

Cancino-Badías L., A Leiva González, G. Garrido, M. Cossío Ayala and E. Prietó González. 2001. VIMANG: los efectos antígenotóxico y modulador de las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa. *Rev. Cubana de Investigación Biomédica* **20**: 48-53.

Clark, A. M. 1982. The use of larval stages of *Drosophila* in screening for some naturally occurring mutagens. *Mutation Research* **2**: 89-97.

Clifford Conaway C., S. M. Getahun, L. L. Liebes, D. J. Pusateri, D. K. W. Topham, M. Botero-Omary and F.-L. Chung. 2000. Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutrition and Cancer* **38**: 168-178.

Chang M., M. Bellaoui, Ch. Boone and G. W. Brown. 2002. A genome-wide screen for methyl methanesulfonate sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Genetics*. **99**: 16934-16939.

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

Cooke S. M., M. D. Evans, I. S. Podmore, K. E. Herbert, N. Mistry, P. Mistry, P. T. Hickenbotham, A. Hussieni, H. R. Griffiths and J. Lunec. 1998. Novel repair action of vitamin C upon in vitro oxidative DNA damage. *FEBS Letters* **363**: 363-367.

Cooke S. M., N. Mistry, J. Ahmad, H. Waller, L. Langford, R. J. Bevan, M. D. Evans, G. N. D. Jones, K. E. Herbert, H. R. Griffiths and J. Lunec. 2003. Deoxycytidine glioxal lesion induction and evidence of repair following vitamin C supplementation in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* **34**: 218-225.

Cullinton B. J. 2000. The complete genome sequense of *Drosophila melanogaster* will be a powerful tool for using fly biology to study human medicine. Genome News Network. [en línea] [fecha de acceso 20 de enero del 2006; fecha de actualización 20 de enero del 2006]; Disponible en: [http://www.genomenewsnetwork.org/articles/03\\_00/article\\_fly\\_3\\_24.shtml](http://www.genomenewsnetwork.org/articles/03_00/article_fly_3_24.shtml).

Danielson P. B., J. L Fister, M. M McMahill, M. K Smith and J. C Fogleman. 1998. Induction by alkaloids and Phenobarbital of Family 4 cytochrome P450s in *Drosophila*: evidence for involvement in host plant utilization. *Molecular & General Genetics* **259**: 54-59.

Danielson, P. B., R. J MacIntyre and J. C. Fogleman. 1997. Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome p450s: evidence for involvement in host-plant allelochemical resistance. *Proceedings of the National Academy od Sciences of the United States of America* **94**: 10797-10802.

De Buendía G. P. 1998. Search for DNA repair pathways in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/ DNA Repair* **407**: 67-84.

Dueñas-García, I. E., V. Vega-Contreras, J.C. Gómez-Luna, L.F. Sánchez-Santos, L. Castañeda-Partida, A. Durán-Díaz and M.E. Heres-Pulido. 2005. Toxicity parameters of 4-nitroquinoline-1-oxide, urethane and methyl methanesulfonate in the *flare* and *Oregon-flare* strains of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service* **88**: 83-89.

Dunkov, B. C., R. Rodríguez-Arnaiz, B. Pittendrigh, R. H. French-Constant and R. Feyereisen. 1996. Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. *Molecular & General Genetics* **251**: 290-297.

Dusenbery R. L. and P. D. Smith. 1996. Cellular responses to DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/ DNA Repair* **364**: 133-145.

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

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

Fenech M. 2005 The genome health clinic and genome health nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis* **20**: 255-269.

Flora D. S., M. Bagnasco and H. Vainio. 1999. Modulation of genotoxic and related effects by carotenoids and vitamin A in experimental models: mechanistic issues. *Mutagenesis* **14**:153-172.

Frei, H. and Würgler, F. E. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research* **334**: 247-258.

Frei, H. and Würgler, F. E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research* **203**: 297-308.

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

Friedman A. A. 1997. Anti-cancer effect of broccoli: selective inhibition of transformed mammalian cell growth by *Brassica oleracea* extract. *Academy of Science*. **50**: 665-669.

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

Gingras D., G. M. Boivin, D. Moghrabi, A. Théorêt, and Y. Béliveau R. 2004. In . . . . . 51  
of meduloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from *Brassica* vegetables. *Cancer Letters* **203**: 35-43.

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

Goncebat R. 2005. Brócoli el anticancerígeno número uno. Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agropecuaria y Ganadería del Ecuador[en línea] [fecha de acceso 25 de noviembre del 2005; fecha de actualización 25 de noviembre del 2005]; Disponible en: [http://www.ocvive.com/mi\\_cocina/1121\\_mi\\_cocina\\_wr-comida\\_saludable\\_brocoli.shtml](http://www.ocvive.com/mi_cocina/1121_mi_cocina_wr-comida_saludable_brocoli.shtml).

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

Graf U., C. B. Hall and N. van Schaik. 1990. On the use of excision repair defective cells in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **16**: 225-237.

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

Graf U., M. A. Spanó, J. G. Rincón, S. K. Abraham and H. H. De Andrade. 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: an efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *Environment Mutagenesis Carcinogenesis* **16**: 1-7.

Green M. H. L., J. E. Lowe, A. P. W. Waugh, K. E. Aldridge, J. Cole and C. F. Arleh. 1994. Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly isolated human with blood cells. *Mutation Research-DNAging Genetic Instability and Aging* **316**: 91-102.

Greenwald P., C. K. Clifford and J. A. Milner. 2001. Diet and cancer prevention. *European Journal of Cancer* **37**: 948-965.

Greggi Antunes L. M. and C. S. Takahashi. 1998. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutation Research* **419**: 137-143.

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

Halliwell B. 1999. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea?. *Trends in Biochemical Sciences* **24**:255-259.

Hällström, I., A. Blanck, and S. Atuma. 1984. Genetic variation in cytochrome P450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Pharmacology* **33**:13-20.

He Y. H., M. D. Friesen., R. J. Ruch and H. A. J. Schut. 2000. Indole-3-carbinol as a chemopreventive agent in 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol (4, 5, b) pyridine

(phIp) carcinogenesis: Inhibition of phIp-DNA adduct formation, acceleration of phIp metabolism and induction of cytochrome P450 in female F344 Rats. *Food Chemistry Toxicology* **38**: 15-23.

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

Heres-Pulido M. E., I. Dueñas García, L. Castañeda Partida, A. Sánchez García, M. Contreras Sousa, A. Durán Díaz y U. Graf. 2004. Genotoxicity of tamoxifen citrate and 4-nitroquinoline-1-oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*. **19**: 1-7.

Hertzog Santos J., U. Graf, M. L. Reguly and H. H. Rodríguez de Andrade. 1999. The synergistic effects of vanillin on recombination predominate over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* **444**: 355-365.

Horváthová E., D. Slamenová, L. Hlincíková, T. K. Mandal, A. Gábelová and A. R. Collins. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research* **409**: 163-171.

Hncirík K., J. Valusek and J. Velísek. 1998. A study on the formation and stability of ascorbigen in a aqueous system. *Food Chemistry* **63**:349-355.

Hrcirík K. J. Valusek and J. Velisek. 2001. Investigation of ascorbigen as a breakdown product of glucobrassicin autolysis in Brassica vegetables. *European Food Research and Technology* **212**: 576-581.

Hsien Lin C. and C. Yue Chang. 2005. Textural change and antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments. *Food chemistry* **90**:9-15.

Jeffery E. H., A. F. Brown, A. C. Kurilich, A. S. Keck, N. Matusheski, B. P. Klein and J. A. Juvik. 2003. Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis* **16**: 323-330.

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

Joong Kim D., D. Hwan Shin, B. Ahn, J. Seok Kang, K. Taek Nam, C. Beom Park, C. Kyu Kim, J. Tae Hong, Y. B. Kim, Y. Won Yun, D. Deuk Jang and K. H. Yang. 2003. Chemoprevention of colon cancer by Korean food plant components. *Mutation Research* **523-524**:99-107.

Kall M. A., O. Vang and J. Clausen. 1997. Effects of dietary broccoli on human drug metabolizing activity. *Cancer Letters* **114**: 169-175.

Kassie F., W. Parzefall, S. Musk, I. Johnson, , G. Lamprecht, G. Sontag and Siegfried S. Knasmüller. 1996. Genotoxic effects of crude juices from *Brassica* vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells. *Chemico-Biological Interactions* **102**: 1-16.

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

Kaya B. 2003. Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. *Turk Journal Biology* **27**: 241-246.

Kaya B., A. Creus, A. Velásquez, A. Yanikoglu and R. Marcos. 2002. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Research* **520**: 93-101.

Keck A. S., Q. Quiao and E. H. Jeffery. 2003. Food matrix effects on bioactivity of broccoli-derived sulforaphane in liver and colon of F344 rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**:3320-3327.

Klamt F., F. Dal-Pizzol, R. Roehrs, R. Birnfeld de Oliveira, R. Dalmolin, J. A. P. Henriques, H. H. Rodrigues de Andrades, A. L. L. Paula Ramos, J. Saffi and J. C. Fonseca Moreira. 2003. Genotoxicity, recombinogenicity and cellular preneoplastic transformation induced by Vitamin a supplementation. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **539**: 117-125.

Kong Tony A. N., E. Owuor, R. Yu, V. Hebbar, C. Chen, R. Hu and S. Mandlekar. 2001. Induction of xenobiotic enzymes by the map kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug metabolism reviews* **33**: 255-271.

Konopacka M., M. Widel and J. Rzeszowska-Wolny. 1998. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutation Research* **417**: 85-94.

Kontush A., U. Mann, S. Arlt, A. Ujeyl, C. Lührs, T. Müller-Thomsen and U. Beisiegel. 2001. Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* **31**:345-354.

Lehman M., U. Graf, M. L. Reguly and H. H. Rodríguez de Andrade. 2000. Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **36**:195-200.

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

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

Luque Cabrera J. and A. Herráez Sánchez. 2001. Texto ilustrado de: Biología molecular e Ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. España. Harcourt 469pp.

Lunec J., K. A. Hollaway, M. S. Cooke, S., Faux, H. R. Griffiths and M. D. Evans. 2002. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radical Biology and Medicine* **33**: 875-885.

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

Manahan S. E. 2003. Toxicological chemistry and biochemistry. Lewis Publishers. 3<sup>a</sup> ed. Washington, 425 pp.

Mitchell, I. and Combes, R. 1984. Mutation test with the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Mutagenicity testing* 149-155.

Morimitsu Y., Y. Nakagawa, K. Hayashi, H. Fujii, T. Kumagai, Y. Nakamura, T. Osawa, F. Horio, K. Itoh, K. Iida, M. Yamamoto and K. Uchida. 2002. A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *Journal Biology Chemistry* **5**: 3456-3463.

Morris M. C., L. A. Beckett, P. A. Scerr, L. E. Hebert, D. A. Bennett, T. S. Field and D. A. Evans. 1998. Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease. *Alzheimer disease and associated disorders* **12**: 121-126.

Mukherjee S. and J. Sekelsky. 2006. Identifying novel genes in Double Strand Break Repair in *Drosophila*, 47<sup>th</sup> Annual *Drosophila* Research Conference Program and Abstracts, 253.

Munday R. and Ch. M. Munday. 2004. Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanates with sulforaphane and related compounds. *Journal of agricultural Food Chemistry* **52**: 1867-1871.

Murray R. K., D. R Granner., P. A Mayes and V. W Rodwell. 1992. Bioquímica de Harper. Manual Moderno. 12. México, 656-660.

Musk S. R. R., T. K. Smith and L. T. Johnson. 1995. On the cytotoxicity and genotoxicity of allyl and phenethyl isothiocyanates and their parent glucosinolates sinigrin and gluconastutiin. *Mutation Research* **384**: 19-23.

Niki E., N. Noguchi, H. Tsuchihashi and N. Gotoh. 1995. Interaction among vitamin C, vitamin E. and  $\beta$ -carotene. *American Journal of Clinical Nutrition* **62**:1322-1326.

Omenn G. S., G. E. Goodman, M. D. Thornquist, J. Balmes, M. R. Culler, A. Glass, J. P. Keogh, Jr. F. L. Meyskens, b. Valanis, Jr. J. H. Williams, S. Barnhart and S. Hammar. 1996. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine* **334**:1150-1155.

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

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

Petri N., C. Tannergen and B. Holst. 2003. Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II, in human jejunum *in vivo*. *Drug Metabolism and Disposition* **31**: 805-813.

Podsdek A. 2005. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. Artículo en prensa.

Poltoratsky V., J. K Horton, M. Prasad and S. H. Wilson. 2005. REV 1 mediated mutagenesis in base excision repair deficient mouse fibroblast. *DNA Repair* **4**:1182-1188.

Rench Franke. S. I., D. Prá, B. Erdtmann, J. A. Pêgas Henriques and J. da Silvia. 2005. Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an *in vivo* analysis. *Mutagenesis* **20**: 279-283.

Rech Franke S. I., D. Prá, J. da Silva, B. Erdtmann and J. A. Pêgas Henriques. 2005. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> in mouse blood cells *in vivo*. *Mutation Research* **583**:75-84.

Rehman A., C. S. Collis, M. Yang, M. Kelly, A. T. Diplock, B. Halliwell and C. R. Evans. 1998. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochemical and biophysical research communications* **246**: 293-298.

Rodríguez-Arnáiz R., P. O Soto., J. C Gaytán-Oyarzún and U. Graf. 1996. Analysis of mitotic recombination induced by several mono and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing-spot test. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **351**: 133-145.

Rodríguez Perón J. M., J. R. Méndez López and Y. Trujillo López. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista cubana médica militar* **30**: 36-44.

Ross R. K., S. J London, and J. M. Yuan. 2000. Isotiocyanates, glutathione S-transferase: a prospective study of men in Shanghai, China *Horto Science* **356**: 724-729.

Rubin G. M., M. D Yandell., J. R. Wortman and G. L. Gabor Miklos. 2000. Comparative genomics of the eukaryotes *Science* **287**: 2204-2215.

Sánchez Lamar A., G. Fonseca López, N. Capiro Trujillo and D. Fernández Fuentes. 2000. Propuesta de una ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Revista Cubana Farmacéutica* **34**:34-43.

Saner. C. Weibel, B. Würgler, F. and C. Senggstag. 1996. Metabolic of promutagens catalyzed by *Drosophila melanogarter* CYP6A2 enzyme in *Saecharomyces cerevisiae*. *Environmental Molecular Mutagenesis* **27**: 46-58.

Savina N., O. Dalivelya and T. Kuzhir. 2003. Adaptative response to alkylating agents in *Drosophila* sex-linked recessive lethal assay. *Mutation Research* **535**:195-204.

Seidel D. S., B. R. Sparrow, H. L. Kan, W. T. Stott, M. R. Shisler, V. A. Linscombe and B. B. Gollapudi. 2004. Profiles of gene expression changes in L5178Y mouse lymphoma cell treated with methyl methanesulfonate and sodium chloride. *Mutagenesis* **19**: 195-201.

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

Smith J. P. and Ch. J. Jones. 1999. DNA recombination and repair. Oxford University Press. New York. 236pp.

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

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

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

Takahashi N., R. H. Dashwood, L. F. Bjeldanes, D. E. Williams and G. S. Bailey. 1995. Mechanisms of Indole-3-carbinol (I3C) anticarcinogenesis: inhibition of aflatoxin b1-DNA adduction and mutagenesis by I3C acid condensation products. *Food and Chemical toxicology* **33**: 851-857.

Talalay, P. 1999. The war against cancer: new hope. *Proceedings of the American Society* **143**: 52-72.

Tao K. S., C. Urlando and J. A. Heddle. 1993. Mutagenicity of methylmethanesulfonate *in vivo* at the *dlb-1* locus and a *lac I* transgene. *Environmental Molecular Mutagenesis* **22**: 293-296.

Teaf CH M. and P. J. Middendorf. 2000. Mutagenesis and genetic toxicology In: Principles of toxicology: Environmental and industrial applications. 2a ed. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A., 240-264 .

Tian Q. R. A. Rosselot, S. J. Schwartz. 2005. Quantitative determination of intact glucosinolatos in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometri Analytical. *Biochemistry* **343**:93-99.

Toporek M. 1984. Bioquímica 3ª edición Interamericana México. 523 .

Vang O., H. Jenesen and H. Autrup. 1991. Induction of cytochrome P-450IA1, IA2, IIB1, IIB2 and IIE1 by broccoli in rat liver and colon. *Chemico-Biological Interactions* **78**: 85-96.

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

Vang O, J. Mortensen and O. Andersen. 2001. Biochemical effects of dietary intake of different bróccoli samples. II. Multivariate analysis of contributions of specific glucosinolates in modulating cytochrome P-450 and antioxidant defense enzyme activities. *Metabolism* **50**: 1130-1135.

Verhoeven D. T. H., H. Verhagen, R. A. Goldbohm, P. A. van den Brandt and G. van Poppel. 1997. Mini review: A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions* **103**: 79-129.

Vijayaraghavan R. C. Panneerselvam. 2005. Protective role of vitamin E on the oxidative stress in Hansen's disease (Leprosy) patients. *European Journal of Clinical Nutrition*. **59**: 1121-1128.

Vogel E. W., U. Graf, H. J. Frei, and M. M. Nivard. 1999. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC, Scientific Publics* **146**: 427-470.

Vogel E. W. 1991. Genotoxic Chemicals. An introduction into basic principles of genetic toxicology. Apuntes del primer taller Latinoamericano en Genética Toxicológica en *Drosophila melanogaster*. Tlaxcala, México. Sin publicar.

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

Won Nho C. and E. Jeffery. 2001. The synergistic upregulation of phase II detoxification enzymes by glucosinolate breakdown products in cruciferous vegetables. *Toxicology and Applied Pharmacology* **174**: 146-152.

Zhang Y. and E. C. Collaway. 2002. High cellular accumulation of sulphoraphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate. *Biochemistry* **364**: 301-307.

Zhang, Y., R. H. Kolm., B. Mannervik and P. Talalay. 1995. Reversible conjugation of isothiocyanates with glutathione catalyzed by human glutathione transferases. *Biochemical Biophysical Research Communications* **206**: 748-755.

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

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