

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Valoración del efecto genotóxico del co-tratamiento metilmetanosulfonato y sulforafano en *Drosophila melanogaster* mediante SMART en ala”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ALEJANDRA SÁNCHEZ SANTOS

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. MARÍA EUGENIA HERES PULIDO



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉX.

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

Tú que en silencio me has acompañado a lo largo de mi vida y sin pedirme nada a cambio, hoy me regalas la alegría de ver realizado uno más de mis sueños. No tengo como agradecerte, ni con que pagarte guarda mi corazón cerca de ti y guíame día con día en el camino que lleva hacia ti.

GRACIAS DIOS

DEDICATORIA

A MIS PADRES por todos sus esfuerzos, sus desvelos, sus sacrificios para que yo pudiera terminar mi carrera profesional. Por las lágrimas que cayeron de sus ojos cuando sus sueños se quebraban. Por haberme dado todo, por enseñarme que lo que cuenta no es lo que tienes en la vida, sino a quienes tienes en ella, **LOS QUIERO**. Este triunfo también es de ustedes

AGRADECIMIENTOS

A mis hermanas por todo el apoyo que me han brindado en el transcurso de mi vida, por toda la ayuda recibida, por la vida misma, quiero agradecer todo el amor, paciencia y comprensión para conmigo. Por todo y mucho más..... GRACIAS

A mis sobrinos por ese brillo en sus miradas que iluminó mi hogar y a la familia Gallegos Santos por su apoyo y cariño.

A mi tía Araceli y a Doña Luisa por que a veces solía correr sin dirección, dormir sin tranquilidad, gracias por guiarme y por hacer más ligero mi camino.

A mis amigos Blanca, David, Lorena y Samantha por el apoyo que en cada segundo de mi vida me han brindado. Por sus cuidados, amor y comprensión; por sus consejos, por las palabras de aliento escuchadas en los momentos más difíciles. Por compartir tristezas y alegrías, éxitos y fracasos pero sobre todo por su amistad. MIL GRACIAS.

A mis amigos de la carrera Diana, Enrique, José Luis, Marcelo, Miguel, Néstor y Rosalba por el cariño, comprensión y apoyo brindados en las derrotas y logros obtenidos, por la tolerancia y locura compartida, por coincidir conmigo en esta vida. Gracias por su amistad.

A mis compañeros de grupo y a los que me faltaron, mil gracias por los breves pero sin duda agradables momentos durante mi estancia en la Universidad.

A mi directora de tesis la M. en C. Ma. Eugenia Heres por su profesionalismo, por sus consejos, por enseñarme a querer avanzar siempre un poco más, a descubrir y a valorar la vida y el mundo de la Genética Toxicológica. Fue un placer haber sido su alumna.

A las M. en C. Irma Elena Dueñas y Laura Castañeda por su cariño, por enriquecer mi vida profesional y personal, pero sobre todo por hacer mi estancia en el Laboratorio muy agradable.

A mis compañeros de Laboratorio: Juan Carlos, Luis, Paty, Stephanie y Viridiana por compartir historias, cuentos y relatos; pero sobre todo por el apoyo y cariño brindado.

Al Dr. Diego Arenas y al Dr. Elías Piedra gracias por su tiempo y por sus comentarios que enriquecieron esta investigación.

A mis maestros por toda su ayuda, enseñanza y consejos a lo largo de la carrera, pero sobre todo por transmitirme su pasión por la biología.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir mi estancia en ella y por ser la máxima casa de estudios.

Y a todas las personas que me han ayudado de una u otra manera durante mi vida personal y como estudiante.

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Metabolismo Xenobiótico (MX).....	4
1.2 Metilmetanosulfonato (MMS).....	7
1.3 Sulforafano (SF)	10
1.4 ARE (<i>Antioxidant response element</i>).....	11
1.5 Prueba SMART.....	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	17
3. OBJETIVO	17
4. HIPÓTESIS.....	17
5. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6. RESULTADOS	20
6.1 Cruza ST	23
6.2 Cruza HB	25
7. DISCUSIÓN.....	29
8. CONCLUSIONES.....	34
9. REFERENCIAS.....	34
10. ANEXOS.....	42

RESUMEN

El Sulforafano (SF) es un isotiocianato derivado del brócoli (*Brassica oleracea* var. *itálica*) que ha sido reportado como un agente potencial quimioprotector contra el cáncer en diferentes órganos. Induce apoptosis y detiene el ciclo celular. Inhibe la fase I (CYP450s) del metabolismo xenobiótico (MX) e induce la fase II que elimina genotóxicos por conjugación. Activa los genes de respuesta al estrés oxidativo (*ARE/EpRE*), protegiendo contra el daño en el DNA causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS). El metilmetanosulfonato (MMS) es un alquilante directo monofuncional con gran afinidad a los centros nucleofílicos del DNA, especialmente en los N7G y N3A, e independiente de la fase I del MX. Se evaluó en las cruzas estándar (ST) y bioactivación elevada (HB) de la prueba en el ala SMART de *Drosophila melanogaster*, el papel del SF (0, 8.9, 18 y 35 mM) como un agente que no debía tener efecto en co-tratamientos con el MMS (0.5 mM, LC₄₀). Se determinó la pérdida de heterocigosis de los marcadores *mwh* +/- + *flr*³ en el ala de ambas cruzas. Sorprendentemente, en la craza ST se obtuvo una clara concentración-respuesta al SF y una disminución en la frecuencia de clones/ individuo, indicando un efecto protector. En la craza HB sólo el SF 35 mM disminuyó significativamente la frecuencia de clones/ individuo. Se propone que los resultados se deben a que el SF induce la activación de la respuesta *ARE/EpRE*, lo que podría haber disminuido las especies electrofílicas derivadas de los efectos del MMS.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las enfermedades con mayor importancia en las áreas urbanas por ser la principal causa de muerte, superando a las enfermedades cardiovasculares, ya que en pacientes con cáncer avanzado a menudo los tratamientos no salvan sus vidas y causan una tremenda devastación económica y social. No obstante existen enormes avances en el conocimiento de las bases moleculares del cáncer y el desarrollo de nuevos diagnósticos y tratamientos (Talalay, 1999).

El cáncer se caracteriza por el rápido crecimiento de tejidos y su origen celular (carcinogénesis), es típicamente un proceso que permanece oculto durante muchos años. Existe una amplia evidencia de que a través de daños repetidos al DNA por cancerígenos se produce la activación secuencial de oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores, entre otros, lo cual constituye la base molecular de la carcinogénesis (Lippman *et al.*, 2002; Sporn *et al.*, 2000).

El término cancerígeno se refiere a un agente químico, biológico o físico capaz de cambiar de forma permanente, directa y en la mayoría de los casos irreversible, la estructura molecular del componente genético de una célula. Puede ocasionar: la división incompleta de la cadena de DNA en uno o más lugares, la eliminación de uno de sus componentes, o errores en la reparación del DNA. Los cancerígenos químicos se pueden clasificar en dos categorías basadas en su capacidad para fijarse al DNA: los compuestos que se fijan al DNA se denominan genotóxicos, mientras que aquellos que no presentan evidencia de fijación al DNA se denominan epigenéticos. Los genotóxicos son por mucho la causa más importante de carcinogénesis en mamíferos (Nebbia, 2001; Guengenrich, 2000).

El desarrollo de productos químicos naturales y sintéticos en los campos farmacéutico, industrial, agrícola y cosmetológico entre otros, generan compuestos llamados xenobióticos que al estar en contacto con el humano pueden provocar efectos tóxicos, genotóxicos o cancerígenos a corto, mediano o largo plazo (Loomis, 1982). La exposición a los xenobióticos puede ser inadvertida y accidental, e incluso inevitable.

1.1 Metabolismo Xenobiótico (MX)

Existe un mecanismo celular para desactivar los compuestos tóxicos internos y externos llamado metabolismo xenobiótico (MX) proceso mediante el cual el agente químico sufre una serie de cambios químico-estructurales para su eliminación por el riñón, el pulmón, el bazo, la placenta y el hígado de mamíferos. El MX se divide en dos fases: Fase I y Fase II.

En la Fase I ocurre un conjunto de reacciones de biotransformación por reducción, peroxidación y preferentemente oxidación, para transformar a agentes químicos endógenos (esteroides, sales biliares, ácidos grasos, prostaglandinas, etc.) y exógenos o xenobióticos (productos naturales en plantas, drogas, contaminantes ambientales, etc.) en moléculas más polares al exponer o introducir grupos funcionales (-OH, -NH₂, -SH). Para realizar este trabajo algunas células procariontes y todas las eucariontes cuentan con una super familia de enzimas denominada Citocromo P450 (CYP450), que están presentes en mamíferos e insectos con muchas isoformas con especificidad para sustratos y que parcialmente se superponen (Boelsterli, 2002). Se han determinado más de 400 genes diferentes de CYP450s y en *Drosophila* hay aproximadamente unos 90 genes diferentes para estas enzimas (FlyBase, 2006).

Los CYP450s son heterodímeros formados por dos proteínas diferentes, una enzima con función reductasa (NADPH-CYP) y otra con actividad monoxigenasa que contiene un grupo hemo. Este grupo tiene un átomo de Fe²⁺ al que se le une una molécula de oxígeno (O₂), pero también se le puede unir una de monóxido de carbono (CO). El nombre de CYP450 se deriva de las propiedades del espectro de esta proteína. En su forma reducida (ferrosa) es capaz de unirse al CO para formar un ferrocarbonilo aductor que absorbe en una forma máxima a 450 nm en la región visible del espectro magnético (Lee *et al.*, 2003). Los CYP450s son capaces de catalizar una gran variedad de reacciones pero tienen preferencia por las reacciones de oxidación.

Para que se lleven a cabo las oxidaciones de los xenobióticos se requiere la presencia de la monoxigenasa CYP450, la NADPH-CYP reductasa y el oxígeno molecular. El mecanismo de la reacción de oxidación del xenobiótico catalizada por los CYP450s, inserta en el xenobiótico un átomo de oxígeno que proviene de la molécula de oxígeno:



donde R es el agente químico o su metabolito, y los hechos sucesivos son los siguientes:

1. El agente químico entra al sitio activo de la monoxigenasa (CYP450).
2. La NADPH-CYP reductasa transfiere sucesivamente dos electrones al hierro del grupo hemo del CYP450 reduciéndolo del nivel III al nivel II cada vez.
3. La reducción abre un sitio activo en el CYP450 al que se une una molécula de oxígeno.
4. La molécula de oxígeno se escinde en sus dos átomos.
5. Se oxida el agente químico al recibir uno de los dos átomos de oxígeno.
6. El segundo átomo de oxígeno es reducido formando una molécula de agua que se libera.
7. Del CYP450 se libera el agente químico oxigenado.

Si los metabolitos de la Fase I tienen o logran una polaridad suficiente pueden ser excretados con facilidad. No obstante, muchos productos de la Fase I no se eliminan con rapidez y participan en una reacción subsecuente. En la Fase II un substrato endógeno como el ácido glucorónico, el ácido acético, una combinación de aminoácidos, y principalmente el tripéptido glutámico-glicina-cisteína denominado glutatión (GSH), se unen al nuevo grupo funcional para formar un conjugado con una polaridad más elevada. Aunque en algunos casos el agente químico original puede ya poseer un grupo funcional capaz de formar un conjugado

en forma directa. De esta forma las reacciones de la Fase II pueden preceder o sustituir a las de la Fase I (Lee *et al.*, 2003).

La glutatiónización (mecanismo de emergencia) consiste en la adición de GSH a través de la unión de su grupo sulfidilo (nucleofílico) con un carbón electrofílico del agente químico. La reacción es catalizada por la glutatión S-transferasa (GST [EC 2.5.1.18]), los metabolitos se degradan en derivados cisteínicos y después son acetilados hasta formar conjugados de N-acetilcisteína siendo excretados en la bilis y la orina (Goodman y Gilman, 2003) (Figura 1).

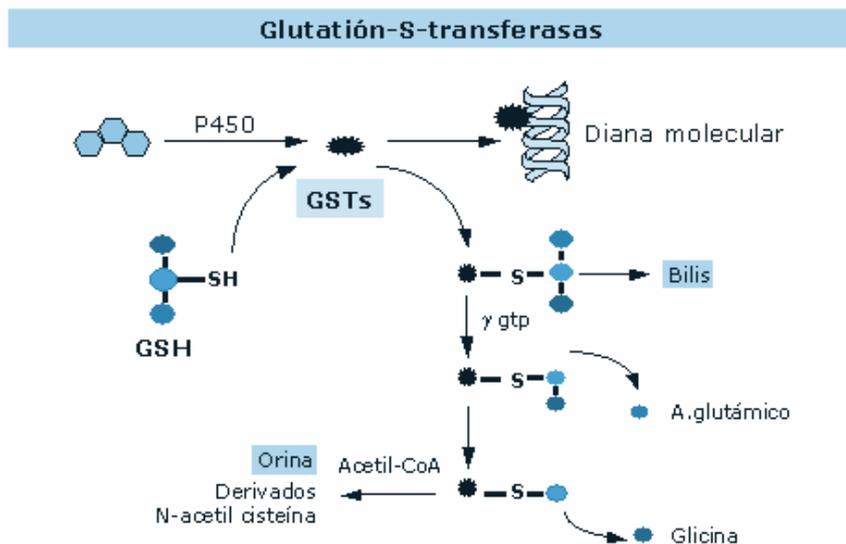


Fig. 1. Mecanismo de acción de la GST (Modificado de Goodman y Gilman, 2003)

En algunos casos, la inducción de las enzimas de la Fase I o II de este metabolismo que se consideran benéficas, pueden biotransformar agentes químicos convirtiéndolos en genotóxicos (Goodman y Gilman, 2003).

1.2 Metilmetanosulfonato (MMS)

Existen dos tipos de agentes genotóxicos: indirectos y directos. Los indirectos requieren activación enzimática para dañar al DNA; los directos reaccionan con el DNA o con las proteínas sin requerir activación enzimática. Entre los genotóxicos directos se encuentran los agentes alquilantes como el metilmetanosulfonato (MMS).

El MMS (Figura 2) es un solvente anteriormente utilizado como insecticida, y en tratamientos contra el cáncer como fármaco antineoplásico o citostático. Fue uno de los primeros en utilizarse para tratar los tumores malignos, ya que es activo durante todo el ciclo celular, aunque presenta mayor efecto sobre las células en división ya que puede formar enlaces cruzados entre las moléculas biológicas. Es un agente alquilante monofuncional (con un grupo reactivo CH₃), con gran afinidad a los centros nucleofílicos del DNA, alquilando el N7 de la Guanina, N3 de la Adenina de manera preferente, y en menor cantidad el O⁶ de la Guanina (Jenkins *et al.*, 2005).

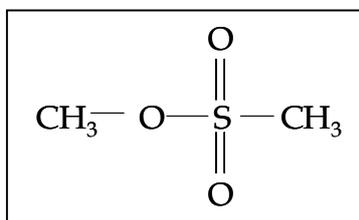


Fig. 2. Estructura química del metilmetanosulfonato (MMS) (Vogel, 1991).

Los alquilos son citotóxicos y mutagénicos, provocan aductos en el DNA, enlaces cruzados (*cross links*) entre dos moléculas DNA-DNA y DNA-proteínas, así como rompimientos que pueden generar aberraciones cromosómicas y otros daños. Los aductos en los oxígenos de las bases producen transiciones (O⁶-G de GC a AT; O⁴-T de AT a GC) o transversiones (O²-T de AT a TA). Las N-alquilpurinas no producen desemparejamientos durante la replicación, pero tienden a formar sitiosapurínicos/apirimídicos (sitios AP). La ausencia de una base nitrogenada altera el código genético si la cadena implicada es la que se transcribe y se traduce, además

el sitio AP puede provocar que la replicación se detenga ya que no es un molde adecuado. Si se inserta un nucleótido, que normalmente no es el correcto (3 de cada 4 serán incorrectos) se provocan mutaciones (Jenkins *et al.*, 2005). Sin embargo las células tienen sistemas de reparación que contrarrestan y corrigen este tipo de lesión.

La Reparación por Escisión de Bases (BER) es considerado el sistema de reparación predominante del DNA en células de mamíferos para eliminar las lesiones pequeñas en las bases del DNA generadas por compuestos exógenos o endógenos. Como ya se ha explicado el daño al DNA puede ser causado por exposición a agentes ambientales o por el proceso metabólico celular normal que produce Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), moléculas alquilantes y otros metabolitos reactivos capaces de modificar el DNA (Sobol, 2002).

En términos generales este sistema de reparación funciona así:

- 1) BER se inicia con el reconocimiento del daño en una a siete bases del DNA.
- 2) Las DNA glicosilasas rompen el enlace glucosídico formando sitios AP.
- 3) Las endonucleasas AP rompen el enlace azúcar-fosfato en el sitio AP.
- 4) Las exonucleasas eliminan los residuos.
- 5) La DNA polimerasa I rellena el hueco insertando desoxiribonucleótidos complementarios a los de la cadena intacta. La enzima añade las bases al extremo 3'-OH del DNA cortado.
- 6) La DNA ligasa sella el corte que queda en el extremo 3'-OH de la última base insertada, cerrando así el hueco (Figura 3).

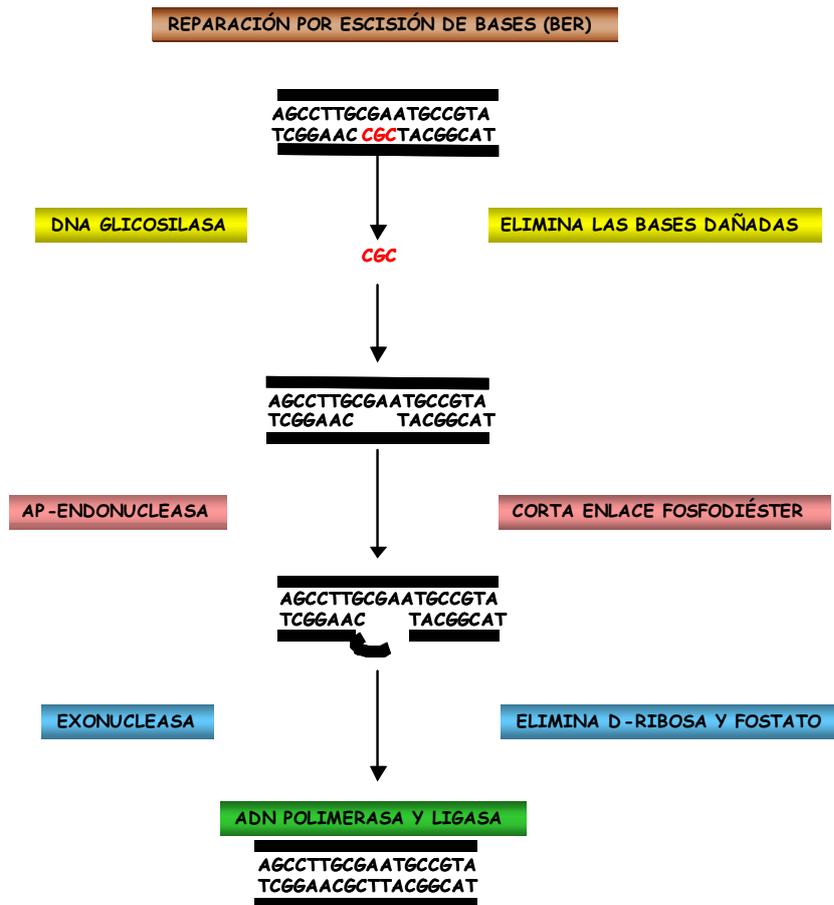


Fig. 3. Sistema de reparación por escisión de bases (Friedberg *et al.*, 1995).

En años recientes, ha obtenido gran atención el estudio de los antimutágenos y/ o anticancerígenos de una amplia variedad de químicos presentes en la comida (Stravric, 1994). Éstos han sido extensamente estudiados con respecto a su capacidad para prevenir o minimizar efectos deletéreos producidos por un incremento en el número de mutágenos y cancerígenos ambientales; han sido identificados en frutas frescas, vegetales, vitaminas, minerales, condimentos, café, té e infusiones (Ferguson, 1994). Por consiguiente, la comida y la bebida ordinaria pueden ser fuente de varias sustancias capaces de prevenir algunas enfermedades humanas. Así la reducción del riesgo de cáncer parece depender, entre otras causas, de dietas ricas en frutas y verduras.

1.3 Sulforafano (SF)

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

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

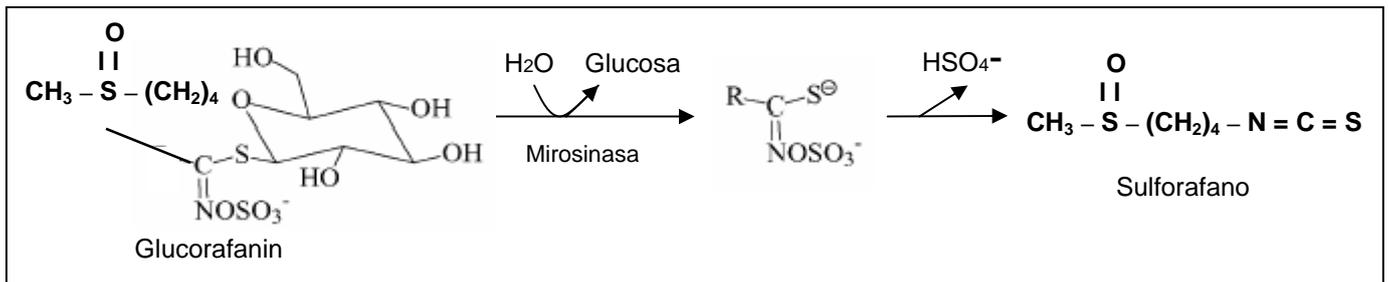


Fig. 4. La conversión de glucorafanin a sulforafano por hidrólisis mediante la mirosinasa (modificado de Zhang, 2004).

El SF reduce la incidencia y la multiplicación de la célula cancerosa en ratas (Jackson y Singletary, 2004), protege células epiteliales del pigmento retinal en humanos (Gao y Talalay, 2004) y tiene efecto antioxidante en células del músculo liso en ratas (Fahey *et al.*, 1997). Jackson y Singletary (2004) demostraron que induce la Fase II del MX, inhibe tumores mamarios provocados químicamente en ratas e induce la detención del ciclo celular, además induce la apoptosis en células de cáncer de colon. Singh *et al.* (2004) demostraron que el SF induce apoptosis en células humanas cultivadas de cáncer de próstata, reflejando la reducción de 50%

en el volumen del tumor. También detiene la progresión del ciclo celular y quizá afecta otras funciones celulares, entre las cuales destaca la de ser un potente inductor de la proteína Nrf2, que es un factor de transcripción con forma de cierre de leucina que regula la activación de un gen maestro denominado *ARE/EpRE* (Lee *et al.*, 2005).

1.4 ARE (Antioxidant response element)

El gen *ARE/EpRE* (*Antioxidant Response Element* o *Electrophile Response Element*), tiene una secuencia 5'-TGAC n nGC-3' (donde n representa más nucleótidos), fue reportado por primera vez por Rushmore *et al.* (1990) y fue subsecuentemente encontrado en muchos genes que codifican enzimas del MX, enzimas implicadas en la biosíntesis de GSH, proteínas que protegen células contra el estrés oxidativo y proteínas que previenen el cáncer (Prester *et al.*, 1993; Rushmore *et al.*, 1991; Rushmore *et al.*, 1990)

ARE regula la expresión basal e inducible de numerosos genes que codifican isoformas de la quinona reductasa 1 (NQO1), la GST, la gama-glutamylcisteína sintetasa (GCS), la UDP-glucuronosiltransferasa (UGT) y la epóxido hidrolasa, influyendo en la regeneración de algunas enzimas (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfogluconato deshidrogenasa, y enzimas málicas). Además regula enzimas antioxidantes del metabolismo xenobiótico: GSH peroxidasa, GSH reductasa. Se cree que enzimas de biosíntesis de la conjugación del GSH y glucuronidación son reguladas por *ARE* (Lee *et al.*, 2003; Morimitsu *et al.*, 2002; Park y Rho, 2002; Thimmulapa *et al.*, 2002). Recientemente se ha descubierto que docenas de genes en células de mamíferos pueden ser regulados por *ARE* (Kwak *et al.*, 2003; Thimmulapa *et al.*, 2002), aunque los roles de muchos de estos genes en la prevención del cáncer permanecen indefinidos.

La transcripción de *ARE* es mediada o regulada por diferentes clases de componentes químicos (Figura 6), incluyendo la reacción de aceptores de Michel (Prester *et al.*, 1993), difenoles, quinonas, peróxidos, mercaptanos, arsénicos trivalentes, metales pesados, ditioles, tiones e isotiocianatos. A pesar de esto, si existe mutación de una o más bases de la secuencia, se detiene la respuesta de *ARE* para los inductores químicos lo que daría por resultado una pérdida total de la función (Noi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2002).

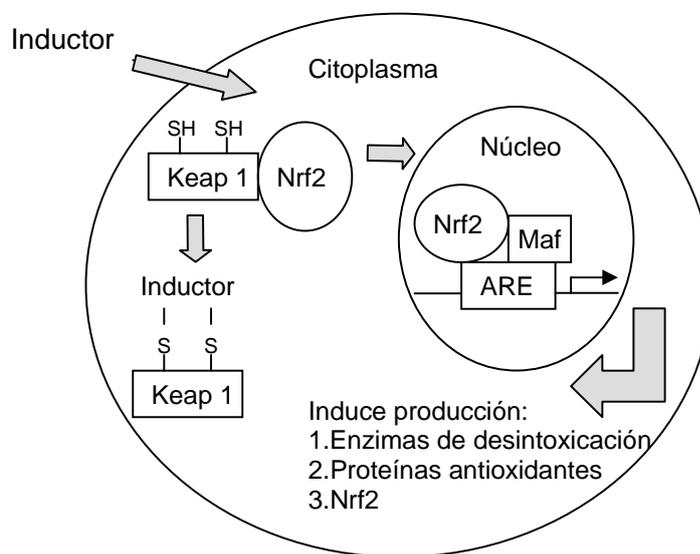


Fig. 6. Mecanismo de protección celular al regular la transcripción de *ARE*. Los inductores rompen el complejo citoplasmático entre la proteína Keap 1 y el factor de transcripción Nrf2, ya liberado Nrf2 migra al núcleo donde forma heterodímeros con otros factores de transcripción como Maf que se unen a *ARE* y aceleran su transcripción (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002).

1.5 Prueba SMART

La prueba *in vivo* SMART (*Somatic Mutation and Recombination Test*), fue desarrollada para detectar en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, mutaciones y recombinaciones somáticas por la acción de agentes físicos o

químicos (Graf *et al.*, 1984), y es una prueba con mayor sensibilidad que la prueba de letales recesivos ligados al sexo (Vogel, 1999).

Drosophila melanogaster es un eucarionte, díptero, multicelular, con un ciclo de vida corto (Figura 7), experimentalmente muy valioso por su fácil y barato mantenimiento, además de ser un organismo ideal para investigar *in vivo* el efecto de tratamientos diversos sobre los genes.

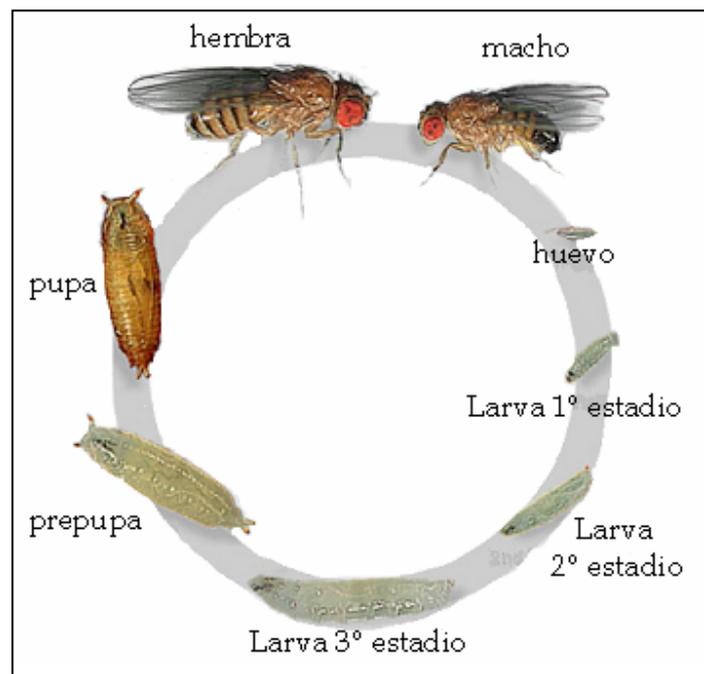


Fig. 7. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* (modificado de www.anatomy.unimelb.edu.au/.../life-cycle.jpg).

La prueba SMART (Anexo 1) utiliza dos marcadores fenotípicos en células que dan origen a los tricomas (pelos) de las alas de *Drosophila melanogaster*: *flare*³ y *mwh*. Tiene como fundamento la pérdida de heterocigosidad de estos genes marcadores, debido a eventos genéticos tales como: no disyunción, delección, mutación puntual y recombinación somáticas provocadas por un agente químico o físico en las células de los discos imagales de las larvas. Éstos son sacos epiteliales que inicialmente tienen alrededor de 50 células que después se dividen por mitosis y dan origen a estructuras tales como las alas, antenas y ojos. Si se exponen a un agente

genotóxico, las células sufrirán eventos genéticos de mutación o recombinación somática, que se expresarán en el ala como clones o manchas que pueden ser sencillas (pequeñas o grandes) o gemelas (grandes o pequeñas) (Figura 8). Al diferenciarse cada célula del disco imagal del ala da origen a un tricoma, que se forma por la acumulación de fibras de actina en un polo de la célula; el tricoma crece durante la metamorfosis y posterior a ésta la célula muere y sólo es observable la presencia del tricoma en la superficie de las alas. De esta manera puede establecerse una relación directa entre el aspecto de los tricomas en los distintos sectores del ala y el número de células que forman una mancha (clon). Al alimentar a las larvas con un agente químico sospechoso, se puede determinar si hay daño en el material genético mediante métodos estadísticos que comparan la frecuencia y el tamaño de manchas en los organismos expuestos, con la obtenida en organismos no expuestos (Frei y Würigler, 1995; Graf *et al.*, 1984; García-Bellido y Dapena, 1974; García-Bellido y Merriam, 1971; Demerec, 1965).

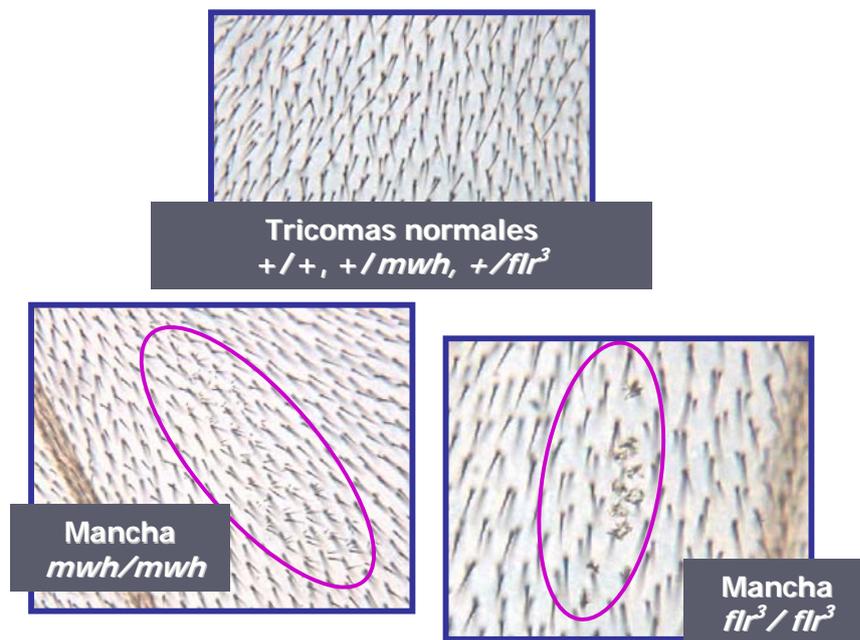


Fig. 8. Fenotipo silvestre y mutante (*flare*³ y *mwh*) en el ala de *Drosophila melanogaster* (Concentración: SF 8.9 + MMS, experimento: 1, porta: 4, fecha de lectura: 13/05/05, Fecha de exp: 15/12/04, mosca 3, ala 2, cruza ST, 40X)

La prueba SMART se realiza en dos cruza: la Cruza Estándar (ST) y la Cruza de Bioactivación Elevada (HB). ST presenta niveles regulados de CYP450s y por lo tanto los mutágenos indirectos provocan menos daño; HB tiene niveles altos y constitutivos de CYP450s, por lo tanto activa mutágenos indirectos en mayor intensidad.

2. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación forma parte de un proyecto del Laboratorio de Genética Toxicológica en el que se demostró una reducción en la frecuencia basal de manchas con el brócoli comercial (*Brassica oleracea*, var. Itálica), al hacer el ensayo SMART en ala (cruza HB) de *D. melanogaster* (López, 2004). Sin embargo el brócoli orgánicamente cultivado mostró efectos controvertidos en cuanto a la protección contra diferentes genotóxicos de acción conocida como el uretano y el MMS en la misma prueba (Santos, 2006; Vega, 2006). Actualmente se sostiene que uno de los glucosinolatos como el SF, es el responsable de la actividad quimioprotectora del brócoli contra el cáncer. Sin embargo, sus mecanismos no están completamente entendidos por lo cual en este trabajo se realizó la Prueba SMART en ala de *D. melanogaster*, para valorar el presumible efecto antígenotóxico del SF en co-tratamiento crónico con el MMS cuyos efectos genotóxicos son bien conocidos en las cruza de esta prueba.

3. OBJETIVO

Debido a que la acción del SF se ha relacionado con el MX, se planteó determinar la ausencia del efecto protector del SF con respecto a la genotoxicidad directa del MMS en co-tratamiento con este isotiocianato, mediante la prueba SMART en ala en las cruza Estándar (ST) y Bioactivación Elevada (HB).

4. HIPÓTESIS

Como el MMS es un agente alquilante directo y se reporta que el SF inhibe la Fase I e induce las enzimas de la Fase II del MX, entonces en ambas cruza el SF no modificará el efecto genotóxico del MMS.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Las líneas que se utilizaron fueron Oregon-*flare*³ (ORR (1); ORR (2); *flr*³/TM3,*Bd*⁶), *flare*³ (*flr*³/TM3,*Bd*⁶) y *mwh* (*mwh/mwh*), del Laboratorio de Genética Toxicológica, FES-Iztacala, UNAM, donadas por el Dr. Ulrich Graf del ETH, Schwerzenbach, Suiza.

Las hembras se colectaron a las ± 4 h después de emerger de la pupa, y se verificó su virginidad manteniéndolas aisladas durante tres días. Posteriormente se realizaron las cruzas Estándar (ST): hembras vírgenes *flr*³/TM3,*Bd*⁶ x machos *mwh/mwh* y de Bioactivación Elevada (HB): hembras vírgenes ORR (1); ORR (2); *flr*³/TM3,*Bd*⁶ x machos *mwh/mwh*. Una vez realizadas las cruzas, se procedió a la colecta de huevos durante 8 horas, a 25°C y 65% de humedad en un medio de levadura fresca activada con sacarosa y se incubaron hasta el 3er estadio larvario (72 ± 4 h de edad). Las larvas se aislaron para ser alimentadas en co-tratamientos crónicos (Guzmán-Rincón y Graf, 1995).

Se probaron tres diferentes concentraciones de sulforafano (Sigma CAS-No.142825-10-3, 99% de pureza) de 8.9, 18 y 35 mM disuelto primero en 5.5 μ l de DMSO (Sigma CAS-No. 67-85-5) y posteriormente en etanol 5%-Tween-80 al 3% 1:1 (TW-OH). Los co-tratamientos se realizaron con la CL₄₀ (Dueñas *et al.*, 2001) para MMS (0.5 mM) (Fluka, CAS-No.66-27-3, 99% de pureza) diluido en TW-OH. Para ambas cruzas se hicieron testigos negativos con DMSO y la mezcla TW-OH. Como testigo positivo de la acción genotóxica directa se usó el MMS 0.5 mM y como testigo positivo de la genotoxicidad indirecta, se usó el promutágeno Uretano (Fluka, CAS. 51-79-6.) 20 mM. Se incubaron las larvas a 25°C hasta que completaron el tercer estadio, puparon y finalmente se obtuvieron los imagos. Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones en tres experimentos diferentes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño experimental para los co-tratamientos de larvas de *Drosophila melanogaster* 72±4h con MMS y SF.

TRATAMIENTO	SF (mM)	MMS (mM)	TESTIGOS
T1	8.9	0.5	
T2	18.0	0.5	
T3	35.0	0.5	
T4	-	-	MMS 0.5 mM disuelto en TW-OH
T5	8.9	-	
T6	18.0	-	
T7	35.0	-	
T8	-	-	DMSO disuelto en TW-OH
T9	-	-	TW-OH
T10	-	-	Uretano 20 mM

Los imagos que emergieron fueron colectados y almacenados en frascos con alcohol 70%, para después separar la progenie trans-heterocigota (*mwh* +/+ *flr*³) con alas de fenotipo silvestre. Posteriormente se disectaron las alas desde la base con pinzas de relojero y fueron montadas con solución de Faure (30 g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 50 g de hidrato cloral y 50 ml de agua), dejando secar por 24-48 horas a temperatura ambiente en preparaciones permanentes.

Posteriormente las alas se observaron a 40x en el microscopio óptico registrando el número y tipo clones mutantes. Buscando manchas *flr*³ (*flare*) y *mwh* (*multiple wing hairs*), pequeñas y grandes, sencillas y gemelas, es decir, manchas que exhiben áreas *mwh* y *flr*³ adyacentes (*mwh,flr*³ / *mwh,flr*³) (Graf *et al.*, 1984).

La evaluación estadística de las manchas en las alas se realizó por medio del programa SMART PC-versión 2.1, desarrollado por Frei y Würigler (1988), el cual se basa en la prueba paramétrica ji-cuadrada para proporciones, con un nivel de significancia de $\alpha < 0.05$.

6. RESULTADOS

En el Cuadro 2, se muestran los resultados de la prueba SMART (Frei y Würgler, 1988), donde se comparan las frecuencias y el número de clones por individuo en cada uno de los co-tratamientos y testigos. Como se puede observar en los tratamientos con SF no hubo diferencias significativas con respecto a los testigos lo que indica que con las tres concentraciones de este isotiocianato no se incrementó o disminuyó la tasa de mutación espontánea en ambas cruzas. Además, se observa claramente en los co-tratamientos una disminución entre la frecuencia de clones/individuo y el efecto del MMS en ambas cruzas, comprobando la actividad directa de este mutágeno. A pesar de las aparentes diferencias observadas en el número de frecuencia de clones/individuo entre las cruzas, éstas no fueron estadísticamente significativas al contrastar la craza ST con la craza HB y viceversa con el programa SMART y la prueba de U (Mann-Whitney-Wilcoxon).

En el Cuadro 3 se observa que en los co-tratamientos SF-MMS, el SF no aumenta en ambas cruzas las frecuencias y el número de clones/individuo causadas por el MMS. Para un mejor análisis se muestran a continuación los resultados por craza.

Cuadro 2. Resumen de los co-tratamientos de SF y MMS

Componentes	No. de ind.	Manchas por mosca (Número de manchas) Diagnóstico est.a				Manchas con Clones <i>mwh</i>	No. de células division	Frecuencia de formación de		
		Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2	Manchas grandes (>2 células) m = 5	Manchas gemelas m = 5	Manchas totales m = 2			observada	control corregido	
	Conc. (mM)									
<i>Cruza Estándar (ST)</i>										
Test-TW-OH	5%	60	0.57 (34)	0.07 (4)	0.05 (3)	0.68 (41)	40.0	1.75	2.7	
Test-DMSO	0.0	60	0.37 (22)-	0.10 (6)-	0.02 (1)-	0.48 (29)-	29.0	2.17	2.0	-0.8
SF	8.9	55	0.98 (54)-	0.07 (4)-	0.00 (0)-	1.05 (58)-	56.0	1.54	4.2	1.4
SF	18.0	60	0.55 (33)-	0.10 (6)-	0.03 (2)-	0.68 (41)-	40.0	1.95	2.7	0.0
SF	35.0	40	0.50 (20)-	0.00 (0)-	0.00 (0)-	0.50 (20)-	20.0	1.25	2.1	-0.7
<i>Cruza Bioactivación Elevada (HB)</i>										
Test-TW-OH	5%	60	0.68 (41)	0.17 (10)	0.02 (1)	0.87 (52)	51.0	1.73	3.5	
Test-DMSO	0.0	60	0.75 (45)-	0.10 (6)-	0.00 (0)-	0.85 (51)-	49.0	1.61	3.4	-0.1
SF	8.9	60	0.82 (49)-	0.18 (11)-	0.00 (0)-	1.00 (60)-	59.0	1.85	4.0	0.5
SF	18.0	60	0.85 (51)-	0.13 (8)-	0.00 (0)-	0.98 (59)-	58.0	1.66	4.0	0.5
SF	35.0	40	0.62 (25)-	0.10 (4)-	0.00 (0)-	0.73 (29)-	28.0	2.11	2.9	-0.6
<i>Cruza Estándar (ST)</i>										
Test-DMSO	0.0	60	0.37 (22)	0.10 (6)	0.02 (1)	0.48 (29)	29.0	2.17	2.0	
MMS(0.5mM)	0.0	39	13.44 (524)+	4.10 (160)+	1.64 (64)+	19.18 (748)+	732.0	2.12	77.0	74.7
SF + MMS	8.9	60	11.42 (685)+	3.57 (214)+	1.88 (113)+	16.87 (1012)+	996.0	2.15	68.1	65.8
SF + MMS	18.0	60	9.70 (582)+	3.63 (218)+	1.38 (83)+	14.72 (883)+	859.0	2.16	58.7	56.4
SF + MMS	35.0	59	8.36 (493)+	2.97 (175)+	1.73 (102)+	13.05 (770)+	756.0	2.24	52.6	50.2
<i>Cruza Bioactivación Elevada (HB)</i>										
Test-DMSO	0.0	60	0.75 (45)	0.10 (6)	0.00 (0)	0.85 (51)	49.0	1.61	3.4	
MMS(0.5mM)	0.0	60	8.53 (512)+	3.97 (238)+	0.57 (34)+	13.07 (784)+	774.0	2.34	52.9	49.6
SF + MMS	8.9	59	9.54 (563)+	4.58 (270)+	0.08 (5)+	14.20 (838)+	838.0	2.23	58.3	54.9
SF + MMS	18.0	59	10.51 (620)+	4.42 (261)+	0.34 (20)+	15.27 (901)+	896.0	2.16	62.3	59.0
SF + MMS	35.0	59	6.31 (372)+	2.00 (118)+	0.22 (13)+	8.53 (503)+	500.0	2.01	34.8	31.4

SF = Sulforafano; MMS = Metil metanosulfonato. a Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988).

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

+ = positivo; - = negativo; Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Prueba estadística de un "factor"

Cuadro 3. Resumen de los co-tratamientos SF-MMS en ambas cruzas

Componentes	No. de ind.	- Manchas por mosca (Número de manchas) Diagnóstico est.a				Manchas con Clones <i>mwh</i>	No. de células division	Frecuencia de formación de x 10 ⁻⁵ células		
		Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2	Manchas grandes (>2 células) m = 5	Manchas gemelas m = 5	Manchas totales m = 2			observada	control corregido	
	Conc. (mM)									
<i>Cruza Estándar (ST)</i>										
MMS	0.5	39	13.44 (524)	4.10 (160)	1.64 (64)	19.18 (748)	732.0	2.12	77.0	
SF + MMS	8.9	60	11.42 (685)-	3.57 (214)-	1.88 (113)-	16.87 (1012)-	996.0	2.15	68.1	-8.9
SF + MMS	18.0	60	9.70 (582)-	3.63 (218)-	1.38 (83)-	14.72 (883)-	859.0	2.16	58.7	-18.3
SF + MMS	35.0	59	8.36 (493)-	2.97 (175)-	1.73 (102)-	13.05 (770)-	756.0	2.24	52.6	-24.4
<i>Cruza Bioactivación Elevada (HB)</i>										
MMS	0.5	60	8.53 (512)	3.97 (238)	0.57 (34)	13.07 (784)	774.0	2.34	52.9	
SF + MMS	8.9	59	9.54 (563)-	4.58 (270)-	0.08 (5)-	14.20 (838)-	838.0	2.23	58.3	5.3
SF + MMS	18.0	59	10.51 (620)-	4.42 (261)-	0.34 (20)-	15.27 (901)-	896.0	2.16	62.3	9.4
SF + MMS	35.0	59	6.31 (372)-	2.00 (118)-	0.22 (13)-	8.53 (503)-	500.0	2.01	34.8	-18.2

SF = Sulforafano; MMS = Metil metanosulfonato. a Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988).
m: riesgo mínimo del factor de multiplicación para la valoración de los resultados negativos.
- = negativo; Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Prueba estadística de un "factor"

Cuadro 4. Resumen de los co-tratamientos SF-MMS en la cruce ST

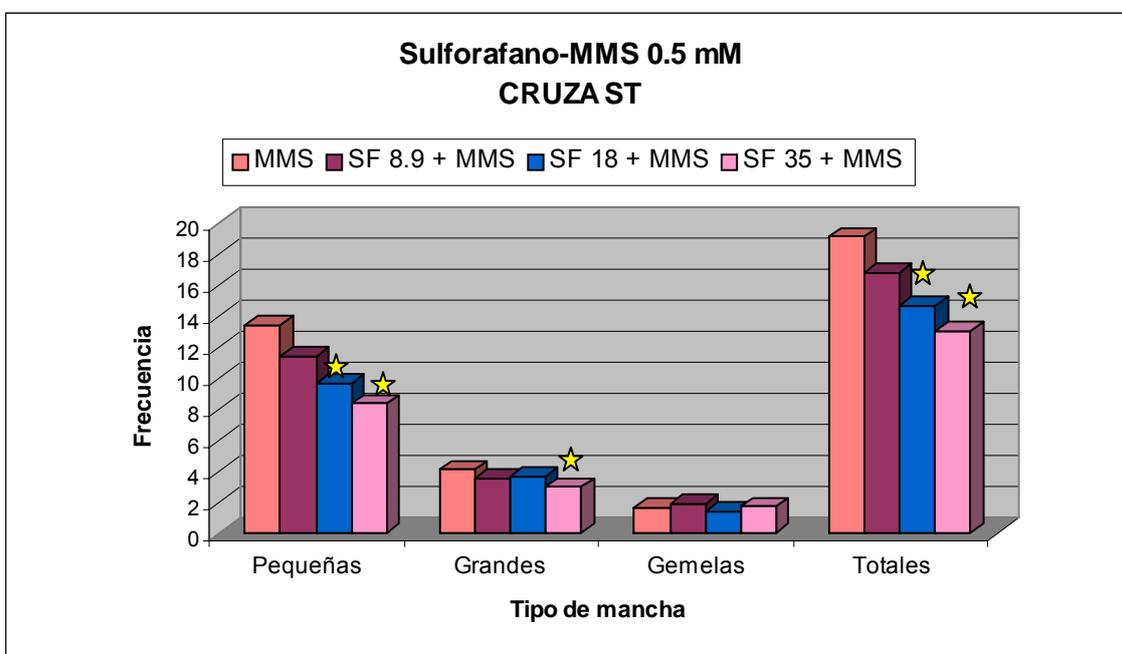
Componentes	No. de ind.	- Manchas por mosca (Número de manchas) Diagnóstico est.a				Manchas con Clones <i>mwh</i>	No. de células division	Frecuencia de formación de x 10 ⁻⁵ células		
		Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2	Manchas grandes (>2 células) m = 5	Manchas gemelas m = 5	Manchas totales m = 2			observada	control corregido	
	Conc. (mM)									
<i>Cruza Estándar (ST)</i>										
SF + MMS	8.9	60	11.42 (685)	3.57 (214)	1.88 (113)	16.87 (1012)	996.0	2.15	68.1	
MMS(0.5Mm)	0.0	39	13.44 (524)-	4.10 (160)-	1.64 (64)-	19.18 (748)-	732.0	2.12	77.0	8.9
<i>Cruza Estándar (ST)</i>										
SF + MMS	18.0	60	9.70 (582)	3.63 (218)	1.38 (83)	14.72 (883)	859.0	2.16	58.7	
MMS(0.5Mm)	0.0	39	13.44 (524)w	4.10 (160)-	1.64 (64)-	19.18 (748)w	732.0	2.12	77.0	18.3
<i>Cruza Estándar (ST)</i>										
SF + MMS	35.0	59	8.36 (493)	2.97 (175)	1.73 (102)	13.05 (770)	756.0	2.24	52.6	
MMS(0.5Mm)	0.0	39	13.44 (524)+	4.10 (160)w	1.64 (64)-	19.18 (748)w	732.0	2.12	77.0	24.4

SF = Sulforafano; MMS = Metil metanosulfonato. a Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988).
m: riesgo mínimo del factor de multiplicación para la valoración de los resultados negativos.
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Prueba estadística de un "factor"

6.1 Cruza ST

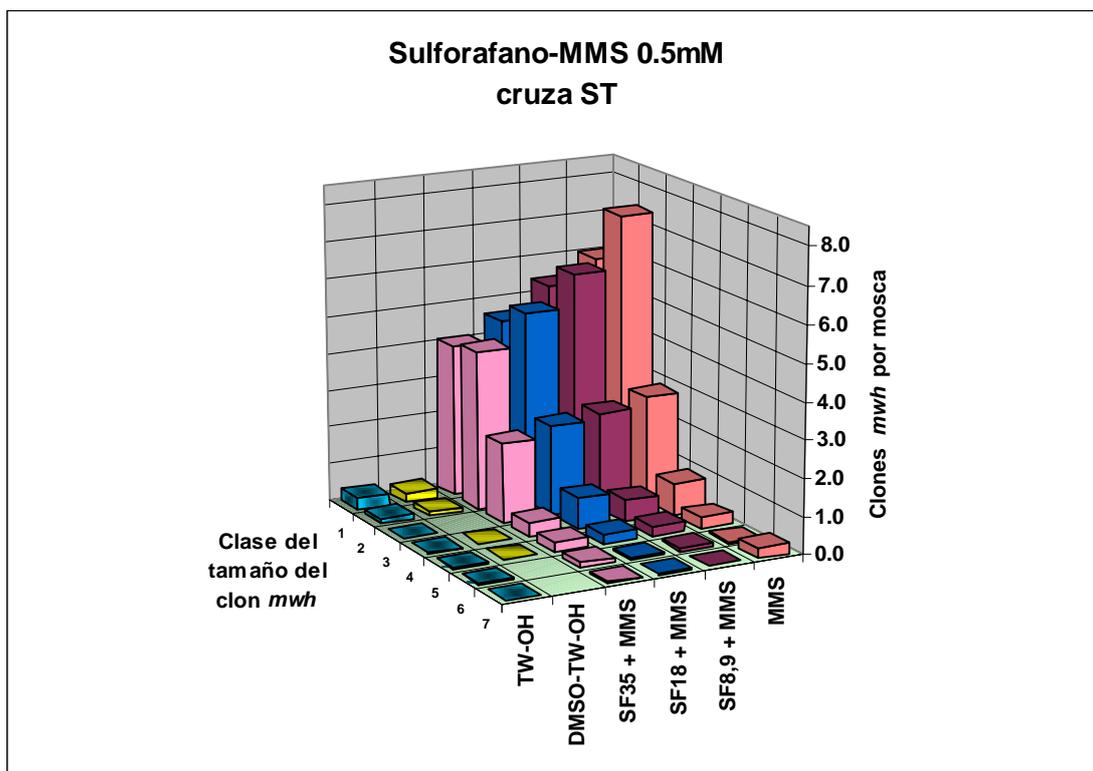
En la cruza ST, el SF disminuyó la frecuencia de los diferentes clones/ individuo en co-tratamiento con MMS, para verificar si las reducciones en las frecuencias de los co-tratamientos con respecto al MMS eran significativas se corrió el programa SMART de forma inversa (Cuadro 4) para los co-tratamientos con respecto al testigo MMS. El Cuadro 4 muestra los resultados débiles positivos (w) para el MMS con respecto al co-tratamiento con SF 18 y 35 mM en la cruza ST, por lo cual se realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon arrojando resultados significativos con una $\alpha = \beta = 0.5$. Esto reafirma el efecto protector del SF al reducir significativamente la tasa de mutación inducida por el MMS (Anexo 2).

En esta cruza, el SF desplegó un efecto antimutagénico estadísticamente significativo contra el agente alquilante MMS lo que se demuestra por una marcada disminución en la frecuencia de manchas (clones) pequeñas, grandes y totales/ individuo inducidas por el MMS a 0.5 mM, particularmente en la concentración de 35 mM (Gráfica 1).



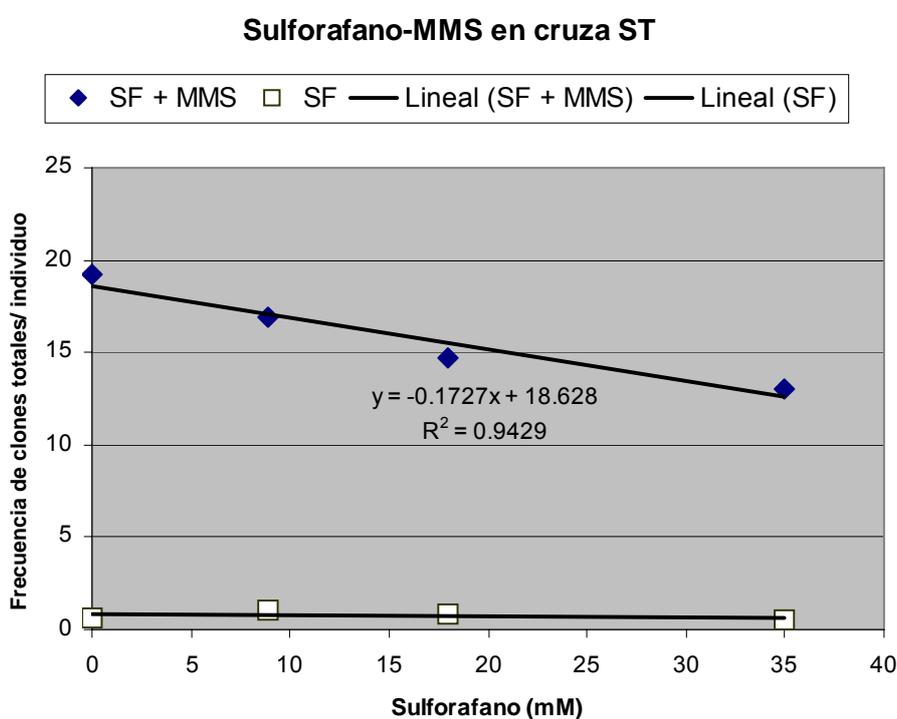
Gráfica 1. Frecuencia de los diferentes tipos de manchas/ individuo en la cruza ST. Donde  representa un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Se analizó la frecuencia más alta de los clones *mwh*, su tamaño (1, 2, 3-4, 9-16, 17-32, 33-64 células) y su distribución. Las manchas grandes corresponden a las células que perdieron la heterocigosis en las primeras horas de alimentación con MMS y las pequeñas ocurrieron en las últimas horas, al final del desarrollo larvario, o las que al ser dañadas dejaron de dividirse (Graf, 1995). En la gráfica 2 se muestran estos resultados en los testigos y los co-tratamientos en la cruz ST. El testigo DMSO-TW-OH no aumentó la tasa de mutación espontánea. La frecuencia de todos los tipos de manchas en los tratamientos con MMS coinciden con la acción directa del mutágeno en etapas tempranas del desarrollo larval, de manera semejante a lo reportado por Rodríguez-Arnaiz *et al.* (1996) para esta concentración en un número menor de individuos. Como se ha mencionado, este agente alquilante directo no requiere bioactivación y genera grupos metilo desde el momento en que entra a la célula (Jenkins *et al.*, 2005), por lo tanto con respecto al TW-OH y al DMSO-TW-OH el número de manchas fue mayor en los individuos tratados con MMS.



Gráfica 2. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo en la cruz ST. Los tamaños de clones representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes 1(1), 2(2), 3(3-4), 4 (5-8), 5(9-16), 6(17-32), 7(33-64) células). Coinciden con la distribución que se obtiene al alimentar las larvas con el MMS, un agente químico directo.

Los resultados obtenidos en la cruz ST para los co-tratamientos SF-MMS, muestran una marcada curva concentración-respuesta, pero además el SF provocó una marcada disminución en la frecuencia de clones totales/ individuo inducidos por el MMS a 0.5 mM, particularmente en la concentración de SF 35 mM. Además, todos los co-tratamientos con SF disminuyeron significativamente la genotoxicidad del MMS en una concentración-respuesta que tiene un comportamiento lineal con un valor $R^2 = 0.94$ (Gráfica 3).



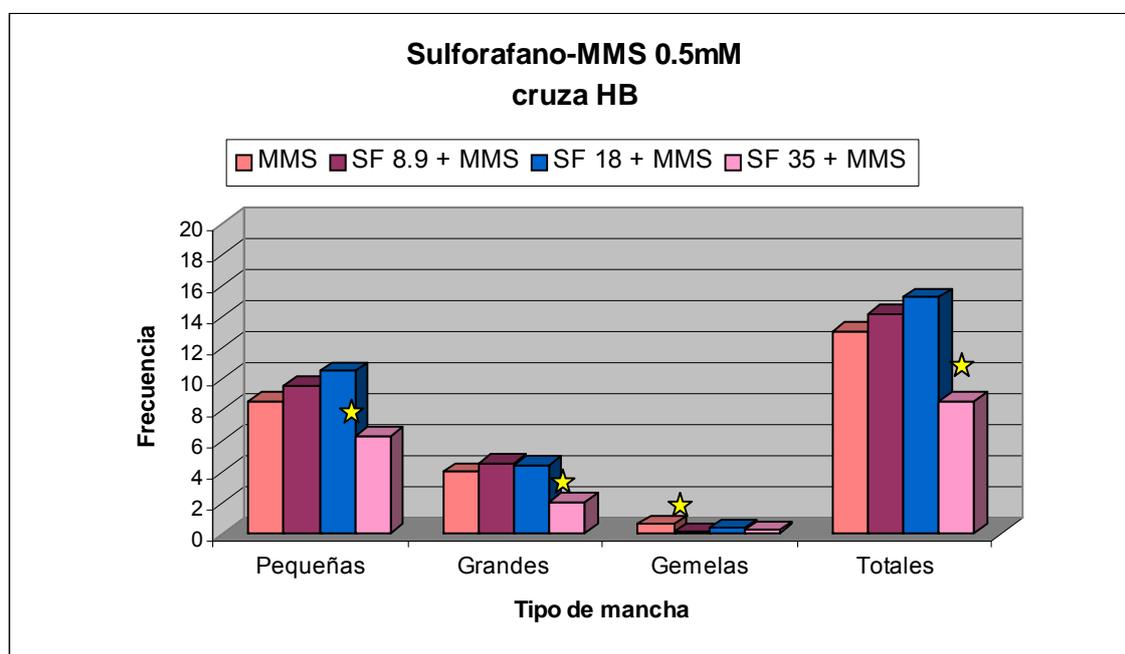
Gráfica 3. En la cruz ST el tratamiento con SF (8.9, 18, 35 mM) no modifica la frecuencia espontánea de manchas/ individuo en contraste con la disminución que produce el co-tratamiento SF-MMS (0.5 mM).

6.2 Cruza HB

En la cruz HB el co-tratamiento SF-MMS provocó una marcada disminución en la frecuencia de clones pequeños, grandes y totales/ individuo inducidos por el MMS, pero sólo en la concentración de 35 mM (Gráfica 4). Aunque en las concentraciones

8.9 y 18 mM parece que hay una tendencia al aumento en la frecuencia de clones totales/ individuo, el incremento no fue estadísticamente significativo

Para conocer si la reducción en las frecuencias de las manchas/ individuos del co-tratamiento SF 35 mM era significativa se corrió el programa SMART de forma inversa (Cuadro 5) para los co-tratamientos con respecto al testigo MMS. El cuadro 5 muestra los resultados positivos en la concentración 8.9 para manchas gemelas y resultados débiles positivos (w) para el MMS con respecto al co-tratamiento SF 18 y 35 mM en la crucea HB, por lo cual se realizó la prueba de U de Mann-Whitney y Wilcoxon arrojando resultados no significativos en el co-tratamiento SF 18 + MMS. Pero contrastando los resultados del co-tratamiento SF 35 + MMS con el del testigo MMS se obtuvo con este alquilante un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de manchas pequeñas, grandes y totales, lo que reafirma el efecto antimutagénico del SF 35 + MMS y que redujo de manera significativa la tasa de mutación inducida por el MMS en esta crucea (Anexo 2).



Gráfica 4. Frecuencia de los diferentes tipos de clones/ individuo en la crucea HB. Donde ★ representa un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Cuadro 5. Resumen de los co-tratamientos SF-MMS en la craza HB

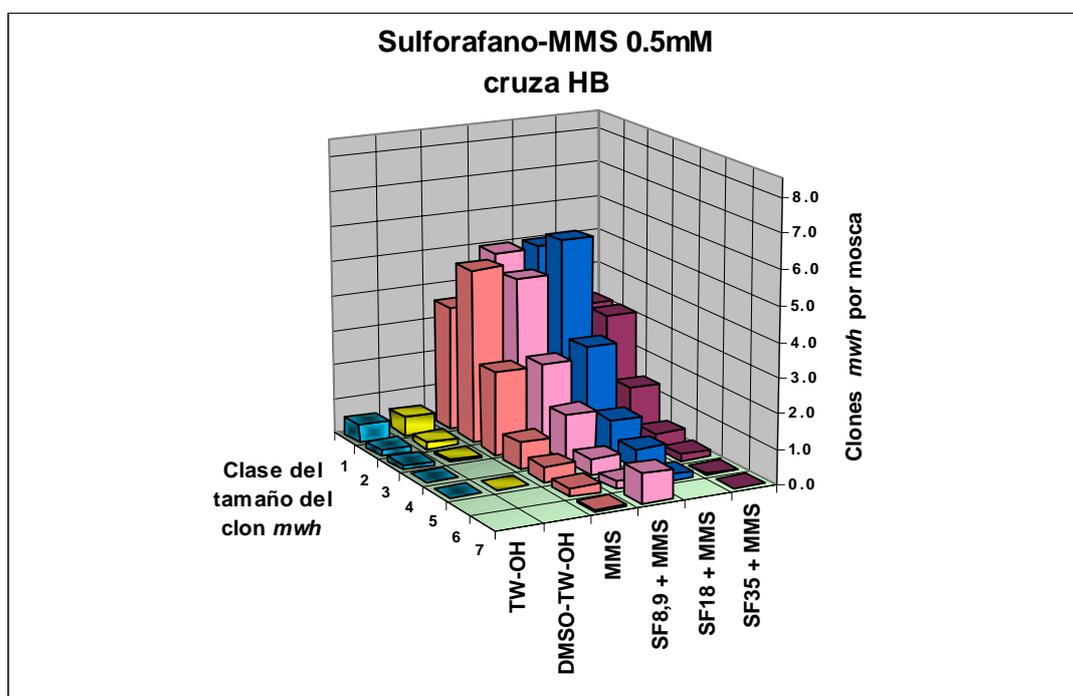
Componentes	No. de ind.	Manchas por mosca (Número de manchas) Diagnóstico est.a				Manchas con Clones <i>mwh</i>	No. de células division	Frecuencia de formación de x 10 ⁻⁵ células		
		Manchas pequeñas (1-2 células) m = 2	Manchas grandes (>2 células) m = 5	Manchas gemelas m = 5	Manchas totales m = 2			obser- vada	control corregido	
	Conc. (mM)									
<i>Cruza Bioactivación Elevada (HB)</i>										
SF + MMS	8.9	59	9.54 (563)	4.58 (270)	0.08 (5)	14.20 (838)	838.0	2.23	58.3	
MMS(0.5mM)	0.0	60	8.53 (512)-	3.97 (238)-	0.57 (34)+	13.07 (784)-	774.0	2.34	52.9	-5.3
<i>Cruza Bioactivación Elevada (HB)</i>										
SF + MMS	18.0	59	10.51 (620)	4.42 (261)	0.34 (20)	15.27 (901)	896.0	2.16	62.3	
MMS(0.5mM)	0.0	60	8.53 (512)-	3.97 (238)-	0.57 (34)w	13.07 (784)-	774.0	2.34	52.9	-9.4
<i>Cruza Bioactivación Elevada (HB)</i>										
SF + MMS	35.0	59	6.31 (372)	2.00 (118)	0.22 (13)	8.53 (503)	500.0	2.01	34.8	
MMS(0.5mM)	0.0	60	8.53 (512)w	3.97 (238)w	0.57 (34)w	13.07 (784)w	774.0	2.34	52.9	18.2

SF = Sulforafano; MMS = Metil metanosulfonato. a Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würigler (1988).

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

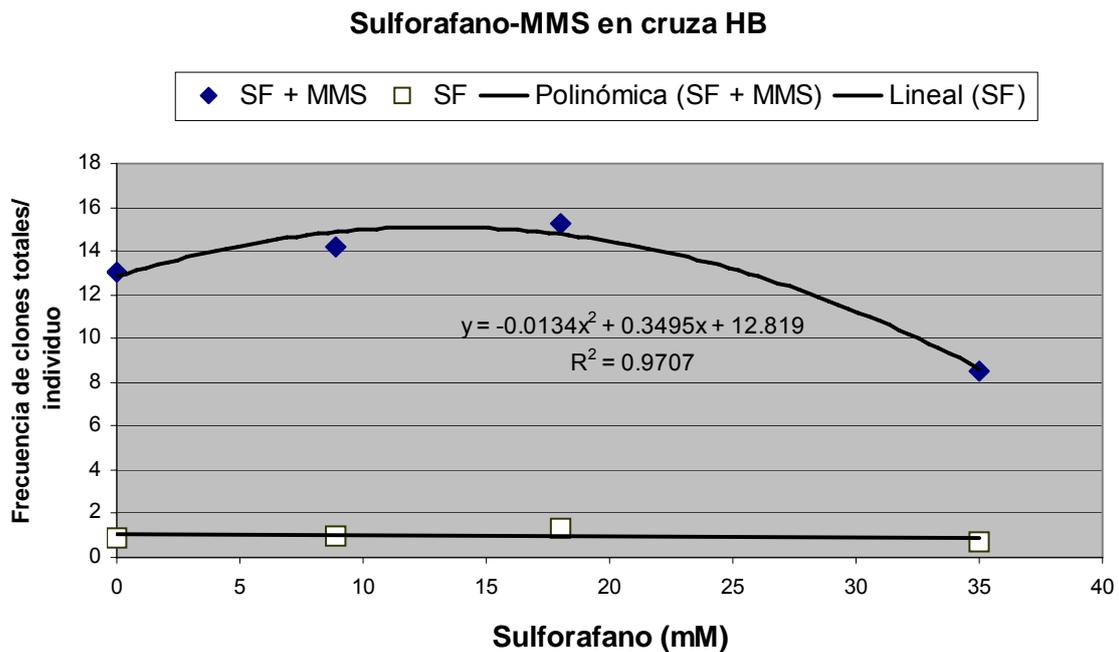
+ = positivo; - = negativo; w = débil positivo; Niveles de probabilidad: alfa = beta = 0.05. Prueba estadística de un "factor"

De la misma manera que para la cruce ST, para la cruce HB se analizó la frecuencia más alta de los clones *mwh*, su tamaño (1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 33-64 células) y su distribución según Graf (1995). La distribución exponencial del tamaño del clon en las células de las *D. melanogaster* alimentadas con TW-OH, involucra el número de ciclos de divisiones de las células imagales del ala en condiciones normales. En la gráfica 5 se pueden observar los datos para los testigos y co-tratamientos donde el testigo DMSO-TW-OH no aumentó o disminuyó la tasa de mutación espontánea en comparación con el testigo TW-OH. Si se comparan los resultados del testigo MMS con el co-tratamiento SF 35 + MMS se demuestra que el SF disminuyó significativamente la genotoxicidad del MMS (Gráfica 5).



Gráfica 5. Distribución de tamaños de clones *mwh* por individuo en la cruce HB. Los tamaños de clones representan el número de divisiones que ocurrieron en las células somáticas mutantes 1(1), 2(2), 3(3-4), 4 (5-8), 5(9-16), 6(17-32), 7(33-64) células) y coinciden con la distribución que se obtiene al alimentar las larvas con un agente químico directo.

En la cruce HB sólo el co-tratamiento SF 35 + MMS disminuyó significativamente la frecuencia de clones totales/ individuo por lo que al graficar los datos se obtuvo una regresión polinómica con una $R^2 = 0.97$ (Gráfica 6). Esto indica que en esta cruce el SF sólo interviene levemente en eventos genotóxicos directos, pero eficientemente a la concentración 35 mM.



Gráfica 6. En la cruce HB el tratamiento con SF (8.9, 18, 35 mM) tampoco modifica la frecuencia espontánea de manchas/ individuo en contraste con la disminución que produce el co-tratamiento SF 35 + MMS.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo el tratamiento crónico a larvas de 72 ± 4 h con MMS 0.5 mM produjo un aumento estadísticamente significativo de la genotoxicidad con respecto a los testigos TW-OH y DMSO-TW-OH. Estos resultados demuestran el claro efecto genotóxico del MMS sobre *D. melanogaster* y concuerdan con lo reportado por Kaya (2003), El-Hamss *et al.* (2003), Heres-Pulido (2001), Lehmann *et al.* (2000) y Santos *et al.* (1999). Como se mencionó, este mutágeno es un agente alquilante conocido por su capacidad de reaccionar directamente con el DNA *in vivo* e *in vitro*

(Jenkins *et al.*, 2005; Shelby y Tindall, 1997; Fiorio *et al.*, 1994; Vogel y Nivard, 1994), por lo tanto no hubo diferencias entre las cruzas. Además se observó que el efecto genotóxico del promutágeno uretano fue estadísticamente mayor en la craza HB, lo que demuestra su fuerte dependencia sobre la activación metabólica por parte de los CYP450s como lo había descrito Frölich y Würigler (1990) y permite comprobar que las cepas utilizadas poseen los marcadores genéticos en buen estado.

Los resultados indican que en ambas cruzas el SF tuvo un efecto protector contra el MMS. La actividad quimiopreventiva del SF reportada por Zhang (2004) (Figura 9) y otros autores permite proponer varias hipótesis para explicar los resultados que se obtuvieron con los co-tratamientos:

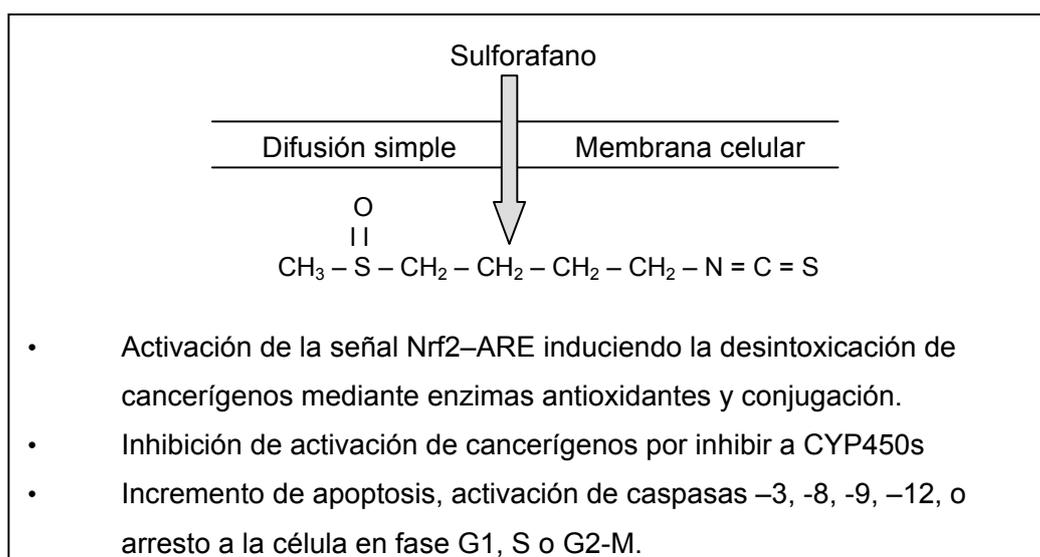


Fig. 9. Actividad quimiopreventiva del SF (modificado de Zhang, 2004).

1. Activación de la señal Nrf2-ARE induciendo la desintoxicación de cancerígenos mediante enzimas antioxidantes y conjugación.

1.1. El SF induce a las enzimas de la Fase II vía activación del factor Nrf2 que a su vez induce la respuesta ARE, mediante las dos proteínas: Nrf2 y Keap1. Esto pudo ocurrir en *Drosophila melanogaster* ya que en este organismo existen proteínas citoplasmáticas homólogas a Keap1 y Nrf2 llamadas Kelch y Cap'n'Collar (CNC),

respectivamente. Bajo condiciones basales Nrf2 es capturado en el citoplasma por Keap1, pero por una propiedad química común (reaccionan con grupos sulfidrilos y grupos tioles por oxidoreducción o alquilación) los inductores como el SF rompen el complejo citoplasmático Keap1-Nrf2 y de este modo Nrf2 migra al núcleo donde se activa *ARE*. Esta respuesta acelera la transcripción de las enzimas de la Fase II, entre otras proteínas, que ayudan a la desintoxicación y protegen a las células del estrés oxidativo causado por ROS (Dinkova-Kostova *et al.*, 2002; Spencer *et al.*, 1991; Talalay *et al.*, 1988). La posibilidad de que el SF pudiera haber protegido a las células de un estrés oxidativo producido indirectamente por el MMS, se sustenta en que en *D. melanogaster* el co-tratamiento con vainillina, compuesto que induce la actividad de la GST de la Fase II, protege significativamente del efecto de este alquilante directo a una concentración de 1.25 mM (Santos *et al.*, 1999).

1.2. Tomando en cuenta que el MMS es un genotóxico que no depende del MX, es posible que la anti-genotoxicidad del SF pueda ser regulada por su propio papel antioxidante. Horváthová *et al.* (1998) mencionan que la cinética de algunos antioxidantes puede actuar contra la reactividad de mutágenos, aunque en una forma que aún es inexplicable.

1.3. La mayoría de los estudios con antioxidantes, muestran que éstos son capaces de proteger a las células de las mutaciones mediadas por radicales (Kaya, 2003), aunque en este estudio, el SF protegió contra un agente alquilante. Bajo condiciones fisiológicas, el SF podría competir contra la alquilación de sitios nucleofílicos celulares (DNA, RNA y proteínas) e inhibir la unión de los metilos. Por lo tanto, la acción antimutagénica del SF contra el MMS podría estar relacionada con la habilidad de bloquear el enlace covalente del DNA con los alquilos derivados del metabolismo de agentes alquilantes directos (Kaya *et al.*, 2000). Tal es el caso del ácido ascórbico o vitamina C (17 mM) ya que en un trabajo realizado por Kaya (2003) este antioxidante reduce 45-70% las mutaciones inducidas por el MMS. En otro trabajo, Franke *et al.* (2005) encontraron que el daño sobre el DNA causado por el MMS fue reducido significativamente por la administración de vitamina C en ratones (1 y 30 mg/ kg) proponiendo que se deba a la inducción de la reparación del DNA. Se ha descrito que el MMS tiene indirectamente efecto oxidante (Franke *et al.*,

2005; Horváthová *et al.*, 1998), así el efecto protector contra el MMS, no descrito a la fecha para el SF, debe estar relacionado con su acción antioxidante.

2. Inhibición de activación de cancerígenos y CYP450s.

2.1. Se sabe que el MMS es un alquilante directo, por lo cual se esperaba que la acción de los CYP450s no tuviera efecto sobre el daño que causa al DNA. Contrariamente a esta premisa, se encontraron disminuciones significativas en los resultados que fueron descritos anteriormente. En la cruce HB (donde los CYP450s son altos y constitutivos), sólo con el tratamiento SF 35 + MMS se dio la reducción. Esto podría ser explicado si el metabolismo del SF fuera dependiente de los CYP450s, es decir que lo eliminaran, provocando que los remanentes de la concentración más alta tuvieran efecto disminuyendo el estrés oxidativo (Franke *et al.*, 2005; Horváthová *et al.*, 1998) relacionado con el MMS.

2.2. Santos (2006) y Vega (2006) reportaron que sólo en la cruce HB, al utilizar brócoli orgánicamente cultivado (BOC) y en la proporción más alta (100%), existen reducciones estadísticamente significativas en las frecuencias de manchas gemelas con respecto al testigo agua, indicando efecto anti-recombinogénico del brócoli, tal vez por acción antioxidante (Fahey y Talalay, 1999; Friedberg *et al.*, 1995). En este trabajo, en la cruce HB el co-tratamiento SF 8.9 mM sólo disminuyó significativamente la frecuencia de manchas gemelas. La reducción de manchas gemelas a dicha concentración permite suponer que el SF interviene o interactúa con los CYP450s y con la recombinación mediante mecanismos aún no descritos. Aunque con esta prueba no podemos distinguir si el efecto anti-recombinogénico descrito por esos autores para el brócoli (mezcla compleja), se deba a la acción antioxidante del SF o a la interacción de éste con los CYP450s.

3. *Incremento de apoptosis, activación de caspasas -3, -8, -9, -12, o arresto a la célula en fase G1, S o G2-M.*

3.1. Se tiene conocimiento de que el SF detiene la proliferación de células cancerígenas *in vitro* e *in vivo* en colon humano, leucemia, meduloblastoma y cáncer de próstata, al inducir apoptosis y/ o al inhibir la progresión del ciclo celular (Jackson y Singletary, 2004; Singh *et al.*, 2004; Zhang y Collaway, 2002; Fahey y Talalay, 1999). Sin embargo se ha demostrado que algunos genotóxicos no solo dañan al DNA, sino que también pueden inducir apoptosis, si son letales para la célula. Se sabe que algunas proteínas como p53, Bcl-2 y Bax están implicadas en la muerte celular inducida por el MMS. En un estudio realizado por Jiang *et al.* (1999) en células de hepatoblastoma usaron dosis no letales de MMS (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 mM), que indujeron altos niveles de acumulación de p53; así mientras la cantidad de p53 incrementó con la dosis de MMS, aumentó la muerte celular. Así, se pudo demostrar que la acumulación de p53 regula la concentración de Bax y por lo tanto la apoptosis en las células afectadas por el MMS. Esto es lo que ocurriría en el testigo MMS, pero con esta prueba no podemos distinguir si los efectos observados son menores de los causados inicialmente en el DNA. En apoyo a esta hipótesis, Choi y Singh (2005) demostraron que el SF incrementa los niveles de dos proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak en fibroblastos de embriones de ratón. En células normales la proteína Bax se encuentra en forma inactiva en el citosol pero puede ser inducida por el SF (Wolter *et al.*, 1997); o al detener la polimerización de la tubulina (Jackson y Singletary, 2004). Estudios recientes (Yamaguchi *et al.*, 2004) indican que el daño a microtúbulos, por ciertos agentes como el SF provocan la activación de Bax y disparan la muerte celular. También el SF incrementa los niveles de la proteína Apaf-1 y así regula la activación de las caspasas -9 y -3 que intervienen en la muerte celular (Choi y Singh, 2005). Así el daño provocado por el MMS en el DNA aunado con el efecto del SF al incrementar aun más la apoptosis, pudo provocar la disminución en la frecuencia de los diferentes clones/ individuo y por lo tanto parte del daño genotóxico producido por el MMS pudo haber sido eliminado.

8. CONCLUSIONES

- En los co-tratamientos con SF en las cruza ST y HB hubo una clara disminución en la frecuencia de los diferentes clones/ individuo provocados por el MMS.
- Los mecanismos de la acción protectora del SF contra el MMS pueden deberse a que induce apoptosis, la activación enzimática de la Fase II del metabolismo xenobiótico y/o a la intervención en productos activos del MMS.
- El SF en la cruza ST provocó una clara concentración-respuesta, aunque en la cruza HB no hubo una respuesta lineal el SF disminuyó de manera significativa la frecuencia de clones/ individuo en especial a la concentración de 35 mM.
- Las reducciones en células mutantes producidas por el co-tratamiento sugiere que los mecanismos de protección directos e indirectos pueden contraatacar la mutagénesis inducidas por MMS.

9. REFERENCIAS.

Abraham SK. 1994. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis* 9:383–386.

Boelsterli U. A. 2002. *Mechanistic toxicology*. Taylor and Francis, Great Britain, 93-147 p.

Choi S. y Singh S. 2005. Bax and Bak are required for Apoptosis induction by sulforaphane, a cruciferous vegetable-derived cancer chemopreventive agent. *Cancer Res.* 65:2035–2043.

Conaway CC, Yang YM, Chung FL. 2002. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents. their biological activities and metabolism in rodents and humans. *Curr. Drug Metab.* 3:233–255.

Demerec M. 1965. *Biology of Drosophila*. Hafner Pub. Co. USA. 238-270p.

Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Yamamoto M, Talalay P. 2002. Direct evidence that sulhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99:11908-11913.

Dueñas GIE, Heres ME, Castañeda PL, Graf U. 2001. Easy raising of *Drosophila melanogaster* on a medium consisting of mashed potato flakes and a preservative solution. *DIS.* 88:166.

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

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

Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10367-72.

Ferguson LR. 1994. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat. Res.* 307:395-410.

Fiorio R, Vellosi R, Bronzetti G. 1994. Effects of spermine on formation of HGPRT-mutants induced by ethylmethanesulfonate, methylmethanesulfonate, and mitomycin C in V79 Chinese hamster cells. *Environ Mol. Mutagen.* 23:294–298.

Franke SIR, Daniel Prá, Juliana da Silva, Erdtmann B, João Antonio Pêgas Henriques. 2005. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo *Mutat. Res.* 583:75–84.

Frei H. y Würigler FE. 1995. Optimal experimental desing and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.* 334:247-325.

Frei H. y Würigler FE. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila melanogaster* indicates a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* 203:297-308.

Friedberg EC, Walkel GD, Siede W. 1995. *DNA repair and mutagenesis*. ASM Press, Washington 698 p.

Frölich A. y Würigler FE. 1990. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutat. Res.* 244: 201-208.

García-Bellido A. y Dapena J. 1974. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen.* 128:117-130.

García-Bellido A. y Merriam J. 1971. Parameters of the wing imagal disc developement of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 24:61-87.

Gao X. y Talalay P. 2004. Induction of phase 2 genes by sulforaphane protects retinal pigment epithelial cells against photooxidative damage. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 101:10446-10451.

Goodman y Gilman. 2003. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 9° Edición McGraw-Hill. 12-16 p.

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 *D. melanogaster*. *Experientia*. 51:168-173.

Graf U, Würzler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PF. 1984. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen*. 6:153-188.

Guengerich FP. 2000. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 21:345-351.

Guzman-Rincón J. y Graf U. 1995. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test. En: Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change: a handbook. Ed. F.M. Butterworth L.D. Corlennum and Guzman-Rincón, Plenum Publishing Corp. 169-181 p.

Hecht SS. 2005. Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metab. Rev.* 32:395–411.

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

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.

Horváthová E, Slamenova D, Hlincikova L, Mandal TK, Gabelova A, Collins AR. 1998. The nature and origin of DNA singlestrand breaks determined with the comet assay, *Mutat. Res.* 409:163–171.

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

Jenkins GJS, Doak SH, Johnson GE, Quick E, Waters EM, Parry JM. 2005. Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? *Mutagenesis* 20: 389-398.

Jiang C, Liang HJ, Liao CF, Lu FJ. 1999. Methyl methanesulfonate and hydrogen peroxide differentially regulate p53 accumulation in hepatoblastoma cells. *Toxicol Lett.* Jun 1:106(2-3):201-8.

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

Kaya B, Creus A, Velásquez A. 2000. Induction of adaptive response in *Drosophila* imaginal disc cell exposed *in vivo* to low doses of alkylating agents. *Mutagenesis* 15:337-340.

Kwak MK, Wakabayashi N, Itho K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW. 2003. Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1 Nrf2 pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. *J. Biol. Chem.* 278:8135-8145.

Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA. 2005. Nrf2, a multi-organ protector? *FASEB J.* 19:1061-1066.

Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Jonson J. 2003. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J. Biol. Chem.* 278:12029-12038.

Lee JS, Obach S, Fisher MB. 2003. *Drug metabolizing enzymes. Cytochrome P450 and other enzymes in drug discovery and development.* Frontis Media, Netherlands. 1-27, 87-139 p.

Lehmann M, Graf U, Reguly ML, Rodríguez de Andrade HH. 2000. Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Env. and Mol. Mut.* 36:195-200.

Lippman SM, Hong WK. 2002. Cancer prevention science and practice. *Cancer Res.* 62: 5119-5125.

Loomis T.A. 1982. *Fundamentos de toxicología.* Ed. Acriba, Zaragoza, 27p.

López Rocha LZ. 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.

Morimitsu Y, Nakagawa Y, Hayashi K. 2002. A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J. Biol. Chem.* 3456-3463.

Nebbia C. 2001. Biotransformation enzymes as determinants of xenobiotic toxicity in domestic animals. *Vet. J.* 161:238-252.

Noi P, McHahon M, Itoh K, Yakamoto M, Hayes JD. 2003. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P):quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem. J.* 374:337-348.

Park EY, Rho HM. 2002. The transcriptional activation of the human copper/zinc superoxide dismutase gene by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin through two different regulator sites, the antioxidant responsive element and xenobiotic responsive element. *Mol. Cell Biochem.* 24:47-55.

Paolini M, Perocco P, Canistro D, Valgimigli V, Pedulli GF, Iori R, Croce CD, Cantelli-Forti G, Legator MS, Abdel-Rahman SZ. 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.

Prester T, Zhang Y, Spencer SR, Wilczak CA, Talalay P. 1993. The electrophile counterattack response: protection against neoplasia and toxicity. *Adv Enzyme Regul.* 33:281-296.

Rodríguez-Arnáiz R, Soto PO, Gaytán-Oyarzún JC, Graf U. 1996. Analysis of mitotic recombination induced by several mono and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.* 351: 133-145.

Rushmore TH, King RG, Paulson KE, Pickett CB. 1990. Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression. Identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3826-3830.

Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J. Biol. Chem.* 266:11632-11639.

Santos JH, Graf U, Reguly L, Rodriguez de Andrade HH. 1999. The synergistic effects of vanillin on recombination predominante over its antimutagenic action in relation to MMC-induced lesions in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* 444:355-365.

Santos Cruz LF. 2006. Interacción del Brócoli (*Brassica oleracea*, vaitálica) – uretano (carbamato de etilo) en la Prueba de Mutación y Recombinación Somáticas (SMART) en ala de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. Fac. Estudios Superiores Iztacala. UNAM, México. 65pp.

Shelby M, Tindall KR. 1997. Mammalian germ cell mutagenicity of ENU, IPMS and MMS, chemicals selected for a transgenic mouse collaborative study. *Mutat. Res.* 388: 99–109.

Singh AV, Xiao D, Lew KL, Dhir R. y Singh SV. 2004. Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts *in vivo*. *Carcinogenesis* 25:83-90.

Sobol RW, Watson DE, Nakamura J, Yakes FM, Hou E, Horton JK, Ladapo J, Bennett Van Houten, Swenberg JA, Tindall KR, Samson LD, Wilson SH. 2002. Mutations associated with base excision repair deficiency and methylation-induced genotoxic stress. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 99(10):6860-6865.

Spencer SR, Xue L, Klenz EM, Talalay P. 1991. The pontency of inducers of NAD(P)H:(quinone-acceptor) oxidoreductase parallels their efficiency as substrates for glutathione transferases. *Biochem. J.* 273:711-717.

Sporn MB, Suh N. 2000. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* 21:525-530.

Stavric B. 1994. Antimutagens and anticarcinogens in foods. *Food Chem. Toxicol.* 32:79-90.

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

Talalay P. 1999. The war against cancer: new hope. *Proc. Am. Philos. Soc.* 143:52-72.

Talalay P, De Long MJ, Prochaska HJ. 1988. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *P. Nat. Acad. Sci. USA* 85:8261-8265.

Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yakamoto M, Biswal S. 2002. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* 62:5196-5203.

Vega Contreras V. 2006. 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) Tesis de licenciatura. Fac. Estudios Superiores Iztacala. UNAM, México. 78pp.

Vogel EW, Graf U, Frei HJ, Nivard MM. 1999. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC, Scientific Publics* 146: 427-470.

Vogel EW. 1991. An introduction into basic principles of genetic toxicology, Genotoxic Chemical (sin publicar).

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* 139: 1281-1292.

Yamaguchi H, Chen J, Bhalla K, Wang HG. 2004. Regulation of Bax activation and apoptotic response to microtubule-damaging agents by p53 transcription-dependent and – independent pathways. *J. Biol. Chem.* 310:263-271.

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

Zhang Y, Gonzalez V, Xu MJ. 2002. Expresión and regulation of glutation S-transferasa P1-1 in cultured human epidermal cells. *J. Dermatol. Sci.* 30:205-214.

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

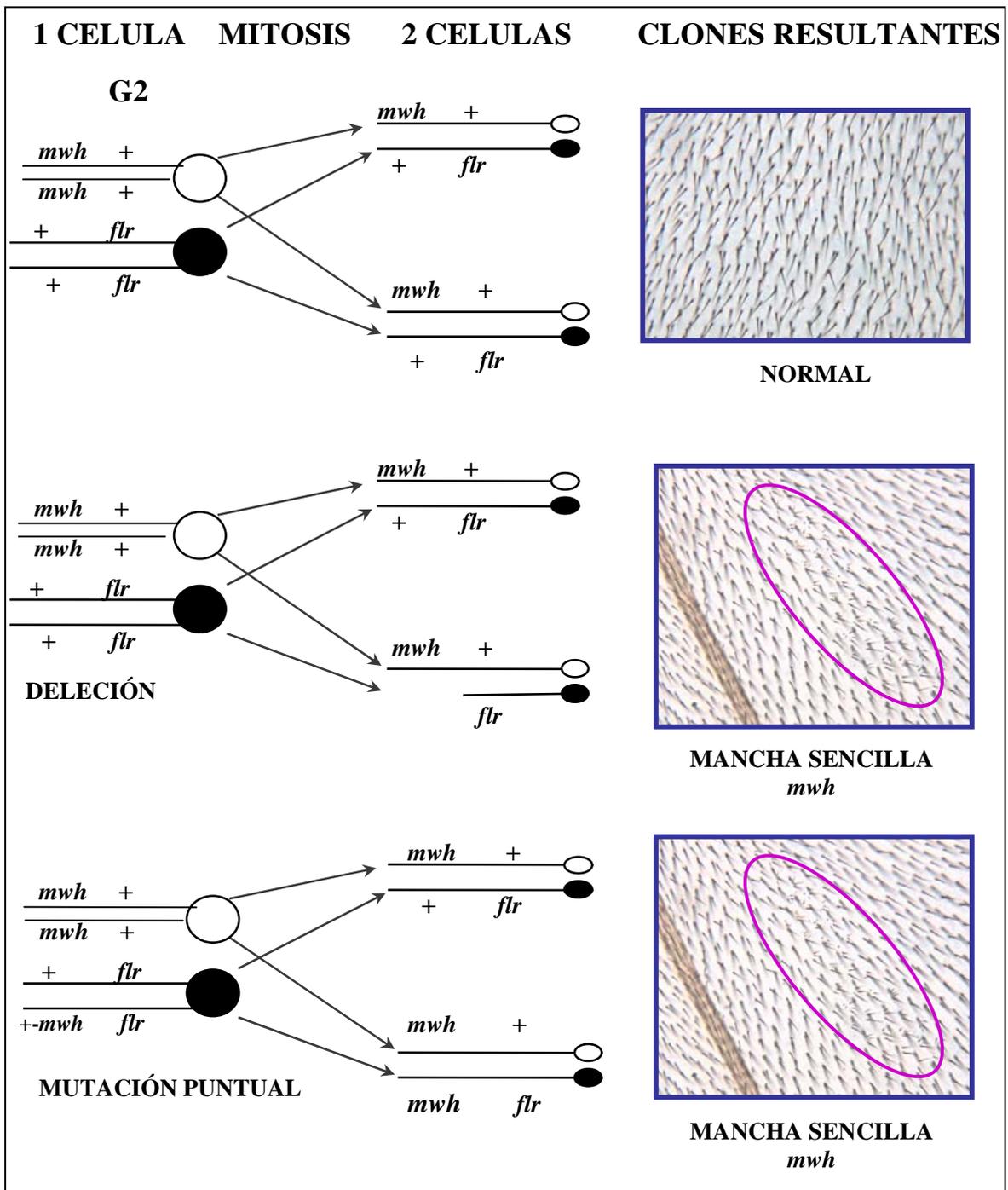
Zhang Y, Kensler TW, Cho C-G, Posner GH, Talalay P. 1994. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3147-3150.

Zhang Y, Talalay P, Cho C-G, Posner GH. 1992. A major inducer of carcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2399-2403.

10. ANEXOS

ANEXO 1.

El fundamento de la prueba SMART es “la pérdida de heterocigosis de genes marcadores que se expresan como clones o manchas de tricomas múltiples o malformados, derivados de células mutantes en las alas de los organismos adultos” ocasionada por la actividad genotóxica de compuestos que inducen eventos genéticos como: mutaciones puntuales, deleciones, recombinaciones somáticas y no-disyunción (Figura 10) (Graf *et al.*, 1998; 1984).



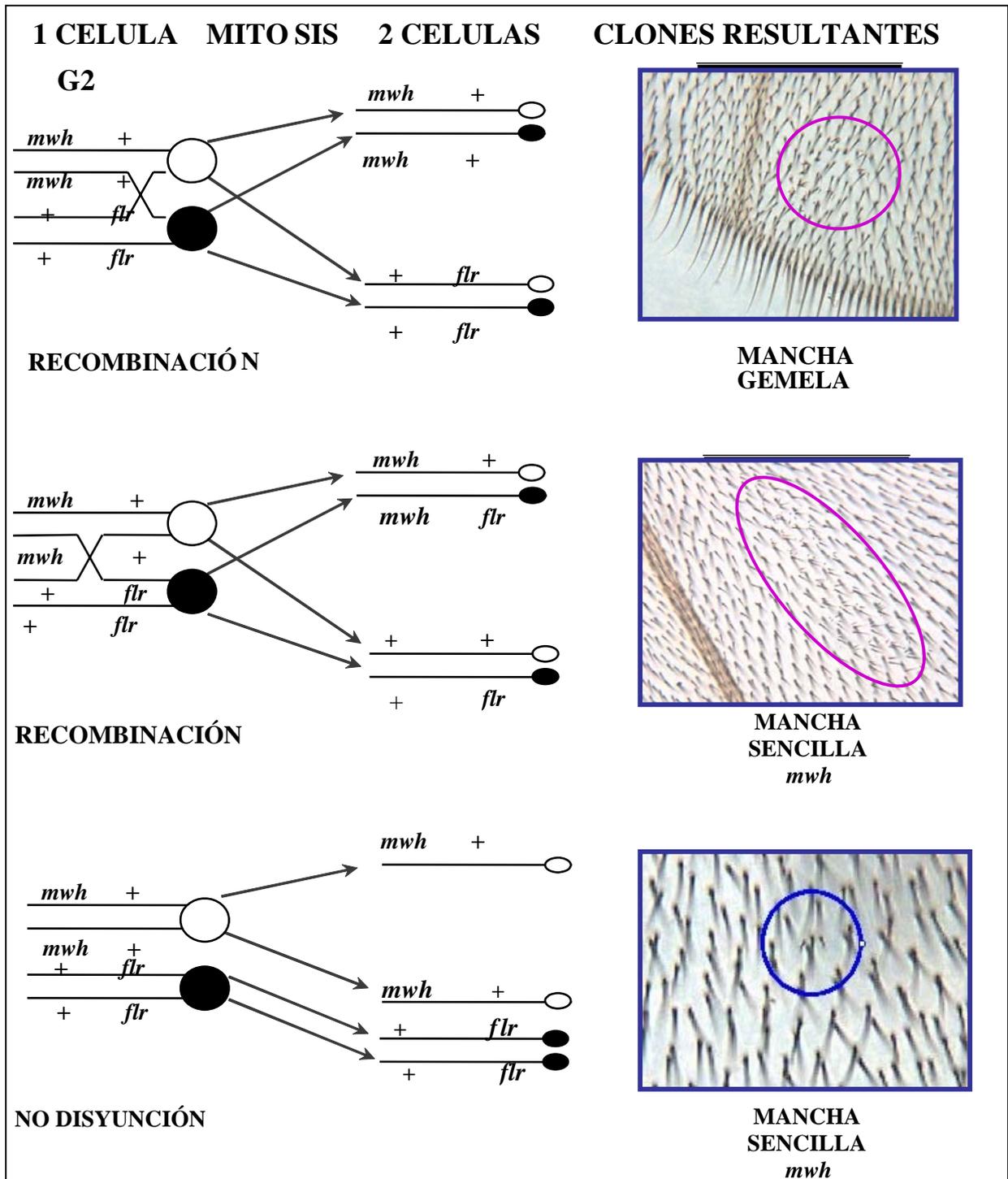


Fig. 10. Eventos genéticos que llevan a la pérdida de la heterocigosis y la Formación de manchas en la prueba SMART. (Modificado de Guzmán-Rincón y Ramírez-Victoria, 2001. Modificado de Graf et al., 1984).

ANEXO 2.

Resultados de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney-Wilcoxon.

- Para comprobar que los resultados (w) obtenidos con SMART para PC eran significativos se contrastaron con la prueba de U los valores del testigo MMS contra los resultados del co-tratamiento. Cuando Z ajustada es negativa entonces el valor del nivel p se divide entre dos. Si el resultado es < 0.05 entonces es significativo.

1. En este caso para SF 35 + MMS en la cruz ST

variable	Rank Sum SF35M	Rank Sum MMS	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N SF35M	Valid N MMS	2*1sided exact p
pequeñas	2440.500	2410.500	670.500	-3.49362	0.000494	-3.49217	0.000479	59	39	0.000400
grandes	2722.500	2126.500	952.500	-1.43708	0.150687	-1.44964	0.147160	59	39	0.151327
gemelas	2621.500	2029.500	1051.500	-0.71854	0.472426	-0.76805	0.442457	59	39	0.474223
totales	2436.500	2414.500	666.500	-3.51295	0.000443	-3.51718	0.000436	59	39	0.000356
clones	2437.500	2413.500	667.500	-3.50960	0.000456	-3.51052	0.000447	59	39	0.000367

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

2. Comparación entre el testigo MMS y el co-tratamiento SF 18 + MMS para la cruz ST.

variable	Rank Sum 18M	Rank Sum MMS	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 18M	Valid N MMS	2*1sided exact p
pequeñas	2714.300	2236.300	884.000	-2.04809	0.040552	-2.05496	0.039883	60	39	0.040510
grandes	2904.500	2045.500	1074.500	-0.68389	0.494045	-0.68942	0.490558	60	39	0.496822
gemelas	2983.500	1966.500	1153.500	-0.11816	0.906942	-0.12453	0.900896	60	39	0.906394
totales	2727.300	2223.300	897.000	-1.95499	0.050585	-1.96149	0.049823	60	39	0.050689
clones	2724.300	2226.300	894.000	-1.97646	0.048102	-1.98252	0.047421	60	39	0.048176

- Z ajustada para manchas pequeñas y totales es negativa entonces $p/2 < 0.05$ por lo que se obtuvo un resultado significativo.

3. Comparación entre el testigo MMS y el co-tratamiento SF 18 + MMS para la cruz HB.

Mann-Whitney U Test (sf18vsmsms.sta)
By variable conc
Marked tests are significant at $p < 0.05000$

variable	Rank Sum 18mM	Rank Sum MMS	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 18mM	Valid N MMS	2*1sided exact p
pequeñas	3951.500	3288.500	1458.500	1.655604	0.097803	1.660275	0.096860	59	60	0.097914
grandes	3559.500	3680.500	1750.500	0.10364	0.917454	0.104489	0.916782	59	60	0.917765
gemelas	3427.500	3712.500	1657.500	-0.59793	0.549867	-0.958418	0.337349	59	60	0.551224
totales	3735.300	3405.300	1575.000	1.036413	0.300010	1.037513	0.299498	59	60	0.302440
clones	3779.500	3360.500	1530.500	1.272928	0.203044	1.274361	0.202537	59	60	0.203840

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

4. Resultado (w) entre el testigo MMS y el co-tratamiento SF 35 + MMS para la cruz HB.

Mann-Whitney U Test (s05vsmsms.sta)
By variable conc
Marked tests are significant at $p < 0.05000$

variable	Rank Sum 35mM	Rank Sum MMS	U	Z	p-level	Z adjusted	p-level	Valid N 35mM	Valid N MMS	2*1sided exact p
pequeñas	3168.500	3971.500	1398.500	-1.97450	0.048326	-1.98149	0.047538	59	60	0.048066
grandes	2981.500	4158.500	1211.500	-2.96839	0.002994	-3.01592	0.002562	59	60	0.002779
gemelas	3477.300	3663.300	1707.000	-0.33484	0.737745	-0.51440	0.636975	59	60	0.740669
totales	3055.500	4083.500	1286.500	-2.56977	0.010177	-2.57379	0.010060	59	60	0.009827
clones	3115.300	4025.300	1345.000	-2.25886	0.023893	-2.26264	0.023659	59	60	0.023678

- Z ajustada para manchas pequeñas, grandes y totales es negativa entonces $p/2 < 0.05$ por lo que se obtuvo un resultado significativo.

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