

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUIMIOPROTECTORA DE
EXTRACTOS ACUOSOS Y METANÓLICOS DE PLANTAS
COMESTIBLES EN EL ESTADO DE QUERÉTARO COMO
INDUCTORES DE ENZIMAS DE FASE 2”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

DIEGO EMANUEL SUBÍAS JUÁREZ

DIRIGIDA POR

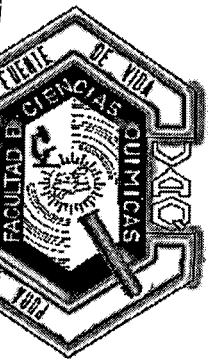
Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2006

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. ADQ: H71377

CLAS TS
581.632097245
594/e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUIMIOPROTECTORA DE
EXTRACTOS ACUOSOS Y METANÓLICOS DE PLANTAS
COMESTIBLES EN EL ESTADO DE QUERÉTARO COMO
INDUCTORES DE ENZIMAS DE FASE 2”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

DIEGO EMANUEL SUBÍAS JUÁREZ

DIRIGIDA POR

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SINODALES

Dra. MINERVA RAMOS GOMEZ
DIRECTOR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO
SINODAL

Dra. SANDRA O. MENDOZA DÍAZ
SINODAL

Q en A. RAFAEL PÉREZ MUÑOZ
SINODAL

RESUMEN.

El cáncer es una de las principales enfermedades crónica-degenerativas a nivel mundial y, en México, las tasas de mortalidad por cáncer muestran tendencias crecientes en las últimas décadas. Estudios epidemiológicos sugieren que el empleo de fuentes vegetales verdes y amarillos reducen el riesgo de cáncer inducido por diferentes carcinógenos en varios órganos y tejidos. Un mecanismo importante en la regulación del cáncer por los componentes de estos vegetales, se basa en la inducción de enzimas de fase 2, como la quinona reductasa (QR), la cual destoxifica, eliminando los metabolitos tóxicos del organismos. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de plantas vegetales para inducir enzimas de destoxificación en células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7. Las células fueron sembradas en micro placas de 96 pozos (20,000 células/pozo) y tratadas por 48 horas con medio que contiene diferentes concentraciones de los extractos acuosos y metanólicos de *Amaranthus hybridus* L. (quelite de pollo), *Brassica rapa* L. (nabo), *Rumex crispus* L. (lengua de vaca), *Portulaca oleraceae* L. (verdolaga) y *Yuca filifera* Chab. (yuca), usando como control positivo el agente quimioprotector sulfurofano. La actividad de QR se determinó mediante la técnica establecida por Prochaska y col. (1992) y la concentración de proteína, empleando seroalbúmina bovina como estándar. La actividad de QR se incrementó en un 240% a la concentración de 2.5 μ M del inductor sulfurofano, comparado contra el control negativo. El extracto acuoso de la *Portulaca oleraceae* presentó la mayor actividad con un incremento del 5.1%. Por otro lado, los extractos metanólicos de *Amaranthus hybridus* presentaron 74.3%, ($P < 0.05$). Todos los extractos metanólicos mostraron mayor capacidad para inducir la enzima QR en las células Hepa 1c1c7 con respecto a los acuosos. Los resultados obtenidos en el estudio son de suficiente importancia dado que los extractos no son puros y constituyen la base para estudios posteriores.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Cáncer	3
II.1.1. Etapas del cáncer	3
II.2 La dieta y el cáncer	4
II.3 Bioactivación de carcinógenos (metabolismo)	5
II.4 Inducción de enzimas de fase 2 (QR) como un estimador confiable de la actividad inductora (Prueba de potencia inductora).	7
II.5 Quimioprevención (quimioprotección)	7
II.6 Los alimentos en la quimioprotección contra el cáncer	8
II.7 Plantas comestibles en el estado de Querétaro como fuentes de agentes inductores de enzimas de fase 2	11
II.7.1. Amaranthaceae, <i>Amaranthus hybridus</i> L., "Quelite de pollo"	11
II.7.2. Brassicaceae, <i>Brassica rapa</i> L., "Nabo o mostaza"	14
II.7.3. Polygonaceae, <i>Rumex crispus</i> L., "Lengua de vaca"	15
II.7.4. Portulacaceae, <i>Portulaca oleraceae</i> L., "Verdolaga"	16
II.7.5. Agavaceae, <i>Yuca filifera</i> Chab., "Palma"	18

Contenido	Página
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	21
IV.1 General	21
IV.2 Específicos	21
V. METODOLOGÍA	22
V.1 Materiales	22
V.1.1. Químicos	22
V.1.2. Biológicos	22
V.2 Métodos	23
V.2.1 Reactivación de la línea celular Hepa 1c1c7	23
V.2.2 Crecimiento de las células Hepa 1c1c7	24
V.2.3 Preparación de la suspensión celular de trabajo	24
V.2.4 Tratamiento de las células con diferentes concentraciones de sulfurofano (potente inductor de enzimas de fase 2	25
V.2.5 Determinación enzimática QR y cuantificación de proteínas	25
V.2.6 Evaluación de los extractos de las plantas comestibles sobre la actividad de QR	26
V.2.7 Efecto citotóxico de los extractos metanólicos y acuosos de las plantas comestibles	27
V.3 Análisis Estadístico.	27

Contenido	Página
VI. RESULTADOS	28
VI.1 Potencia inductora sobre la enzima QR en células Hepa 1c1c7.	28
VI.1.1 Efecto del agente quimioprotector sulfurofano en células Hepa 1c1c7.	28
VI.2 Efectos de los extractos acuosos en células Hepa 1c1c7	31
VI.2.1 Efecto del extracto acuoso de <i>Amaranthus hybridus</i> L. en células Hepa 1c1c7.	31
VI.2.2 Efecto del extracto acuoso de <i>Brassica rapa</i> L. en células Hepa 1c1c7	33
VI.2.3 Efecto del extracto acuoso de <i>Portulaca oleraceae</i> L. en células Hepa 1c1c7.	34
VI.3 Efecto de los extractos metanólicos en células Hepa 1c1c7.	36
VI.3.1 Efecto del extracto metanólico de <i>Amaranthus hybridus</i> en células Hepa 1c1c7.	36
VI.3.2 Efecto del extracto metanólico de <i>Brassica rapa</i> L. en células Hepa 1c1c7.	38
VI.3.3 Efecto del extracto metanólico de <i>Rumex crispus</i> L. en células Hepa 1c1c7	38
VI.3.4 Efecto del extracto metanólico de <i>Portulaca oleraceae</i> L. en células Hepa 1c1c17.	39

Contenido	Página
VI.3.5 Efecto del extracto metanólico de <i>Yuca filifera</i> Chab. en células Hepa 1c1c7.	41
VII. DISCUSIÓN	42
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Plantas comestibles en el estado de Querétaro	12
2	Potencia inductora de sulfurofano en células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7	30
3	Capacidad inductora de extractos acuosos de <i>Amaranthus hybridus</i> , <i>Brassica rapa</i> L. y <i>Portulaca oleraceae</i> sobre las células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7	35
4	Capacidad inductora de extractos metanólicos de <i>Amaranthus hybridus</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Rumex crispus</i> , <i>Portulaca oleraceae</i> y <i>Yuca fillifera</i> sobre las células Hepa 1c1c7.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fam. <i>Amaranthaceae</i> , <i>Amaranthus hybridus</i> L.	13
2	Fam. <i>Brassicaceae</i> , <i>Brassica rapa</i> L.	14
3	Fam. <i>Polygonaceae</i> , <i>Rumex crispus</i> L.	16
4	Fam. <i>Portulacaceae</i> , <i>Portulaca oleraceae</i> L.	17
5	Fam. <i>Agavaceae</i> , <i>Yuca filifera</i> Chab.	18
6	Potencia inductora sobre QR y toxicidad del sulfurofano en las células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7.	29
7	Potencia inductora QR y toxicidad de tres extractos acuosos (<i>Amaranthus hybridus</i> L, <i>Brassica rapa</i> L, y <i>Portulaca oleraceae</i>) sobre las células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7.	32
8	Potencia inductora y toxicidad de cinco extractos metanólicos (<i>Amaranthus hybridus</i> L, <i>Brassica rapa</i> L, <i>Rumex crispus</i> L, <i>Portulaca oleraceae</i> e <i>Yuca filifera</i> Chab.) sobre las células Hepa 1c1c7.	37

I. INTRODUCCIÓN.

El cáncer es una de las principales enfermedades a nivel mundial, que causa más de 7 millones de muertes por año. En la mayoría de los países desarrollados la mortalidad por las principales neoplasias malignas muestra, durante los últimos años, una reducción en la magnitud de sus tendencias crecientes. Sin embargo, el perfil de la mortalidad por cáncer en las naciones menos desarrolladas presenta todavía un claro patrón ascendente. México no es la excepción y las tasas de mortalidad por cáncer muestran una marcada tendencia creciente en las últimas décadas. El promedio nacional de mortalidad específica por cáncer representa la segunda causa de muerte entre las mujeres y hombres, con un incremento consistente en la mayoría de las principales neoplasias en ambos sexos.

Factores extrínsecos, incluyendo el estilo personal de vida, juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades en la mayoría de los humanos. Hábitos tales como el fumar y el consumo de alcohol, así como la exposición a agentes carcinogénicos naturales y sintéticos, radiación, drogas, agentes infecciosos, son reconocidos extensamente como contribuidores importantes en la teología del cáncer. Pero quizá sorprenda el papel tan importante que juega la dieta rica en grasa y baja en fibra, causando más de un tercio de neoplasia en humanos (y posiblemente dos tercios).

Un mecanismo importante en la regulación de ciertas neoplasias se basa en el balance entre las enzimas de fase 1, las cuales activan carcinógenos y las enzimas de fase 2, las cuales destoxifican los productos de los mismos. Prester y colaboradores (1993) proponen que algunos anticarcinógenos presentes en la dieta pueden inhibir la activación de carcinógenos, por un balance competitivo entre la activación del carcinógeno por enzimas de fase 1 (tales como citocromo P450 1A) y la destoxificación por enzimas de fase 2 (tales como glutatión S-transferasa, quinona reductasa y UDP- glucoronosil transferasa). Además, existe una amplia evidencia, tanto en estudios epidemiológicos como en experimentales

in vivo e *in vitro*, que indican que la dieta humana contiene una gran cantidad de componentes que afectan la expresión de enzimas de fase 1 y fase 2, es decir, enzimas metabolizadoras de xenobióticos en tejidos y órganos tales como el hígado, el intestino y los riñones.

Los vegetales y las frutas contienen varias clases de compuestos fitoquímicos que poseen efectos antioxidante, antimutagénico y anticancerígeno, por lo que son empleadas para el tratamiento de la arteriosclerosis, cáncer y otras enfermedades crónico-degenerativas en humanos. El empleo de fuentes vegetales con capacidad para inducir enzimas de detoxificación se basa en las siguientes razones: Primero, numerosos estudios epidemiológicos sugieren que un alto consumo de vegetales verdes y amarillos, especialmente los de la familia Cruciferae y del género Brassica (coliflor, berros, coles de Bruselas, col, brócoli), reduce el riesgo de desarrollo de cáncer en varios órganos. Por otra parte, el consumo de vegetales o de algunos de sus componentes químicos en roedores también protege químicamente contra la carcinogénesis. Segundo, evidencias bien fundamentadas establecen que la alimentación con ciertos vegetales inducen enzimas de fase 2 en tejidos de animal. Tercero, la vasta flora mexicana ofrece la oportunidad de obtener una amplia gama de compuestos fitoquímicos, que pueden formar parte de las diferentes estrategias en la prevención del cáncer. Por lo tanto, la población mexicana ante la necesidad de encontrar nuevos recursos terapéuticos para enfermedades de alta incidencia, realiza un proceso de cambio o adecuación en el uso de la flora medicinal. En este sentido, la diversidad vegetal que se encuentra en la zona del estado de Querétaro, así como la información en el uso de las plantas para consumo directo en la dieta, promueve la realización de estudios sistemáticos sobre plantas comestibles, como una fuente potencial de compuestos fitoquímicos con capacidad de inducir enzimas de fase 2, principalmente glutatión S-transferasa y quinona reductasa. La actividad inductora de los extractos fue medida en células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7 de acuerdo a técnicas ampliamente estandarizadas.

II. ANTECEDENTES.

II.1. Cáncer

La carcinogénesis es un proceso crónico de varias etapas, caracterizado por la acumulación de alteraciones genéticas y fenotípicas específicas que pueden evolucionar durante un período de 10 a 20 años desde el primer acontecimiento inicial. El crecimiento celular incontrolado característico del cáncer es el resultado de un defecto adquirido del ADN celular que provoca cambios o una desregulación de los mecanismos que controlan el proceso de crecimiento celular (Flórez, 1997). Existen diferentes mecanismos por los cuales el ADN de una célula normal se daña resultando en malignidad. A éste proceso se le llama carcinogénesis, y se puede deber a una mutación puntual, a la delección de un gen o a la traslocación de un cromosoma resultando en una reordenación genética. Los oncogenes y los genes supresores de tumores (antioncogenes) son genes importantes en el desarrollo de un cáncer. Los oncogenes están presentes en una célula normal como proto-oncogenes y son necesarios para el crecimiento celular normal. Sin embargo, una expresión incorrecta del mismo hace que la célula se vuelva cancerosa. Los genes supresores de tumores tienen como función inhibir el crecimiento de células con lesiones y pueden inducir la muerte de la misma mediante el proceso de apoptosis (González y González, 2000).

II.1.1. Etapas del cáncer

La carcinogénesis tiene tres fases que son la iniciación, la promoción y la progresión. Durante la etapa de iniciación, agentes físicos (radiaciones), químicos o biológicos (virus) implicados en la carcinogénesis, inducen una alteración en la información genética de las células mediante lesiones en el ADN. A este tipo de agentes se les denomina iniciadores. Esta célula iniciada crece con una velocidad ligeramente superior a las normales, y puede pasar inadvertida durante un período muy largo. La promoción de una célula iniciada a un tumor aparece como

consecuencia de la exposición a agentes no necesariamente carcinogénicos, como son los agentes promotores. Estos agentes actúan a nivel del control de la proliferación celular, de modo que su papel es colaborar con la mutación inicial, y sólo causan cáncer cuando actúan de modo repetido tras el efecto del carcinógeno iniciador. Así, los agentes promotores estimulan el crecimiento de las escasas células iniciadas, que con una sola mutación tienen ligeras ventajas sobre su crecimiento. El aumento de células con una mutación favorece la posibilidad de que alguna de ellas acumule una nueva mutación que la haga proliferar aún más deprisa, bajo lo que se conoce como teoría de la expansión clonal. Más allá de la fase de promoción, las células malignas van adquiriendo de forma irreversible nuevas características, que singularizan la fase de progresión. Uno de los hechos más significativos es la adquisición de la capacidad metastásica o de invasión en otros órganos, rasgo tal vez conferido por mutaciones en genes diferentes de los oncogenes (Hoffmann, 2001).

II.2. La dieta y el cáncer.

Nuestra dieta comprende una compleja mezcla de sustancias orgánicas, las cuales no sólo nos proporcionan sustento sino que también pueden desempeñar un importante papel en el desarrollo, modulación y prevención de enfermedades como el cáncer. Tras numerosos estudios, hoy en día se acepta que entre el 70 y el 80 % de los cánceres humanos están relacionados con el estilo de vida (Toribio y col., 2000). El factor de mayor contribución es la dieta, la cual se puede relacionar con el 35 – 45 % de los cánceres, especialmente los colorrectales y los de páncreas, próstata, mama, ovario y endometrio (Olantunde, 2004). Varios macrocomponentes de los alimentos, como por ejemplo la grasa o el cloruro de sodio, pueden ayudar a la aparición de cáncer en el colon o en el estómago, respectivamente. Por otro lado, en la dieta se encuentran un gran número de microcomponentes capaces de dañar el material genético celular, lo cual puede derivar en la formación de tumores tras un complejo proceso. Los carcinógenos dietéticos representan una fuente potencialmente importante de mayor riesgo de

cáncer para la población general. Aunque el público a menudo atribuye el origen de los carcinógenos presentes en los alimentos a los aditivos alimenticios, a los pesticidas de síntesis y a varios contaminantes ambientales, se cree que estos productos químicos representan menos del 1% de los carcinógenos encontrados en los alimentos (Devita y col., 1997).

La mayor parte de los carcinógenos dietéticos pertenecen a los pesticidas naturales – toxinas producidas por las plantas para la protección frente a hongos, insectos y animales predadores; micotoxinas -metabolitos secundarios producidos por los hongos en alimentos, y sustancias producidas durante la preparación y conservación de los alimentos. En este último grupo se incluyen compuestos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los N-nitroso compuestos y las aminas heterocíclicas (HAs). Las HAs se pueden formar durante el freído, asado a la parrilla y chamuscado de alimentos ricos en proteínas. Los PAHs son formados durante el asado a la parrilla y el ahumado de ciertos alimentos; mientras que los N-nitroso compuestos están presentes en alimentos salados, en conserva y en alimentos curados con nitratos o nitritos. Estos compuestos genotóxicos se transforman por la acción de enzimas metabolizadoras de fase 1 en metabolitos capaces de interaccionar covalentemente con el material genético para formar aductos con el DNA (Toribio y col., 2000; Fisher, 2003). En los alimentos también se encuentran numerosas sustancias anticancerígenas que retrasan o dificultan la producción de genotoxinas, su interacción con el DNA o la progresión de las células malignas (Devita y col., 1997).

II.3. Bioactivación de carcinógenos (biotransformación)

La bioactivación de carcinógenos presentes en los alimentos generalmente involucra dos etapas, a las cuales se les ha denominado como reacciones de fase 1 y de fase 2. Las reacciones de fase 1 o de activación consisten en reacciones de oxidación y reducción, que exponen o introducen nuevos grupos funcionales (-OH, -SH, -NH, -COOH). Estos cambios producen en general un

aumento en la polaridad de la molécula y conducen a algunos o varios de estos resultados: a) la inactivación; b) la conversión de un producto inactivo en otro activo; c) la conversión de un producto activo en otro también activo, cuya actividad aprovechable con fines terapéuticos puede ser cualitativamente similar o distinta del original, y d) la conversión de un producto activo, pero cuya actividad resulta tóxica. Las reacciones de fase 1 son llevadas principalmente por el sistema enzimático de mono-oxigenasas del citocromo P450. El sistema se encuentra en el retículo endoplásmico o la fracción microsomal del hígado, que corresponden a las membranas que conforman el retículo endoplásmico liso. Estas mono-oxigenasas representan, pues, una primera línea de defensa contra las sustancias xenobióticas, e involucra la introducción de grupos funcionales (-OH, -NH₂ - COOH) en la molécula del xenobiótico, lo que permite después las reacciones de conjugación o de fase 2.

Las reacciones de fase 2 son reacciones de conjugación en las cuales el xenobiótico o el metabolito procedente de la fase 1 se acopla a un sustrato endógeno, como los ácidos glucorónico, acético o sulfúrico, aumentando así el tamaño y la hidrofiliidad de la molécula, con lo cual casi siempre se inactiva el xenobiótico y se facilita su excreción. En la formación de conjugados participan intermediarios de alta energía y las enzimas glutatión S-transferasas (GSTs) y UDP-glucuronosil transferasas (UGTs); reacciones de reducción catalizadas por las enzimas NAD(P)H: y quinonareductasa (QR), y reacciones de hidrólisis catalizadas por la enzima époxido hidrolasa (EH). En definitiva, los productos resultantes de las reacciones de fase 2 tienden a ser compuestos polares, hidrosolubles y, por lo tanto, más fácilmente excretables por la orina y por la bilis (Flórez, 1997; Bertram y Katzung, 1999). Aunque un simple mecanismo no puede explicar todas las formas de quimiopreención, está claro que la inducción de enzimas de fase 2 (ej. GST, UGT y QR) es un mecanismo importante de protección contra agentes tóxicos y efectos neoplásicos de carcinógenos químicos (Prochaska y Talalay, 1988).

II.4. Inducción de enzimas de fase 2 (QR) como un estimador confiable de la actividad inductora (Prueba de potencia inductora).

La medición de inducción de enzimas en los diferentes órganos de animales es laboriosa y costosa. La alternativa es un procedimiento simple *in vitro* de investigación, en el cual es posible medir de manera específica las actividades de enzimas de fase 2. Diversas líneas celulares proporcionan evidencia apremiante de ayuda para la inducción de enzimas que participan en el metabolismo de xenobióticos, particularmente enzimas de fase 2, y que resultan en protección contra efectos tóxicos y efectos neoplásicos de agentes carcinógenos.

Diversos estudios demuestran que la línea celular Hepa 1c1c7 responde a casi todos los compuestos que inducen enzimas de fase 2 (ej. QR y GST) en roedores. Además, la inducción de QR en estas células es invariablemente un estimador confiable de la actividad del agente inductor en varios órganos de roedores. Las células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7 han sido utilizadas ampliamente como una herramienta sensible para examinar la relación función-estructura, de compuestos con potencial para inducir enzimas de fase 2 (Uda y col., 1997). El sistema de prueba puede distinguir inductores monofuncionales (los cuales incrementan selectivamente enzimas de fase 2) de agentes bifuncionales (los cuales incrementan tanto enzimas de fase 1 como enzimas de fase 2). Tal información es crucial para la identificación de los inductores quimioprotectores de enzimas de fase 2 para su uso potencial en seres humanos. En el área de prevención del cáncer, idealmente tales inductores deben ser monofuncionales, ya que el incremento de enzimas de fase 1 puede inducir a la activación cancerígena de ciertos compuestos o químicos.

II.5. Quimiopreención (quimioprotección)

El término quimioprotección fue introducido por primera vez por Michael Sport (1976) para referirse al uso de agentes farmacológicos o naturales que inhiben el

desarrollo de cáncer invasivo, ya sea por el bloqueo del daño al ADN que inicia la carcinogénesis o por la inhibición o reversión de la evolución de células premalignas en las cuales el daño ya ha ocurrido.

La quimioprevención del cáncer puede definirse como la intervención farmacológica con nutrientes u otros productos químicos específicos para bloquear, suprimir o revertir la carcinogénesis e impedir el desarrollo del cáncer invasivo. La premisa de la quimioprevención humana es que se puede intervenir (y suprimir) en los diferentes pasos del proceso carcinogénico y durante un período de varios años.

En la actualidad, los agentes mejor estudiados en la quimioprevención humana son los retinoides (los derivados naturales y los análogos sintéticos de la vitamina A) y un miembro de la clase de los carotenoides, el β -caroteno. La ingesta dietética de carotenoides de provitamina A, como β -caroteno, pero no de retinol, se asociaba a una reducción del riesgo de cáncer. La interpretación de los resultados derivados de los estudios epidemiológicos es difícil, ya que los carotenoides se consumen en las frutas y verduras, las cuales contienen otras muchas sustancias con propiedades preventivas contra el cáncer tales como compuestos fenólicos, flavonoides, isotiocianatos, ditioles, etc. (Devita y col., 1997).

II.6. Los alimentos en la quimioprotección contra el cáncer

Los alimentos pueden contener sustancias con ciertas propiedades que directa o indirectamente pueden reducir, proteger o eliminar la actividad mutagénica de otros compuestos (Kelloff y col., 1994), a los cuales se les ha llamado alimentos funcionales o nutraceuticos, proporcionando así beneficios medicinales y a la salud (Reséndiz, 1999).

De acuerdo a la definición dada en 1994 por el Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos (Glinsmann, 1996), "los alimentos funcionales son aquellos en los cuales se ha variado la concentración de uno o más ingredientes para incrementar su contribución a una dieta saludable". Goldberg (1994) define a los alimentos funcionales como: "Alimentos que tienen un impacto positivo en la salud, capacidad física o estado mental de los individuos, además de su valor nutricional". Existen muchas otras definiciones más o menos precisas y cuyo calificativo depende de la fuente y del punto de vista de quien lo analiza.

A los alimentos funcionales se les denomina también como nutracéuticos, fitoquímicos, fitoalimentos, fitonutrientes, farmaalimentos, alimentos de diseño, alimentos nutricionales, alimentos medicinales, alimentos hipernutricios, súper alimentos, alimentos de descripción, alimentos terapéuticos y muchos otros términos (Riaz, 1999). Es importante hacer notar también la diferencia entre alimentos fortificados y alimentos funcionales. Mientras que los alimentos fortificados se utilizan principalmente para ayudar a prevenir deficiencias nutricias, los alimentos funcionales van más allá del estado nutricional, ayudando a prevenir o tratar enfermedades y a mejorar el estado de salud general del individuo. Un alimento funcional es similar en apariencia a los alimentos convencionales, es consumido como parte de la dieta diaria y se le ha demostrado que tiene efecto fisiológico benéfico o que proporciona protección en contra de enfermedades crónicas.

El paso inicial en la búsqueda y desarrollo de un alimento funcional es la identificación de una interacción específica y potencialmente benéfica, entre uno o más componentes del alimento y una función genómica, celular, bioquímica o fisiológica en el organismo. Se ha elaborado una lista de seis criterios que deben cumplirse para que un producto natural sea utilizado para consumo humano: 1) Identificación de la planta o cultivo con actividad biológica, 2) Identificación y caracterización del principio o principios activos presentes en la planta, 3)

Variación en el contenido del principio o principios activos, 4) Evaluación de la actividad biológica y la eficacia de un producto natural o de sus componentes activos, 5) Determinación de la toxicidad del producto natural o de sus principios activos, y 6) Evaluación del producto natural en humanos (Milner, 1999).

Las plantas son un grupo amplio de sustancias naturales bastante complejas, en virtud de la diversidad biológica y de sus constituyentes, las plantas ofrecen una fuente única y renovable de compuestos bioactivos, siendo así un alimento funcional. Sin duda, una gran variedad de fitoquímicos activos existen prácticamente en cualquier alimento vegetal pero no todos han sido estudiados. Hoy en día disponemos de varias hierbas, vegetales y frutas que contienen numerosos compuestos fitoquímicos, tales como los compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados, carotenoides y ácido ascórbico, entre otros (Zheng y Wang, 2001). Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos distribuidos extensamente a través del reino vegetal. Los compuestos fenólicos son comúnmente encontrados en ambas plantas, comestibles y no comestibles, y se han reportado que poseen múltiples efectos biológicos, incluyendo la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antihepatotóxica y acción anti-úlceras (Kähkönen y col., 1999). En la actualidad se conocen cerca de 3 000 compuestos de flavonoides, varios de los cuales tienen toxicidad baja en mamíferos y algunos de ellos son utilizados ampliamente en la medicina. Se ha sugerido que los flavonoides y otros compuestos fenólicos desempeñan un papel preventivo en el desarrollo de cáncer, inhibiendo *in vitro* el crecimiento de varias líneas celulares transformadas y reduciendo el desarrollo de tumores en experimentos con animales (Narayana y col., 2001).

Así mismo el consumo de frutas y vegetales, especialmente crucíferos, reduce la incidencia de varios tipos de cáncer. Algo de la actividad quimioprotectora de estos vegetales, puede deberse a su contenido de componentes, tales como los glucosinolatos. La microflora del tracto digestivo del humano convierte estos glucosinolatos a un gran número de compuestos con actividad biológica,

incluyendo tiocianatos, nitrilos e isotiocianatos (Fahey y col., 2001). Las propiedades quimiopreventivas de los isotiocianatos son también asociadas con la inducción de enzimas de fase 2, incluyendo GST, QR, EH y UGT. De hecho, los isotiocianatos podrían también actuar a nivel de DNA o modular la señal de transducción que conduce al arresto o muerte celular. Por otra parte, estos compuestos exhiben efectos protectivos contra cáncer en varios órganos blanco, tales como pulmón, esófago, glándulas mamarias, hígado, vejiga, intestino delgado y colon (Gamet-Payrastre y col., 2000).

Por otro lado, la basta flora del Estado de Querétaro, así como la búsqueda bibliográfica exhaustiva en cuanto el uso de plantas para consumo directo en la dieta y su efecto benéfico en la salud, sugiere el uso de ciertas plantas como una fuente potencial de compuestos fitoquímicos directamente en la dieta.

II.7. Plantas comestibles en el estado de Querétaro como fuentes de agentes inductores de enzimas de fase 2.

Entre las plantas de consumo preferente en el estado de Querétaro y con algún antecedente farmacológico observado, encontramos las siguientes (Cuadro 1):

Cuadro 1. Plantas comestibles en el estado de Querétaro

Familia	Nombre científico	Nombre común	Usos
Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	"Quelite de pollo"	Alimento y medicina
Brassicaceae	<i>Brassica rapa</i> L.	"Nabo o Mostaza"	Alimento y medicina
Polygonaceae	<i>Rumex crispus</i> L.	"Lengua de vaca"	Alimento y medicina
Portulacaceae	<i>Portulaca oleraceae</i> L.	"Verdolaga"	Alimento y medicina
Agavaceae	<i>Yuca filifera</i> Chab.	"Palma"	Alimento

Tomado de: Suárez y col., 2004

II.7.1. Amaranthaceae, *Amaranthus hybridus* L, "Quelite de pollo"

La planta es originaria de México y distribuida también en el viejo mundo. Habita en clima cálido, semiseco y templado desde el nivel del mar hasta los 2,600 msnm. Es una hierba de hasta de 70 cm. de altura, erecta y rojiza, cuyas hojas tienen forma alargada y extremos puntiagudos. Las flores son verdosas, pequeñas y están agrupadas en espigas paniculadas de 4 a 12 cm de largo, algo espinosas en sus extremos. Los frutos son redondos (Figura 1). En las hojas se han detectado los componentes heterocíclicos de nitrógeno no-alcaloides, el

amarantín y el isoamarantín. Hasta el momento no se ha reportado efectos tóxicos relacionado con el consumo de dicha planta.

Al quelite se le emplea con frecuencia en problemas del aparato digestivo, contra el dolor de estómago y contra la diarrea. Además se hace uso de esta planta para controlar la irritación de la boca y la garganta y para las hemorragias intestinales.

La planta se encuentra distribuida en casi todo el estado de Querétaro, excepto en los municipios de Colón, Corregidora y Huimilpan. Se emplea con frecuencia en casi todo el estado como forraje para toda clase de animales y como alimento cuando está "tierna". En estado vegetativo poco avanzado "tierno" se usa como alimento ya sea hervido, frito o asado, combinado o no, con carne y chile o guisadas con huevo (Argueta y col., 1994; Ramos y col., 2004).



Figura 1. FAM. AMARANTHACEAE *Amaranthus hybridus* L.

Nombre común: "Quelite de pollo".

Uso: Forrajero, comestible y medicinal

II.7.2. Brassicaceae, *Brassica rapa* L., "Nabo o Mostaza"

Sugástegui y Levia (1993, citado en Argueta y col., 1994) indican que el nabo es una especie de origen Euroasiática, adventicia en América; muy difundida como maleza de los cultivos en los rastrojos, escombros, borde de caminos, pastizales, campos abiertos, etcétera. Se encuentra ampliamente distribuida en altitudes de 2,250 a 2,950 msnm. *Brassica rapa* es una planta herbácea, erecta de 30 a 120 cm de alto; con tallo pubescente; con hojas inferiores divididas, con un lóbulo terminal grande de 10 a 20 cm de largo; mientras que las superiores más pequeñas y enteras. Las flores son pequeñas, con cuatro pétalos de color amarillo. Los frutos son silicuas alargadas de 1 a 1.5 cm, dihiscentes y con varias semillas (Figura 2). La raíz en decocción durante 15 minutos a una concentración de 100 gramos por litro de agua, se utiliza para las inflamaciones intestinales crónicas. Las raíces cocidas y aplicadas en cataplasma reducen los sabañones. El jugo obtenido de la raíz cocida combate la tos y la bronquitis crónica. En la India el nabo se utiliza para el tratamiento de la tuberculosis (Argueta y col., 1994).



Figura 2. FAM. BRASSICACEAE *Brassica rapa* L.

Nombre común: "Nabo o Mostaza"

Uso: Forrajero y comestible

En el estado de Querétaro, el nabo se localiza en los municipios de Amealco, Colón, Corregidora, El Marqués, Huimilpan, Pedro Escobedo, Pinal de Amoles, Querétaro y San Juan del Río. En Pedro Escobedo, Amealco, San Joaquín, Huimilpan y Querétaro se usa como alimento cuando está tierna. Las hojas y las flores son consumidas crudas o cocidas con sal en la cuenca de México (Ramos y col., 2004).

II.7.3. Polygonaceae, *Rumex crispus* L., "Lengua de Vaca"

Planta originaria de Europa y adventicia en todo el globo. La lengua de vaca se presenta en clima templado en altitudes de 1,950 a 2,500 msnm y es una planta que crece de 50cm a un metro de altura. Las hojas son alargadas y asemejan una lengua, estas forman densas agrupaciones en la parte inferior de la planta. Las flores son de color rosa o verdes y se encuentran en pequeños racimos. Los frutos son cafés y lustrosos (Figura 3).

A la lengua de vaca se le emplea en particular para el tratamiento de trastornos digestivos, dolor de estómago, hígado, empacho, diarrea e inflamación del bazo. Se le puede utilizar contra la calentura, para sanar riñones y heridas (Argueta y col., 1994; Ramos y col., 2004).

Los estudios químicos realizados indican la presencia de componentes quinoideos en toda la planta. Los ácidos crisofánico, emodín y fisción se han detectado en todos los órganos de la planta, así como la 1,8-dihidroxi-3-metil-3-antrona y reocrisín en la raíz. Extractos metanólicos y acuosos, este último acidulado, de las raíces de la planta mostraron actividad antitumoral al ser evaluados en ratones de ambos sexos por la vía subcutánea frente a tumores del tipo Sarcoma 37 (Argueta y col., 1994).

En el estado de Querétaro, la lengua de vaca se encuentra en los municipios de Amealco, El Marqués, Colón, Huimilpan, Pedro Escobedo y Querétaro. En el

municipio de Pedro Escobedo se consume cuando la planta está tierna, Las hojas se consumen guisadas con algún alimento (Ramos y col., 2004).



Figura 3. FAM. POLYGONACEAE *Rumex crispus* L.

Nombre común: "Legua de vaca"

Uso: Forrajero y comestible.

II.7.4: Portulacaceae, *Portulaca oleraceae* L., "Verdolaga"

Planta originaria de la India, naturalizada en Europa y de ahí pasó a América. Posee una gran distribución en regiones templadas y tropicales del mundo. La planta está presente en numerosos municipios de la parte baja del valle de México en altitudes de 2,250 a 2,350 msnm. La hierba crece tendida en el suelo y posee tallos rojizos y jugosos. Las hojas son carnosas y rojizas con forma ovada. Las flores son de color amarillo y parecen estrellitas. Los frutos tienen forma de cápsula y semillas abundantes (Figura 4).

De la planta completa se han aislado los componentes heterocíclicos de nitrógeno, no-alcaloides, oleracín I y II; los ácidos orgánicos, málicos y oxálicos y el compuesto fenílico ácido ferúlico. En las ramas se han identificado el alcaloide nor-epinefrina, y los diterpenos juwenoles A y B. Las semillas contienen un aceite fijo en el que se encuentran ácidos grasos comunes en otros aceites comestibles, además de los ácidos behénico y fórbico.

A la verdolaga se le atribuye principalmente usos medicinales relacionados con problemas digestivos, tales como infecciones intestinales, calor en el estómago, estreñimiento, parasitosis. La planta también se emplea contra la diabetes, las varices e inflamaciones. No se han detectado efectos tóxicos en vacas que consumieron hojas frescas de la planta por la vía oral, a la dosis de 48 g/kg. Por otra parte, se calculó que la dosis tóxica mínima de un extracto acuoso evaluado en ratones por la vía intraperitoneal fue de 1ml/animal. Se pudo comprobar la actividad antitumoral de un extracto acuoso de la planta, en ratones tratados por la vía intraperitoneal, a la dosis de 150 mg/kg, frente a tumores del tipo ascitos de CA-Ehrlich (Argueta y col., 1994).



Figura 4. FAM. PORTULACACEAE *Portulaca oleraceae* L.

Nombre común: "Verdolaga"
Uso: Comestible

En el estado de Querétaro, la verdolaga se encuentra en los municipios de Amealco, Colón, Cadereyta, El Marqués, Ezequiel Montes, Peñamiller y Tesquiapan. En el municipio de El Marqués se usa como alimento, así como en el de Querétaro, Pedro Escobedo y Colón, cuando está en estado tierno. Los brotes tiernos se consumen como verdura o guisadas (Ramos y col., 2004).

II.7.5. Agavaceae, *Yuca filifera* Chab., "Palma"

Planta arborescente, de 4 a 10 m de altura, muy ramificada en algunos ejemplares; hojas alargadas, planas, rígidas, de 20 a 60 cm de largo, blancas o de color crema, muy numerosas, agrupadas en una inflorescencia colgante de 1 a 1.5 m de largo; fruto carnoso, de 5 10 cm de longitud, conocido como dátil (Figura 5).



Figura 5. FAM. AGAVACEAE *Yuca filifera* Chab.

Nombre común: "Palma"

Usos: comestible y medicinal

Con las hojas del corazón o cogollo se pincha el sitio en el que haya mordido una víbora de cascabel para sacar el veneno. Este tratamiento se aplica a personas y

animales domésticos. Las flores de esta planta se comen preparadas en distintas formas: capeadas, revueltas con huevo, guisadas con diferentes condimentos, en barbacoa y en mixiotes (Villavicencio, 1995).

En base a todos estos antecedentes, resulta claro el uso medicinal que se le atribuye a estas plantas por parte de las poblaciones rurales. Sin embargo, existen pocos o escasos estudios que soporten científicamente su uso, por lo que, la evaluación de parámetros relacionados con salud aportará información relevante para promover el consumo de dichas plantas por la población en general.

Dentro de dichos parámetros se encuentra la actividad inductora de enzimas de fase 2, esta es comúnmente medida en células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7, sembradas en micro placas de 96 pozos (20,000 células/pozo) y tratadas por 48 horas con medio que contiene una serie de diluciones de extractos (o compuestos) para ser probados (Prochaska y col., 1992; Hashimoto y col., 2002). Un compuesto generalmente usado como control positivo es el sulfurofano, el cual es un isotiocianato aislado del brócoli. El sulfurofano es el inductor más importante de enzimas de fase 2 presente en los extractos orgánicos de estos vegetales. Se trata de un inductor monofuncional muy potente de enzimas de fase 2 (Fahey y col., 1997) y se ha reportado que el sulfurofano induce ambas enzimas, QR y GST, *in vitro* y en diversos órganos *in vivo* (Matussheski y Jeffery, 2001). Además, se ha observado que el sulfurofano reduce la incidencia, retarda la aparición y reduce el tamaño de tumores en un modelo de cáncer de mama, así como induce el arresto del ciclo celular y apoptosis en células de cáncer de colon de humano *in vitro* (Singh y col., 2004).

En base a lo anteriormente expuesto, en este estudio se determinó la potencia inductora de los extractos de las plantas comestibles del estado de Querétaro (Cuadro 1) sobre la enzima QR en células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7, como un estimador confiable de su capacidad inductora *in vivo*.

III. HIPÓTESIS.

Las plantas comestibles seleccionadas en el estado de Querétaro son una fuente potencial de una amplia variedad de metabolitos o agentes químioprotectores, algunos de los cuales son inductores de enzimas de fase 2.

IV. OBJETIVOS.

IV.1. General

Evaluar *in vitro* de la actividad quimioprotectora de extractos de plantas comestibles en el estado de Querétaro.

IV.2. Específicos

- Evaluar *in vitro* la capacidad de los extractos metanólicos y acuosos de las plantas comestibles para inducir la actividad enzimática de QR.
- Determinar el efecto citotóxico de los extractos metanólicos y acuosos de plantas comestibles mediante el ensayo de viabilidad.
- Comparar y seleccionar las especies vegetales que presenten mayor potencia inductora de enzimas de fase 2.

V. METODOLOGÍA.

V.1. Materiales

V.1.1. Químicos

El agente inductor sulfurofano y el dimetilsulfóxido (DMSO) fueron de la marca Sigma (St. Louis, MI, EUA).

Los reactivos para el mantenimiento y crecimiento celular, tales como el medio mínimo modificado de Eagle (DMEM), antibióticos, antimicóticos, tripsina, L-glutamina, solución salina de buffer de fosfatos (PBS), suero fetal bovino fueron de la marca Gibco (Canadá).

Los reactivos para las determinaciones enzimáticas tales como la albúmina bovina (BSA), dicumarol, flavín adenin dinucleótido (FAD), glucosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, tetrazolium (MTT), difosfato de nicotín adenina dinucleótido (NADP), 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB), y Tween fueron de la marca Sigma (St. Louis, MI, EUA).

Los solventes acetonitrilo, agua, etanol, y los reactivos para la preparación de soluciones amortiguadoras (fosfato de sodio, Tris-HCl) fueron de la marca JT Baker (Edo. de México).

El kit para la cuantificación de proteína por el método de ácido bicínico (BCA) fue de la marca Pierce, Inc (Rockford, IL, EUA).

V.1.2. Biológicos

Plantas

Las muestras de las especies vegetales fueron colectadas en el Municipio de Pedro Escobedo, Querétaro. Las muestras de referencia de cada una de las especies vegetales fueron depositadas en el herbario de Querétaro (QMEX), a cargo de la M. en C. Valentina Serrano.

Elaboración de extractos metanólicos y acuosos de plantas

Una vez que la planta fue colectada en el campo y se separaron las partes que son habitualmente consumidas por la población, el material fue desecado en una estufa a 39 °C. Posteriormente el material se molió y 25 gramos de la muestra se colocaron en una cámara de extracción. Para extraer la grasa de la muestra, se agregó primeramente hexano. El segundo solvente fue acetona para remover compuestos de mediana polaridad. El tercer solvente de extracción fue metanol, lo que permitió obtener los compuestos hidrosolubles de interés para el trabajo de investigación. Los 300 ml extraídos de metanol de cada extracto se evaporaron en un rotavapor Büchi por separado. El extracto metanólico fue colocado en un vial y se conservó a 4° C y protegidos de la luz hasta su uso. Otros 10 gramos del material de cada especie fueron extraídos por infusión usando agua como disolvente. El extracto obtenido fue concentrado al vacío hasta un volumen aproximado de 10 ml, para posteriormente ser liofilizados y guardados a 4°C y protegidos de la luz.

Células Hepa 1c1c7

Las células Hepa 1c1c7 fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Guillermo Elizondo del Departamento de Toxicología del CINVESTAV-México.

V.2. Métodos

V.2.1. Reactivación de la línea celular Hepa 1c1c7

Varias soluciones madre de las células Hepa 1c1c7 almacenadas a -70°C fueron descongeladas en baño María a 37°C, se adicionaron a un frasco de cultivo con 15 ml de medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino y antibióticos y se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

V.2.2. Crecimiento de las células Hepa 1c1c7

De manera general, el tiempo de crecimiento de las células Hepa fue aproximadamente 24 h, por lo que el medio de cultivo se cambio cada 24 ó 48 h. Cuando el frasco de cultivo alcanzó el 80% de confluencia o de crecimiento (adherencia), las células fueron resembradas en frascos nuevos de cultivo de 75 cm².

Brevemente, se aspiró el medio de cultivo y células muertas, y se lavó el frasco con 10 ml de PBS estéril. Las células fueron removidas del frasco con 5 ml de tripsina por 5 minutos, agitando el frasco para facilitar su desprendimiento. Posteriormente, se inhibió la reacción adicionando 10 ml de medio DMEM. El contenido celular se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos y se desechó el sobrenadante (PBS, medio de cultivo y células muertas). Al paquete celular se le adicionaron 5 ml de medio de cultivo y se mezclaron cuidadosamente.

Finalmente, se tomaron diferentes volúmenes de la suspensión celular anterior (1, 2 y 3 ml) y se depositaron en frascos nuevos de cultivo estériles, con 15 ml de medio DMEM, se mezclaron cuidadosamente y se incubaron a 37°C en 5% de CO₂. Se revisó el crecimiento celular en el microscopio y se cambió el medio de cultivo DMEM cada 24 h o 48 h. Se mantuvo en reserva el frasco de cultivo con menor confluencia y se trabajó solamente con aquellos frascos con mayor confluencia (80% de crecimiento celular de acuerdo a la superficie del frasco) para los ensayos de QR.

V.2.3. Preparación de la suspensión celular de trabajo

Se trabajó con aquellos frascos con un 90% de confluencia. Se aspiró el contenido (medio y células muertas) y se desprendieron las células de la superficie del frasco añadiendo 5 ml de tripsina por 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 5 ml de medio DMEM para inhibir la reacción y las células se resuspendieron uniformemente.

La concentración de la suspensión de trabajo (200, 000 células/ml = 20^4 células/ml) se calculó en base a la densidad celular por ml de medio de cultivo, de tal forma que 100 μ l de la suspensión de trabajo (20, 000 células/pozo) se cultivaron en microplacas de 96 pozos. Las placas fueron posteriormente incubadas a 37°C en 5% CO₂ por 24 horas.

V.2.4. Tratamiento de las células con diferentes concentraciones de sulfurofano (potente inductor de enzimas de fase 2).

Con la finalidad de determinar la concentración del control positivo que incremente en un 100% la actividad de QR, se probaron las siguientes concentraciones de sulfurofano: 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 10 μ M en DMSO. Las células fueron incubadas por un período de 48 h a 37°C en 5% CO₂. Al término del período de incubación, las células se enjuagaron con solución amortiguadora de fosfatos y se lisaron mediante métodos físicos para las determinaciones enzimáticas.

V.2.5. Determinación enzimática (QR) y cuantificación de proteína.

Las actividades de QR fueron medidas en el extracto celular, una vez que las células fueron lavadas y lisadas mediante tratamientos físicos. El ensayo de potencia inductora se basa en la reducción enzimática del colorante tetrazolium (MTT) por la enzima citosólica QR dando como resultado un precipitado azul-café, el cual puede medirse a través de un lector de Elisa a una longitud de onda de 610 nm, después de 5 minutos de reacción. Una unidad de actividad inductora se define como la cantidad de compuesto o extracto que cuando es añadida a un solo pozo duplica la actividad específica de la enzima QR (Prochaska y col., 1992).

Los datos se analizaron con el software Pro Ver.4.7.1 (Molecular Devices Co. Sunnyvale, EUA) y se realizaron los cálculos correspondientes empleando la siguiente fórmula y expresando el resultado en nmol / mg• min.

$$\text{nmol / mg} \bullet \text{nim} = \frac{A_{610}}{(\text{mg proteína}) (0.1833)}$$

Donde A: es la absorbancia de la muestra a 610 nm

mg proteína: son los mg de proteína en la muestra por pozo

0.1833: es la relación entre el coeficiente de extinción ($0.0009 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y el tiempo de reacción.

La cuantificación de proteína se hizo por el método BCA, después de una incubación de 30 minutos a 37°C o 1 h a temperatura ambiente, empleando BSA como estándar. Las muestras se midieron en el lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA) a una longitud de onda de 562 nm, y los resultados fueron analizados con el software Pro Ver.4.7.1 (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA). La actividad específica para QR fue expresada en nmoles de producto/min/mg de proteína.

V. 2.6. Evaluación de los extractos de las plantas comestibles sobre la actividad de QR.

Las células crecidas (20, 000 células / pozo) en micro placas de 96 pozos fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de las plantas comestibles, de acuerdo a lo propuesto por Prochaska y col. (1992). Las concentraciones utilizadas, para los extractos acuoso fueron: 0, .05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 mg extracto/ml DMEM y para los extractos metanólicos fueron: 0, .05, 0.1, 0.5 y 1.0 mg extracto/ml DMEM. Se prepararon diluciones de la solución stock de cada uno de los extractos en DMSO, en una concentración máxima de 0.2%. Se incluyeron pozos solamente con DMEM y DMSO (blanco), un control negativo con vehículo (DMSO) y un control positivo (sulfurofano) en cada una de las placas experimentales. Finalmente, las placas fueron incubadas por 48 h a

37°C con 5% CO₂. La actividad de la enzima QR después del tratamiento con los extractos se determinó de acuerdo a la técnica previamente mencionada.

V.2.7. Efecto citotóxico de los extractos metanólicos y acuosos de las plantas comestibles

El efecto citotóxico del compuesto sulfurofano o de los extractos de las plantas comestibles se evaluó directamente en las placas, en el mismo intervalo de las concentraciones empleadas en la prueba de Potencia Inductora. Una disminución en la densidad celular, medida como el contenido de proteína, se tomará como un indicativo de un efecto citotóxico.

V.3. Análisis Estadístico.

Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM). La evaluación estadística de los datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Dunnet para la comparación entre los grupos tratados con cada extracto y el grupo control (negativo). La prueba de Tukey se empleó para la comparación de medias entre los grupos tratados con los diferentes extractos y el sulfurofano. En todos los casos, se empleó un nivel de significancia de $P < 0.05$.

VI. RESULTADOS

VI.1. Potencia inductora sobre la enzima QR en células Hepa 1c1c7.

VI.1.1. Efecto del agente quimioprotector sulfurofano en células Hepa 1c1c7.

El análisis *in vitro* para la inducción de QR identifica características protectivas que también se exhiben *in vivo*. El análisis es simple y rápido, además, determina la toxicidad de extractos acuosos y metanólicos en las células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7, así como de compuestos puros como el sulfurofano.

El potente agente inductor sulfurofano fue utilizado como control positivo en la inducción de QR en las células Hepa 1c1c7 a las concentraciones de 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, y 10 μM .

En la Figura 6A se puede observar la actividad de QR (tratamiento sobre control) en células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7 por efecto del agente quimioprotector sulfurofano a las diferentes concentraciones. La actividad específica de QR presenta una diferencia significativa a la concentración de 2.5 μM del inductor sulfurofano ($P < 0.05$) comparado con el grupo control, incrementándose la actividad de QR hasta en un 240% (165.18 ± 7.43 nmol/mg/min), comparado contra el control negativo (68.99 ± 9.04 nmol/mg min) (Cuadro 2). A esta misma concentración también se observa una disminución de la densidad celular, expresada en mg de proteína (efecto citotóxico), la cual se reduce hasta un 48.5% (0.00377 ± 0.00056 mg proteína) comparado con el control negativo (0.00732 ± 0.00023 mg proteína) (Figura 6B). Por el contrario, a la concentración de 0.5 μM del inductor sulfurofano se observa un incremento de la densidad celular en un 18% (0.0087 ± 0.00038 mg proteína), siendo el valor más alto en este experimento independiente, y para la actividad se observa un incremento del 30% (94.96 ± 2.93 nmol/mg/min).

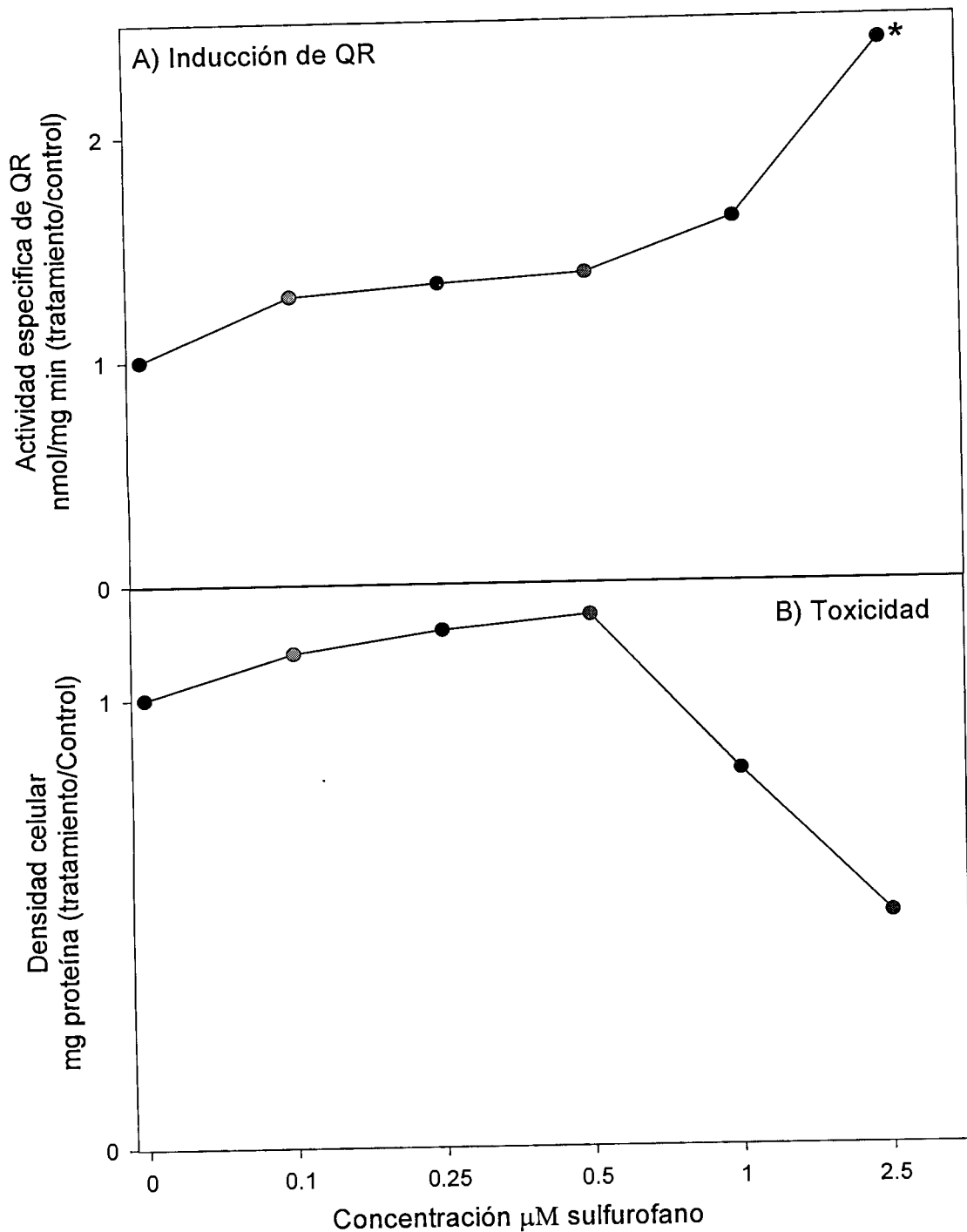


Figura 6. Potencia inductora sobre QR y toxicidad del sulfurofano en las células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7.

(A) Actividad específica de QR nmol/mg min (inducción de QR)

(B) Relación de la densidad celular expresada en mg de proteína (toxicidad)

* Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, de acuerdo a la prueba estadística de Dunnett ($\alpha=0.05$)

Los resultados obtenidos a la concentración de 10 μM no se ilustran en la Figura 6. A esta concentración la actividad se incrementó en un 45% (100.04 ± 24.42 nmol/mg min) y la densidad celular expresada en mg de proteína se redujo hasta en un 46% (0.0034 ± 0.00047 mg), comparados contra su control negativo (68.98 ± 9.038 nmol/mg/min) y (0.0073 ± 0.00023 mg), respectivamente. Sin embargo, ambos valores decrecen con respecto a los obtenidos a la dosis de 2.5 μM . Para fines prácticos, en el Cuadro 2 se presentan los resultados obtenidos con el potente agente inductor sulfurofano expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM)

La inducción obtenida con el agente quimioprotector sulfurofano en este estudio fue casi proporcional a la dosis que se agregó sobre una gama razonable amplia. Por otro lado, la toxicidad del sulfurofano fue modesta y sin relación con su poder inductor. En base a estos resultados, la concentración de 2.5 μM de sulfurofano fue incluido en los siguientes experimentos como control positivo.

Cuadro 2. Potencia inductora de sulfurofano en células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7

Grupos	Actividad QR \pm EE (nmol/mg/min)	T/C	Dunnett $P < 0.05$
Control negativo	68.98 ± 9.04	1	
0.1 μM sulfurofano	88.68 ± 4.47	1.29	No diferencia
0.25 μM sulfurofano	92.17 ± 3.32	1.34	No diferencia
0.5 μM sulfurofano	94.96 ± 2.93	1.38	No diferencia
1.0 μM sulfurofano	111.35 ± 16.25	1.61	No diferencia
2.5 μM sulfurofano	165.17 ± 7.43	2.39	Diferencia *
10 μM sulfurofano	100.04 ± 24.42	1.45	No diferencia

Los valores de P para Dunnett en un resultado de "no prueba" ocurre para una comparación cuando no se encuentra diferencia significativa entre dos medias que incluyan esa comparación (grupo control vs el resto).

* Indica diferencia estadística significativa con respecto al grupo control, de acuerdo a la prueba estadística de Dunnett ($\alpha=0.05$)

T/C = Tratamiento sobre control.

VI.2. Efectos de los extractos acuosos en células Hepa 1c1c7

Los extractos acuosos fueron evaluados para determinar su capacidad para inducir enzimas de fase 2 (QR) a diferentes concentraciones. En este experimento sólo fue posible trabajar con *Amaranthus hybridus* L, *Brassica rapa* L, y *Portulaca oleraceae*. Para estos tres extractos, las concentraciones probadas fueron 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, y 8.0 mg/ml de DMEM.

Durante el periodo de tratamiento (48h) con los diferentes extractos acuosos, se observó en el microscopio que el concentrado de células Hepa 1c1c7 crecidas en la superficie del pozo de la microplaca, disminuyó un poco. Dado lo anterior y no habiendo una disminución significativamente notable en el concentrado de células, con respecto a las células de los pozos sin extracto, se tomó la decisión de trabajar con las concentraciones antes mencionadas.

VI.2.1. Efecto del extracto acuoso de *Amaranthus hybridus* L. en células Hepa 1c1c7.

En la Figura 7 se muestra la capacidad inductora del extracto *Amaranthus hybridus* L. a las diferentes concentraciones sobre la actividad específica de QR en células Hepa 1c1c7. El nivel más alto de actividad de QR en este experimento fue a la concentración de 0.5 mg/ml DMEM, representando tan sólo un 5.1% (103.74 ± 2.49 nmol/mg min) por arriba del control (98.72 ± 4.26 nmol/mg min). En este mismo punto, la densidad celular expresada en mg de proteína presentó un incremento del 3.2% (0.0163 ± 0.0081 mg de proteína) con respecto al control (0.0158 ± 0.0091 mg de proteína). Por el contrario, el nivel de actividad de QR más bajo en este experimento fue a la concentración de 0.05 mg/ml, reduciendo su potencia inductora en 8.8% (90.00 ± 4.60 nmol/mg min) con respecto al control (98.72 ± 4.26 nmol/mg min), y la densidad celular en 9.8% (0.014 ± 0.0082 mg de proteína) con respecto al control (0.0158 ± 0.0091 mg de proteína).

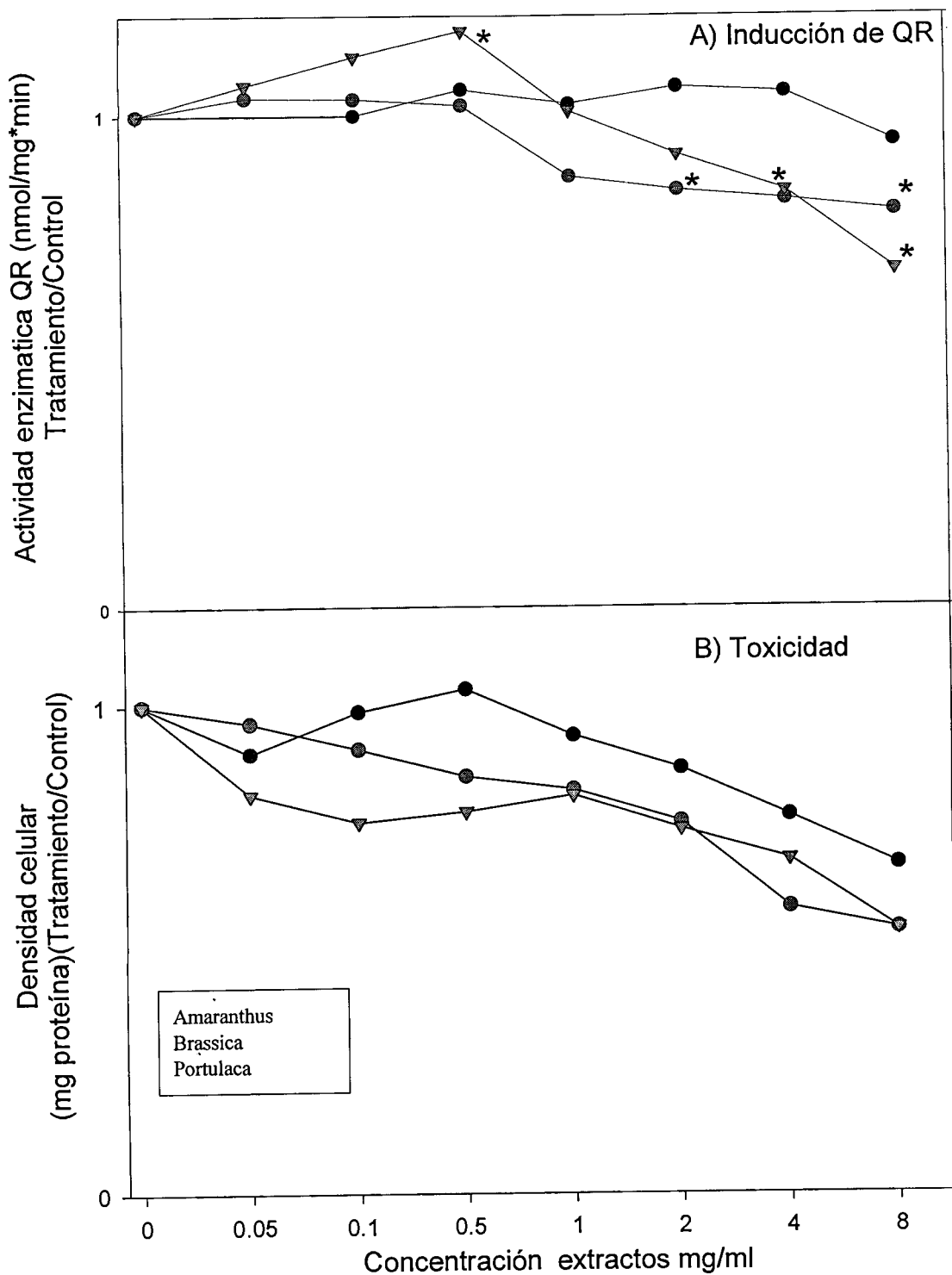


Figura 7. Potencia inductora sobre QR y toxicidad de tres extractos acuosos (*Amaranthus hybridus* L, *Brassica rapa* L, y *Portulaca oleraceae*) sobre las células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7.

A) Actividad específica de QR (tratamiento sobre control)

B) Densidad celular expresada como mg de proteína.

* Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, de acuerdo a la prueba de estadística de Dunnett ($\alpha=0.05$), significando una reducción de actividad.

La inducción obtenida con las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Amaranthus hybridus* mostraron una tendencia sin cambio, es decir, que la actividad de QR se mantuvo casi en un mismo nivel y la toxicidad fue modesta y sin relación con su poder inductor. Por lo tanto, no se logró elevar significativamente la actividad de QR en las células Hepa 1c1c7 a ninguna de las concentraciones evaluadas ($P = 0.145$, Cuadro 3).

VI.2.2. Efecto del extracto acuoso de *Brassica rapa L.* en células Hepa 1c1c7

En la Figura 7 se observa el efecto de la capacidad inductora del extracto *Brassica rapa L.* a diferentes concentraciones. El punto más alto de actividad obtenido por este extracto fue a la concentración de 0.05 mg/ml de DMEM, representando un ligero incremento del 3.5% (102.22 ± 3.33 nmol/mg min) con respecto al grupo control (98.72 ± 4.26 nmol/mg min) (Cuadro 3). Para este mismo punto, la densidad celular expresada por los mg de proteína muestra una reducción de solo 3.6% (0.015 ± 0.0076 mg proteína) con respecto al grupo control (0.016 ± 0.0091 mg proteína). Por el contrario, el punto de actividad más bajo obtenido en este experimento fue a la concentración mayor, representando una reducción de actividad del 19.8% (79.22 ± 1.88 nmol/mg min) con respecto al grupo control (98.72 ± 4.26 nmol/mg min) (Cuadro 3), y la densidad celular para este punto también se redujo en un 46% (0.0085 ± 0.0043 mg proteína) con respecto al grupo control (0.015 ± 0.0076 mg proteína). La inducción obtenida con las diferentes concentraciones del extracto de *Brassica rapa L.* fue modesta y no proporcional a la cantidad de extracto. Sin embargo, en ninguna de las concentraciones probadas para este extracto de *Brassica rapa L.* se logró doblar la actividad basal de QR en las células Hepa 1c1c7. Por otro lado, la toxicidad fue mayor al 40% y casi proporcional a la cantidad de extracto que se agregó. Además, algunos datos se encuentran por debajo del grupo control, es decir, son valores que no representan un incremento en la actividad de QR, por el contrario representan una reducción de la actividad, así como también un incremento en la toxicidad de las células Hepa 1c1c7.

VI.2.3. Efecto del extracto acuoso *Portulaca oleraceae* en células Hepa 1c1c7.

La capacidad inductora del extracto *Portulaca oleraceae* probado en sus diferentes concentraciones se muestra en la Figura 7. En este experimento independiente, el punto más alto obtenido para la actividad se observó a la concentración de 0.5 mg/ml DMEM, el cual equivale a un incremento del 16.9% (115.41 ± 2.64 nmol/mg min) con respecto al grupo control (98.72 ± 4.26 nmol/mg min) (Cuadro 3). Sin embargo, su densidad celular, expresada en mg de proteína, para este punto se ve reducida en un 21.8% (0.013 ± 0.0045 mg de proteína) con respecto al grupo control (0.0158 ± 0.0091 mg proteína). Por otro lado, el punto más bajo de actividad obtenido por el extracto *Portulaca oleraceae* fue a la concentración de 8.0 mg/ml DMEM, significando una reducción del 31.7% (67.42 ± 2.46 nmol/mg min) con respecto al grupo control (98.72 ± 4.260 nmol/mg min) (Cuadro 3). La densidad celular expresada en mg de proteína obtenida en este punto, también se redujo en un 46% (0.0085 ± 0.0038 mg de proteína). La inducción obtenida con las diferentes concentraciones del extracto de *Portulaca oleraceae* presenta una tendencia de incremento hasta la concentración de 0.5 mg/ML DMEM, después de este punto se observa un decremento en la actividad y un incremento en la toxicidad de más del 40%. Ninguna de las concentraciones probadas para este extracto dobló la actividad de QR en las células Hepa 1c1c7.

Nuevamente existen datos por debajo de la actividad basal del grupo control, es decir, que son valores que no representan un incremento en la actividad de QR, por el contrario representan una reducción de la actividad en las células Hepa 1c1c7 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Capacidad inductora de extractos acuosos de *Amaranthus hybridus*, *Brassica rapa L.* y *Portulaca oleraceae* sobre las células transformadas de hígado de ratón Hepa 1c1c7

Grupos	Actividad de QR (nmol/mg min) Media ± EE	T/C	Dunnett P < 0.05
<i>Amaranthus hybridus</i>			
Control	98.72 ± 4.26	1	
0.05 mg/ml DMEM	90.00 ± 4.60	0.91	No diferencia
0.1 mg/ml DMEM	98.66 ± 3.34	0.99	No diferencia
0.5 mg/ml DMEM	103.74 ± 2.48	1.05	No diferencia
1.0 mg/ml DMEM	100.87 ± 2.73	1.02	No diferencia
2.0 mg/ml DMEM	104.19 ± 2.77	1.05	No diferencia
4.0 mg/ml DMEM	103.16 ± 3.84	1.04	No diferencia
8.0 mg/ml DMEM	93.32 ± 5.43	0.94	No diferencia
<i>Brassica rapa L</i>			
Control	98.72 ± 4.26	1	
0.05 mg/ml DMEM	102.21 ± 3.32	1.03	No diferencia
0.1 mg/ml DMEM	101.94 ± 1.60	1.03	No diferencia
0.5 mg/ml DMEM	100.63 ± 6.10	1.02	No diferencia
1.0 mg/ml DMEM	86.28 ± 0.51	0.87	No diferencia
2.0 mg/ml DMEM	83.46 ± 0.75	0.84	Diferencia *
4.0 mg/ml DMEM	81.60 ± 6.07	0.82	Diferencia *
8.0 mg/ml DMEM	79.22 ± 1.9	0.80	Diferencia *
<i>Portulaca oleraceae L</i>			
Control	98.72 ± 4.26	1	
0.05 mg/ml DMEM	104.71 ± 2.75	1.06	No diferencia
0.1 mg/ml DMEM	110.29 ± 5.37	1.12	No diferencia
0.5 mg/ml DMEM	115.40 ± 2.64	1.17	Diferencia *
1.0 mg/ml DMEM	99.50 ± 3.94	1.00	No diferencia
2.0 mg/ml DMEM	90.69 ± 0.62	0.92	No diferencia
4.0 mg/ml DMEM	83.42 ± 4.50	0.84	No diferencia
8.0 mg/ml DMEM	67.41 ± 2.4	0.68	Diferencia *

* Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, de acuerdo a la prueba de estadística de Dunnett ($\alpha=0.05$).

T/C = Tratamiento sobre control.

VI.3. Efecto de los extractos metanólicos en células Hepa 1c1c7.

Los extractos metanólicos fueron evaluados en su capacidad para inducir enzimas de fase 2. En este caso fue posible trabajar con *Amaranthus hybridus*, *Brassica rapa L.*, *Rumex crispus L.*, *Portulaca oleraceae* y *Yuca fillifera Chab.* Las concentraciones probadas inicialmente fueron 0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, y 8.0 mg/ml DMEM; sin embargo, a concentraciones mayores a 1.0 mg/ml DMEM, el concentrado celular crecido en cada uno de los pozos de la microplaca no formaba adecuadamente una monocapa en la superficie del pozo y representaba un concentrado celular significativamente reducido comparado con el control. Por lo tanto, se decidió trabajar con las concentraciones de 0, .05, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/ml DMEM.

VI.3.1. Efecto del extracto metanólico de *Amaranthus hybridus* en células Hepa 1c1c7.

En la Figura 8 se muestra la capacidad inductora del extracto *Amaranthus hybridus*, probado a diferentes concentraciones. La mayor potencia significativa se observó a la concentración de 0.1 mg/ml DMEM (130.66 ± 16.92 nmol/mg*min), representando un incremento en la actividad de QR del 74.3% con respecto al control (74.97 ± 9.18 nmol/mg min); la densidad celular correspondiente a esta concentración disminuyó menos del 20%. Por otro lado, el poder inductor más bajo se obtuvo a la mayor concentración (98.73 ± 6.14 nmol/mg min), incrementándose la enzima QR en un 31.7% por arriba del control (74.97 ± 9.18 nmol/mg*min), mientras que la densidad celular disminuyó aproximadamente 10%. Ninguna de las concentraciones probadas para el extracto logró doblar la actividad de QR en las células Hepa 1c1c7. Sin embargo cabe mencionar que el extracto de *Amaranthus hybridus* fue el extracto con mayor potencia inductora, comparado con el resto de los extractos metanólicos y acuosos bajo estudio. Dichos resultados se expresan en el Cuadro 4 como la media \pm el SEM.

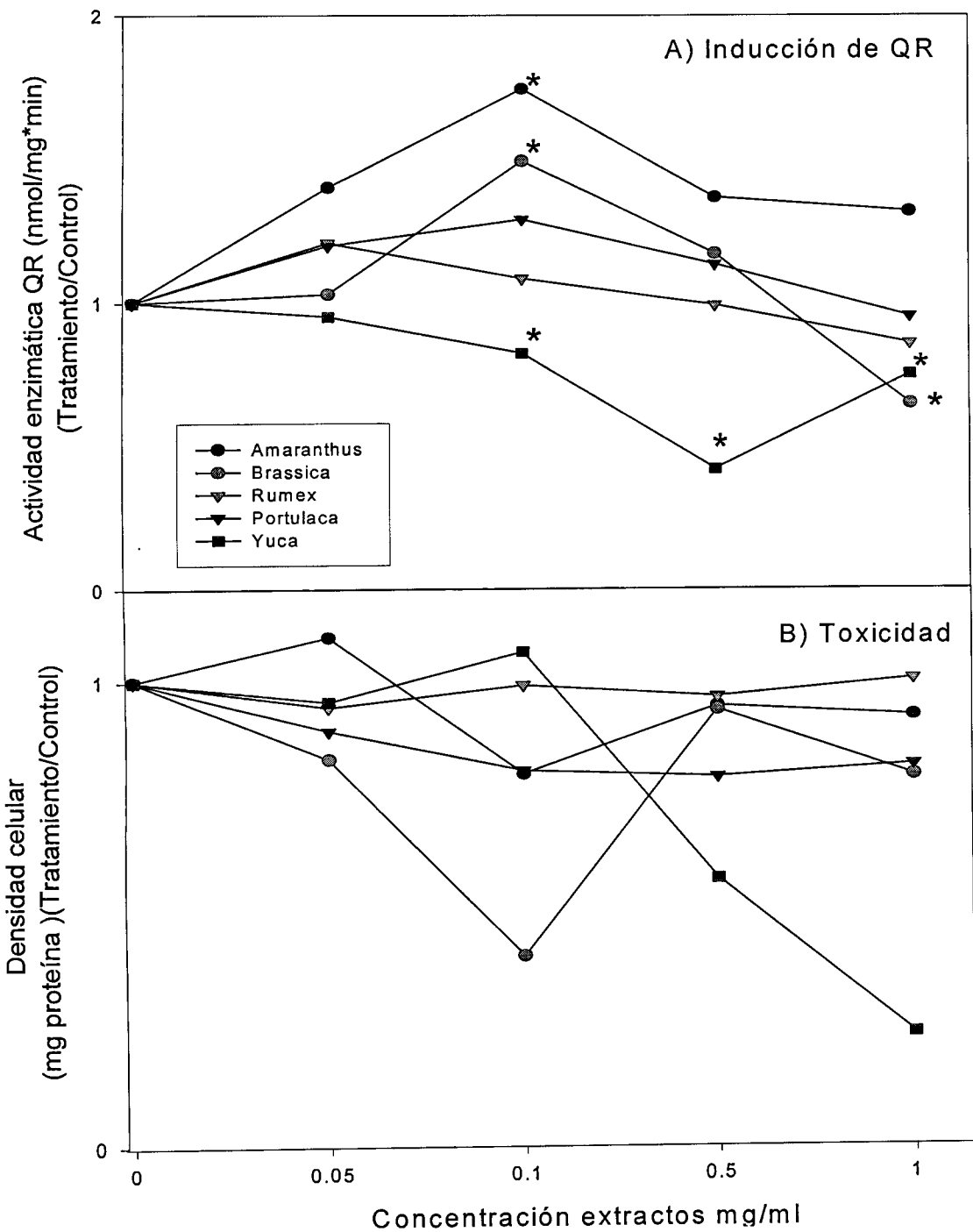


Figura 8. Potencia inductora y toxicidad de cinco extractos metanólicos (*Amaranthus hybridus* L, *Brassica rapa* L, *Rumex crispus* L, *Portulaca oleraceae* e *Yuca filifera chab.*) sobre las células Hepa 1c1c7.

- A) Actividad específica de QR (tratamiento sobre control).
- B) Densidad celular expresada como mg de proteína (toxicidad).

* Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, de acuerdo a la prueba de estadística de Dunnett ($\alpha=0.05$).

VI.3.2. Efecto del extracto metanólico de *Brassica rapa* L. en células Hepa 1c1c7.

En la Figura 8 se muestra la potencia inductora del extracto de *Brassica rapa* L. a las diferentes concentraciones. Para este experimento, la mayor potencia inductora significativa ($P < 0.05$) del extracto de *Brassica rapa* se obtuvo a la concentración de 0.1 mg/ml DMEM (141.45 ± 12.13 nmol/mg min), representando un incremento del 49.2% con respecto al control (94.79 ± 5.93 nmol/mg min). Sin embargo, la densidad celular o toxicidad del extracto obtenida a esta concentración se incrementó en un 59.1%, representando el valor más alto de toxicidad en las cuatro concentraciones probadas. Por otro lado, el poder inductor más bajo obtenido por el extracto fue a la concentración de 1.0 mg/ml DMEM (61.17 ± 1.81 nmol/mg min), incrementándose el 35.5% con respecto al control (94.79 ± 5.93 nmol/mg min). A esta concentración la toxicidad del extracto se observa ligeramente menor en un 10%. Sin embargo, el extracto presenta un comportamiento modesto e inversamente proporcional, es decir, entre más actividad menos proteína, a consecuencia de la toxicidad. El poder inductor obtenido a las diferentes concentraciones del extracto de *Brassica rapa* L. no logró doblar la actividad de QR en las células Hepa 1c1c7. Sin embargo, el extracto metanólico de *Brassica rapa* es el segundo con mayor potencia inductora comparado con el resto de los extractos metanólicos y acuosos.

VI.3.3. Efecto del extracto metanólico de *Rumex crispus* L. en células Hepa 1c1c7.

La capacidad inductora del extracto *Rumex crispus* L. probado a las diferentes concentraciones se muestra en la Figura 8. La mayor potencia inductora significativa ($P < 0.05$) se obtuvo a la concentración 0.05 mg/ml DMEM (90.57 ± 4.45 nmol/mg min), representando un 20.8% por arriba del grupo control. La densidad celular en este punto fue alrededor del 6%, de hecho es el valor más alto de toxicidad obtenido para el extracto (Cuadro 4). Por otro lado, el punto más bajo

de potencia inductora obtenida por el extracto fue a la concentración mayor (64.34 ± 2.72 nmol/mg min), representando una reducción de la actividad en 14.2% por debajo del grupo control (74.98 ± 9.18 nmol/mg min) y un incremento modesto en la densidad celular del 0.4% con respecto al grupo control. El extracto de *Rumex crispus L.* se coloca como cuarto inductor más potente, comparado con el resto de los extractos metanólicos y acuosos. Tampoco se consiguió doblar la actividad de QR en las células Hepa 1c1c7 a las concentraciones probadas por el extracto de *Rumex crispus L.*, no; sin embargo, su toxicidad es la más modesta comparada con el resto de los extractos tanto metanólicos como acuosos.

VI.3.4. Efecto del extracto metanólico de *Portulaca oleraceae L.* en células Hepa 1c1c7.

En la Figura 8 se muestra la capacidad inductora del extracto de *Portulaca oleraceae L.* probado a las diferentes concentraciones en las células Hepa 1c1c7. En este experimento, el punto más alto de potencia inductora se observó a la concentración de 0.1mg/ml, representando un incremento del 28.9% (96.62 ± 3.69 nmol/mg min) con respecto al grupo control (74.98 ± 9.18 nmol/mg min). La densidad celular correspondiente a esta concentración se vio reducida en menos del 20% (0.0117 ± 0.00013 mg de proteína) con respecto al grupo control (0.0145 ± 0.00032 mg de proteína). Por otro lado, el punto más bajo de potencia inductora obtenida por el extracto fue a la concentración mayor, con una reducción del 5% (71.41 ± 1.17 nmol/mg min) por debajo del grupo control (74.98 ± 9.18 nmol/mg min), y la densidad celular correspondiente a esta concentración fue reducida en un 18.2% (0.0119 ± 0.00013 mg de proteína) con respecto al grupo control (0.0145 ± 0.00031 mg de proteína). El extracto de *Portulaca oleraceae L.* se coloca como el tercer extracto más potente comparado contra el resto de los extractos metanólicos y acuosos probados en este experimento. Sin embargo, ninguna concentración probada para el extracto dobló la actividad de QR en las células Hepa 1c1c7.

Cuadro 4. Capacidad inductora de extractos metanólicos de *Amaranthus hybridus*, *Brassica rapa*, *Rumex crispus*, *Portulaca oleraceae* y *Yuca fillifera* sobre las células Hepa 1c1c7.

Grupos	Actividad de QR (nmol/mg min) Media ± EE	T/C	Dunnett P < 0.05
<i>Amaranthus hybridus L</i>			
Control	74.98 ± 9.18	1	
0.05 mg/ml DMEM	105.01 ± 1.84	1.401	No diferencia
0.1 mg/ml DMEM	130.66 ± 16.92	1.743	Diferencia *
0.5 mg/ml DMEM	102.37 ± 3.76	1.365	No diferencia
1.0 mg/ml DMEM	98.73 ± 6.14	1.317	No diferencia
<i>Brassica rapa L</i>			
Control	94.79 ± 5.93	1	
0.05 mg/ml DMEM	97.71 ± 2.75	1.031	No diferencia
0.1 mg/ml DMEM	141.45 ± 12.13	1.492	Diferencia *
0.5 mg/ml DMEM	110.99 ± 2.69	1.171	No diferencia
1.0 mg/ml DMEM	61.17 ± 1.81	0.645	Diferencia *
<i>Rumex crispus L</i>			
Control	74.98 ± 9.18	1	
0.05 mg/ml DMEM	90.57 ± 4.45	1.208	No diferencia
0.1 mg/ml DMEM	81.25 ± 3.14	1.084	No diferencia
0.5 mg/ml DMEM	74.35 ± 3.39	.992	No diferencia
1.0 mg/ml DMEM	64.34 ± 2.72	.858	No diferencia
<i>Portulaca oleraceae L</i>			
Control	74.98 ± 9.18	1	
0.05 mg/ml DMEM	89.81 ± 5.49	1.198	No diferencia
0.1 mg/ml DMEM	96.62 ± 3.69	1.289	No diferencia
0.5 mg/ml DMEM	84.99 ± 8.91	1.134	No diferencia
1.0 mg/ml DMEM	71.45 ± 1.17	.953	No diferencia
<i>Yuca fillifera Chab</i>			
Control	94.79 ± 5.93	1	
0.05 mg/ml DMEM	90.29 ± 4.31	.952	No diferencia
0.1 mg/ml DMEM	78.09 ± 4.31	.824	Diferencia *
0.5 mg/ml DMEM	39.57 ± 2.71	.417	Diferencia *
1.0 mg/ml DMEM	71.01 ± 1.90	.749	Diferencia *

* Indica diferencia estadística significativa con respecto al control, de acuerdo a la prueba de estadística de dunnett ($\alpha=0.05$), representando una reducción de actividad.

T/C = Tratamiento sobre control.

VI.3.5. Efecto del extracto metanólico de *Yuca filifera* Chab. en células Hepa 1c1c7.

La capacidad inductora del extracto de *Yuca filifera* Chab. probado a las diferentes concentraciones en las células Hepa 1c1c7 se muestra en la Figura 8. En este extracto en particular se observa un resultado altamente citotóxico, alcanzando una reducción de la actividad del 58.3% (39.57 ± 2.71 nmol/mg min) con respecto al grupo control (94.79 ± 5.93 nmol/mg min). Por otro lado, la densidad celular descendió hasta un 76.1% (0.00332 ± 0.000036 mg de proteína) por debajo del grupo control (0.0139 ± 0.00076 mg de proteína). Ninguna concentración evaluada mostró inducción de la actividad de QR en las células Hepa 1c1c7. El extracto se coloca en el último lugar de los extractos, siendo el más tóxico de todos los extractos evaluados, tanto metanólicos como acuosos, en el presente estudio. Dichos resultados se expresan en el Cuadro 4 como la media \pm el SEM.

VII. DISCUSIÓN.

A nivel mundial, las plantas se han estudiado por sus propiedades alimenticias, incluyendo no solo a los frutos, si no también a sus hojas, sus tallos y sus raíces. Sin embargo, las plantas también se han estudiado por sus propiedades medicinales, tales como sus propiedades antioxidantes, anticarcinógenas, antiespasmódicas, antimicrobianas, antiinflamatorias y antiproliferativas, entre otras. Se ha demostrado, además, que los efectos anticarcinogénicos de los vegetales están mediados, en parte, a través de la inducción de enzimas del metabolismo del xenobióticos. Diversas líneas celulares proporcionan evidencia apremiante de ayuda para el propósito de inducir enzimas que participan en el metabolismo de xenobioticos, particularmente enzimas de fase 2, que resultan en protección contra efectos tóxicos y neoplásicos de agentes carcinógenos.

Con el propósito de determinar el efecto quimioprotector de los extractos objeto de estudio, se evaluó la potencia inductora de estos sobre la actividad enzimática de QR. La actividad inductora fue medida en células Hepa 1c1c7 de hepatoma de ratón, crecidas en microplacas de 96 pozos. Con el empleo de esta técnica de cultivo celular inspeccionamos la potencia inductora, utilizando como control positivo el potente agente inductor sulfurofano, el cual dobló la actividad de QR en la concentración de 2.5 μM . Sin embargo, se observó una marcada citotoxicidad a concentraciones mayores de 5 μM . Previos trabajos demuestran que el sulfurofano a concentraciones de 10–30 μM , induce arresto del ciclo celular y, subsecuentemente, muerte apoptótica en una línea celular de cáncer de colon HT29 (Gamet-Payraastre y col., 2000). Por otro lado, el tratamiento con sulfurofano a concentraciones de 5 μM en células pancreáticas MIA PaCa-2 decrecen su crecimiento en microplacas, y a la concentración de 10 μM inhibe la proliferación en las células pancreáticas MIA PaCa-2 y PANC-1, mostrando un incremento en especies reactivas de oxígeno, sin un incremento en los niveles de glutatión reducido (GSH), principal antioxidante celular. Estos resultados indican que el

estrés oxidativo ocurrido, es causado por el tratamiento con sulfurofano a las concentraciones antes mencionadas (Pham y col., 2004).

Cabe mencionar que la línea celular propuesta (Hepa 1c1c7) responde a la mayoría de los compuestos con actividad inductora de enzimas de fase 2. Por lo tanto, el modelo fue empleado para probar la potencia inductora de una variedad de extractos acuosos y metanólicos de plantas comestibles en el estado de Querétaro. Por otra parte la técnica permite la evaluación del efecto citotóxico de los extractos bajo condiciones experimentales del ensayo. Por lo que en primera instancia fue necesario determinar la citotoxicidad básica del extracto, para después establecer su posible efecto protector. El estudio de citotoxicidad se inició con la optimización de la densidad de siembra de las células Hepa 1c1c7. Cabe añadir que el estudio inicialmente propuesto incluía la técnica de viabilidad celular mediante la incorporación del compuesto MTT para evaluar la citotoxicidad de los extractos. Debido a problemas de mantenimiento y crecimiento de las células Hepa 1c1c7 en el laboratorio, no fue posible realizar estos experimentos. Sin embargo, la densidad celular, medida como la concentración de proteína, da una estimación del número de células viables al final del tratamiento con los extractos.

Inicialmente se sembraron 10 000 células por pozo en medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino y antibióticos, durante un periodo de 24 horas. Posteriormente se vio que las células no formaron una monocapa adecuada y que representan muy pocas células; por lo cual se decidió sembrar 20 000 células viables por pozo. Sin embargo, se observó que las células después de 48 horas de tratamiento con los extractos acuosos no formaban una monocapa a concentraciones mayores de 1mg/ml DMEM. Por otro lado, las células tratadas con los extractos acuosos no presentaron este comportamiento. Esto es de suma importancia, ya que las mezclas complejas de ambos extractos podrían contener una gran variedad de constituyentes conocidos y desconocidos que podrían ser tóxicos, y que estos pueden verse afectados por el tipo de extracción.

Los resultados indican que el extracto acuoso de *Portulaca oleraceae* tuvo la mayor potencia inductora a la concentración de 0.5 mg/ml DMEM, mostrando un incremento del 16.9% comparado con el de *Amaranthus hybridus*, que a la misma concentración tuvo un incremento de 5.1%; mientras que el extracto acuoso de Brassica rapa tuvo un incremento del 3.5% a la concentración de 0.05 mg/ml DMEM (Figura 7). En ninguno de los tres casos la cantidad del inductor agregada a los pozos de la microplaca logró doblar la actividad específica de QR en células Hepa 1c1c7. Esto es importante ya que de acuerdo a Proshaska y colaboradores (1992), una unidad de actividad del inductor es definida como la cantidad de inductor requerida para doblar la actividad específica de QR en células Hepa 1c1c7 crecidas en microplaca. Aunque en el presente trabajo no se obtuvieron estos valores de inducción, lo anterior se realiza con fines comparativos. Por otro lado, cabe resaltar que con niveles de inducción enzimática de QR de 1.03 a 1.09 veces, Tanaka y colaboradores (1999) encontraron una disminución del 51% de la incidencia de fosas crípticas aberrantes inducidas químicamente con el carcinógeno azoximetano (AOM, 15 mg/kg de peso corporal) en el colon de ratas F344 tratadas con 500 ppm de morina (un flavonoide puro). Lo anterior sugiere que *in vivo* no necesariamente se requiere niveles de inducción de enzimas de fase 2 elevados para ejercer un efecto biológico significativo.

Prochaska y colaboradores (1992) tienen reportes de indican que algunos extractos vegetales de la familia de las Brassicas son potentes inductores de la actividad de QR en células Hepa 1c1c7. Sin embargo, diversos estudios indican que esto depende fuertemente de cómo fueron procesados los extractos (Hashimoto y col., 2002). Por ejemplo; de una serie de extractos de vegetales orgánicos, crecidos y cultivados bajo una variedad de condiciones, muestran grandes diferencias en la potencia inductora, porque el contenido en peso seco varía considerablemente de una muestra a otra. La actividad inductora se expresa en términos de rendimiento seco de los vegetales bajo condiciones estandarizadas dada una cantidad del inductor. Estas mediciones proporcionan la potencia inductora expresado como unidad por gramo de peso seco de vegetal.

Aunque muchos extractos vegetales inducen QR, ciertas familias son consideradas como los que poseen los componentes inductores más potentes. Por ejemplo, mientras que diversos extractos de la familia de Crucifereae tienen un alto poder por la actividad del inductor, los extractos de las Solanáceas (pimienta, patatas, tomates) tienen una baja actividad inductora (Prochaska. y col 1992). Los tres extractos acuosos objeto de estudio, correspondientes a las familias de Amaranthaceae, Brassicaceae y Portulacaceae, mostraron tener una actividad inductora sobre QR menor que el compuesto de referencia (sulfurofano).

En el caso de los cinco extractos metanólicos correspondientes a las familias de Amaranthaceae, Brassicaceae, Polygonaceae, Portulacaceae y Agavaceae, mostraron una actividad de QR inferior al potente agente inductor sulfurofano, utilizado como control positivo, pero mayor potencia inductora comparada con los extractos acuosos. En el caso de los extractos metanólicos de *Rumex crispus* y *Yuca fillifera*, no fue posible compararlos con los extractos acuosos correspondientes de su misma familia, debido a la falta de material disponible para el ensayo. En general, los resultados indican que la mayor actividad enzimática de los extractos metanólicos se obtuvo a la concentración de 0.1 mg/ml DMEM, a excepción de *Rumex crispus* (0.5 mg/ml DMEM) y para la *Yuca fillifera* Chab se obtuvo un efecto citotóxico bien marcado. A ninguna de las concentraciones probadas para los extractos metanólicos se logró doblar la actividad específica de QR, sin embargo el extracto metanólico con mayor potencia inductora fue *Amaranthus hybridus* con un incremento altamente significativo del 74.3%.

Otra limitante de este trabajo de investigación fue comparar la potencia inductora de cada uno de los extractos con el potente inductor sulfurofano, el cual se debe considerar como un compuesto químico puro. En el caso de los extractos estudiados se tiene una mezcla de compuestos que, en general, aún no han sido determinados y no se conoce cual o cuales son los compuestos que están proporcionando esta actividad o inhibición de la misma.

Con respecto al método de extracción, las familias difirieron en la potencia inductora, siendo mayor en los extractos metanólicos que en los acuosos, comparados con la misma familia. Los resultados indican que con el extracto metanólico de *Amaranthus hybridus* a concentraciones de 0.1 mg/ml DMEM, la actividad enzimática del tratamiento/control fue 1.742; mientras que para el extracto acuoso, la actividad enzimática del tratamiento/control (T/C) fue de 1.055 a la concentración de 2.0 mg/ml DMEM. Similarmente ocurrió con el extracto metanólico de *Brassica rapa*, a la concentración de 0.1 mg/ml DMEM la actividad enzimática T/C fue 1.492, mientras que para el extracto acuoso la actividad enzimática T/C fue de 1.035 a la concentración de 0.05 mg/ml. Por otro lado, a la concentración de 0.2 mg/ml DMEM del extracto metanólico de *Portulaca oleraceae*, la actividad enzimática T/C fue de 1.288 y para el extracto acuoso fue de 1.169 a la concentración de 0.5 mg/ml DMEM. En todos los casos antes comparados se tomó en cuenta los valores más altos de potencia inductora obtenida por cada uno de los extractos.

Todos los extractos metanólicos que se evaluaron en el presente estudio mostraron tener una mayor potencia inductora, ya que el contenido de compuestos que se pueden extraer con metanol es diferente en cada planta, debido a la composición y a las características propias de la eficiencia de extracción. Cabe añadir que en el presente trabajo, los extractos metanólicos fueron preparados a partir de una extracción previa con hexano:acetona para eliminar compuestos de carácter lipofílico, tales como los carotenoides, la clorofila y las grasas. Posteriormente, se realizó una extracción con metanol los que nos permitió obtener los compuestos con características más polares, tales como glucósidos de flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, entre otros. Por otro lado, en los extractos acuosos pudieran encontrarse compuestos más polares, mono-, di- y polisacáridos, así como ciertos compuestos que se encuentran presentes en el extracto metanólico previamente descrito, Además, existen factores que influyen en el contenido y tipo de metabolitos presentes en las plantas; como lo son los cambios estacionales, el entorno, las condiciones del suelo en que crecen (Yao y

col., 2005). Por tal motivo, es necesario evaluar en un futuro otras condiciones o métodos de extracción. Sin embargo, para los fines del presente estudio la cantidad de extracto y sus antecedentes farmacológicos previamente citados en la literatura fueron adecuados para la consecución de los objetivos planteados.

Estudios realizados en el Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA), muestran que de los cinco extractos metanólicos objeto de estudio, la *Portulaca oleraceae* presenta el mayor contenido de fenoles totales con un valor de 808 mg de ácido gálico por cada gramo del extracto, seguido por *Rumex crispus* (456 mg ácido gálico/gramo del extracto), *Brassica rapa* (351 mg ácido gálico/gramo del extracto), *Yuca fillifera* (222 mg ácido gálico/gramo del extracto) y el extracto de *Amaranthus hybridus* (155 mg de ácido gálico/gramo de extracto) (Miranda-Centeno, 2005). Los compuestos fenólicos incluyen, los ácidos fenólicos, ácidos hidroxinámicos, derivados de ácidos hidroxinámicos y flavonoides. Los más activos biológicamente son los flavonoides, las protantocianinas, las antocianinas y las catequinas. Los compuestos fenólicos poseen propiedades antioxidantes, que les permiten actuar como quimioprotectores en las diferentes etapas del proceso carcinógeno, además de la actividad antioxidante, los polifenoles contribuyen con otros mecanismos para ejercer sus efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos, como por ejemplo la inducción de enzimas de fase 2. Por lo anterior, sería posible que los extractos presentarán una correlación positiva entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante, de igual manera guardará una relación con el poder inductor de enzimas de fase 2.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que los extractos metanólicos no guardan una marcada actividad inductora con respecto al contenido de fenoles totales. Por ejemplo, para el extracto de *Amatranthus hybridus*, fue el extracto con mayor poder inductor en el presente estudio, mientras que su contenido de fenoles totales es el menor comparado con el resto de los extractos metanólicos. En el caso de *Portulaca oleraceae* L, el extracto presenta la mayor cantidad fenoles totales, mientras que su actividad inductora no fue

relativamente alta. Resultados similares fueron obtenidos al correlacionar el contenido de fenoles totales y flavonoides presentes en estas plantas con su capacidad antiproliferativa en células de cáncer humano de epitelio mamario (MDA-MB-231, MCF-7 y MCF-10F) (Miranda-Centeno, 2005). De manera inesperada, ambos estudios sugieren que no existe una correlación positiva y significativa en cuanto a la actividad biológica (medida como la capacidad antiproliferativa o la inducción de enzimas de fase 2) con el contenido de fenoles totales en las plantas bajo estudio.

Los resultados aquí obtenidos son valores de suficiente importancia dado que los extractos no son puros y se ven influidos por las condiciones de extracción y su composición de mezclas heterogéneas, por otra parte y, aún más importante, no existe acervo bibliográfico con información sobre ensayos de potencia inductora para los extractos probados en el presente estudio.

Cabe mencionar que cuando se utiliza métodos *in vitro*, frecuentemente se observan concentraciones tóxicas aún con los materiales más inocuos (Phillips., 1996). Los compuestos que son tóxicos a altas concentraciones pueden resultar benéficos a bajas concentraciones. Estudios *in vitro* evidencian que ciertas líneas celulares transformadas son más sensibles a los efectos biológicos de un gran número de fitoquímicos o compuestos quimioprotectores que su contraparte normal (Aparicio-Fernández y col., 2006). Por ello los resultados reportados aquí no implican que los extractos puedan tener efectos tóxicos en humanos, sino que simplemente constituyen parte de la información que pueden servir de base para estudios posteriores.

VIII. CONCLUSIONES.

En el presente estudio, se logró evaluar la potencia inductora de cada uno de los extractos acuosos y metanólicos de las plantas comestibles en el estado de Querétaro, observándose una mayor potencia de inducción de la enzima de fase 2 (QR) en células Hepa 1c1c7 para los extractos metanólicos.

El extracto metanólico con una mayor capacidad inductora ($P < 0.05$) sobre QR fue el de *Amaranthus hybridus* (quelite de pollo) a la concentración de 0.10 mg/ml DMEM (130.664 ± 16.924 nmol/mg min), representando un incremento del 74.3% con respecto al control (74.975 ± 9.183 nmol/mg min).

Por otro lado, el extracto con mayor efecto citotóxico fue el de *Yuca fillifera* Chab, el cual mostró una reducción de la actividad del 58.3% (39.573 ± 2.709 nmol/mg min) con respecto al grupo control (94.79 ± 5.931 nmol/mg min). Similarmente, la densidad celular disminuyó hasta un 76.1% (0.00332 ± 0.0364 mg de proteína) por debajo del grupo control (0.0139 ± 0.76 mg de proteína).

En los resultados obtenidos en el presente estudio fue posible evaluar el efecto citotóxico, en base a la densidad celular (expresada en mg de proteína), así como también fue posible seleccionar las especies vegetales con mayor potencia inductora de enzimas de fase 2, constituyendo las bases para los estudios posteriores en evaluaciones *in vivo*

La quimioprotección ha ganado seria consideración como una alternativa de controlar la incidencia de cáncer y ya no es solamente una estrategia teórica, es una realidad que genera resultados experimentales y clínicos impresionantes. Actualmente el desarrollo de la quimioprotección del cáncer es una disciplina que involucra el descubrimiento de nuevos agentes anticancerígenos, provenientes de plantas seleccionadas en base a información etnobotánica. El presente estudio aporta una pequeña luz local sobre ensayos de potencia inductora de los extractos de plantas comestibles en el estado de Querétaro, como una estrategia de

controlar la incidencia del cáncer. Sin embargo, un conocimiento más completo de los efectos biológicos de los agentes quimioprotectores permitirá una combinación de ellos más racional para estudios posteriores.

IX. BIBLIOGRAFÍA.

- Aparicio-Fernandez, X., Garcia, G.T., Yousef, G.G., Ann, L.M., González, M.E., y Loarca, P.G. 2006.** Chemopreventive Activity of Polyphenolics from Black Jamapa Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on HeLa and HaCaT Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 54: 2116 – 2122.
- Argueta, A., Cano, L.M., y Rodarte, M.E. 1994.** Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 1a. ed., Instituto nacional indigenista. México: 898-899, 1351, 1196, 1379-1380.
- Bertram, G., y Katzung, H. 1999.** Farmacología básica y clínica. 7a. ed., Manual moderno, México: 61-68.
- Devita, V.T., Hellman, S.J., y Rosenberg, S.A. 1997.** Cáncer Principios y prácticas de oncológica. 5a. ed., Médica Panamericana, EUA: 579-587, 1144-1148.
- Fahey, J.W., Zhang, Y., y Talalay, P. 1997.** Broccoli sprouts: An exceptional rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Medical Sciences*: Vol. 94: 10367-10372.
- Fahey, J.W., Zalcmann, A.T., y Talalay, P. 2001.** The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*: Vol. 56: 5-51.
- Fisher, D. 2003.** Functional foods and nutraceuticals in cancer prevention. 1a ed., Iowa State Press, Estados Unidos de América: 27.
- Flórez, J. 1997.** Farmacología humana. 3a. ed, Masson, España: 73-75.
- Gamet-Payrastre, L., Li, P., Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, M.A., Chevolleau, S., Gasc, N., Tulliez, J., y Terce, F. 2000.** Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induces cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells. *Cancer Research*: Vol. 60:1426-33.
- Glinsmann, W.H. 1996.** Functional foods in North America. *Nutrition Reviews*: Vol. 54: S33 – S37.
- Goldber, I. 1994.** Fuctional Foods. 1ra. Ed., Nutraceuticals, New Cork: 3 – 18.
- González, M.J. y González, B.J. 2000.** Ginecología oncológica. 2da. ed., Masson, Estados Unidos de América: 1-15, 71-87.

- Hashimoto, K., Kawamata, S., Usui, N., Tanaka, A., y Uda, Y. 2002.** *In vitro* induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in human hepatoma cells by food extracts. *Cancer Letters*: Vol. 180: 1-5.
- Hoffmann, G, R. 2001.** *Toxicology the basic science of poison*. 6a. ed., McGraw-Hill, Estados Unidos de América: 271-277.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., y Heinonen, M. 1999.** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 47: 3954-3962.
- Kelloff, G.J., Boone, C.Q., Crowell, J.A., Steele, V.E., Lubet, R., y Sigma, C.C. 1994.** Chemopreventive drug development prospective and progress. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*: Vol.3: 85-98.
- Matussheski, N.V., y Jeffery, E.H. 2001.** Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: Vol. 49: 5743-5749.
- Milner, J.A. 1999.** Functional foods and health promotion. *The Journal of Nutrition*: Vol: 129: 1395S – 1397S.
- Miranda-Centeno, C.N. 2005.** Estudio Químico y Evaluación del Potencial Quimioprotector de Plantas Comestibles en Zonas Rurales Queretanas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias y Tecnología de los Alimentos. 21- 43.
- Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., y Krishna, D.R. 2001.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*: Vol. 33: 2-16.
- Olantunde, E. 2004.** Diet related cancer and prevention using anticarcinogens. *African Journal of Biotechnology*: Vol.3: 651-661.
- Pham, N., James, W., Jacobberger., Aaron, D., Schimmer., Pinjiang, C., Gronda, M., y Hedley, D. 2004.** The dietary isothiocyanate sulforaphane target pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Molecular Cancer Therapeutics*: Vol. 10: 1239 – 1248.

- Phillips, B.J. 1996.** Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. *Toxicol in Vitro*: Vol: 10: 69 – 76.
- Prester, T., Holtzclaw, W.D., Zhang, Y., y Talalay, P. 1993.** Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*: Vol. 40: 2965 – 2969.
- Prochaska, H.J., y Talalay, P. 1988.** Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Research*: Vol. 48: 4776-4782.
- Prochaska, H.J., Santamaria, A.B., y Talalay, P. 1992.** Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Medical Sciences*. Vol. 89: 2394-2398.
- Ramos, G., Serrano, V., Balderas, P., Pelz, R. 2004.** Atlas de malezas Arvenses del estado de Querétaro. 1a. ed., Ediciones UAQ, México: 34-35, 90-91, 210-213, 222-223.
- Reséndiz, I. 1999.** Actividad antimutagénica de compuestos fenólicos presentes en la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) contra 1-Nitropireno. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 3.
- Riaz, M. N. 1999.** Soybeans as functional foods. *Cereal Foods World*: Vol. 34: 88-92.
- Singh, S.V., Antosiewicz, A.H., Singh, A.V., Lew, K.L., Srivastava, S.K., Kamath, R., Brown, K.D., y Zhang, L. 2004.** Sulforaphane induced-G₂/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *Journal of Biological Chemistry*: Vol. 279: 25813- 25822.
- Toribio, F., Galceran, M.T., y Puignou, L. 2000.** Separation of heteroaromatic amines in food products. *Journal of Chromatography B*: Vol. 747: 717-202
- Uda, Y., Price, K., Williamson, G., y Rhodes, M.J.C. 1997.** Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells *in vitro* by flavonoides. *Cancer Letters*: Vol. 120: 213-216.

Villavicencio, M.A. 1995. Plantas útiles del estado de Hidalgo. 1a. ed., Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México: 58.

Yao, L., Caffin, N., D'arcy, B., Jiang, Y., Shi, Y., Singanusong, R., Liu, X., Datta, N., Kakuda, Y., y Xu, Y. 2005. Season variation of phenolic compounds in Australia-grown tea (*Camellia sinensis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry: Vol: 53: 6477 – 6483.

Zheng, W., y Wang, S.Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry : Vol. 49: 5165-5170.