



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**“Efecto de los compuestos liofilizados de dos especies de
Brassicas en un modelo de
transformación tumoral de cáncer de mama mediado por
Benzo(a)Pireno”**

Tesis presentada para obtener el grado de
Maestría en Ciencias Biológicas

**PRESENTA
Q.F.B MONTES ALVARADO JOSÉ BENITO**

DIRECTOR DE TESIS INTERNO

DRA. LORENA MILFLORES FLORES

CODIRECTOR DE TESIS EXTERNO

DRA. IRMA FABIOLA DOMÍNGUEZ AVILÉS

Febrero 2024



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

H. Puebla de Z. a 12 de febrero de 2024

Asunto: Voto Aprobatorio

**Comité Académico del Posgrado
PRESENTE**

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

“Efecto de los compuestos liofilizados de dos especies de Brassicas en un modelo de transformación tumoral de cáncer de mama mediado por Benzo(a)Pireno”

Que presenta el estudiante **Montes Alvarado José Benito** con número de matrícula (**221470308**), aspirante al grado de **Maestro en Ciencias Biológicas**, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: **“Estructura y Funcionamiento de los Seres Vivos”**, notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los **VOTOS APROBATORIOS** como miembros del **Comité de Jurado de Examen de Grado** como a continuación se indica:

Tutor Interno: **Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna**

Tutor Externo: **Dra. Paola Maycotte González**

Revisor: **Dra. Dalia Molina Romero**

Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.



DECLARATORIA DE TRABAJO ORIGINAL

NOMBRE DEL AUTOR: José Benito Montes Alvarado.

NÚMERO DE MATRÍCULA: 221470308.

PROGRAMA: Maestría en Ciencias Biológicas de la BUAP.

TITULO DE LA TESIS: Efecto de los compuestos liofilizados de dos especies de *Brassicas* en un modelo de transformación tumoral de cáncer de mama mediado por Benzo(a)Pireno.

LUGAR: H. Puebla de Zaragoza a 19 de febrero de 2024.

Por medio de la presente

DECLARO QUE: El documento de tesis presentado para la obtención de grado de Maestro en Ciencias Biológicas es una obra original que ha sido desarrollado íntegramente, que no se han utilizado ideas, ilustraciones diversas u otra información de fuentes en medios escritos o electrónicos, sin mencionar de forma clara y exacta su origen o autor(es). Además, el documento no infringe los derechos de propiedad intelectual ni otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente. Del mismo modo, la tesis no es plagio y no ha sido usada para otro tramite de graduación por lo cual asumo frente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y ante la instancia que corresponda cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la falta de originalidad del contenido de la tesis terminal presentada en conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.



Q.F.B José Benito Montes Alvarado

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento y el apoyo brindado durante la realización de este proyecto a través del número de beca **798701**.

A la Maestría en Ciencias Biológicas de la facultad de Ciencias Biológicas incluida en el SNP (clave 005671), por su apoyo durante mi estancia.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de posgrado por las facilidades otorgadas para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra Lorena Milflores Flores por su apoyo y su paciencia en la realización de este proyecto.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social sobre todo al Centro de Investigación Biomédica de Oriente, por otorgarme las facilidades para trabajar y desarrollar este proyecto.

A la Dra Fabiola Domínguez directora del centro y co-directora de este trabajo.

A la Dra Paola Maycotte y su excelente grupo de investigación el laboratorio de Bioquímica Metabólica por sus enseñanzas y colaboración en mi proyecto.

A mi comité tutorial Dra. Rosalina Reyes Luna y la Dra Dalia Molina Romero por sus atinadas observaciones para la mejora del trabajo.

A mi madre (QEPD) mi gran ayuda y motivo de seguir superándome donde sea que tu estuvieres.

A mi esposa la Q.F.B Yazmin Morales Lezama gracias por creer en mí, por tu sacrificio y tu incondicionalidad "Todo tiene su recompensa"

Un agradecimiento especial a mi amigo Jonary Enrique Martínez Sánchez un honor haberte encontrado y compartir platicas y momentos agradables.

**טוב טעם ודעת למדני כי במצותיך האמנתי
טרם אענה אני שגג ועתה אמרתך שמרתי
טוב־אתה ומטיב למדני חקיך
תהיחלים 119,66-68**

INDICE

Resumen	Pag. 4
1. Introducción	Pag. 5
1.1. Cáncer	Pag. 8
1.2. Cáncer de mama	Pag. 9
1.2.1. Clasificación de cáncer de mama	Pag. 9
1.2.1.1. Cáncer de mama luminal	Pag. 10
1.2.1.2. Cáncer de mama enriquecido con Her2	Pag. 10
1.2.1.3. Cáncer de mama tipo basal/triple negativo	Pag. 11
1.3. Factores de riesgo asociados al cáncer de mama	Pag. 11
1.4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Pag. 13
1.4.1. Benzo (a)Pireno	Pag. 14
1.4.1.1. Metabolismo del Benzo (a) Pireno	Pag. 16
1.5. Proceso de la carcinogenesis	Pag. 18
1.6. Alimentos en la prevención del cáncer	Pag. 19
1.7. Verduras crucíferas y los glucosinolatos	Pag. 20
1.7.1. Metabolismo de los glucosinolatos	Pag. 22
1.8. Biotransformación de los Xenobióticos	Pag. 24
1.9. Mecanismo de acción de los Isotiocianatos	Pag. 25
2. Justificación	Pag. 27
3. Pregunta de Investigación	Pag. 27
4. Hipótesis	Pag. 28
5. Objetivo General	Pag. 28
6. Objetivos Particulares	Pag. 28
7. Metodología	Pag. 28
7.1. Transformación y cultivo celular	Pag. 28
7.2. Obtención de los liofilizados	Pag. 29
7.2.1. Extracción y determinación de glucosinolatos	Pag. 30
7.2.2. Extracción y determinación de isotiocianatos en brotes de brócoli y col roja	Pag. 30
7.3. Determinación de Proliferación	Pag. 30
7.4. Determinación de especies reactivas de oxígeno	Pag. 31
7.5. Análisis de datos en el programa flowJo V.10	Pag. 32
7.6. Análisis estadístico	Pag. 34
8. Resultados	Pag. 34
8.1. Modelo de transformación celular	Pag. 34
8.2. Determinación de proliferación en el modelo de transformación celular	Pag. 34
8.3. Determinación de las especies reactivas de oxígeno en la transformación celular mediada por B[a]P	Pag. 37
8.4. Comparación morfológica de células MCF10-A tratadas con B[a]P	Pag. 40
8.5. Efecto de los tratamientos con <i>Brassicas</i> sobre la transformación mediada con B[a]P	Pag. 41

8.6. Efecto de los extractos de brócoli y col roja sobre la producción de especies reactivas de oxígeno.	Pag. 43
9. Discusión	Pag. 46
10. Conclusiones	Pag. 48
11. Referencias	Pag. 49

RESUMEN

El cáncer de mama es el cáncer más frecuentemente diagnosticado en mujeres alrededor del mundo con más de 2 millones de nuevos casos en 2020. México ocupa el primer lugar en incidencia. Dentro de los factores de riesgo tenemos a los ambientales, especialmente de las sustancias químicas que han mostrado tener la capacidad de estimular el tejido glandular de la mama. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos han sido de mucho interés debido a su amplia distribución, persistencia en el ambiente por largos periodos y por su capacidad de bioacumularse en los alimentos y en el tejido adiposo de humanos y animales. El Benzo[a]Pireno (B[a]P) es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP), se produce principalmente mediante la quema de combustibles fósiles, madera y otros materiales orgánicos. La exposición a corto plazo de las células a B(a)P da como resultado una elevación transitoria de las Especies Reactivas de Oxígeno, lo que conduce a la inducción de la proliferación celular y el daño al ADN. Numerosos estudios nos indican que un alto consumo de frutas y vegetales está asociado con un decremento en el riesgo de cáncer de mama. Las verduras crucíferas pertenecen a la familia Brassicaceae también conocida como Cruciferae dentro del orden de las Brassicales. Casi todas las crucíferas contienen metabolitos secundarios conocidos como glucosinolatos, sus derivados son los isotiocianatos, y en particular sulforafano, inducen la expresión de enzimas antioxidantes. Otro mecanismo por el cual los isotiocianatos pueden actuar es por medio de los isotiocianatos que se unen al receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) translocando al núcleo al complejo con AhR para interactuar con el elemento responsable xenobióticos (XRE) localizados en las regiones promotores de algunos genes. Paso siguiente recluta coactivadores y factores de transcripción resultando en una transactivación, mientras que los ITC activan genes de la vía de los antioxidantes por medio de la vía elemento respuesta antioxidante (ARE). Por tal motivo es necesaria la búsqueda de moléculas que nos ayuden a disminuir el proceso tumorigénico en células de mama que son expuestas ante cancerígenos químicos y al mismo tiempo aclarar las rutas por la

cuales se lleva a cabo ese efecto biológico proporcionando información sobre la identificación temprana de biomarcadores que nos puedan ayudar a descubrir una importante intervención para la prevención del cáncer de mama. En este trabajo se evaluó el efecto de dos liofilizados uno de brotes de brócoli y otro de la hoja de la col lombarda sobre un modelo de transformación celular mediado por un cancerígeno B[a]P, encontrando que el B[a]P puede incrementar la proliferación y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), un dato importante ante la alta incidencia y mortalidad de esta enfermedad, así como en otros tipos de cáncer desde los procesos donde se involucra el metabolismo y la oxidación.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la enfermedad de las alteraciones fisiopatológicas en el proceso inherente de división celular, se ha perfilado como un importante trastorno responsable de un gran número de muertes al año en todo el mundo (Matthews et al., 2021). El cambio en el medio ambiente debido a la industrialización, junto con el estilo de vida y la alimentación se consideran importantes ya que influyen considerablemente en la incidencia del cáncer (Eala et al., 2022). El cáncer de mama es el cáncer más frecuentemente diagnosticado en mujeres alrededor del mundo con más de 2 millones de nuevos casos en 2020 (Sung et al., 2021). México no es la excepción y en 2020, de acuerdo con lo reportado por Globocan, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia (Cancer, 2020). Estos grados de incidencia se han ido incrementado en las últimas tres décadas, debido al aumento en los factores de riesgo. Estos factores de riesgo no han podido explicar el incremento del cáncer de mama en más del 50 por ciento de los casos. Debido a estas circunstancias, en los últimos 20 años se han iniciado estudios dirigidos a los factores ambientales, especialmente de las sustancias químicas que han mostrado tener la capacidad de estimular el tejido glandular de la mama. El

desarrollo del cáncer es multifactorial desde la influencia ambiental, estrés o tipo hereditario, sin embargo, los factores varían de paciente a paciente (Cheung & Vousden, 2022). Uno de los sellos distintivos del cáncer es el que sostiene la señalización de la proliferación. Podría decirse que el rasgo más fundamental de las células cancerosas implica su capacidad para mantener una proliferación crónica. Los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento que instruyen la entrada y la progresión a través del ciclo de crecimiento y división celular, asegurando así una homeostasis en la célula (Hanahan & Weinberg, 2011)

A diferencia de los tejidos normales, en las células cancerosas se pierde la homeostasis que regula cuidadosamente la entrada al ciclo de división celular y, por ende, el número de células y la arquitectura y función del tejido. Las células son estimuladas por señales externas de proliferación (principalmente factores de crecimiento) que activan receptores presentes en la superficie celular, permitiendo la activación consecutiva de vías de señalización intracelular y la proliferación de la célula favoreciendo su supervivencia (Hanahan & Weinberg, 2011). En las células tumorales se observan mutaciones en los genes involucrados en estas vías de señalización, generalmente son oncogenes que mantienen activa la proliferación de manera anormal, esto lo pueden hacer estimulando a las células vecinas para la síntesis de ligandos similares a los factores de crecimiento que estimulan a la célula tumoral; pueden aumentar la expresión de receptores de tirosina cinasa en la superficie, haciéndose hipersensibles; presentando mutaciones en los receptores de superficie o en las proteínas de la vía de señalización río abajo del receptor lo que las mantendría constitutivamente activas. Las mutaciones en la vía de señalización proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que se encuentran río debajo de los receptores de tirosinas cinasa, explican el desarrollo de una serie de tumores (Belden & Flaherty, 2012). Otra vía de señalización comúnmente alterada en los tumores es la vía PI3K-Akt-mTOR, relacionada con la proliferación y supervivencia, en la

que se pierde la función de la proteína supresora de tumores (PTEN) (Baínes et al., 2011). Cuando se produce un desbalance entre la producción de oxidantes y antioxidantes, ocurre un estado conocido como estrés oxidativo donde se puede llegar a producir un daño celular, esto se puede dar por medio de un aumento en la producción de precursores de radicales libres, de un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO), de un incremento de las catálisis prooxidantes, de una reducción de los sistemas antioxidantes o por una combinación de todos ellos juntos, teniendo como blancos fundamentales a los ácidos grasos insaturados de membranas fosfolipídicas, las proteínas y el ADN. Existen diferentes tipos de daño oxidativo al ADN entre las que se han reportado: ruptura del esqueleto azúcar-fosfato de una o de las dos hebras, modificación de las bases nitrogenadas y la formación de uniones cruzadas ADN-ADN o ADN- proteína a través de diferentes mecanismos (García et al., 2004). Se ha comprobado que las ERO puede estimular el desarrollo tumoral en sus tres etapas; inducción de mutación en el ADN (iniciación), estimulación de la expansión tumoral del clon mutado (promoción) y promoción de malignidad en el tumor (progresión). En la iniciación requiere de una modificación permanente del material genético que puede ser por la formación del $\text{OH}\cdot$ generado por la interacción del H_2O_2 con el hierro (Fe^{2+}) o (Cu^{2+}) constitutivos unidos o cercanos al ADN (García et al., 2004). Incremento del calcio (Ca^{2+}) libre intracelular, ya sea producto de la movilización a partir de sus depósitos intracelulares (el retículo endoplasmático y la mitocondria) o a través del influjo extracelular. Esta respuesta es provocada por una sobrecarga de estrés oxidativo que agota las reservas de antioxidantes endógenos, lo que constituye una señal para la liberación de este elemento; que una vez liberado, además de provocar otras respuestas, conduce a la activación de endonucleasas que fragmentan al ADN (proceso que normalmente tiene lugar durante la apoptosis). Estos mecanismos no son excluyentes, por lo que pueden tener lugar simultáneamente (García et al., 2004). Existe una lista creciente de compuestos tóxicos que, se ha demostrado, están integrados al ambiente entre ellos los hidrocarburos

aromáticos policíclicos (HAP), actualmente se ha estimado que el tabaquismo y la dieta son las principales vías de exposición incluso más significativas que la exposición a un ambiente laboral. Actualmente se acepta que un gran número de casos de cáncer de mama se originan por la exposición a sustancias tóxicas entre ellas los (HAP) que tienen la capacidad de provocar mutaciones en el ADN (De Célis et al., 2006). Los isotiocianatos (ITC) juegan un papel importante como anticancerígeno asociado con el consumo de verduras crucíferas, los glucosinolatos (GST) de los cuales derivan los ITC están involucrados en la detoxificación de sustancias tales como los carcinógenos, sugiriendo que personas que tienen reducida actividad de GST podrían ser susceptible a contraer cáncer. También se ha demostrado que pueden actuar como antioxidantes induciendo la producción de enzimas de fase II importantes defensas contra el estrés oxidativo y el daño asociado con el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Higdon et al., 2007).

1.1. CÁNCER

La división celular es controlada por una serie de sistemas que tienen efectos estimulantes o inhibitorios. El cáncer es de origen monoclonal, y para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en célula neoplásica deben ocurrir mutaciones genéticas en la misma. Dichas mutaciones genéticas ocasionan la modificación de los productos que en condiciones normales codificaría el gen y, finalmente llevaría a un cambio en la función proteica y posiblemente al desarrollo de un cáncer (De Civetta & Civetta, 2011). Los principales mecanismos que permiten su progresión incluyen la evasión de la apoptosis, la capacidad ilimitada de dividirse, la angiogénesis mejorada, la resistencia a las señales anti-crecimiento y la inducción de señales de crecimiento propias, así como la capacidad de metástasis (Hanahan & Weinberg, 2000).

La carcinogénesis es un proceso multifactorial que es estimulado principalmente por predisposiciones genéticas y causas ambientales (De Civetta & Civetta, 2011).

1.2. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad donde las células del tejido mamario cambian y se dividen sin control, dando lugar a un tumor. El cáncer de mama es el cáncer más frecuentemente diagnosticado en mujeres alrededor del mundo con más de 2 millones de nuevos casos en 2020 (Sung et al., 2021). México no es la excepción y en 2020, de acuerdo con lo reportado por Globocan, el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia (Cancer, 2020). Estos grados de incidencia se han ido incrementado en las últimas tres décadas, debido al aumento en los factores de riesgo. El número de factores de riesgo de cáncer de mama es significativo e incluye tanto factores modificables como los no modificables. Existen tipos de cáncer de mama in situ, como el carcinoma ductal in situ (DCIS) y el carcinoma lobular in situ (LCIS). Además, estos pueden ser invasivos, siendo más del 81 % de los cánceres de mama invasivos o infiltrantes. (Society, 2019)

1.2.1. CLASIFICACION DEL CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea cuya valoración pronóstica clásica se ha basado en parámetros clínicos e histopatológicos en tamaño tumoral y afectación ganglionar.

La aplicación de técnicas inmunohistoquímicas permite estudiar otras variables que nos pueden ayudar a ser más específicos en esta indicación. El índice de proliferación tumoral, determinado por la expresión de moléculas como Ki67, o la expresión de receptores hormonales (RH) o del receptor Her2/neu por las células tumorales son otros factores con valor pronóstico y predictivo de la respuesta a una determinada terapia (Piñero-Madróna et al., 2008).

1. Luminal A (HR+/HER2-).
2. Luminal B (HR+/HER2+)
3. Enriquecido con HER2 (HR-/HER2+).
4. Triple Negativo (HR-/HER2-).

1.2.1.1. CÁNCER DE MAMA LUMINAL.

Los cánceres de mama luminales son tumores que presentan receptores a estrógenos (ER) y comprenden casi el 70 % de todos los casos de cáncer de mama en las poblaciones occidentales.

LUMINAL A:

Constituye el 50-60% de los luminales. Es el subtipo de mejor pronóstico, con menos incidencia de recaídas y mayor índice de supervivencia. Son tumores que expresan (RE+). Presenta una alta tasa de respuesta a la hormonoterapia.

LUMINAL B:

Constituye el 10-20% de los tumores luminales, presenta una baja expresión de receptores estrogénicos y mayor expresión de genes de proliferación y ciclo celular. A diferencia del subtipo A, los tumores luminal B son de mayor grado y peor pronóstico, son RE+ y pueden ser negativos a receptores de progesterona (RP-) y/o HER2 positivos, tienen una alta expresión de genes relacionados con la proliferación (Ki67) (Ades et al., 2014).

1.2.1.2. HER2 POSITIVO:

El grupo enriquecido con Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) constituye 10-15% de los cánceres de mama, se caracteriza por la alta expresión de HER2 con ausencia de RE- y RP-, este subtipo expresa genes y proteínas relacionados con la proliferación (ERBB2 y GRB7) (Roberts et al., 2013). Los cánceres con HER2+ crecen más rápido que los cánceres luminales. Tienen peor pronóstico si se comparan con los luminales y sus tratamientos son dirigidos al antiHER2.

1.2.1.3. TRIPLE NEGATIVO:

El cáncer de mama triple negativo (TN) está caracterizado por ser RE-, RP- y HER2-, constituye cerca del 20 % de todos los cánceres de mama, es más común entre mujeres menores de 40 años y mujeres afroamericanas (Plašilová et al., 2016). Son tumores que expresan <1% de RE y RP por inmunohistoquímica (IHQ) y el HER2 no amplificado, por lo que su comportamiento es agresivo con alta tasa de recurrencia, la quimioterapia es el único tratamiento disponible. (Alcaide Lucena, Mayo 2021; Eroles, Bosch, Pérez-Fidalgo, & Lluch, 2012; Prat, 2013).

1.3. FACTORES DE RIESGO MODIFICABLES Y NO MODIFICABLES ASOCIADOS AL CÁNCER DE MAMA

Como se ha mencionado líneas arriba, el cáncer de mama es una enfermedad multifactorial. Existen factores de riesgo genéticos, hormonales y ambientales que se vinculan al desarrollo de esta neoplasia (Carmona, 2019). La mayoría de los tumores de mama están vinculados con la exposición a estrógenos, así han sido identificadas situaciones en los que los niveles de estrógenos son relevantes como la menarca temprana.

Los factores de riesgo asociados al cáncer de mama incluyen factores que no pueden ser modificados (no modificables) y factores asociados al estilo de vida, la concientización de hábitos saludables y el enfoque preventivo (modificables). A continuación, se desglosa una tabla con los principales factores asociados al cáncer de mama. Tabla 1.

FACTORES NO MODIFICABLES	FACTORES MODIFICABLES
Sexo femenino	Terapia de reemplazo hormonal
Edad avanzada	Dietilestilbestrol
Historia familiar	Actividad física
Mutaciones genéticas	Sobrepeso/obesidad
Raza/Etnia	Consumo de alcohol
Embarazo tardío/ lactancia nula	Consumo de tabaco
Periodo menstrual prematuro/ menopausia	Vitaminas insuficientes
Densidad del tejido mamario	Suplementación
Antecedentes de cáncer de mama	Exposición excesiva a luz artificial
Enfermedades mamarias no cancerosas	Ingesta de alimentos procesados
Radioterapia previa	Exposición a productos químicos

Tabla 1.- Lista de factores modificables y no modificables asociados al cáncer de mama

Estos factores de riesgo no han podido explicar el incremento del cáncer de mama en más del 50 por ciento de los casos. Debido a estas circunstancias, en los últimos 20 años se han iniciado estudios dirigidos a los factores ambientales, especialmente de las sustancias químicas que han mostrado tener la capacidad de estimular el tejido glandular de la mama.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos han sido de mucho interés debido a su amplia distribución, persistencia en el ambiente por largos periodos y por su capacidad de bioacumularse en los alimentos y en el tejido adiposo de humanos y animales (De Célis et al., 2006).

1.4. HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS: UN FACTOR DE RIESGO

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son contaminantes ambientales que se producen a partir de la combustión incompleta de la materia orgánica, los podemos encontrar en los escapes de los automóviles (especialmente en los motores a diésel), el humo del tabaco, las chimeneas de las fábricas, los alimentos asados a la parrilla con carbón o leña y el humo de la leña (Wogan et al., 2004).

La agencia internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha identificado más de 476 agentes ambientales ((IARC), 2006) de los cuales 216 han sido identificados como carcinógenos (agente químico o físico específico que tiene la capacidad de causar cáncer en individuos expuestos a él) los cuales pueden dañar la glándula mamaria y que han sido probados en animales (Rudel et al., 2007), estos agentes son detectables en la contaminación del aire, comida, productos industriales, farmacéuticos y productos para la agricultura. Entre estos agentes los hidrocarburos aromáticos policíclicos, han sido identificados como inductores de estrés oxidativo en estudios *in vitro e in vivo* (Burdick et al., 2003) (Guo et al., 2015).

De acuerdo con la Norma oficial NOM-010-STPS-2014, (Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral-Reconocimiento, evaluación y control) la clasificación del riesgo de exposición a sustancias químicas contaminantes del ambiente laboral se deberá determinar con base en el Grado de Riesgo a la Salud o la Categoría de Peligro para la Salud de la sustancia química según lo indicado en la tabla 2(NOM-010-STPS-2014, 2014). Donde grado 0 es mínimamente peligroso, la clasificación de riesgo es de 0 y van incrementando a grado 4, severamente peligroso, no obstante, en la categoría de peligro va de categoría 5 mínimamente peligroso hasta categoría 1 severamente peligroso.

Grado de Riesgo a la Salud NOM-018-STPS-2000, Modelo rectángulo (ver Tabla 5)	Clasificación de Riesgo	Categoría de Peligro para la Salud NMX-R-019-SCFI-2011 (ver Tabla 6)
Grado 0, Mínimamente peligroso	0	Categoría 5
Grado 1, Ligeramente peligroso	1	Categoría 4
Grado 2, Moderadamente peligroso	2	Categoría 3
Grado 3, Seriamente peligroso	3	Categoría 2
Grado 4, Severamente peligroso	4	Categoría 1

Tabla 2.- Clasificación de riesgo y categoría de peligro para la salud Las sustancias químicas contaminantes del ambiente laboral según la norma oficial, se han clasificado en Grado 0 es la mínimamente peligrosa, su clasificación de riesgo es 0 y en la categoría de peligro para la salud es de categoría 5, hasta llegar a un Grado 4 que es severamente peligroso, su clasificación de riesgo es 4 y su categoría de peligro para la salud se encuentra en la categoría 1.

1.4.1. BENZO[A]PIRENO

El Benzo[a]Pireno (B[a]P) es el hidrocarburo aromático policíclico (HAP) mejor estudiado, se produce principalmente mediante la quema de combustibles fósiles, madera y otros materiales orgánicos. Tiene la capacidad de permanecer en el medio ambiente; por lo tanto, se ha encontrado en la atmósfera (Dutta et al., 2010). Se puede absorber fácilmente por tres vías: mediante su inhalación, administración oral y a través de la piel. En el caso de los humanos las principales vías de exposición al B[a]P son los alimentos y el aire contaminado (Mo et al., 2021).

Entre los procesos sufridos por los alimentos en los que se ha evidenciado su formación, se encuentran: el ahumado, el secado, el tostado, el horneado, la fritura, la extracción de aceites y la termo degradación de lípidos, como es el caso de los aceites comestibles que se someten a temperaturas elevadas (Castañeda-Ortega et al., 2023).

El B[a]P tiene la capacidad de elevar las especies reactivas de oxígeno (ERO), por medio de las reacciones de oxido reducción generadas por quinonas, derivadas de su metabolismo por enzimas de fase 1 especialmente las de la familia de los citocromos, las que pueden contribuir a transformaciones oncogénicas, estas ERO pueden inducir la peroxidación lipídica que cataliza la oxidación de dioles a diol-epóxidos y estos a su vez tienen la posibilidad de unirse al ADN formando aductos y a las proteínas (Castañeda-Ortega et al., 2023).

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha determinado que el B[a]P es un compuesto carcinogénico para los seres humanos categorizándolo en el grupo 1 de acuerdo con la tabla 3 es severamente peligroso (Ba et al., 2015).

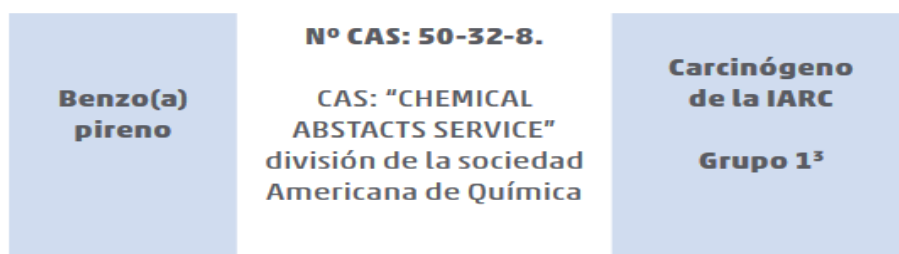


Tabla 3.- La agencia internacional para la investigación del cáncer clasifica al B[a]P dentro del grupo 1= cancerígeno. La evidencia ha probado que es un agente que se asocia con el cáncer en seres humanos.

Por otro lado, la Norma oficial NOM-010-STPS-2014 también nos menciona los límites permitidos de exposición a sustancias químicas contaminantes del ambiente en una jornada de 8 horas de trabajo donde la connotación se maneja en 5 etapas A1= carcinógeno confirmado en humanos, A2= Carcinógeno sospechoso en humanos, A3 = Carcinógeno confirmado en animales con desconocimiento relevante para humanos, A4 = No clasificado como carcinógeno en humano, y A5= no sospechoso como carcinógeno en humano y donde la exposición promedio ponderado en tiempo

es (L) indicando que la exposición por todas las vías (respiratoria, cutánea e ingestión) debe ser controlada a un nivel tan bajo como sea posible (NOM-010-STPS-2014, 2014) Tabla 4.

No.	Sustancia Química	Alteración/Efecto a la salud	PM	No. CAS	Connotación	VLE	
						PPT	CToP
96	Benzo(a)antraceno	Cáncer de piel	228.30	56-55-3	A2, IBE _P	(L)	
97	Benzo(a)Pireno	Cáncer	252.30	50-32-8	A2, IBE _P	(L)	
98	Benzo(a)fluoranteno	Cáncer	252.30	205-99-2	A2, IBE _P	(L)	

Tabla 4.- Valores límites de exposición a sustancias químicas contaminantes del ambiente laboral para una jornada de 8 horas. En trabajos donde se expone a los carcinógenos los valores permitidos enlistados donde PM= peso molecular, No. Cas= número asignado por el US Chemical Abstracts Service (CAS), Connotación A2= Carcinógeno sospechoso en humanos, IBE_P = Índice biológico de exposición por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, VLE= valor límite de exposición, PPT= Exposición promedio ponderado en tiempo, (L) Exposición por todas las rutas debe ser controlado a nivel tan bajo como sea posible.

1.4.1.1. METABOLISMO DEL BENZO[A]PIRENO

El B[a]P tiene especial importancia ya que, aunque no es tóxico *per se*, es considerado como carcinógeno debido a que los metabolitos derivados de su biotransformación como el B[a]P diol epóxido (B[a]PDE) tiene propiedades mutagénicas y carcinogénicas (Vázquez-Gómez et al., 2016). Los efectos carcinogénicos del B[a]P pueden ser explicados, en términos generales, por dos mecanismos, la vía genómica y la vía no genómica. La primera consiste en la inducción de genes (CYP1, CYP2) que codifican enzimas que participan en la bioactivación del B[a]P. En la primera fase, el B[a]P es oxidado por CYP1A1 produciendo (+) y (-) B[a]P -7,8-óxidos. Posteriormente por acción del epóxido hidrolasa (EH) hidroliza estos óxidos y se forman (-) y (+) B[a]P-7,8-dioles que son oxidados una vez más por CYP1A1 para formar (-) B[a]P-7,8 diol- 9,10 epóxido-1, (+) B[a]P-7,8 diol- 9,10 epóxido 2 (B[a]PDE) que son las formas tóxicas. La fase 2 consiste en la conjugación de B[a]PDE generados en la fase 1 con moléculas polares principalmente por la glutatión-S-tranferasa (GST) y de esta manera evitar su interacción y un posible daño a constituyentes celulares como el ADN

(Burdick et al., 2003) (Sigounas et al., 2010) **Figura 1.** Por otro lado, los metabolitos intermedios de diol se oxidan por efecto de la aldo-ceto reductasa 1 A 1 (AKR1A1) que forman quinonas reactivas (BPQ), estos metabolitos forman aductos en el DNA y entran en un ciclo redox para producir ERO, aniones superóxido, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilos (Burdick et al., 2003). La elevación de las ERO inducida por BPQ conducen a la activación de la vía de AKT y ERK para aumentar la proliferación celular, al activarse la vía de ERK nos lleva a la inducción de metaloproteinasas de matriz 9 (MMP-9) que mejora la migración de células de cáncer de mama in vitro y la metástasis de tumores mamarios in vivo, sugiriendo que la acumulación de B(a)P por exposición contribuye a la metástasis del cáncer de mama (Burdick et al., 2003).

El segundo mecanismo tiene que ver con la participación del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en la estimulación, promoción y progresión de tumores, mediante la alteración de las vías de señalización relacionadas con la proliferación celular y del sistema inmune, por lo que debe ser regulada. La activación de AhR conlleva a una sobreexpresión de enzimas de fase 1 y 2 del metabolismo de xenobióticos y forma derivados de los ligandos, facilitando su remoción por medio de transportadores de membrana dependientes de ATP. Otro mecanismo de remoción por el cuál la célula es capaz de disminuir la señalización es por medio de la degradación vía proteasoma 26S (Vázquez-Gómez et al., 2016) Fig 2.

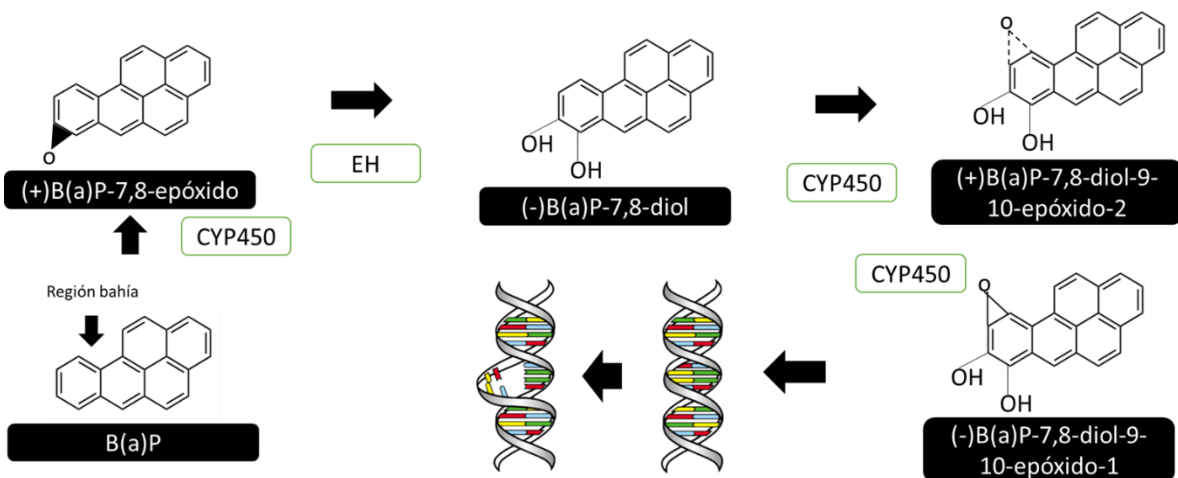


Figura 1 Metabolismo del B[a]P por medio del CYP450. Esta reacción forma como primer metabolito un epóxido (+) B(a)P-7,8-epóxido, que al entrar en contacto con una epóxido hidrolasa nos va a dar un diol llamado (-) B(a)P-7,8-diol, nuevamente al interaccionar con CYP450 formara otros epóxidos hasta concluir en (-)B(a)P-7,8-diol-9-10-epóxido-1 que se translocara al DNA para formar los aductos.

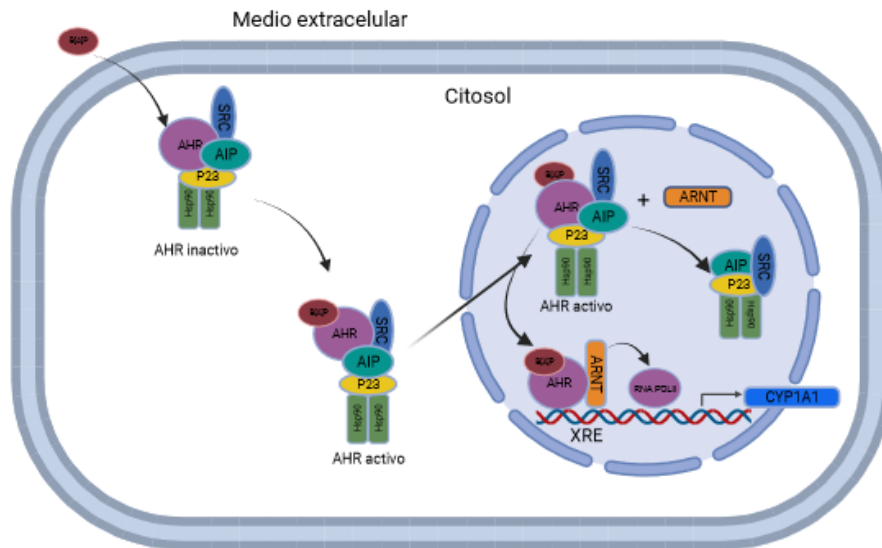


Figura 2 Activación de AhR. El receptor en su forma inactiva (sin ligando unido, para este caso B[a]P) forma un complejo con un dínmero de la proteína de choque térmico (Hsp90) otra proteína de choque térmico llamada P23 y una proteína de interacción con el AhR parecida a la inmunofilina (AIP), también conocida con XAP2, y una cinasa de tirosina (c-SRC). Una vez unida a su ligando se activa y se trasloca al núcleo y forma un heterodímero con la proteína traslocadora nuclear del receptor de hidrocarburos de arilo (ARNT), liberando el complejo de las proteínas de choque térmico, traslocando solamente al AhR y su ligando al ADN uniéndose a la región XRE (GCGTGA) reclutando coactivadores y favorecer la transcripción de genes blanco como el CYP1A1.

1.5. PROCESO DE LA CARCINOGENÉISIS

El proceso de carcinogénesis puede dividirse en al menos tres etapas: iniciación, promoción y progresión. La primera etapa de carcinogénesis, iniciación, resulta de una alteración genética irreversible, muy probablemente una o más mutaciones simples, transversiones, transiciones y/o pequeñas deleciones en el ADN. La etapa reversible de la promoción no implica cambios en la estructura del ADN, sino más bien en la expresión del genoma mediada a través de interacciones

promotoras-receptoras. La etapa irreversible, final de progresión se caracteriza por el crecimiento descontrolado de las células y su malignidad (Pitot, 1993).

El inicio de la carcinogénesis se puede medir mediante puntos finales y transitorios incluidos la elevación de las ERO, el daño al ADN, la activación de la vía Ras-ERK-NOX y el aumento de la proliferación celular inducidos por la exposición al B(a)P (Pluchino & Wang, 2014). La exposición a corto plazo de las células a B(a)P da como resultado una elevación transitoria de las ERO, lo que conduce a la activación de la vía ERK independiente de Ras/Raf y la posterior inducción de la proliferación celular y el daño al ADN (Rathore et al., 2011).

Dado que siempre se está expuesto a elementos ambientales que pueden generar ERO esto aunado al multifacético rol de estos en la promoción y desarrollo del cáncer de mama es necesario identificar sustancias no citotóxicas que posean propiedades anticancerígenas, antioxidantes para poder controlar el cáncer de mama esporádico. Numerosos estudios nos indican que un alto consumo de frutas y vegetales está asociado con un decremento en el riesgo de cáncer de mama (Block et al., 1992) (Vadodkar et al., 2012).

1.6. ALIMENTOS EN LA PREVENCIÓN DEL CÁNCER

Una dieta con poca cantidad de frutas, verduras, cereales integrales, semillas y frutos secos, y un consumo excesivo de alimentos como cereales ultraprocesados y bebidas azucaradas es el factor que más contribuye al riesgo de enfermedades crónicas (Afshin et al., 2019) (Kris-Etherton et al., 2002).

Las frutas y los vegetales contienen varios tipos de compuestos bioactivos entre los que tenemos metabolitos primarios (vitaminas, minerales etc.) así como metabolitos secundarios (carotenoides, flavonoides, polifenoles, glucosinolatos etc) que tienen efectos antioxidantes para suprimir el estrés

oxidativo e inhibir la carcinogénesis, así como varios estados del desarrollo del cáncer de mama (Rathore et al., 2011).

El consumo regular de vegetales crucíferas como son el brócoli, coles de Bruselas, repollo, coliflor, col rizada, colinabo y nabo se asocia con una reducción de la incidencia de cáncer. Las verduras crucíferas contienen exclusivamente glucosinolatos en aproximadamente 20 $\mu\text{mol/g}$ de masa seca de verdura y se cree que estos fitoquímicos son los principales responsables de la supuesta quimioprevención del cáncer conferida por el consumo de dietas ricas de estas verduras (Hayes et al., 2008). Los compuestos organosulfurados como el indol-3carbinol, el sulforafano y la iberina encontrados en los vegetales crucíferos pueden ayudar a disminuir las ERO al aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes como GST involucradas en la detoxificación de ERO producidas por carcinógenos (Liu, 2013).

1.7. VERDURAS CRUCÍFERAS Y LOS GLUCOSINOLATOS

Las verduras crucíferas pertenecen a la familia *Brassicaceae* también conocida como Cruciferae dentro del orden de las Brassicales. Dentro de este orden, casi todas las crucíferas contienen metabolitos secundarios conocidos como glucosinolatos (Shakour et al., 2022) Figura 2.

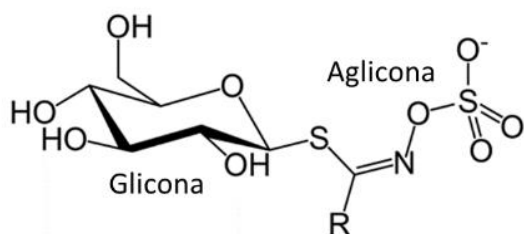


Figura 3.- Glucosinolatos. Estructura general de los glucosinolatos también llamado tioglicósido formado de una glicona (b-D-tioglucona) y una aglicona (oxima sulfatada) además de un grupo R que determinara el producto final al ser sustituido por diferentes aminoácidos.

Los glucosinolatos son responsables del sabor amargo y el olor acre que se encuentra en estos vegetales (Barba et al., 2016). El tipo de glucosinolatos determina los compuestos formados; diferentes cadenas laterales dan como resultado la producción de diferentes productos finales (Barba et al., 2016). Los glucosinolatos se clasifican comúnmente en tres categorías: (Blažević et al., 2020) Figura 4.

1. Glucosinolatos Alifáticos, nombrados así porque en su cadena R es sustituida por una valina, leucina, alanina o metionina.
2. Glucosinolatos Aromáticos, nombrados así porque en su cadena R es sustituida por una tirosina o fenilalanina.
3. Glucosinolatos Indólicos, nombrados así porque en su cadena R es sustituida por un triptófano.

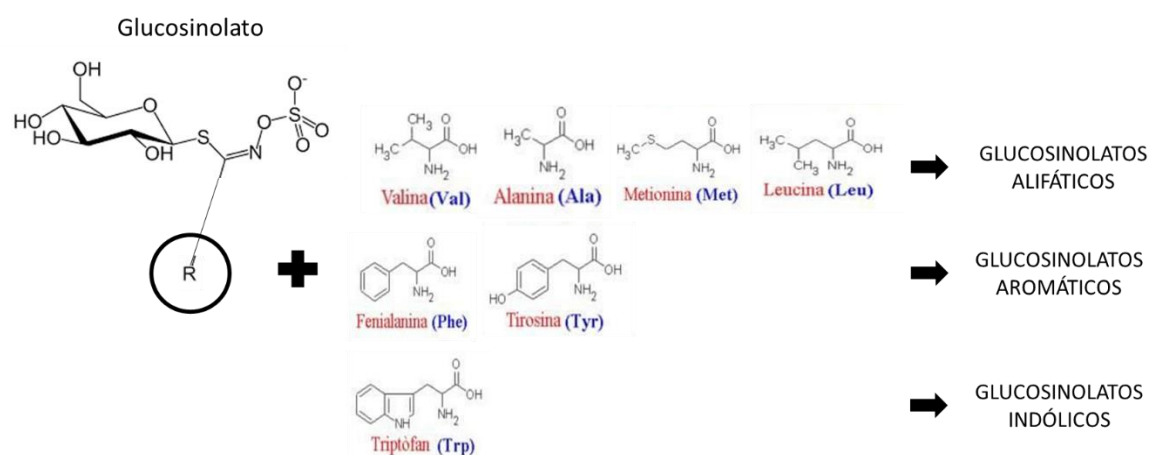


Figura 4.- Clasificación de los glucosinolatos según el aminoácido en el grupo R. La clasificación propuesta por Blažević determina que los glucosinolatos se van a clasificar por el aminoácido que se encuentre en su grupo R así tenemos alifáticos (Valina, Alanina, Metionina, Leucina), aromáticos (Fenilalanina, Tirosina) e Indólicos (Triptófano)

1.7.1. METABOLISMO DE LOS GLUCOSINOLATOS

Estos glucosinolatos por sí mismos son inocuos, pero tras el daño que sufre el tejido de la planta ya sea por masticar, cortar o mezclar se produce la hidrólisis de los glucosinolatos por medio de una enzima que está contenida en las verduras crucíferas llamada mirosinasa debido a la descomposición celular. Esto sirve como mecanismo de defensa de la planta ante los depredadores y esta acción da como resultado la formación de productos incluidos los isotiocianatos, nitrilos y tiocianatos (Kissen et al., 2008) Figura 5.

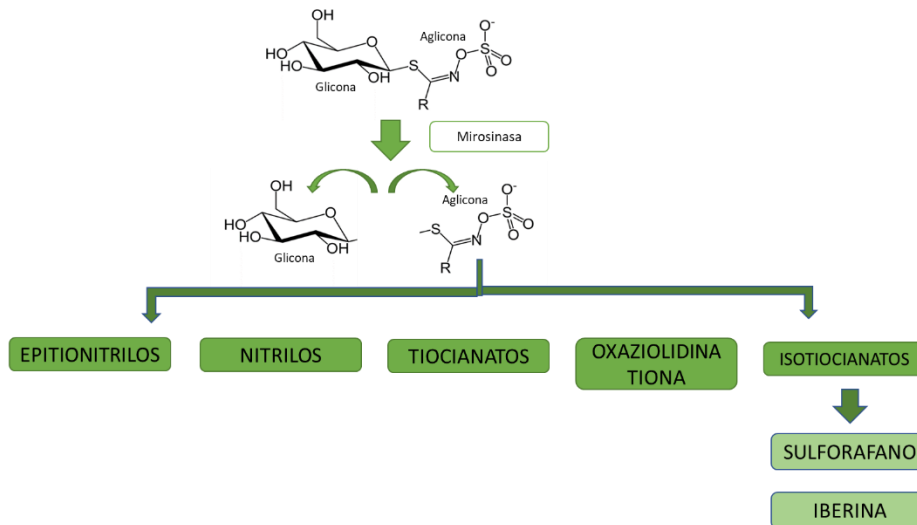


Figura 5 Síntesis enzimática de los glucosinolatos. Por medio de la acción de la enzima mirosinasa sobre los glucosinolatos cortando el enlace entre la Glicona y la Aglicona, esta última al ser muy inestable tiene rearrreglos químicos que dan como resultado la formación de productos incluyendo los isotiocianatos.

El metabolismo de los glucosinolatos también puede estar dado por la microbiota intestinal (Luang-In et al., 2013). Si la mirosinasa se desnaturaliza cuando es ingerida, los glucosinolatos podrían absorberse parcialmente en el estómago y los glucosinolatos intactos restantes transitarían hacia el intestino delgado y el colon, donde la microbiota intestinal se encarga de hidrolizarlos y

absorberlos como isotiocianatos (Barba et al., 2016), las propiedades beneficiosas para la salud de estos compuestos se relaciona en gran medida con las acciones de los isotiocianatos (Maina et al., 2020) (Shakour et al., 2022).

Diversos factores influyen en el tipo y la concentración de glucosinolatos que se encuentran en estos vegetales, como el genotipo, el cultivo, el sitio donde se cultiva, las condiciones de crecimiento (temperatura, disponibilidad de nutrientes, contenido de agua), etapa de la planta, tejido analizado, condiciones de almacenamiento y métodos de preparación y cocción (Maina et al., 2020). El genotipo de la planta determina los glucosinolatos específicos que están presentes en cada uno de los vegetales crucíferos, pero la interacción de este genotipo con el medio ambiente puede afectar la concentración de glucosinolatos que se encuentra en una muestra específica (Björkman et al., 2011). Por otro lado, la etapa de desarrollo y el tejido vegetal específico también influyen en la concentración de glucosinolatos, por ejemplo, en los brotes de brócoli y coliflor de 3 días contienen niveles de glucorafanina por gramo de 10 a 100 veces más altos en comparación con sus formas de plantas maduras (Fahey et al., 1997).

Por lo general, las verduras crucíferas no se consumen de inmediato, por tal motivo el almacenamiento y procesamiento de dichas verduras tienen un impacto en el contenido de glucosinolatos y el beneficio para la salud y el consumo (Björkman et al., 2011).

Cuando los alimentos se cocinan o se preparan utilizando métodos comprobados científicamente, con o sin conocimiento de cómo o por qué se utilizan los alimentos son llamados “alimentos funcionales”, estos aportan al organismo la cantidad necesaria de vitaminas, grasas, proteínas, hidratos de carbono, etc, necesarias para su sana supervivencia.

Un nutraceutico de acuerdo con la definición de DeFelice en 2011 “Es un alimento o parte de un alimento” que tienen un beneficio médico o de salud, incluida la prevención y el tratamiento

de enfermedades (News-Medical, 2022) y que además es seguro para el consumo humano en la cantidad y con la frecuencia requerida para realizar tales propiedades.

1.8. BIOTRANSFORMACIÓN DE XENOBIÓTICOS.

Las enzimas de biotransformación, también denominadas enzimas metabolizadoras de fármacos o xenobióticos desempeñan un papel importante en la regulación de los efectos tóxicos, mutagénicos y neoplásicos de los carcinógenos químicos. Los fitoquímicos de los alimentos vegetales modulan la actividad de las enzimas de biotransformación, un mecanismo por medio del cual las frutas los vegetales y las verduras crucíferas en particular pueden contribuir a la reducción del riesgo de cáncer (Langouët et al., 2000).

Existen dos grupos importantes de enzimas de biotransformación. Las enzimas de Fase I (citocromos P-450 y las monooxigenasas dependientes de flavinas) que convierten a los compuestos hidrofóbicos a electrófilos reactivos por medio de la oxidación, hidroxilación y reducción, preparándolos para reaccionar con fracciones solubles en agua. Las consecuencias de la biotransformación por medio de las enzimas de Fase I son:

1. Inactivación.
2. Activación (profármaco/bioactivación)
3. Activo en activo.
4. Activo en tóxico.

Las enzimas de Fase II como (glutación-S-transferasa, glucoronosiltransferasa, sulfotransferasa, N-acetil transferasa) catalizan reacciones de conjugación. Al metabolito procedente de la Fase I, se le acoplan compuestos endógenos voluminosos como ácido glucurónico, ácido acético o ácido sulfúrico que aumentan el tamaño de la molécula, con ello se incrementa la hidrosolubilidad y se inactiva el fármaco. Ambos mecanismos buscan inactivar y aumentar la ionización y polaridad del

xenobiótico haciéndolo más soluble y más fácilmente eliminable. Los polimorfismos genéticos en estos sistemas enzimáticos pueden influir en la susceptibilidad al cáncer cuando se combinan a las exposiciones a carcinógenos (Hecht, 2000).

Como se mencionó anteriormente los glucosinolatos se hidrolizan a isotiocianatos por efecto de la enzima mirosinasa. Esto provoca un aumento en la actividad metabólica de la fracción microsomal y esta inducción enzimática puede reducir, pero al mismo tiempo potenciar los efectos de los xenobióticos. De esto dependerá si el proceso de transformación da lugar a metabolitos inactivos, activos o tóxicos. La acción carcinogénica de algunos HAP está relacionada con el incremento de la síntesis de compuestos oxidantes muy reactivos en el hígado (epóxidos) que producen daño al ADN (Verhoeven et al., 1997).

1.9. MECANISMO DE ACCION DE LOS ISOTIOCIANATOS.

Los compuestos en las verduras crucíferas afectan la actividad enzimática de biotransformación por diversos mecanismos. Pueden inducir la expresión de enzimas de Fase I, enzimas de Fase II y, también pueden inhibir directamente a P-450 (Conaway et al., 1999).

Se ha demostrado que muchos ITC en particular sulforafano, inducen la expresión de enzimas antioxidantes (sustancias que previenen o reducen el daño causado por las ERO), mediante la acción de la vía dependiente del factor nuclear E2 relacionada con el factor 2 (Nrf2). Nrf2 es un factor de transcripción (proteína que inicia, mejora o inhibe la transcripción de un gen) que se une a la proteína kelch la proteína similar a la ECH 1 (Keap1), que son proteínas reclutadoras principalmente a través de la ligasa E3 que es dirigida selectivamente a proteínas para ubiquitinarlas y llevar a degradación por medio del proteasoma 26S. Keap 1 responde a las señales de estrés oxidativo o inductores químicos liberando Nrf2. Los isotiocianatos pueden reaccionar con residuos sulfhidilo de Keap 1 liberando Nrf2, esto provocaría que Nrf2 se transloque al núcleo y se

una al elemento de respuesta antioxidante (ARE) ubicado en el ADN en los promotores de genes que codifican para enzimas antioxidantes como GST, Tioredoxina, NAD(P)H, quinona oxidorreductasa 1 (NQO-1) y hemo oxigenasa 1 (HO-1) Figura 6.

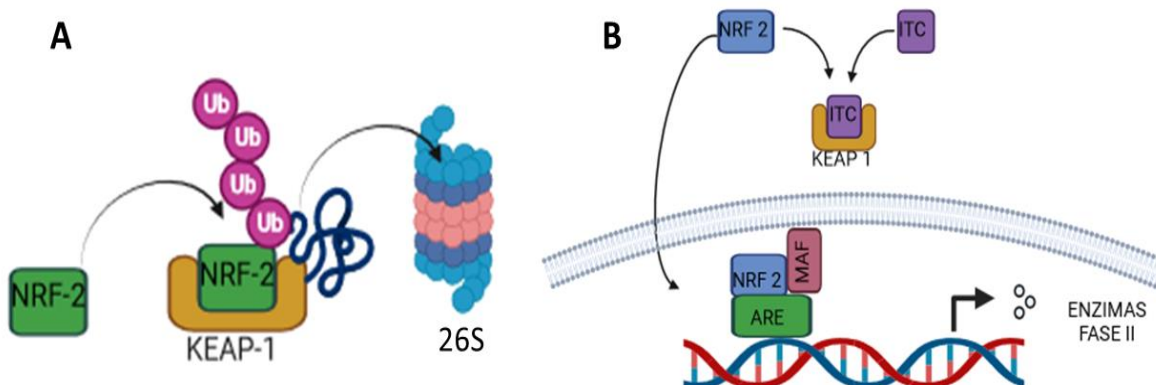


Figura 6. Mecanismo de Acción de los isotiocianatos en la activación de Nrf2. Figura A Cuando la célula no requiere de Nrf2 este es reclutado por la proteína Keap 1 ubiquitinizado y degradado por el proteasoma 26S. Figura B la actividad de los isotiocianatos para inducir enzimas de detoxificación de fase 2 lo hace uniéndose a proteína Keap-1 evitando la degradación de Nrf2 y promoviendo la traslocación a núcleo para la unión de una pequeña proteína MAF y el elemento de respuesta antioxidante para la codificación de enzimas de fase 2.

Otro mecanismo por el cual los isotiocianatos pueden actuar es por medio de los isotiocianatos que se unen al receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) traslocando al núcleo al complejo con AhR para interactuar con el elemento responsable xenobióticos (XRE) en el gen promotor. Paso siguiente recluta coactivadores y factores de transcripción resultando en una transactivación (Safe, 2001) mientras que los ITC activan genes de la vía de los antioxidantes por medio de la vía elemento respuesta antioxidante (ARE).

Algunos ITC pueden inducir enzimas de Fase I, otros pueden inducir solo enzimas de Fase II y otros más pueden inducir ambas (Talalay & Fahey, 2001).

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en el mundo. A partir del 2006, esta enfermedad se ha convertido en la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres en México y en todo el mundo. En parte debido al retraso en el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno. Por lo tanto, además, de explorar la búsqueda de nuevos tratamientos siempre será fundamental implementar medidas e intervenciones que ayuden a la prevención de esta enfermedad, evitando llegar a los procesos inflamatorios y oxidantes del cáncer.

Es necesaria la búsqueda de moléculas que nos ayuden a disminuir el proceso tumorigénico en células de mama que son expuestas ante cancerígenos químicos y al mismo tiempo aclarar las rutas por la cuales se lleva a cabo ese efecto biológico proporcionando información sobre la identificación temprana de biomarcadores que nos puedan ayudar a descubrir una importante intervención para la prevención del cáncer de mama, un dato importante ante la alta incidencia y mortalidad de esta enfermedad así como en otros tipos de cáncer desde los procesos donde se involucra el metabolismo y la oxidación.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo se modifica el proceso de carcinogénesis de células no tumorigénicas MCF-10 A expuestas a Benzo (a) Pireno por el tratamiento con extractos de *Brassica oleracea* var. *Italica* y de la hoja de *Brassica oleracea* var. *Capitata* f. *rubra*?

4. HIPÓTESIS

Por su alto contenido en glucosinolatos los extractos de brotes de *Brassica oleracea var. Italica*, hoja de *Brassica oleracea Var. Capitata f. rubra* retrasan el proceso de carcinogénesis en un modelo de transformación de células de cáncer de mama MCF-10 A expuestas al Benzo (a) Pireno.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los extractos liofilizados de dos especies de *Brassicac*s en un modelo de transformación *in vitro* de células de cáncer de mama MCF-10 A mediado por Benzo (a) pireno.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Estandarizar un modelo *in vitro* de transformación del cáncer de mama mediado por Benzo(a)Pireno.
- 2.- Evaluar los cambios en la proliferación celular, cambios en la actividad metabólica y Especies Reactivas de Oxígeno inducidos por los liofilizados de dos especies de *Brassicac*s en el modelo *in vitro* de transformación y progresión del cáncer de mama.

7. METODOLOGÍA

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. TRANSFORMACIÓN Y CULTIVO CELULAR

Se utilizarán células no tumorigénicas MCF-10A cultivadas en medio Dubelcco DMEM/F12 marca Caisson DFP 18X1LT suplementado con toxina colérica (100 ng/ml), factor de crecimiento epidermal (20 ng/ml), suero de caballo (5%), insulina humana (10 µg/ml), hidrocortisona (0.5 µg/ml), y penicilina estreptomycin al 1 %, mantenidas en un incubador Heracell 150i a 37°C, 5% CO₂. Las células MCF10-A serán tratadas con un cancerígeno Benzo(a)Pireno estándar analítico (48564) de la

marca supelco Sigma Aldrich 100 mg que es resuspendido en 396 μ l de Dimethyl sulfoxide (DMSO) marca Sigma (D8418-100 ml) para tener una concentración [1mM] solución stock. De la solución stock se tomará 2 μ l y lo disolveremos en 999 μ l de medio para tener una concentración final de [2 μ M] con la que serán tratadas las células MCF10-A durante 24 h.

Se sembrarán 100,000 células en cajas de 6 pozos, después de 24 h se pondrá el tratamiento tomando 2 μ l de la solución de trabajo [1mM] y se pondrá en 1 ml de medio y se incubarán a 37°C CO₂ al 5%, pasadas las 24 h con el tratamiento se harán ensayos de proliferación para medir la transformación de no-tumorigénica a tumorigénica.

Las células transformadas se congelan a -80°C en una solución de DMSO más medio en relación 1/10 hasta su nuevo uso.

7.2. OBTENCIÓN DE LOS LIOFILIZADOS.

Las semillas de brotes de brócoli y la col roja se realizaron en cámaras de cultivo controladas del Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables. Departamento de Ciencia y tecnología de Alimentos CEBAS-CSIC, en condiciones de ciclos de luz/oscuridad 16/8 horas, temperatura de 25 y 20 °C y humedad relativa del 60 y 80 % respectivamente, radiación PAR (región del espectro solar) 400 μ mol/m²s mediante tubos fluorescentes y lámparas de haluro metálico (Baenas et al., 2012).

La germinación de los brotes se realizó mediante hidratación y aireación de las semillas durante 24 h en agua con 5g/L de hipoclorito sódico para su activación y desinfección. Se extendieron sobre celulosa 10 g de semillas hidratadas por bandeja de 12 x 7 cm y se trasladaron a la cámara de cultivo controlada, se mantuvieron en oscuridad durante los primeros 3 días y a partir del cuarto día de germinación se expusieron al ciclo de luz/oscuridad hasta el octavo día cuando se recogieron, pesaron, congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a 80°C. Por último, los brotes se liofilizaron y molieron para realizar su extracción (Baenas et al., 2012).

7.2.1. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE GLUCOSINOLATOS

Cada muestra liofilizada contiene (50 mg) se extrajo con una solución metanol: agua (70:30). Las muestras se incubaron a 70°C durante 30 min, para desactivar la enzima mirosinasa. Se centrifugan las muestras, se evapora la solución en un evaporador rotatorio y el residuo se disolvió en agua para el análisis cromatográfico, las muestras se filtraron con una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.45 µm y se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento junto con detección de matriz de diodos y espectrometría de masas en tándem de ionización por electropulverización (HPLC-DAD-MS/MS) mediante el método descrito por Baenas *et al.* Para la efectiva identificación y cuantificación de los glucosinolatos (Baenas et al., 2012).

7.2.2 EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE ISOTIOCIANATOS EN BROTES DE BRÓCOLI

Cada muestra liofilizada de (50 mg) se extrajo con 1.5 ml de H₂O, se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente (25°C), en agitación para conseguir la hidrólisis de los glucosinolatos a isotiocianatos. Se centrifugan las muestras y se filtran con una membrana de PVDF de 45 µm y se analizó mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplado a la espectrometría de masas de triple cuádruplo (UHPLC-QqQ-MS/MS) mediante el método descrito por Domínguez-Perles *et al.* Para la identificación y cuantificación de los isotiocianatos (Domínguez-Perles et al., 2014)

7.3 DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN

Para medir la proliferación de la línea celular MCF10-A tratadas con B[a]P se sembraron placas de 96 pozos con una concentración de 3000 células por pozo, en una solución con B[a]P a concentraciones de 1, 2 y 4 µM, se tomaron fotos cada 4 horas durante 24 h por medio del equipo INCUCYTE®. La herramienta de análisis de procesamiento del equipo permite adaptar los

parámetros de la segmentación de fase a los tipos de células individuales y condiciones experimentales. El analizador básico calcula y proporciona medidas de la confluencia celular en tiempo real permitiendo un análisis y caracterización óptima. El equipo requiere de un software en donde se crea una colección de imágenes, una definición de procesamiento y se especifica el tipo de análisis de trabajo. También se realizaron pruebas con Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a una concentración stock de 5 mg/ml. El ensayo con MTT es una reducción enzimática donde el color amarillo característico de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol que es soluble en agua es reducido a formazán un colorante púrpura insoluble en agua. Esta reacción es catalizada por las deshidrogenasas celulares y ocurre en células vivas. El ensayo se realizó para medir la proliferación cuando las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de brotes de brócoli a concentraciones de 150 µg/ml y de 1 mg/ml y de concentraciones de hoja de col roja a concentraciones de 10 µg/ml y 25 µg/ml.

7.4. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

La citometría de flujo es una tecnología de análisis rápido de células únicas suspendidas en una solución buffer, cada célula es analizada por dispersión de luz visible y uno o múltiples parámetros de fluorescencia de las células a analizar. La dispersión de la luz visible se mide en dos direcciones diferentes, la dirección hacia adelante (FSC: foward scatter) que indica el tamaño relativo de la célula; y a 90° la dispersión lateral (SSC: side scatter) que indica la complejidad interna o granularidad de la célula. La dispersión de la luz es independiente de la fluorescencia, para poder ser evaluada la célula se tiene que preparar con una tinción fluorescente. Para realizar esta prueba se sembraron 100,000 células MCF10-A en placas de 6 pozos se utilizó tinción de Dihidroetidio Invitrogen (D11347, DHE) a una concentración de 10 µM, en presencia del anión superóxido, el DHE se oxida a 2-dihidroietidio el cual se mide con una longitud de onda de excitación y emisión de (480nm y 567nm) respectivamente, en medio de cultivo suplementado durante 15 min a 37°C y 5%

CO₂. El DHE reducido fluoresce en color azul, una vez oxidado a etidio, se intercala en el ADN celular y fluoresce en color rojo, de esta manera es posible detectar los niveles de ERO totales en las células. Después de la incubación las células fueron lavadas dos veces, primero con medio suplementado y luego con PBS 1X por 30 segundos, las células fueron sometidas a tratamiento con tripsina 150 µL para digerir las enzimas de adhesión de las células al plato y centrifugado a 2500 r.p.m el pellet o botón fue resuspendido en una solución de PBS 1X con 3 % de suero bovino fetal y se filtraron con una malla de 100 micras (diámetro del poro) para ser analizados inmediatamente en un BD FACS Canto II Flow Cytometer leyéndose a diferentes voltajes como se muestra en la tabla 5, el canal en el que se leyó fue PerCP-A (excitación 488 nm-Emisión 675 nm valores similares a la excitación - emisión del Dihidroetidio) analizándose mediante el software FlowJo V10.

Línea celular	FSC-A	FSC-H	SSC-A	SSC-H	PerCP-A
MCF10-A	250	250	380	380	500

Tabla 5. Voltajes utilizados para las lecturas de ERO totales en células MCF10-A

7.5. ANÁLISIS DE DATOS EN EL PROGRAMA FlowJo V10.

Se analizaron los datos obtenidos en el citómetro por medio del programa FlowJo V10, donde se ingresan los datos que arroja el citómetro. Como primer paso se seleccionaron los parámetros FSC-A y SSC-A indicando el tamaño y la complejidad de una célula respectivamente (A), el siguiente paso es posicionar los parámetros FSC-A y FSC-H identificando singletes (B), siguiente paso es establecer el umbral en el cual se considera positiva la tinción de DHE (C), siguiente paso es determinar las poblaciones ERO^{high} y ERO^{low} colocando arbitrariamente una ventana donde se selecciona en la imagen control cual será la población que expresa mayor cantidad de ERO considerado como población high generalmente marcado como (90%) y otra ventana donde se encuentra la población que expresa menos ERO considerado como población low marcado como (10%) (D) finalmente, se plasman estos datos en una gráfica de frecuencia relativa (E) Fig 7.

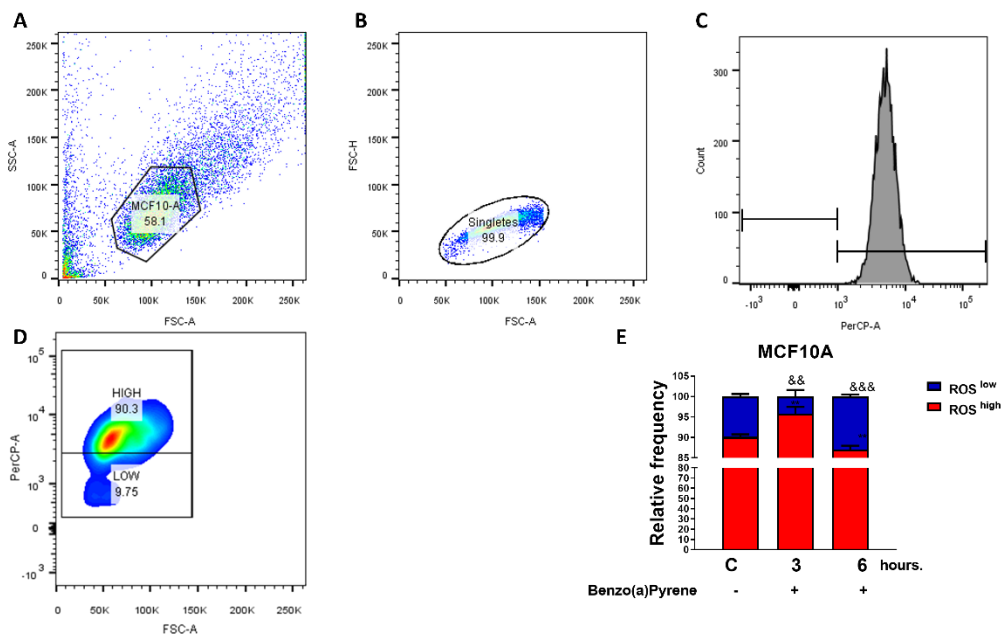


Figura 8. Análisis de datos obtenidos en el citómetro del flujo. Para el análisis de datos se utilizó el programa FlowJo V10, en A se muestra la selección para el tipo de células, en (B) se eligieron los singletes, en (C) se determinó el umbral positivo a la fluorescencia del colorante, en (D) se establecieron las poblaciones de células ERO high y ERO low y se plasmaron los datos en una gráfica de frecuencia relativa (E).

7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó en el software del programa de análisis estadísticos GraphPad Prism versión 5.0.0.288 (GraphPad Software, Inc). Los datos son presentados como media +/- error estándar de la media. Las medias de todos los datos fueron comparadas por el análisis de varianza, ANOVA de dos vías. $P < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativo. Se usó la prueba post-hoc de Dunnett.

8. RESULTADOS

8.1. MODELO DE TRANSFORMACIÓN CELULAR

8.2. MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN CELULAR Y ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Se evaluó un modelo de transformación celular donde células MCF10-A (línea no tumorigénica) son expuestas a diferentes concentraciones de B[a]P en el orden de 1, 2 y 4 μM , para ver los efectos de este carcinógeno en la proliferación celular durante 24 horas, estos resultados fueron analizados por medio del equipo INCUCYTE® que nos permite la visualización y cuantificación del comportamiento celular a lo largo del tiempo analizando imágenes. El resultado obtenido deriva de una $N=5$ se hizo el análisis de imágenes por medio de un software del equipo INCUCYTE® creando una colección de fotos, una definición y un procesamiento adecuado.

Los datos evaluados indican que el B(a)P tiene la capacidad de incrementar la proliferación de las células MCF-10 A en un lapso de 24 horas. En la figura 9 se compara el control con el vehículo dimetil sulfoxido (DMSO) utilizado para disolver el B[a]P y se observó que no existe diferencia significativa entre estos, pero cuando se comparan con los tratamientos, hay un incremento en la proliferación a las concentraciones de 1, 2 y 4 μM . Los resultados son obtenidos de una $n=5$ y

analizados con una anova de dos vías en el GraphPad Prism la barras presentadas con media +/- error estándar con una $p < 0.05$. La comparación entre los tratamientos con el control se realizó por medio de comparaciones múltiples prueba de Dunnet.

Efecto del B(a)P en la proliferación celular

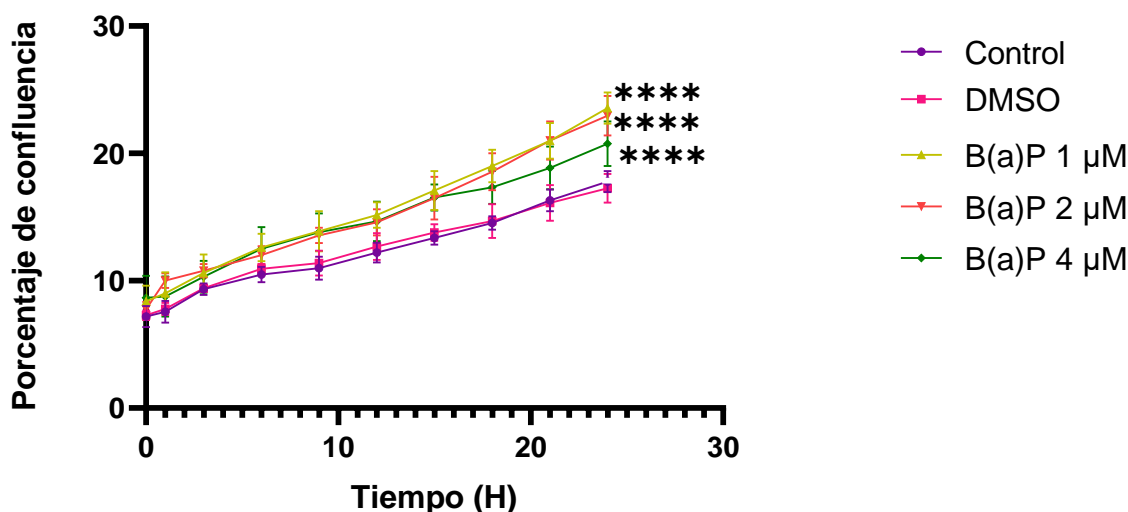


Fig.9 Efecto del B[a]P para inducir la proliferación en células no tumorigénicas MCF10-A Se trataron las células MCF10-A con tres diferentes concentraciones de B[a]P al orden de 1, 2 y 4 μM por un tiempo de 24 h, se analizaron en INCUCYTE® y se hicieron análisis de imágenes para poder graficar % de confluencia vs el tiempo de exposición de B[a]P, se normalizaron los resultados a 1, se observa un incremento en la proliferación de las células tratadas con las diferentes concentraciones de B[a]P con relación al control, se analizaron estadísticamente ($n=5$) por medio de una anova de 2 vías con un valor de $P < 0.001$ en comparación entre los tratamientos con el control.

Se realizó un experimento para observar el comportamiento del efecto del B[a]P sobre las células MCF10-A a sus diferentes concentraciones de la orden de 1, 2 y 4 μM a diferentes horas intermedias dentro de 24 h analizando datos a las 3, 6, 9 y 24 h, los resultados muestran que mientras el tiempo de exposición al cancerígeno es más prolongado, la proliferación va en aumento y el valor obtenido es estadísticamente significativo en comparación con sus controles. Fig 10. Pudiendo observar que la proliferación a las 3 y 6 h aunque se nota una tendencia a la alta de las

barras del tratamiento vs control no es estadísticamente significativa caso contrario a las 9 y 24 h acá se puede observar que mientras más es el tiempo de exposición la proliferación aumenta significativamente con relación a su control.

Efecto del B(a)P sobre la proliferación a diferentes tiempos

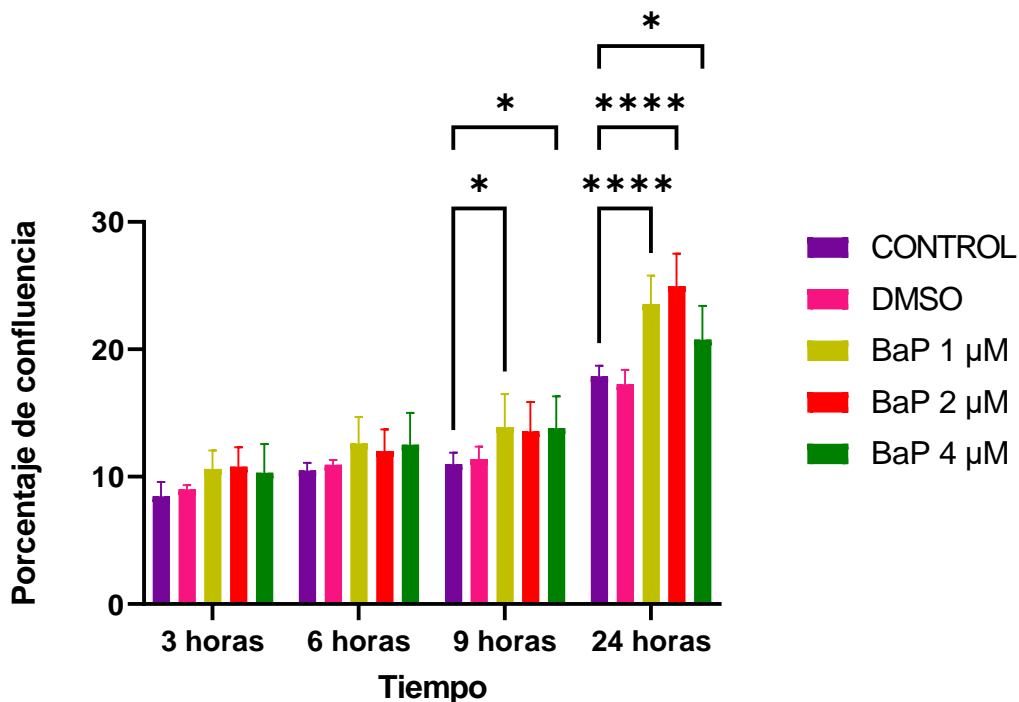


Fig 10. – Comportamiento del efecto del B[a]P sobre las células MCF10-A a las 3, 6, 9 y 24 h después de su exposición. Se sembraron células en placas de 96 pozos para probar el comportamiento del B[a]P a diferentes concentraciones de 1, 2, 4 μM a las 3, 6, 9 y 24 h después de su exposición observando que a las 3 y 6 horas aunque se observa una tendencia a la alta de los tratamientos vs control no es estadísticamente significativo, por otro lado a las 9 hay una diferencia significativa con una $p < 0.05$ con respecto al control, mientras que a las 24 h hay un cambio en la proliferación de las células MCF10-A tratadas con las diferentes concentraciones de B[a]P lo cual es estadísticamente significativo, con una $p < 0.001$ para la concentración de 1 y 2 μM con respecto al control y de una $p < 0.05$ para la concentración de 4 μM, para esta prueba se analizó una $n=5$ y el análisis se hizo mediante una prueba de anova de 2 vías y una comparación múltiple con la prueba de Dunnet.

8.3. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA TRANSFORMACIÓN CELULAR MEDIADA POR BENZO(A)PIRENO

Para la determinación de las ERO, se utilizó la citometría de flujo donde las células MCF10-A (100000) fueron tratadas con diferentes concentraciones de B[a]P en el orden de 1, 2 y 4 μM y se tiñeron con DHE a diferentes horas 3, 6 y 9 horas, los resultados se analizaron por medio del citómetro de flujo BD FACS canto II (detectando anión superóxido) comparando el tiempo contra el porcentaje de fluorescencia Fig. 3. Para analizar los resultados se siguió protocolo de metodología Figura 8.

En los resultados obtenidos se observa un incremento en las ERO en las células MCF10-A que fueron tratadas a diferentes concentraciones a la orden de 2 y 4 μM mientras que a 1 μM no hubo incremento de la ERO, otro dato importante que se observó es que la elevación de las ERO se observa a las primeras horas de la exposición siendo la más intensa a las 3 h puesto que a las 6 h de la exposición empiezan a disminuir la población de células que expresan ERO y a las 9 horas este incremento se ve disminuido casi en su totalidad en relación con su control, esto con la finalidad de elegir la concentración con la que se va a trabajar aquella concentración en la que se incremente la proliferación y ERO Figura 11. Se eligió trabajar con la concentración de 2 μM que es la concentración a la cual se incrementa la proliferación y las ERO dos de las vías con las que se inicia la carcinogénesis. Para corroborar que efectivamente el resultado se comportaba de la misma manera se hicieron experimentos por triplicado Figura 12 y Figura 13.

Comparación de la producción de ERO a diferentes concentraciones de B(a)P

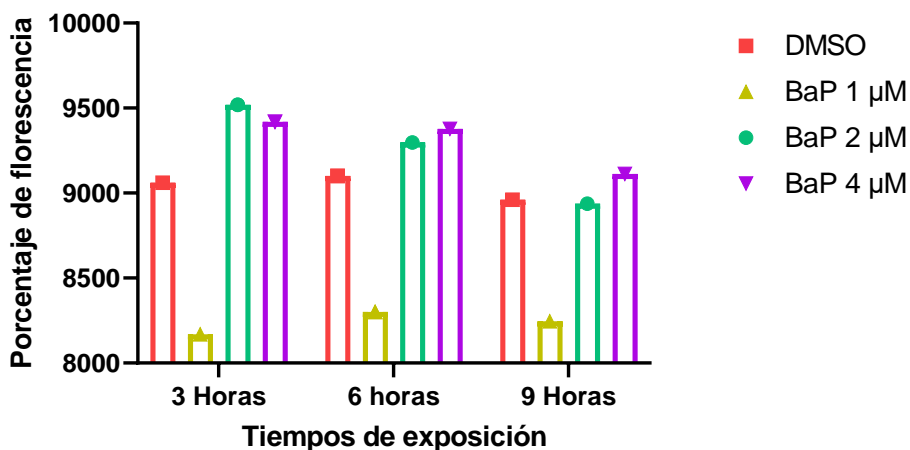


Fig 11.- Producción de ERO mediadas por diferentes concentraciones de B[a]P en células MCF10-A. Se sembraron 100,000 células en placas de 6 pozos, se trataron con diferentes concentraciones de B[a]P a la orden de 1,2 y 4 μ M durante 3, 6 y 9 h, se tiñeron con DHE, se analizaron por citometría de flujo en citómetro de flujo BD FACS canto II, los resultados se graficaron comparando la intensidad media de fluorescencia vs tiempo de exposición, en los resultados podemos observar que hay un incremento en las ERO a las 3 horas, parece mantenerse a las 6 h pero a las 9 horas empieza a disminuir, este estudio se realizó para elegir la concentración de B[a]P con la que se va a trabajar aquella concentración en la que se incremente la proliferación y las ERO. Con estos datos determinamos trabajar con la concentración de 2 μ M (n=1).

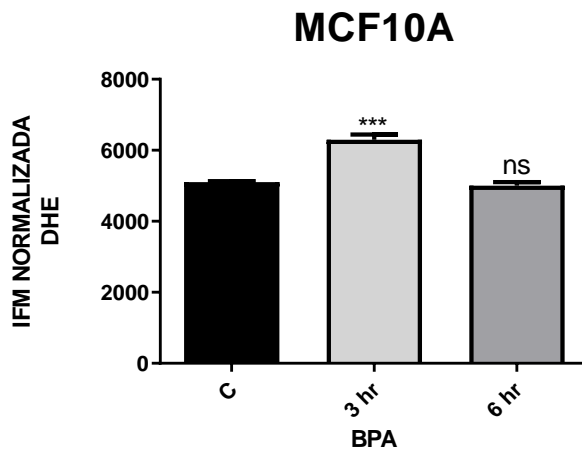


Fig. 12 Intensidad media de fluorescencia de B[a]P 2 μ M. Una vez elegida la concentración de B[a]P con la cual se va a trabajar se realizaron ensayos n=3 donde se observó que la producción de ERO es estadísticamente significativo con una $p < 0.01$ en comparación con su control especialmente a las 3 horas que es el tiempo donde se vio anteriormente el incremento máximo de ERO figura 11.

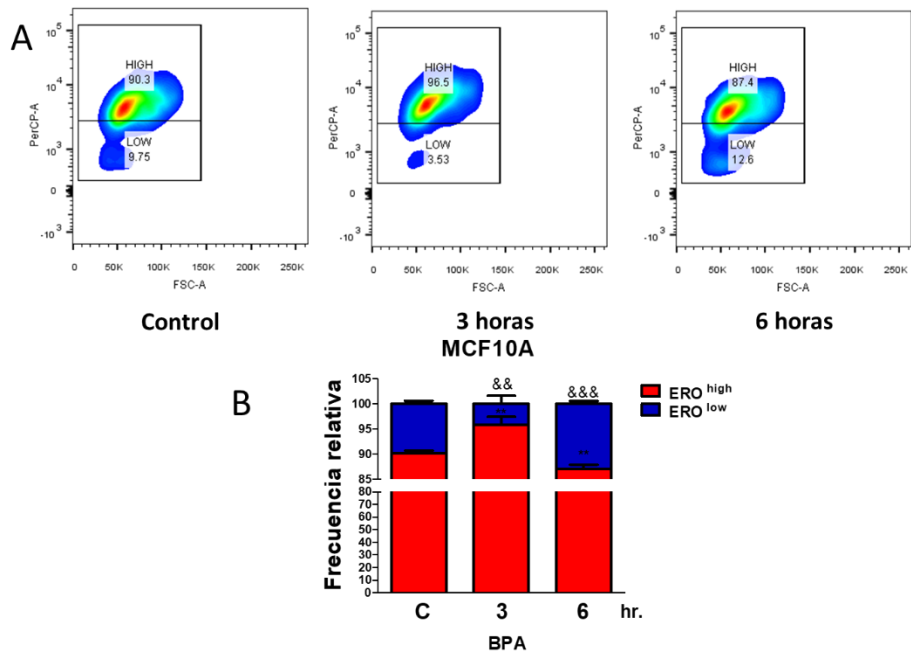


Fig. 13. – Comparación de las poblaciones de células que expresan ERO^{Alta} y células que expresan ERO^{Baja} a dos horas diferentes de las células MCF10-A tratadas con B[a]P 2 μM. Se analizaron los citogramas para delimitar la población de células que presentan ERO^{Alta} y las ERO^{Baja} se tomó un control y tratamientos a 3 y 6 donde se expusieron las células a B[a]P 2μM, observando un aumento significativo de $p < 0.01$ en la población que expresa ERO^{Alta} y una disminución significativa de $p < 0.01$ en la población que expresa ERO^{Baja} a las 3 horas con respecto al control, también se observó que a las 6 h no hubo incremento significativo en la ERO^{Alta} con respecto a lo observado a las 3 h con una $p < 0.01$ más sin embargo hubo un incremento en la población que expresa ERO^{Baja} con una $p < 0.001$ con respecto al control se realizó una $n=3$, se realizó un análisis estadístico de anova de dos vías.

8.4. COMPARACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS MCF10-A TRATADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE B[a]P

Se realizó un análisis de imágenes tomando imágenes representativas de las células MCF10-A que fueron tratadas con B[a]P 1,2 y 4 μ M y su control, a 24 y 48 h donde podemos observar que la morfología celular es alterada en la forma y la estructura. Estos cambios incluyen deformación de la membrana y elongación celular. Para este estudio se sembraron 3000 células por pozo en placa de 96 pozos se trataron con concentraciones de 1,2 y 4 μ M para posteriormente ser analizadas en el equipo INCUCYTE® el equipo se programó para tomar fotos cada 4 horas durante 48 horas el ensayo se realizó por triplicado, se tomaron las fotografías representativas de cada condición al tiempo 0 a las 24 y 48 h.

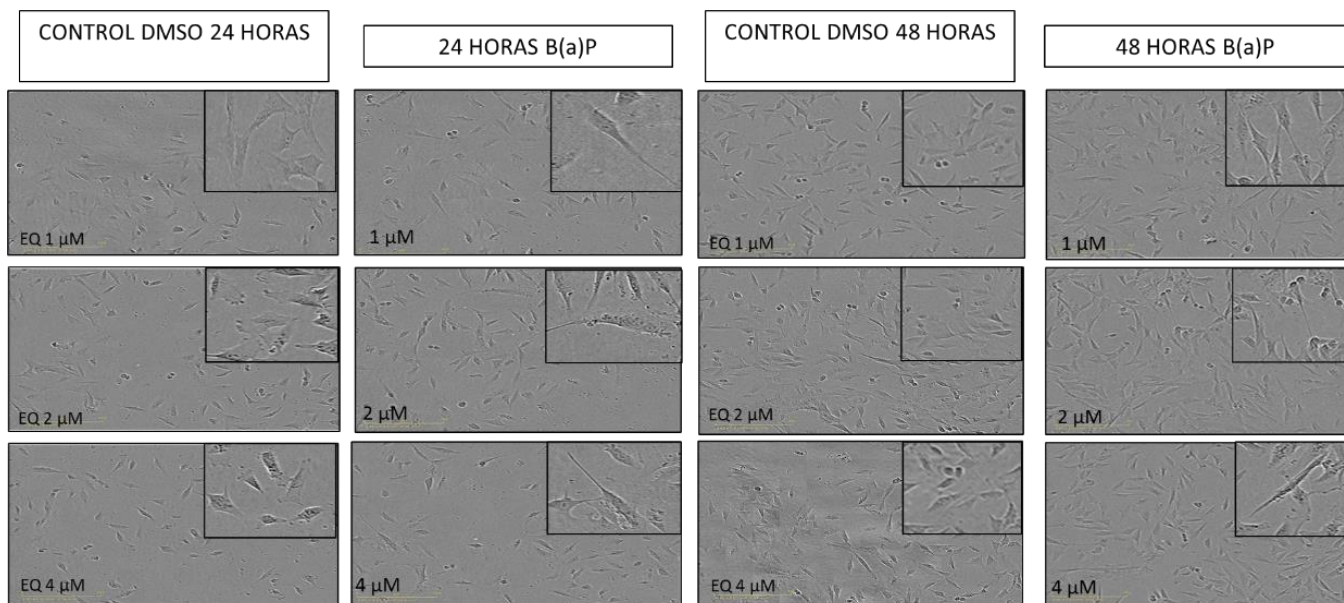


Fig. 14.- Análisis morfológico de las células MCF10-A tratadas con concentraciones de B(a)P 1, 2, 4 μ M. Estudio realizado en células MCF10-A tratadas con concentraciones de 1, 2 y 4 μ M y analizadas con INCUCYTE® programando equipo para tomar fotografías durante 48 h en intervalos de 4 h se toman las fotos representativas de cada tratamiento más el control y se compara su morfología.

8.5. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON BRASSICAS SOBRE LA TRANSFORMACIÓN

MEDIADA POR B[a]P

Se utilizaron células MCF10-A las cuales fueron tratadas con dos concentraciones de brotes de brócoli 150 µg/ml y 1 mg/ml y dos concentraciones de la hoja de la col roja 10 µg/ml y 25 µg/ml, fueron analizadas con el equipo INCUCYTE® Fig. 15 A para medir proliferación se eligieron estas concentraciones porque en estudios realizados por el grupo de trabajo se encontró que a estas concentraciones no eran tóxicas para las células y por lo tanto no influían en la proliferación. Se realizó una prueba de con Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) como prueba alternativa de proliferación, los datos arrojados no indican que no hubo cambios significativos en la proliferación de las células tratadas con los extractos Fig 15 B. Una vez comprobado que los extractos no tenían efectos sobre la proliferación se realizó otro estudio ahora tratando las células MCF10-A con los extractos más B[a]P 2 µM quedando la siembra de la siguiente forma un grupo control que no fue tratado con nada, un grupo que fue tratado con B[a]P 2 µM, un grupo que fue tratado con concentraciones de brotes de brócoli 150 µg/ml + B[a]P 2µM y 1 mg/ml + B[a]P 2 µM, y concentraciones de hoja de col roja 10 µg/ml + B[a]P 2µM y 25 µg/ml + B[a]P 2µM y se midieron por medio del equipo INCUCYTE® Fig 15 C y por medio de ensayo MTT Fig 15 D.

Como se había demostrado en el modelo de transformación celular el B[a]P 2µM incrementa la proliferación de las células MCF10-A Fig. 11,12 y 13, también se observó que los extractos no tenían efecto sobre la proliferación en las células Fig. 15 A, B, al ser expuestos los extractos con el B[a]P los extractos tuvieron la capacidad de inhibir el efecto sobre a proliferación del B[a]P Fig. 15 C, D.

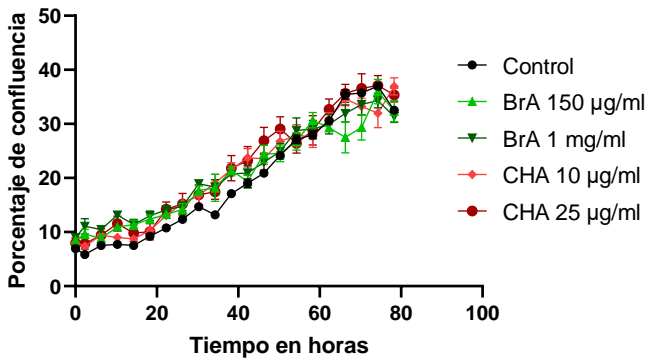
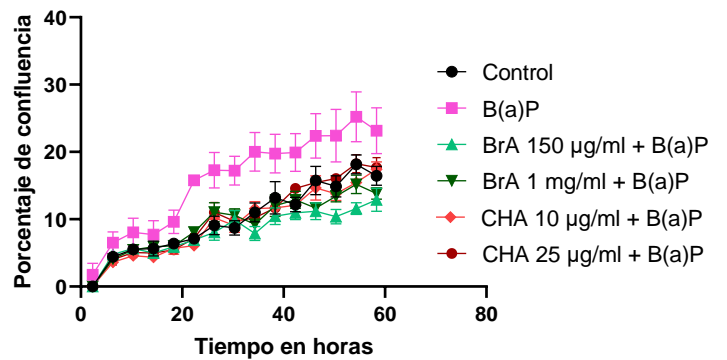
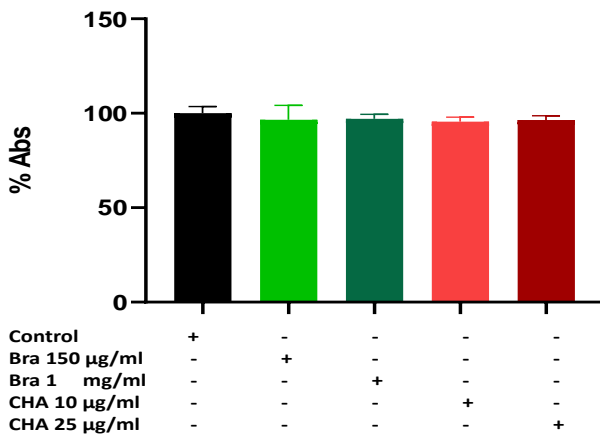
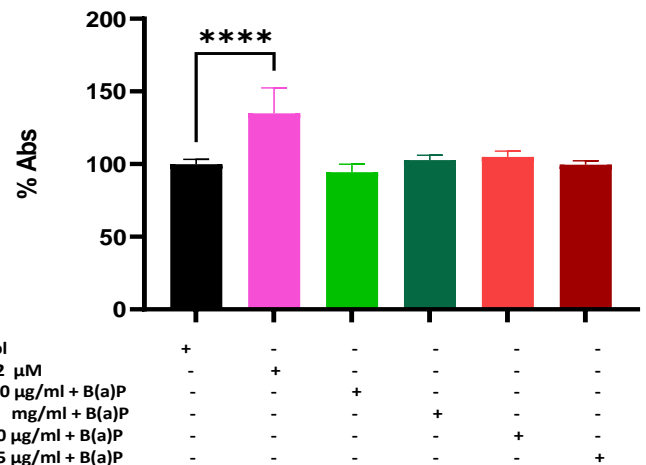
A**Tratamientos con Brassicas sin B(a)P****B****Tratamiento con Brassicas y B(a)P****C****Tratamientos con Brassicas sin B(a)P****D****Tratamientos con Brassicas y B(a)P**

Fig 15.- Efecto de las Brassicas sobre la proliferación celular mediada por B(a)P. Se sembraron células MCF10-A en placa de 96 pozos y fueron tratadas con diferentes concentraciones de extractos de brotes de brócoli y col lombarda para probar el efecto de los extractos sobre la proliferación de las células MCF10-A, en la gráfica A podemos observar que las diferentes concentraciones de las Brassicas no interfieren en la proliferación de las células MCF10-A, en la gráfica B además de los tratamientos con las Brassicas se agregó el tratamiento con B[a]P 2 µM y se observó que mientras el B[a]P 2 µM incrementa la proliferación los extractos de las Brassicas parecen inhibir el efecto sobre la proliferación del B[a]P n=1 medido mediante el equipo INCUCYTE, en las gráficas C y D es la comprobación de A y B mediante el método de MTT donde se observa el mismo comportamiento que los resultados obtenidos mediante INCUCYTE n=3 grafica D hay una diferencia significativa con $p < 0.0001$ obtenido mediante una anova de dos vías con una comparación multiple de Dunnet.

8.6 EFECTO DE LOS EXTRACTOS BRÓCOLI SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES

REACTIVAS DE OXÍGENO

Para medir el efecto de los extractos de brócoli y col roja sobre la producción de especies reactivas de oxígeno se sembraron en placas de 6 pozos 100,000 células un pozo sirvió como control de autofluorescencia , otro pozo sirvió como control de tinción de DHE, y en los pozos restantes se pusieron los tratamientos con B[a]P 2 μ M y con tratamientos de extracto de brócoli 150 μ g/ml + B[a]P 2 μ M y de 1 mg/ml + B[a]P 2 μ M, y se midió la producción de ERO mediante la citometría de flujo, los resultados muestran que las células control a tinción de DHE hay una población de células que expresan ERO^{High} representada por el 90 % de la frecuencia relativa y una población que expresa ERO^{Low} representada por el 10 % de la frecuencia relativa, en la barra de tratamiento de B[a]P 2 μ M hay un desplazamiento hacia la población de células que generan ERO^{High} y disminución en las ERO^{Low} esto nos indica que el B[a]P induce la producción de ERO, al ser tratadas con las diferentes concentraciones de extracto de brócoli hubo una disminución del efecto que produce la interacción del B[a]P con las células Fig 16.

En el caso de la col roja también se trataron las células con concentraciones de 10 μ g/ml + B[a]P 2 μ M y de 25 μ g/ ml + B[a]P 2 μ M y la concentración de 2 μ M de B[a]P, a comparación del brócoli, solo la concentración de 10 μ g/ml tuvo un efecto reductor en producción de ERO mediada por el B[a]P, pues la concentración de 25 μ g/ ml parece incrementar también las ERO Fig 17.

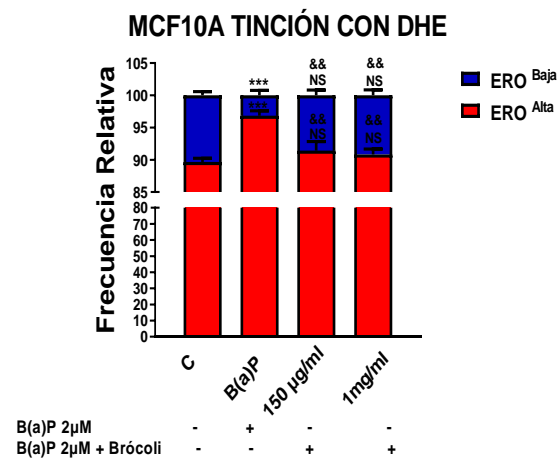
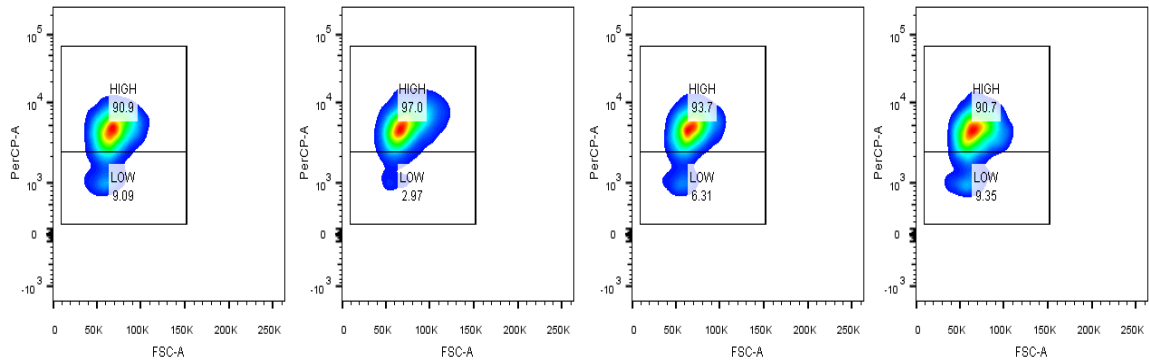


Fig. 16.- Efecto de los extractos de brotes de Brócoli sobre la producción de ERO mediadas por B[a]P. La representación gráfica es de un cultivo de células MCF10-A que fueron tratadas con B[a]P a concentración de 2 µM y además fueron tratadas con extractos de brócoli a diferentes concentraciones 150 µg/ml y 1 mg/ml se tiñeron con DHE y se leyeron por medio de citometría de flujo. Se tomaron células sin tratamiento teñidas con DHE para medir las ERO basales, células tratadas con 2µM de B[a]P donde se observa un incremento en la población de células que expresan ERO^{Alta}, el cual es significativo $p < 0.001$. Las células tratadas con B[a]P 2µM + extracto de brotes de brócoli a una concentración de 150 µg/ml presentan una diferencia significativa en la disminución de la población de células que expresan ERO^{Alta} $p < 0.01$ con respecto a las células tratadas con B[a]P 2 µM, pero no hay diferencia significativa con respecto al control, las células tratadas con la concentración de 1 mg/ml tiene un comportamiento similar al tratamiento de 150 µg/ml con una diferencia significativa $p < 0.01$ con respecto a las células tratadas con B[a]P 2µM y sin diferencia significativa con respecto al control se realizó análisis estadístico de 2 vías y comparación múltiple de Dunnett.

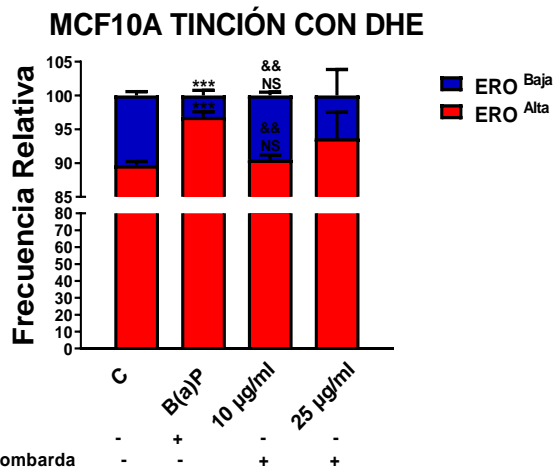
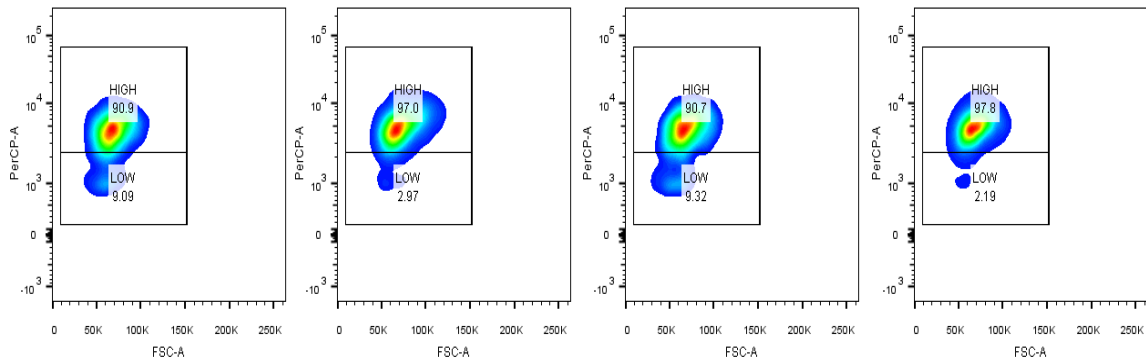


Fig 17 .- Efecto de los extractos de la hoja de col lombarda sobre la producción de ERO mediadas por B[a]P. Esta representación grafica es de células MCF10-A las cuales fueron tratadas con B[a]P 2 µM y con diferentes concentraciones de extracto de hoja de col lombarda + B[a]P 2 µM que fueron teñidas con DHE y leídas en el citómetro de flujo. Se utilizaron células control teñidas con DHE para medir las ERO basales, en otro punto se trataron las células con B[a]P 2µM observando un incremento significativo con respecto al control $p < 0.001$ en la población de células que expresan ERO^{Alta} y en los siguientes puntos se trataron las células con concentraciones de 10 y 25 µg/ml de extracto de hoja de col lombarda + B[a]P 2µM observando que a la concentración de 10 µg/ml no hay una diferencia significativa en la población de células que expresan ERO^{Alta} con respecto al control, pero si hay una diferencia significativa a la baja en la población que expresa ERO^{Alta} con respecto al tratamiento con B[a]P 2µM $p < 0.001$ mientras que a la concentración de 25 µg/ml el incremento en la población de células que expresan ERO^{Alta} no es significativo con respecto al B[a]P y tampoco es significativo con respecto al control la $n=3$ se utilizó un análisis estadístico de anova de dos vías y comparación múltiple de Dunnet.

9. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es el cáncer con mayor prevalencia en el mundo (Ferlay et al., 2021). La capacidad de un agente de producir una neoplasia se denomina carcinogénesis. En el proceso de transformación progresiva de las células normales en células malignas, se produce la adquisición de autonomía por las mismas. Este proceso puede ser resultado de eventos endógenos como el ataque de radicales libres generados durante el metabolismo celular o eventos exógenos como los carcinógenos químicos, las fases de la carcinogénesis son tres: iniciación, promoción y progresión.

El proceso de iniciación es la alteración de una célula a nivel del genoma de esta e implica tres procesos fundamentales metabolismo, reparación del ADN y proliferación celular. La alteración de uno de estos tres procesos puede dar lugar a la carcinogénesis. Un modelo utilizado es la transformación celular mediada por un carcinógeno como el B[a]P, en el modelo presentado por (Nkrumah-Elie et al., 2012) por otro lado (Siriwardhana & Wang, 2007) concluye que una simple exposición de las células MCF10-A ante el B[a]P resulta en la adquisición de propiedades cancerosas y mutaciones espontaneas. Las concentraciones de B[a]P ocupadas fueron 1 ,2 y 4 μ M las que incrementan la proliferación, nuestros datos son similares pues hay un incremento en la proliferación dependiente de las concentraciones Fig 9 y 10.

Se ha reportado que el B[a]P incrementa la proliferación celular y genera especies reactivas de oxígeno (Burdick et al., 2003) de acuerdo con lo reportado en las Fig 9 y 10 para proliferación y las figuras 11,12 y 13 las especies reactivas de oxígeno se ven incrementadas por la exposición al cancerígeno. La morfología también se ve afectada por la exposición al B[a]P según lo reportado por (Caruso et al., 2001) por inhibición de contacto, las células se superponen y se apilan y forman focos mostrando una morfología en forma de huso formando una orientación entrecruzada a alta

densidad, lo mostrado por nuestras imágenes también exponen la inhibición de contacto y la forma de huso entrecruzándose unas con otras en la Fig. 14 mientras el tiempo de exposición avanza.

Los isotiocianatos son derivados de la hidrólisis de los glucosinolatos compuestos sulfurados encontrados en las verduras crucíferas, no hay mucha evidencia que diga que consumir verduras crucíferas decrete el riesgo a contraer cáncer.

Lo que si se ha encontrado es que los isotiocianatos modulan la actividad de las enzimas de biotransformación de Fase I especialmente el citocromo P450, por otro lado inducen la producción de enzimas de fase II lo que podría explicar que al tratar las células con B[a]P y los extractos bloqueen el efecto del metabolismo del B[a]P por enzimas de fase I e incrementen la producción de enzimas de fase II para detoxificarlo Fig 15, 16 y 17. El B(a)P se ha estudiado ampliamente debido a sus efectos carcinogénicos y su capacidad para aumentar la proliferación celular, puede inducir la expresión de enzimas y factores de transcripción que promueven la proliferación celular, una de las posibles explicaciones por medio de las cuales el B(a)P incrementa la proliferación en células MCF-10 A es por medio de la activación del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) que puede desencadenar la expresión de genes involucrados en la proliferación celular. Otro mecanismo por el que puede promover la proliferación es generando ERO y causando estrés oxidativo. El B(a)P puede producir especies reactivas de oxígeno a través del estrés oxidativo, el B(a)P puede ser metabolizado por enzimas de fase 1 para formar metabolitos reactivos como los epóxidos capaces de reaccionar con biomoléculas presentes en la célula, generando ERO como el superóxido (O_2^-) el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-), desencadenando así una cascada de eventos perjudiciales en las células MCF-10 A pudiendo dañar al DNA directamente llevándolo a mutaciones y alteraciones genéticas.

10. CONCLUSIONES

1.- El B[a]P es capaz de incrementar la proliferación en una línea celular proveniente de una glándula mamaria con enfermedad fibroquística.

2.-Por otro lado, el B[a]P también es capaz de incrementar los niveles de ERO en las células MCF10-A, más sin embargo de acuerdo con los resultados obtenidos nos indican que la proliferación no es dependiente de la producción de ERO pues a la concentración de 1 μ M incrementa la proliferación, pero no las ERO.

3.- Las ERO son elevadas a las 3 h pero a las 6 h disminuyen, probablemente por el mecanismo de detoxificación en buen estado que la célula tiene, en futuros experimentos se demostraría si el mecanismo de detoxificación es capaz de disminuir los valores a tiempos mas prolongados de exposición del carcinógeno.

4.- Los extractos de los brotes de brócoli a las concentraciones utilizadas en este experimento son capaces de inhibir el efecto del B[a]P al no incrementar la proliferación ante la exposición del carcinógeno sería de suma importancia poder aislar los componentes de los extractos para ver si la disminución se debe a solo un metabolito o existe una sinergia entre varios componentes.

5.- Nuestros resultados demuestran que la hoja de la col roja a la concentración de 10 μ g/ml es capaz de inhibir los efectos que produce la exposición al carcinógeno tanto en proliferación como en producción de ERO, sin embargo, a la concentración de 25 μ g/ml solo es capaz de revertir el incremento de la proliferación, pero no en las ERO significativamente, también sería necesario aislar los componentes para ver si alguno de ellos podría incrementar las ERO en lugar de disminuirlas.

11. Referencias

- Ades, F., Zardavas, D., Božović-Spasojević, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., De Azambuja, E., Viale, G., Sotiriou, C., & Piccart, M. (2014). Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. *Journal Of Clinical Oncology*, *32*(25), 2794-2803. <https://doi.org/10.1200/jco.2013.54.1870>
- Afshin, A., Sur, P. J., Fay, K., Cornaby, L., Ferrara, G., Salama, J., Mullany, E. C., Abate, K. H., Abbafati, C., Zegeye, A., Afarideh, M., Aggarwal, A., Agrawal, S., Akinyemiju, T., Alahdab, F., Bacha, U., Bachman, V. F., Badali, H., Badawi, A., . . . Roth, G. A. (2019). Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, *393*(10184), 1958-1972. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)30041-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)30041-8)
- Ba, Q., Li, J., Huang, C., Qiu, H., Li, J., Chu, R., Zhang, W., Xie, D., Wu, Y., & Wang, H. (2015). Effects of Benzo[a]pyrene Exposure on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Angiogenesis, Metastasis, and NF- κ B Signaling. *Environmental Health Perspectives*, *123*(3), 246-254. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408524>
- Baenas, N., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2012). Selecting Sprouts of Brassicaceae for Optimum Phytochemical Composition. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, *60*(45), 11409-11420. <https://doi.org/10.1021/jf302863c>
- Baínes, A. D., Xu, D., & Der, C. J. (2011). Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Medicinal Chemistry*, *3*(14), 1787-1808. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.121>
- Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelifa, A., Zhu, Z., & Koubàa, M. (2016). Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Frontiers In Nutrition*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00024>
- Belden, S. E., & Flaherty, K. T. (2012). MEK and RAF inhibitors for BRAF-mutated cancers. *Expert Reviews In Molecular Medicine*, *14*. <https://doi.org/10.1017/erm.2012.11>
- Björkman, M., Klingen, I., Birch, A. N., Bones, A. M., Bruce, T. J. A., Johansen, T. J., Meadow, R., Mølmann, J., Seljåsen, R., Smart, L. E., & Stewart, D. (2011). Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health – Influences of climate, environment and agronomic practice. *Phytochemistry*, *72*(7), 538-556. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.014>
- Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C. E., Burow, M., Rollin, P., & Agerbirk, N. (2020). Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry*, *169*, 112100. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112100>
- Block, G., Patterson, B. H., & Subar, A. F. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition And Cancer*, *18*(1), 1-29. <https://doi.org/10.1080/01635589209514201>
- Burdick, A. D., Davis, J. W., Liu, K. J., Hudson, L. G., Shi, H., Monske, M. L., & Burchiel, S. W. (2003). Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *PubMed*, *63*(22), 7825-7833. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14633709>

Cancer today. (s. f.). <https://gco.iarc.fr/today/en>

Carmona, W. R. (2019). *Modifiable risk factors in patients with breast cancer*. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=87739>

Caruso, J. A., Reiners, J. J., Émond, J., Shultz, T., Tainsky, M. A., Alaoui-Jamali, M. A., & Batist, G. (2001). Genetic alteration of chromosome 8 is a common feature of human mammary epithelial cell lines transformed in vitro with benzo[a]pyrene. *Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 473(1), 85-99. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00140-8](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00140-8)

Castañeda-Ortega, J. C., Hernández-Castellanos, B., & Cocotle-Romero, L. (2023b). EL BENZO(A)PIRENO UN GENOTÓXICO DE IMPORTANCIA EN LA SALUD AMBIENTAL y HUMANA. En *Segurança alimentar e nutricional* 4 (pp. 187-196). <https://doi.org/10.22533/at.ed.31423140416>

Cherry, C., Thompson, B., Saptarshi, N., Wu, J., & Hoh, J. (2016). 2016: A 'Mitochondria' Odyssey. *Trends In Molecular Medicine*, 22(5), 391-403. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.03.009>

Cheung, E. C., & Vousden, K. H. (2022). The role of ROS in tumour development and progression. *Nature Reviews Cancer*, 22(5), 280-297. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00435-0>

Cohen, S. Y., Stoll, C., Anandarajah, A., Doering, M., & Colditz, G. A. (2023). Modifiable risk factors in women at high risk of breast cancer: a systematic review. *Breast Cancer Research*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-023-01636-1>

Conaway, C. C., Ding, J., Kohri, T., Liebes, L. L., & Chung, F. (1999). Disposition and pharmacokinetics of phenethyl isothiocyanate and 6-phenylhexyl isothiocyanate in F344 rats. *PubMed*, 27(1), 13-20. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9884304>

De Célis, R., Morgan, G., Bravo, A., & Feria, A. (2006). Cáncer de mama y exposición a hidrocarburos aromáticos. *Revista Electrónica y Tecnológica e-Gnosis*, 4(4), 0. <https://www.redalyc.org/pdf/730/73000402.pdf>

De Civetta, M. T. M., & Civetta, J. D. (2011). Carcinogénesis. *Salud Publica de Mexico*, 53(5), 405-414. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342011000500008>

Domínguez-Perles, R., Medina, S., Moreno, D. A., García-Viguera, C., Ferreres, F., & Gil-Izquierdo, Á. (2014). A new ultra-rapid UHPLC/MS/MS method for assessing glucoraphanin and sulforaphane bioavailability in human urine. *Food Chemistry*, 143, 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.116>

Dutta, K., Ghosh, D., Nazmi, A., Kumawat, K. L., & Basu, A. (2010). A Common Carcinogen Benzo[a]pyrene Causes Neuronal Death in Mouse via Microglial Activation. *PLOS ONE*, 5(4), e9984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009984>

Eala, M. A. B., Robredo, J. P. G., Dee, E. C., Lin, V., & Lagmay, A. M. F. (2022). Climate crisis and cancer: perspectives from the hardest hit. *The Lancet Oncology*, 23(3), e92. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(21\)00595-7](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(21)00595-7)

Eroles, P., Bosch, A., Fidalgo, J. A. P., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 698-707. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>

Fahey, J. W., Zhang, Y., & Talalay, P. (1997). Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 94(19), 10367-10372. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.19.10367>

Faria, S. S., Costantini, S., De Lima, V. C. C., Andrade, V. P., Rialland, M., Rébé, C., Budillon, A., & Magalhães, K. G. (2021). NLRP3 inflammasome-mediated cytokine production and pyroptosis cell death in breast cancer. *Journal Of Biomedical Science*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-021-00724-8>

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal Of Cancer*, 149(4), 778-789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>

García, A. E. Z., Izquierdo, M. E., & Expósito, M. I. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 23(1), 51-57. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002004000100008

Guo, J., Xu, Y., Ji, W., Song, L., Dai, C., & Zhan, L. (2015). Effects of exposure to benzo[a]pyrene on metastasis of breast cancer are mediated through ROS-ERK-MMP9 axis signaling. *Toxicology Letters*, 234(3), 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.02.016>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hartwell, L. H., & Kastan, M. B. (1994). Cell Cycle Control and Cancer. *Science*, 266(5192), 1821-1828. <https://doi.org/10.1126/science.7997877>

Hayes, J. D., Kelleher, M. O., & Eggleston, I. M. (2008). The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal Of Nutrition*, 47(S2), 73-88. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-2009-8>

Hecht, S. S. (2000). INHIBITION OF CARCINOGENESIS BY ISOTHIOCYANATES*. *Drug Metabolism Reviews*, 32(3-4), 395-411. <https://doi.org/10.1081/dmr-100102342>

Higdon, J., Delage, B., Williams, D. E., & Dashwood, R. H. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research*, 55(3), 224-236. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.009>

IARC Publications Website - IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. (s. f.). <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans>

- Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical-definition and introduction. *Aaps Pharmsci*, 5(3), 27-28. <https://doi.org/10.1208/ps050325>
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(13), 3328. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Kissen, R., Rossiter, J. T., & Bones, A. M. (2008). The 'mustard oil bomb': not so easy to assemble?! Localization, expression and distribution of the components of the myrosinase enzyme system. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 69-86. <https://doi.org/10.1007/s11101-008-9109-1>
- Korsh, J., Shen, A. E., Aliano, K., & Davenport, T. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Breast Cancer: A Review of the Literature. *Breast Care*, 10(5), 316-318. <https://doi.org/10.1159/000436956>
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E., & Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal Of Medicine*, 113(9), 71-88. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(01\)00995-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(01)00995-0)
- Langouët, S., Furge, L. L., Kerriguy, N., Nakamura, K., Guillouzo, A., & Fp, G. (2000). Inhibition of Human Cytochrome P450 Enzymes by 1,2-Dithiole-3-thione, Oltipraz and Its Derivatives, and Sulforaphane. *Chemical Research In Toxicology*, 13(4), 245-252. <https://doi.org/10.1021/tx990189w>
- Lanning, N. J., Castle, J., Singh, S., Leon, A. N., Tovar, E. A., Sanghera, A., MacKeigan, J. P., Filipp, F. V., & Graveel, C. R. (2017). Metabolic profiling of triple-negative breast cancer cells reveals metabolic vulnerabilities. *Cancer And Metabolism*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40170-017-0168-x>
- Leadon, S. A., Stampfer, M. R., & Bartley, J. C. (1988). Production of oxidative DNA damage during the metabolic activation of benzo[a]pyrene in human mammary epithelial cells correlates with cell killing. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 85(12), 4365-4368. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4365>
- Liu, R. H. (2013). Health-Promoting Components of Fruits and Vegetables in the Diet. *Advances In Nutrition*, 4(3), 384S-392S. <https://doi.org/10.3945/an.112.003517>
- Luang-In, V., Narbad, A., Nueno-Palop, C., Mithen, R., Bennett, M. H., & Rossiter, J. T. (2013). The metabolism of methylsulfinylalkyl- and methylthioalkyl-glucosinolates by a selection of human gut bacteria. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(4), 875-883. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300377>
- Lucena, M. A., González, C., De Reyes Lartategui, S., Aragón, R. G., Barrón, M. S., Rubio, J. G., & Poyatos, P. T. (2021). Molecular classification of breast cancer. Treatment and prognosis implications. *Cirugía Andaluza*, 32(2), 155-159. <https://doi.org/10.37351/2021322.9>
- Maina, S., Misinzo, G., Bakari, G. G., & Kim, H. (2020). Human, Animal and Plant Health Benefits of Glucosinolates and Strategies for Enhanced Bioactivity: A Systematic Review. *Molecules*, 25(16), 3682. <https://doi.org/10.3390/molecules25163682>

- Matthews, H. K., Bertoli, C., & De Bruin, R. A. (2021). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74-88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- Mo, J., Au, D. W., Guo, J., Winkler, C., Kong, R. Y., & Seemann, F. (2021). Benzo[a]pyrene osteotoxicity and the regulatory roles of genetic and epigenetic factors: A review. *Critical Reviews In Environmental Science And Technology*, 52(18), 3244-3282. <https://doi.org/10.1080/10643389.2021.1915052>
- Navarro, N., Fernández, D. A. M., & Viguera, C. G. (2018). Estudio de la bioactividad in vitro e in vivo de brotes de brócoli ricos en glucosinolatos/isotiocianatos. *Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, 10, 69-78. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6446417.pdf>
- Network, C. G. A. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Carolina Digital Repository (University Of North Carolina At Chapel Hill)*. <https://doi.org/10.17615/hyeb-c392>
- News-Medical. (2022, 26 noviembre). *What are Nutraceuticals?* <https://www.news-medical.net/health/What-are-Nutraceuticals.aspx>
- NOM-010-STPS-2014, D. O. (2014). Agentes químicos contaminantes del ambiente laboral-Reconocimiento, evaluación y control. *Diario oficial de la Federación*
- Nkrumah-Elie, Y., Reuben, J. S., Hudson, A., Taka, E., Badisa, R. B., Ardley, T., Israel, B., Sadrud-Din, S., Oriaku, E. T., & Darling-Reed, S. (2012). The Attenuation of Early Benzo(a)Pyrene-Induced Carcinogenic Insults by Diallyl Disulfide (DADS) in MCF-10A Cells. *Nutrition And Cancer*, 64(7), 1112-1121. <https://doi.org/10.1080/01635581.2012.712738>
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), 27-47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Piñero-Madrona, A., Polo-García, L., Alonso-Romero, J. L., Salinas-Ramos, J., Canteras-Jordana, M., Sola-Pérez, J., Galindo-Fernández, P. J., Illana-Moreno, J., Bermejo-López, J., Navarrete-Montoya, A., & Parrilla-Paricio, P. (2008). Características inmunohistoquímicas del cáncer de mama: ¿hacia una nueva clasificación? *Cirugía Española*, 84(3), 138-145. [https://doi.org/10.1016/s0009-739x\(08\)72155-9](https://doi.org/10.1016/s0009-739x(08)72155-9)
- Pitot, H. C. (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, 72(S3), 962-970. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930801\)72:3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930801)72:3)
- Plašilová, M., Hayse, B., Killelea, B. K., Horowitz, N., Chagpar, A. B., & Lannin, D. R. (2016). Features of triple-negative breast cancer. *Medicine*, 95(35), e4614. <https://doi.org/10.1097/md.0000000000004614>
- Pluchino, L. A., & Wang, H. R. (2014). Chronic Exposure to Combined Carcinogens Enhances Breast Cell Carcinogenesis with Mesenchymal and Stem-Like Cell Properties. *PLOS ONE*, 9(11), e108698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108698>
- Prat, A., Cheang, M. C., Martín, M., Parker, J. S., Carrasco, E., Caballero, R., Tyldesley, S., Gelmon, K. A., Bernard, P. S., Nielsen, T. O., & Perou, C. M. (2013). Prognostic Significance of Progesterone

- Receptor–Positive Tumor Cells Within Immunohistochemically Defined Luminal A Breast Cancer. *Journal Of Clinical Oncology*, 31(2), 203-209. <https://doi.org/10.1200/jco.2012.43.4134>
- Prolla, C. M. D., Da Silva, P. S., Netto, C. B. O., Goldim, J. R., & Ashton-Prolla, P. (2015). Knowledge about breast cancer and hereditary breast cancer among nurses in a public hospital. *Revista Latino-americana de Enfermagem*, 23(1), 90-97. <https://doi.org/10.1590/0104-1169.0185.2529>
- Rathore, K., Choudhary, S., Odoi, A., & Wang, H. R. (2011). Green tea catechin intervention of reactive oxygen species-mediated ERK pathway activation and chronically induced breast cell carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 33(1), 174-183. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr244>
- Roberts, S. A., Lawrence, M. S., Klimczak, L. J., Grimm, S. A., Fargo, D. C., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G. V., Carter, S. L., Saksena, G., Harris, S., Shah, R., Resnick, M. A., Getz, G., & Gordenin, D. A. (2013). An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nature Genetics*, 45(9), 970-976. <https://doi.org/10.1038/ng.2702>
- Rudel, R. A., Attfield, K. R., Schifano, J. N., & Brody, J. G. (2007). Chemicals causing mammary gland tumors in animals signal new directions for epidemiology, chemicals testing, and risk assessment for breast cancer prevention. *Cancer*, 109(S12), 2635-2666. <https://doi.org/10.1002/cncr.22653>
- Safe, S. (2001). Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicology Letters*, 120(1-3), 1-7. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(01\)00301-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(01)00301-0)
- Shakour, Z. T. A., Shehab, N. G., Gomaa, A. S., Wessjohann, L. A., & Farag, M. A. (2022). Metabolic and biotransformation effects on dietary glucosinolates, their bioavailability, catabolism and biological effects in different organisms. *Biotechnology Advances*, 54, 107784. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107784>
- Sigounas, G., Hairr, J. W., Cooke, C. D., Owen, J., Asch, A. S., Weidner, D. A., & Wiley, J. E. (2010). Role of benzo[α]pyrene in generation of clustered DNA damage in human breast tissue. *Free Radical Biology And Medicine*, 49(1), 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.018>
- Simões, R. V., Serganova, I., Kruchevsky, N., Leftin, A., Shestov, A. A., Thaler, H. T., Sukenick, G., Locasale, J. W., Blasberg, R. G., Koutcher, J. A., & Ackerstaff, E. (2015). Metabolic Plasticity of Metastatic Breast Cancer Cells: Adaptation to Changes in the Microenvironment. *Neoplasia*, 17(8), 671-684. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2015.08.005>
- Siriwardhana, N., & Wang, H. R. (2007). Precancerous carcinogenesis of human breast epithelial cells by chronic exposure to benzo[a]pyrene. *Molecular Carcinogenesis*, 47(5), 338-348. <https://doi.org/10.1002/mc.20392>
- Society, A. C. (2019). *Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020*. Atlanta: American Cancer Society.
- Suárez, R., & Buelvas, N. (2015). El inflammasoma: mecanismos de activación. *Investigacion Clinica*, 56(1), 074-099. <https://www.redalyc.org/pdf/3729/372937695009.pdf>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

- Talalay, P., & Fahey, J. W. (2001). Phytochemicals from Cruciferous Plants Protect against Cancer by Modulating Carcinogen Metabolism. *The Journal Of Nutrition*, 131(11), 3027S-3033S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.11.3027s>
- Vadodkar, A., Suman, S., Lakshmanaswamy, R., & Damodaran, C. (2012). Chemoprevention of Breast Cancer by Dietary Compounds. *Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry*, 12(10), 1185-1202. <https://doi.org/10.2174/187152012803833008>
- Vázquez-Gómez, G., Rubio-Lightbourn, J., & Espinosa-Aguirre, J. (2016). MECANISMOS DE ACCIÓN DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS DE ARILOS EN EL METABOLISMO DEL BENZO[A]PIRENO y EL DESARROLLO DE TUMORES. *TIP*, 19(1), 54-67. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2016.02.006>
- Verhoeven, D., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Van Den Brandt, P. A., & Van Poppel, G. (1997). A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions*, 103(2), 79-129. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(96\)03745-3](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(96)03745-3)
- Weigelt, B., Baehner, F. L., & Reis-Filho, J. S. (2009). The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *The Journal Of Pathology*, 220(2), 263-280. <https://doi.org/10.1002/path.2648>
- Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., & Loeb, L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars In Cancer Biology*, 14(6), 473-486. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2004.06.010>
- Yilmaz, B., Ssempebwa, J. C., Mackerer, C. R., Arcaro, K. F., & Carpenter, D. O. (2007). Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Containing Oil Mixtures on Generation of Reactive Oxygen Species and Cell Viability in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part A: Current Issues*, 70(13), 1108-1115. <https://doi.org/10.1080/15287390701208545>
- Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D. W., Abel, P. W., & Tu, Y. (2012). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*, 32(40), 4814-4824. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.494>