

DIETA Y SALUD

Palabras clave: berro de agua, ensayo cometa, prevención.
Key words: watercress, comet assay, prevention.

Diversos estudios epidemiológicos establecen una asociación inversa entre una dieta con alto contenido de crucíferas y el riesgo a padecer cáncer de pulmón o del tracto gastrointestinal. La familia Cruciferae presenta una extensa distribución geográfica a nivel mundial y son vegetales ampliamente consumidos por la población: repollitos, coliflor, repollo, brócoli, rúcula, berro, rabanito, entre otros. Contienen fitoquímicos como vitaminas, minerales, flavonoides, fenoles, carotenos, folatos y son la fuente principal de glucosinolatos (GSLs) de la dieta. El berro de agua (*Nasturtium officinale*, Aiton) es una de las crucíferas que contiene la mayor concentración de GSLs por gramo además de un gran contenido de carotenos. La Genética Toxicológica participa de manera esencial en el asesoramiento de efectos sobre la salud y su interés se centra en identificar y analizar el impacto de agentes químicos, biológicos o físicos sobre los componentes hereditarios de los organismos vivos. En estudios de genotoxicidad las técnicas de elección deben ser capaces de detectar tanto el daño como la reparación consecuente al material genético en células individuales. Uno de los ensayos que cumple con esta premisa es la electroforesis de una sola célula o ensayo cometa. Considerando el actual interés en aumentar el consumo de alimentos y plantas medicinales con potenciales características benéficas para disminuir o prevenir el impacto negativo de xenobióticos a nivel celular y genético, realizamos el estudio de la variedad local del berro de agua empleando metodologías que posibiliten evidenciar su capacidad como agente promotor de la salud.

**Marcela M. López Nigro*,
Natalia A. Casanova,
Marta A. Carballo.**

CIGETOX (Citogenética Humana y Genética Toxicológica)- INFIBIOC (Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica)- Departamento de Bioquímica Clínica- Facultad de Farmacia y Bioquímica- Universidad de Buenos Aires. Junín 956- 1113- Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

mmlopeznigro@gmail.com

Several epidemiological studies have established an inverse association between a diet with high cruciferous vegetables content and the risk of developing lung or gastrointestinal tract cancer. The Cruciferae families has a globally extensive geographical distribution and are widely consumed by the population: sprouts, cauliflower, cabbage, broccoli, arugula, watercress, radish, among others. They contain nutrients like vitamins, minerals, carotenoids, folate, and are the main source of glucosinolates (GSLs) diet. Watercress (*Nasturtium officinale*, Aiton) is a cruciferous containing the highest concentration of GSLs per gram and a high content of carotenoids. Genetic Toxicology participates in an essential way on the advice of health effects and its focus is on identifying and analyzing the impact of chemical, biological or physical agents on the hereditary components of living organisms. Genotoxicity studies selection techniques must be able to detect in genetic material both damage and consequent repair into individual cells. One of the assays that follow this premise is the single cell gel electrophoresis or comet assay. Considering the current interest in increasing the consumption of food and medicinal plants with potential beneficial characteristics to reduce or prevent the negative impact of xenobiotics at the cellular and genetic level, we conducted a study of the local variety of watercress using methodologies that allow demonstrating its capacity as a health promoting agent.

■ CRUCÍFERAS: BERRO DE AGUA (*NASTURTIIUM OFFICINALE* - CRUCIFERAE).

La prevención y protección del daño al material genético constituyen estrategias claves en la disminución del riesgo de padecer diversas patologías crónicas, entre ellas el cáncer. Ambos escenarios implican una menor exposición a xenobióticos que puedan interaccionar con el ADN u otros blancos biológicos y la estimulación de los mecanismos propios del organismo diseñados

para reducir el impacto de los agentes deletéreos. En este contexto, la dieta es un componente fundamental dado que es fuente de nutrientes que resguardan la salud y es teóricamente causa potencial y prevenible de distintos tipos de cáncer después del tabaco (Key y col., 2004). Numerosos trabajos realizados en animales y con seres humanos describen que ciertos componentes de la dieta de origen vegetal podrían tener propiedades quimiopreventivas debido a la inducción o inhibición de mecanismos vinculados con el desarro-

llo de patologías crónicas (Boeing y col., 2012). Esta capacidad de protección se basa en la riqueza de nutrientes como vitaminas, minerales, fibras y en la presencia de moléculas bioactivas no nutrientes llamadas fitoquímicos. Dentro de este gran grupo se encuentran los carotenos, polifenoles, alcaloides, compuestos nitrogenados y organosulfurados (Liu, 2004).

Según la Organización Mundial de la Salud, la relación entre el consumo habitual de vegetales y frutas

con el desarrollo de patologías crónicas es aún una asociación probable, es decir, que la evidencia aportada por los estudios epidemiológicos es consistente, pero a su vez no es posible elaborar una conclusión determinante por deficiencias en el diseño experimental o seguimiento de los individuos (2003).

La familia Cruciferae presenta una extensa distribución geográfica a nivel mundial siendo cultivadas desde la antigüedad. Son vegetales ampliamente consumidos por la población: repollitos, coliflor, repollo, brócoli, rúcula, berro, rabanito, entre otros. Al igual que otras plantas, presentan una gran variedad de moléculas antioxidantes y son la fuente principal de glucosinolatos (GSLs) de la dieta. Estos últimos, también llamados tioglicósidos, son aniones orgánicos solubles en agua responsables del sabor y aroma característico de las crucíferas.

Los GSLs son sintetizados y almacenados en la planta en forma

de precursores inactivos. La hidrólisis de los glucosinolatos es realizada por una enzima (mirosina o β -tioglucosidasa) que se encuentra físicamente separada de sus sustratos cuando la planta está intacta. La cosecha, cocción, congelamiento y masticación del vegetal así como el ataque de insectos o microorganismos producen la liberación de la enzima de su compartimiento. La enzima también está presente en el tracto intestinal de los mamíferos produciendo la hidrólisis durante la digestión. Así, por medio de la acción enzimática se forman diversos productos dependiendo de las condiciones de reacción (pH, temperatura, iones) y presencia de proteínas epitioespecíficas; entre los más importantes se encuentran los isotiocianatos (ITCs), tiocianatos, nitrilos e indoles. Estos últimos solo se forman si el glucosinolato es un derivado del aminoácido triptófano, reacción en la cual no se generan isotiocianatos.

Diversos estudios epidemiológi-

cos establecen una asociación inversa entre una dieta con alto contenido de crucíferas y el riesgo a padecer cáncer de pulmón o del tracto gastrointestinal. Así mismo hay evidencia sobre una posible protección en casos de cáncer de mama, próstata, vejiga y páncreas (Higdon y col., 2007; Kim y Park, 2009). Los mecanismos subyacentes a los efectos benéficos de las crucíferas estarían vinculados con los ITCs e indoles. Estos metabolitos serían los responsables de la inducción de genes de respuesta antioxidante y detoxificante, inhibición de las enzimas del citocromo P450, inhibición de la histona desacetilasa, inhibición del crecimiento tumoral y angiogénesis e inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular en células neoplásicas (Higdon y col., 2007; Kim y Park, 2009; Traka y Mithen, 2009). Además se les atribuye actividad antiinflamatoria y antibacteriana, protección cardiovascular, renal y del sistema nervioso central (Dinkova-Kostova y Kostov, 2012).



Figura 1. Fotografías del berro.

El berro de agua (*Nasturtium officinale*, Aiton, Figura 1) es una planta de hábitat acuático que crece en forma silvestre en aguas de lenta corriente, en manantiales, arroyos y terrenos anegados. Su nombre deriva de los vocablos latinos *nasus tortus*, “que hace torcer la nariz”, aludiendo a su sabor picante y amargo. Es ampliamente consumido en Europa donde es reconocido por sus virtudes nutricionales y medicinales.

Es una de las crucíferas que contiene la mayor concentración de GSLs por gramo además de un gran contenido de carotenos. El principal glucosinolato presente en el berro es el gluconasturtiin (GNT) el cual deriva del aminoácido fenilalanina. Mediante la acción enzimática de la mirosinasa, el GNT es hidrolizado a feniletilisotiocianato (PEITC) (Canistro y col., 2004).

Esta crucífera ha sido estudiada principalmente a nivel de sus metabolitos aislados (GNT y PEITC) en sistemas *in vitro* e *in vivo* donde se describen resultados similares a otros GSL/ITC, tales como inhibición del proceso carcinogénico *in vitro* en todas sus etapas, inducción *in vitro* de enzimas de fase II e inhibición de fase I (Rose y col., 2000); disminución de colesterol, triglicéridos, LDL y aumento de HDL; incremento de GSH y actividades de las enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), así como disminución de la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) en ratas hipercolesterolémicas (Yazdanparast y col., 2008).

En humanos, la suplementación de la dieta con el vegetal induce mayor resistencia al daño oxidativo exógeno, aumento de la actividad de SOD y GPx en individuos con genotipo GSTM1 sin modificación en la expresión de éstas y otras enzimas de defensa antioxidante (Gill y col.,

2007; Hofmann y col., 2009). Así mismo, ante ejercicio físico excesivo se observa menor daño en el ADN y niveles de peroxidación lipídica, en relación con dietas no suplementadas (Fogarty y col., 2012).

■ GENÉTICA TOXICOLÓGICA – ENSAYO COMETA.

La genética toxicológica es una rama de la genética y una especialidad de la toxicología que participa de manera esencial en el asesoramiento de efectos sobre la salud. Su interés se centra en identificar y analizar el impacto de agentes químicos, biológicos y/o físicos sobre los componentes hereditarios de los organismos vivos y proveer información precisa sobre exposición y asesoramiento de riesgo para una efectiva protección de la salud.

Los estudios en genética toxicológica se orientan con el propósito de implementar métodos para el ensayo y la evaluación del riesgo y, por otro lado, elucidar la relación entre genotoxicidad (lesión inicial inducida sobre el material genético) e iniciación de un proceso neoplásico. De esta manera, es posible definir el impacto de los agentes que se encuentran en el medio ambiente y cuya presencia puede alterar la integridad del patrimonio genético.

Para lograr estos objetivos se diseñan sistemas de ensayo que emplean diversos marcadores mensurables en sistemas biológicos (NRC, 1991; Grandjean, 1992). Estos biomarcadores son elementos intermedios entre la existencia de factores de riesgo y sus posibles efectos. En general son utilizados para detectar exposición y/o susceptibilidad a xenobióticos, determinar efectos biológicos así como estado de salud y enfermedad en un organismo dado. Es decir, constituyen una herramienta valiosa para prevenir, diagnosticar

y tratar enfermedades basadas en anomalías del genoma (Natarajan, 2002; Tucker y Preston, 1996).

Un biomarcador de efecto es un indicador de una alteración bioquímica, fisiológica o genética, resultado de la exposición a un agente tóxico. Se considera que un marcador de efecto biológico temprano representa un evento que puede correlacionarse con el daño a la salud y tiene una posibilidad predictiva (Grandjean, 1995). De este modo, se logra la identificación de una alteración cuando su magnitud es aún menor, es decir una advertencia temprana. Permiten determinar si un grupo de signos o síntomas conducen a un proceso patológico para así intervenir prudente y oportunamente a los fines de evitar la aparición de un daño irreversible (Grandjean, 1992).

En estudios de genotoxicidad las técnicas de elección deben ser capaces de detectar tanto el daño como la reparación consecuente al material genético en células individuales. Uno de los ensayos que cumple con esta premisa es la electroforesis de una sola célula o ensayo cometa.

Östling y Johanson (1984) desarrollaron el ensayo cometa o electroforesis en gel de una sola célula a pH neutro mediante el cual se detectaba daño al material genético. Sin embargo, el único tipo de daño observado eran las roturas de doble hélice dado que las uniones entre las bases nucleotídicas no se alteran a dicho pH. En 1988, Singh y colaboradores modificaron el protocolo original utilizando pH alcalino (pH>13) lo cual permitió detectar rupturas de simple y doble cadena así como también sitios álcali lábiles, sitios de reparación y enlaces cruzados ADN – ADN y ADN – proteína (cross link) aumentando así la sensibilidad del ensayo.

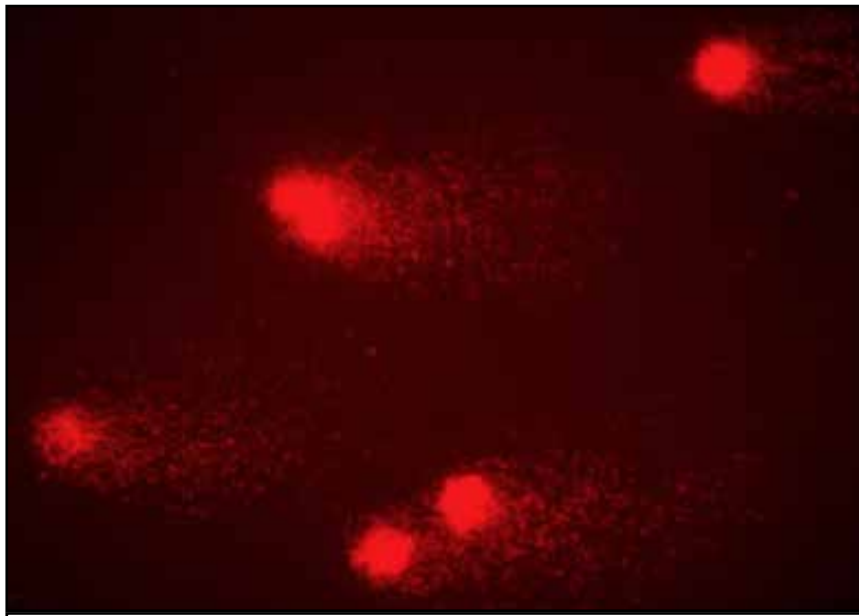


Figura 2. Imágenes de cometas obtenidas a partir de leucocitos de sangre periférica.

La metodología se basa en el estudio de células embebidas en agarosa y colocadas sobre un portaobjeto que luego son lisadas con una solución de alta concentración de sales y detergente. Las membranas y componentes solubles de las células son removidos dejando al ADN superenrollado y unido a la matriz nuclear. Los bucles de ADN que presentan cortes se relajan durante la incubación a pH alcalino; los fragmentos de ADN migran hacia el ánodo al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico bajo las mismas condiciones poniéndose en evidencia las roturas de ADN. Las imágenes observadas al microscopio de fluorescencia con un fluorocromo afín al ADN tienen la apariencia de un cometa siendo la fluorescencia relativa de material en la cola función de la frecuencia de las roturas.

Entre las ventajas de esta técnica podemos citar que, a diferencia de los otros biomarcadores descriptos, este ensayo puede aplicarse a diversos tipos celulares sin la necesidad de trabajar con células en

proliferación (Collins, 2004; Speit y Hartmann, 2005). Las células más frecuentemente utilizadas son los leucocitos y linfocitos de sangre periférica ya que, aun no siendo el tejido blanco de ataque del agente, están en contacto directo con el sistema afectado por lo que su metabolismo y sus características nucleares y celulares pueden modificarse y así reflejar la exposición total del cuerpo. Además es una metodología simple y sensible que requiere poca

cantidad de muestra y permite obtener resultados a corto plazo. Sin embargo, una de las desventajas es su limitación para detectar agentes aneunógenos y rupturas de hebra de rápida reparación. Debe tenerse en cuenta que la muerte celular, ya sea inducida o espontánea, produce fragmentación del ADN lo cual puede interferir en el ensayo generando un falso positivo.

Si bien todavía no se encuentra validado, este ensayo es ampliamente utilizado en el área de la toxicología genética en modelos *in vitro* e *in vivo* para análisis de genotoxicidad, estudios de mecanismos de acción de xenobióticos y biomonitoreo de poblaciones expuestas a tóxicos medioambientales o del ámbito laboral.

La electroforesis de una sola célula, al igual que otros ECP, puede ser adaptada para investigar los efectos benéficos de un xenobiótico dado. La característica o acción de una sustancia para disminuir, evitar o reparar el daño en el material genético y celular se denomina antígenotoxicidad. La diferencia entre un escenario y otro dependerá del orden temporal en que sucedan el daño y la exposición al agente a evaluar.

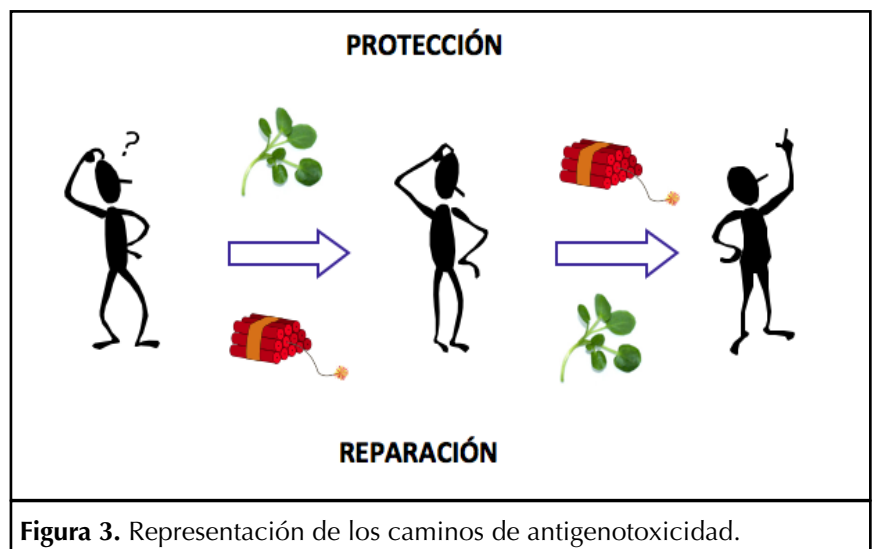


Figura 3. Representación de los caminos de antígenotoxicidad.

■ EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL POTENCIAL EFECTO PROTECTOR DEL BERRO DE AGUA.

Diversos productos naturales y sus derivados han sido estudiados en diferentes sistemas en relación a sus propiedades antioxidantes, antigenotóxicas y anticarcinogénicas (Kale y col., 2008; Prior, 2003; Surh, 2003; Thompson y col., 1999). Debido a la evidencia obtenida en muchos casos, los extractos y/o los fitoquímicos aislados se han convertido en potenciales herramientas para el área terapéutica.

Considerando el actual interés en aumentar el consumo de alimentos y plantas medicinales con potenciales características benéficas para disminuir o prevenir el impacto negativo de xenobióticos a nivel celular y genético (antigenotoxicidad), en nuestro laboratorio se realizó el estudio de la variedad local del berro de agua empleando metodologías que posibiliten evidenciar su capacidad como agente promotor de la salud.

En un principio se realizó una evaluación *in vitro* y posteriormente *in vivo* para estudiar la potencial capacidad de protección frente al daño inducido utilizando el Ensayo Cometa. Los agentes inductores de daño fueron: peróxido de hidrógeno para el estudio *in vitro* y ciclofosfamida para el *in vivo*.

El vegetal se adquirió en una huerta orgánica (Luján). Una vez lavado, secado y pesado se trituró utilizando una juguera. El producto obtenido fue centrifugado y el sobrenadante fue clarificado y esterilizado por filtración. Todos los procedimientos descriptos fueron realizados en oscuridad para preservar el material. Las concentraciones ensayadas representarían la ingesta promedio del vegetal en humanos (75-125g) correspondiente a una

concentración final de 13,2 mg/ml (A) y 26,4 mg/ml (B). El desarrollo experimental se realizó en cultivo de linfocitos de dadores sanos utilizando como control positivo H_2O_2 (50 μ M) siguiendo la metodología propuesta por Singh y colaboradores (1988) con modificaciones (Casanova y Carballo, 2012).

Con el fin de establecer el beneficio potencial del consumo de este elemento de la dieta en humanos, es importante caracterizarlo en un modelo experimental como el de ratones. Para ello se utilizaron ratones Swiss machos y hembras de 7-8 semanas de edad, a los que fue administrado el jugo de berro por la misma vía de ingestión que se utiliza en humanos, o sea en forma oral. Este jugo se administró durante 15 días y también se utilizaron controles negativos y positivos, con el objeto de poder visualizar el efecto beneficioso de su consumo. (Casanova y col., 2013).

La antigenotoxicidad refiere a todo mecanismo que logre prevenir o reparar el daño ocasionado al material genético o celular por factores físicos, químicos y/o biológicos. El daño oxidativo al material genético ejerce un rol fundamental en el desarrollo de enfermedades crónicas, otras relacionadas con el envejecimiento y es considerado un probable factor carcinogénico (Moller y Loft, 2006).

El impacto de este tipo de injuria puede ser atenuado o prevenido por la ingesta de productos naturales a través de la inclusión de antioxidantes y/o por inducción de mecanismos de defensa. En el presente trabajo se evaluó las potenciales propiedades del jugo de berro como agente protector del daño inducido empleando el ensayo cometa.

Las especies reactivas del oxí-

geno, entre ellas el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) así, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$), son moléculas altamente reactivas. Los efectos que producen dependerán del tipo celular, la concentración y la duración de la exposición a dichas especies. Principalmente, las acciones deletéreas se manifiestan en daño al ADN, proteínas y lípidos. Respecto al ADN, cabe destacar que ni el $O_2^{\bullet-}$ ni el H_2O_2 pueden atacar directamente a la doble hélice sino que el daño es ejercido por el $OH^{\bullet}$. Las lesiones incluyen rupturas de simple y doble hebra, oxidación de bases, enlaces cruzados ADN-ADN y ADN-proteínas (Halliwell y Aruoma, 1991).

En los primeros estudios pudimos poner en evidencia que cuando el jugo de berro está presente en el cultivo de linfocitos, se observa que el jugo previene el daño inducido por el oxidante que nosotros habíamos agregado desde los primeros tiempos de exposición. Es de hacer notar que aunque trabajamos con dos concentraciones diferentes, ambas presentaron el mismo comportamiento, de forma tal que se pone en evidencia que el jugo de berro protege del daño inducido, demostrando su acción antigenotóxica potencial.

Nuestros resultados son congruentes con aquellos reportados por otros grupos; Zhu y Loft demostraron que un extracto de repollitos de Bruselas, miembro de la familia Cruciferae, disminuía el daño inducido por el mismo agente (2001). De igual manera, Gill y colaboradores postularon que la suplementación de la dieta con una porción diaria de berro estaría asociada a mayor resistencia al daño oxidativo (2007).

Teniendo en cuenta estos resultados decidimos entonces estudiar el potencial protector del jugo de berro

en roedores frente a un agente mutagénico utilizando el test del cometa en sangre periférica de ratón

En este caso, otra vez teníamos que usar una droga que fuera capaz de provocar un daño en el material genético de los animales, de forma tal que luego de la administración a los ratones del jugo de berro, pudiéramos comprobar si ese daño disminuía.

Para ello elegimos la ciclofosfamida (CF), que es un agente alquilante bifuncional perteneciente a la familia de las mostazas nitrogenadas y actúa como mutágeno indirecto, es decir, es imprescindible que la molécula sea metabolizada para generar sus efectos tóxicos. La prodroga se convierte en productos con actividad citotóxica alquilante mediante el sistema de oxidasas mixtas P450 dependientes. Se transforma en 4-hidroxíciclofosfamida y aldofosfamida la cual genera acroleína y fosfaramida, entre otros (Florez y col., 1998). Al interactuar con el ADN, estas moléculas forman monoaductos y enlaces cruzados entre las hebras que interfieren en la síntesis del mismo y provocan fallas en los mecanismos de reparación aumentando el riesgo de ocurrencia de retardos anafásicos (Gilani y Chatzinoff, 1983; Enns y col., 1999). Así mismo, inducen estrés oxidativo y muerte celular.

Luego de administrar durante 15 días el jugo de berro a los ratones pudimos observar que la suplementación de la dieta disminuyó el daño producido por la ciclofosfamida en el material genético.

Otra vez, como los estudios que habíamos hecho en el cultivo de linfocitos, encontramos que las dos concentraciones estudiadas del jugo de berro, producen un efecto similar y en este caso es aún más importan-

te, ya que dentro de las dosis que estudiamos se encuentra la máxima permitida en ensayos de genotoxicidad de productos de consumo para humanos (OECD, 1997; Hartmann y col., 2003). Por el contrario, las concentraciones ensayadas en el cultivo de linfocitos representan la ingesta promedio del vegetal para un adulto promedio. Estas últimas son muy superiores a las primeras lo cual pone en evidencia la gran capacidad de la planta como agente quimiopreventivo.

La evaluación del berro *in vivo* avaló los resultados obtenidos en los modelos *in vitro*; es decir, se puso de manifiesto la capacidad de este alimento de prevenir la injuria inducida, en este caso por la ciclofosfamida en células de sangre periférica de ratón.

El análisis de la composición de la planta o de los productos derivados de la misma constituye una herramienta importante al momento de diseñar protocolos y/o formular una conclusión. En nuestro caso, el estudio del berro se realizó en forma colaborativa con distintos grupos de investigación. La concentración total de glucosinolatos fue 15 $\mu\text{M/g}$ de peso seco de los cuales el 89% corresponde a gluconasturtiin, el 8% a tres tipos de glucosinolatos indólicos y el porcentaje restante a tres metilsulfinilalquil glucosinolatos. De acuerdo a estas investigaciones las concentraciones ensayadas *in vitro* corresponderían a 1,15 μM y 0,577 μM de PEITC, respectivamente.

Para completar el análisis se efectuaron determinaciones de fitoquímicos que son comunes a todas las plantas como fenoles, taninos, flavonoides y ácidos hidroxicinámicos totales. Por gramo de material fresco se obtuvieron $285 \pm 20 \mu\text{g}$ de fenoles, $42 \pm 14 \mu\text{g}$ de taninos, $146 \pm 3,5 \mu\text{g}$ de flavonoides y $100 \pm 6,8$

μg de ácidos hidroxicinámicos.

El mecanismo de antigenotoxicidad podría estar relacionado con cambios en el estado oxidativo celular. Esta hipótesis se basa en la gran variedad de fitoquímicos del berro que pueden interactuar con las vías o moléculas vinculadas con el balance redox. Sin embargo, la situación más factible es la combinación de diferentes blancos y mecanismos.

La concentración de glucosinolatos y de otros fitoquímicos permite inferir los mecanismos subyacentes de los hallazgos presentados en este trabajo. Los mismos avalan al berro como elemento de la dieta que presenta características promisorias para ser utilizado como agente promotor o protector de la salud.

■ AGRADECIMIENTOS.

Los autores expresan su agradecimiento al Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por su colaboración en el desarrollo del diseño experimental. El trabajo realizado empleando sangre humana fue realizado con el consentimiento informado. Ambos estudios fueron aprobados por el comité de ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Este trabajo fue realizado en el marco del subsidio UBACYT 20020100100123 2011-2014 de la Universidad de Buenos Aires.

■ BIBLIOGRAFÍA.

- Boeing H, Bechthold A, Bub A, Ellinger S, Haller D, Kroke A, Leschik-Bonnet E, Müller M, Oberritter H, Schulze M, Stehle P, Watzl B. (2012). Critical review: vegetables and fruit in the prevention of chronic diseases. *European Journal of Nutrition* 51: 637–663.
- Canistro D, Della Croce C, Iori R, Barillari J, Bronzetti G, Poi G,

- Cini M, Caltavuturo L, Perocco P, Paolini M. (2004). Genetic and metabolic effects of gluconasturtiin, a glucosinolate derived from cruciferae. *Mutation Research* 545: 23–35.
- Casanova N, Carballo MA. (2012). Antigenotoxic activity of Watercress extract in an in vitro mammalian system using comet assay. *Phytotherapy Research* 25: 1743-1746.
- Casanova NA, Ariagno JI, López Nigro MM, Mendeluk GR, Gette MA, Petenatti E, Palaoro LA, Carballo MA (2013) In vivo antigenotoxic activity of watercress juice (*Nasturtium officinale* L.) against induced DNA damage. *Journal of Applied Toxicology* 33: 880-885.
- Collins A. (2004). Review: The Comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26:249–60.
- Dinkova-Kostova A, Kostov R. (2012). Review: Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* 18: 337-347.
- Enns G, Roeder E, Chan R, Ali-Khan Catts Z, Cox C, Golabi M. (1999). Apparent cyclophosphamide (cytoxan) embryopathy: a distinct phenotype? *American Journal of Medical Genetics* 86: 237-241.
- Florez J, Armijo J, Mediavilla Á. (1998). *Farmacología humana*. 3º edición. Editado por Masson, Barcelona, España.
- Fogarty M, Hughes C, Burke G, Brown J, Davison G. (2012). Acute and chronic watercress supplementation attenuates exercise-induced peripheral mononuclear cell DNA damage and lipid peroxidation. *British Journal of Nutrition* 109: 293-301.
- Gilani S, Chatzinoff M. (1983). Embryopathic effects of cyclophosphamide. *Environmental Research* 31: 296-301.
- Gill C, Haldar S, Boyd L, Bennett R, Whiteford J, Butler M, Pearson J, Bradbury I, Rowland I. (2007). Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition* 85: 504-510.
- Grandjean P. (1992). Individual susceptibility to toxicity. *Toxicology Letter* 64/65: 43-51.
- Grandjean P. (1995). Biomarkers in epidemiology. *Clinical Chemistry* 41: 1800-1803.
- Halliwell B, Aruoma O. (1991). Review letter: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letter* 281: 9-19.
- Hartmann A, Aguerri E, Beepers C, Brender-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18: 45-51.
- Higdon J, Delage B, Williams D, Dashwood R. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacology Research* 55: 224-236.
- Hofmann T, Kuhnert A, Schubert A, Gill C, Rowland I, Pool-Zobel B, Gleit M. (2009). Modulation of detoxification enzymes by watercress: in vitro and in vivo investigations in human peripheral blood cells. *European Journal of Nutrition* 48: 483–491.
- Kale A, Gawande S, Kotwal S. (2008). Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research* 22: 567–577.
- Key T, Schatzkin A, Willett W, Allen N, Spencer E, Travis R. (2004). Diet, nutrition and the prevention of cancer. *Public Health Nutrition* 7:187-200.
- Kim M, Park J. (2009). Cruciferous vegetable intake and the risk of human cancer: epidemiological evidence. *Proceedings of the Nutrition Society* 68: 103–110.
- Liu R. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition* 15-16: 3479-3485.
- Møller P, Loft S. (2006). Review article: Dietary antioxidants and beneficial effect on oxidatively damaged DNA. *Free Radic Biology and Medicine* 41: 388–415.
- Natarajan A, Obe G, van Zeeland A, Palitti F, Meijers M, Verdegaal-Immerzeel E. (1980). Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations II. Utilization of neurospora endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle. *Mutation Research* 69: 293-305.
- National Research Council. (1991). *Environmental epidemiology public health and hazardous wastes, VII biologic markers in studies of hazardous-waste sites*. National Academic Press 219-255.

- Organization for Economic Co-operation and Development. (1997). OECD Guideline for the testing of chemicals Nº 474. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Disponible en: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948442.pdf>.
- Organización Mundial de la Salud. (2003). Consulta mixta OMS/FAO de expertos en régimen alimentario, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas: informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916_spa.pdf
- Östling O, Johanson K. (1984). Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical Biophysical Research Communications* 123: 291-298.
- Prior R. (2003). Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 570S-578S
- Rose P, Faulkner K, Williamson G, Mithen R. (2000). 7-methylsulfinylheptyl and 8-methylsulfinyloctyl isothiocyanates from watercress are potent inducers of phase II enzymes. *Carcinogenesis* 21: 1983-1988.
- Singh N, McCoy M, Schneider E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-191.
- Speit G, Hartmann A. (2005). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods of Molecular Biology* 291: 85-95.
- Surh Y. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* 3: 768-780.
- Thompson H, Heimendinger J, Haegele A, Sedlacek S, Gillette C, O'Neill C, Wolfe P, Conry C. (1999). Effect of increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis* 20: 2261-2266.
- Traka M, Mithen R. (2009). Glucosinolates, isothiocyanates and human health. *Phytochemistry Review* 8: 269-282.
- Tucker J, Preston R. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research* 365: 147-159.
- Yazdanparast R, Bahramikia S, Ardeshani A. (2008). Nasturtium officinale reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. *Chemico-Biological Interactions* 172:176-184.
- Zhu C, Loft S. (2001). Effects of Brussels sprouts extracts on hydrogen peroxide-induced DNA strand breaks in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* 39: 1191-7.
- GLOSARIO**
- Antigenotóxico:** se denomina a cualquier agente capaz de evitar o revertir el efecto de un agente genotóxico. Se puede manifestar como procesos de protección y/o reparación de un xenobiótico.
- Catalasa (CAT):** es una enzima que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.
- Ciclofosfamida:** es un fármaco antineoplásico que también tiene propiedades inmunosupresoras y pertenece a la familia de los agentes alquilantes.
- Ensayo cometa:** También conocido como ensayo de electroforesis en gel de una sola célula, es una metodología sencilla y sensible para la detección de daño de simple y/o doble cadena en el ADN en células eucariotas. Tiene amplia aceptación como un método estándar para evaluar daño y reparación en el ADN y biomonitorio de poblaciones expuestas.
- Especies reactivas del oxígeno:** son moléculas muy pequeñas altamente reactivas. Se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno, tienen un rol importante en la señalización celular y su aumento puede llevar a daños significativos que resultan en estrés oxidativo.
- Fitoquímicos:** Los fitoquímicos son sustancias que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, biológicamente activas, que no son nutrientes esenciales para la vida pero tienen efectos positivos en la salud. Se encuentran naturalmente en frutas, vegetales, legumbres, granos enteros, semillas, hierbas y especias.
- Genotóxico:** agente cuya acción utiliza como blanco de ataque el material genético.
- Glucosinolatos:** metabolitos secundarios de las plantas. Son los precursores de los isotiocianatos.
- Glutation (GSH):** es un tripéptido no proteínico que deriva de los aminoácidos. Es un antioxidante y ayuda a

proteger a las células de especies reactivas de oxígeno, como radicales libres y peróxidos.

Glutation peroxidasa: es una de las enzimas que participan en las transformaciones de especies reactivas del oxígeno, catalizando la reducción del peróxido o lipoperóxido, para lo cual utiliza como agente reductor al glutatión reducido. Esta enzima desempeña un importante papel en la defensa antioxidante por su localización en todos los órganos y tejidos.

Glutation reductasa: es una enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido. Esta enzima juega un importante papel en la defensa antioxidante y debido a su presencia en los diferentes tejidos y órganos está involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades.

Isotiocianatos: son fitoquímicos presentes en las crucíferas (coliflor, repollitos, brócoli, entre otros). Participan en la eliminación de toxinas y refuerzan las defensas antioxidantes de las células. Son los responsables

del sabor y olor característico de las crucíferas

Peroxidación lipídica: la lipoperoxidación está relacionada a la degradación oxidativa de los lípidos y en la mayoría de los casos afecta a los ácidos grasos poli-insaturados.

Superóxido dismutasa (SOD): es una enzima que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno y debido a ello es una importante defensa antioxidante en las células expuestas al oxígeno.