

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 472**

51 Int. Cl.:

A61K 36/31 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61K 31/7028 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2010 PCT/GB2010/052200**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11077163**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2010 E 10801262 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 2515921**

54 Título: **Utilización**

30 Prioridad:

23.12.2009 GB 0922505

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.07.2020

73 Titular/es:

**PLANT BIOSCIENCE LIMITED (100.0%)
Norwich Research Park Colney Lane
Norwich, Norfolk NR4 7UH, GB**

72 Inventor/es:

MITHEN, RICHARD

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 776 472 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la utilización de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato, tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato, para la prevención y/o tratamiento de un trastorno cardiovascular.

10 Antecedentes

15 La enfermedad cardiovascular (CVD) es una de las principales causas de muerte prematura en el Reino Unido [1]. En Inglaterra, más de 110,000 personas mueren cada año de enfermedad coronaria (CHD). Más de 1.4 millones de personas sufren de angina y 275,000 personas tienen un ataque al corazón anualmente. La CVD tiene una etiología compleja y generalmente produce un estrechamiento de las arterias (aterosclerosis) y una oclusión a través de la formación de un coágulo de sangre en una arteria estrecha (trombosis) [3]. Se ha encontrado que estos eventos están asociados con cambios en la reactividad vascular, aumento de la agregación plaquetaria, aumentos en los triglicéridos plasmáticos y un aumento en los marcadores sistémicos de inflamación [4-7]. De estas, la inflamación es de importancia central y puede apuntalar el desarrollo de otras formas de enfermedades crónicas tales como el cáncer y el deterioro cognitivo [8].

25 El consejo dietético para consumir al menos cinco porciones de fruta y verdura por día para reducir el riesgo de desarrollar estas enfermedades crónicas se basa en gran medida en datos de observación de estudios epidemiológicos que han asociado dietas ricas en frutas y verduras con una reducción en enfermedad crónica relacionada con la edad [8].

Ahora hay una gran cantidad de evidencia epidemiológica que establece que las dietas ricas en verduras crucíferas pueden reducir el riesgo de incidencia y progresión del cáncer en varios sitios [12-18].

30 El brócoli o calabrese (*Brassica oleracea* variedad itálica) es un miembro representativo de las verduras crucíferas. Esta familia de verduras es única en la síntesis y acumulación de glucosinolatos en sus partes comestibles [34]. Estos glucósidos que contienen azufre se almacenan dentro de la vacuola celular. Después del daño tisular, se hidrolizan a través de una tioglucosidasa verdura (mirosinasa) hasta varios productos, de los cuales los isotiocianatos de glucosinolatos derivados de metionina e indoles de glucosinolatos derivados de triptófano son los más abundantes [35]. Si la mirosinasa ha sido desnaturalizada mediante el blanqueo antes de la congelación o la cocción, los glucosinolatos ingeridos se hidrolizan hasta isotiocianatos e indoles por la acción de las tioglucosidasas microbianas en el colon. Estos productos de degradación son altamente bioactivos, y muchos de los beneficios para la salud de las verduras crucíferas se han asociado con la actividad de estos compuestos, aunque los datos experimentales en humanos están casi ausentes. Las verduras de Brassica también son fuentes particularmente buenas de otros compuestos que se han asociado con beneficios para la salud, especialmente vitamina C, folatos, carotenoides, calcio y magnesio [36, 37]. Distinguir la actividad biológica de cualquier grupo de compuestos en productos alimenticios como el brócoli es muy complejo. Sin embargo, para facilitar los estudios sobre glucosinolatos, se han desarrollado variedades cultivadas de brócoli que específicamente tienen niveles elevados de glucosinolatos derivados de metionina en comparación con el brócoli estándar, pero sin ningún cambio en otros compuestos potencialmente bioactivos [38, 39]. Por lo tanto, estos genotipos novedosos pueden usarse para probar hipótesis en humanos relacionadas con la contribución de una sola clase de compuesto bioactivo dentro de un alimento complejo.

50 Varios estudios epidemiológicos sugieren que ciertos polimorfismos dentro de uno o más miembros de la familia de genes de las glutatión-S-transferasas (GST) pueden ser factores de riesgo para el cáncer. La variación en esta familia de genes también se ha implicado en la CVD, en la que varios estudios han examinado la relación entre genotipos nulos y la CVD. Actualmente hay ocho clases de GST [42], y la mayoría del trabajo se lleva a cabo en GST-mu (GSTM1), GST-theta (GSTT1) y GST-pi (GSTP1) y sus polimorfismos. Aproximadamente el 40% de la población tiene una eliminación homóloga del gen GSTM1 que resulta en un genotipo nulo, y el 20% tiene una eliminación del gen GSTT1. La familia de genes GST convierte los electrófilos reactivos, mediante conjugación con glutatión, en compuestos que se pueden excretar del cuerpo con mayor facilidad. Por lo tanto, los polimorfismos pueden afectar los mecanismos de defensa, lo que podría provocar el desarrollo de una gran cantidad de enfermedades, incluida la CVD [43]. También se ha demostrado que los polimorfismos con GST interactúan con el consumo de verduras crucíferas para influir en el riesgo de cáncer [43].

60 A medida que envejecemos, nuestras arterias se endurecen, lo que provoca un aumento de la demanda miocárdica que da como resultado presiones sanguíneas sistólicas más altas y un aumento de la presión del pulso. El proceso de rigidez resulta de cambios estructurales, la degeneración de la elastina responsable de la elasticidad de la arteria y un aumento en el colágeno que causa un engrosamiento de la pared arterial [44]. Este aumento en la rigidez arterial y la presión sistólica central junto con una disminución en la presión de perfusión de la arteria coronaria aumenta dramáticamente el riesgo de ataque cardíaco, accidente cerebrovascular e insuficiencia cardíaca. La rigidez arterial también se ha asociado con muchos de los factores de riesgo comunes asociados con las CVD, tales como la edad,

la presión arterial alta, el tabaquismo, los niveles de colesterol y obesidad, pero de manera muy importante se ha demostrado que son predictores independientes de morbilidad y mortalidad cardiovascular en varios grupos de poblaciones [45]. La medición de la rigidez arterial se utiliza cada vez más como herramienta en la evaluación clínica de pacientes con CVD. Se ha demostrado que el índice de aumento (Aix) es un fuerte marcador de riesgo independiente para la enfermedad de las arterias coronarias y se ha demostrado que la velocidad de la onda del pulso (PWV) es un predictor independiente de morbilidad y mortalidad en pacientes hipertensos [46, 47]. Los estudios epidemiológicos y clínicos han demostrado que un aumento en la rigidez arterial es un marcador independiente de CVD en pacientes con insuficiencia renal terminal y aquellos con hipertensión [46, 48, 49]. La PWV carótido-femoral se considera el estándar dorado en la medición directa de la rigidez arterial [50, 51].

Wu et al., PNAS, vol. 101, no. 18, páginas 7094-7099, 2004 describe un enfoque dietético para atenuar el estrés oxidativo, la hipertensión y la inflamación en el sistema cardiovascular utilizando el modelo de rata espontáneamente hipertensiva propensa a un derrame cerebral.

Banigesh et al., American Journal of Hypertension vol. 22, no. Supl. 1, página 16, 2009 describe un estudio de un inductor enzimático de fase 2 en la dieta en un modelo de rata de ratas propensas a un accidente cerebrovascular espontáneamente hipertensivas (SHRsp).

Aspectos resumidos de la invención actual

Se ha encontrado que una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato), tal como el descrito en el documento WO99/052345, puede usarse para promover la salud del corazón, más particularmente en el tratamiento o prevención de un trastorno, más particularmente en el tratamiento o prevención de un trastorno cardiovascular. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la inclusión de cantidades suficientes de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (por ejemplo, brócoli con alto contenido de glucosinolato) como se define en el presente documento, o porciones del mismo, en la dieta de personas o animales que lo necesitan, o mediante la administración a tales personas o animales de medicamentos preparados a partir de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (por ejemplo, brócoli con alto contenido de glucosinolato) o porciones de la misma.

Se describen en el presente documento plantas de verduras crucíferas con alto contenido de glucosinolato (tales como plantas de brócoli con alto contenido de glucosinolato) modificadas para aumentar el nivel del 3-metiltiopropil (3-MTP) glucosinolato y plantas de verduras crucíferas con alto contenido de glucosinolato (tal como plantas de brócoli con alto contenido de glucosinolato) que comprenden niveles elevados de 3-MTP-glucosinolato en comparación con plantas de control no modificadas.

Aspectos detallados de la presente invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una verdura crucífera (*Brassicaceae*) que tiene un glucosinolato y/o al menos un derivado del mismo en una cantidad de 20 a 100 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco para usar en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular (CVD) o para su uso en la promoción de la salud del corazón y/o cardiovascular en un sujeto humano, en el que al menos un derivado del mismo se selecciona de al menos uno de: 4-metilsulfonilbutil glucosinolato, 3-metilsulfonilpropil glucosinolato, 4-metiltiobutil glucosinolato, 3-metiltiopropil glucosinolato, sulforafano, erucina, sativina, iberina, β -feniletilisotiocianato (PE-ITC), 3-metiltiopropil isotiocianato en los que la verdura crucífera (*Brassicaceae*) es brócoli y dichos sujetos se definen como aquellos cuyo riesgo de CVD a 10 años es del 10% al 20%.

En otro aspecto, se proporciona una verdura crucífera (*Brassicaceae*) que tiene un glucosinolato y/o al menos un derivado del mismo en una cantidad de 20 a 100 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco para usar en la mejora o el control del nivel de colesterol en suero de mamífero, o tratar o prevenir la hipercolesterolemia en un sujeto humano en el que el al menos un derivado del mismo se selecciona de al menos uno de: 4-metilsulfonilbutil glucosinolato, 3-metilsulfonilpropil glucosinolato, 4-metiltiobutil glucosinolato, 3-metiltiopropil glucosinolato, sulforafano, erucina, sativina, iberina, β -feniletilisotiocianato (PE-ITC), 3-metiltiopropil isotiocianato en los que la verdura crucífera (*Brassicaceae*) es brócoli y dichos sujetos se definen como aquellos cuyo riesgo de CVD a 10 años es del 10% al 20%.

Como se usa en el presente documento, el término "verdura crucífera" significa una verdura crucífera fresca y/o una verdura crucífera procesada y/o un extracto de una verdura crucífera.

En la presente invención, los inventores han demostrado que al menos la presión arterial sistólica, la presión arterial diastólica, el colesterol total, el colesterol LDL en mmol/L y el riesgo de enfermedad cardiovascular (% de eventos en los próximos diez años) pueden reducirse significativamente administrando una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) en comparación con las verduras crucíferas que comprenden niveles estándar de tratamientos con glucosinolato y/o de control (guisante).

En una realización, el término "verdura crucífera" como se usa en el presente documento significa una verdura crucífera fresca.

En una realización adicional, el término "verdura crucífera" como se usa en el presente documento significa una verdura crucífera procesada.

5 En otra realización, el término "verdura crucífera" como se usa en el presente documento significa un extracto de una verdura crucífera.

El término "verdura crucífera fresca" como se usa en el presente documento significa una verdura crucífera o parte de la misma, ya sea que se consuma cruda o cocida por cualquier método adecuado.

10 El término "verdura crucífera procesada" como se usa en el presente documento significa una verdura crucífera que se ha sometido al menos a una etapa de procesamiento adicional tal como, por ejemplo, florecimiento, congelación rápida individual (IQF), maceración, homogeneización, secado, congelación, compactación. etc.

15 "Un extracto de una verdura crucífera" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia o mezcla de sustancias obtenidas mediante la extracción total o parcial de una verdura crucífera fresca como se define en el presente documento y/o mediante la extracción total o parcial de una verdura crucífera procesada como se define en el presente documento. La extracción puede llevarse a cabo utilizando un disolvente tal como etanol o agua. En una realización, preferiblemente el extracto es un extracto acuoso. En una realización, de manera adecuada, el extracto comprende al menos los glucosinolatos de la verdura crucífera.

20 Como se usa en el presente documento, el término "brócoli" como se usa en el presente documento significa brócoli fresco y/o brócoli procesado y/o un extracto de brócoli.

25 En una realización, el término "brócoli" como se usa en el presente documento significa brócoli fresco.

En una realización adicional, el término "brócoli" como se usa en el presente documento significa brócoli procesado.

30 En otra realización, el término "brócoli" como se usa en el presente documento significa un extracto de brócoli.

El término "brócoli fresco" como se usa en el presente documento significa inflorescencias y tallos de brócoli consumidos crudos o cocidos por cualquier método adecuado.

35 El término "brócoli procesado" como se usa en el presente documento significa brócoli que se ha sometido a al menos una etapa de procesamiento adicional tal como, por ejemplo, florecimiento, congelación rápida individual (IQF), maceración, homogeneización, secado, congelación, compactación, etc.

40 "Un extracto de brócoli" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia o mezcla de sustancias obtenidas mediante extracción total o parcial de brócoli fresco como se define en el presente documento y/o mediante la extracción total o parcial del brócoli procesado como se define en el presente documento. La extracción puede llevarse a cabo utilizando un disolvente tal como etanol o agua. En una realización, preferiblemente el extracto es un extracto acuoso. En una realización, de manera adecuada, el extracto comprende al menos los glucosinolatos del brócoli.

45 Como se usa en el presente documento, los términos "administrar", "administración", "tratar" o "tratado" incluyen poner a disposición para el consumo, opcionalmente en un régimen dietético establecido en una dosis adecuada para lograr un efecto fisiológico deseado, cantidades adecuadas de dicha verdura crucífera con alto contenido de glucosinato (tal como el brócoli alto en glucosinato), como se define en el presente documento, que incluye una verdura crucífera alto en glucosinato fresco o porciones del mismo (tal como el brócoli fresco alto en glucosinato o porciones del mismo), una verdura crucífera con alto contenido de glucosinato procesado o porciones del mismo (tales como brócoli procesado con alto contenido de glucosinato o porciones del mismo), extractos de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinato (tal como extractos de brócoli con alto contenido de glucosinato), o medicamentos preparados a partir de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinato).

55 Sin desear limitarse a ninguna teoría, los inventores creen que uno o más compuestos fitoquímicos y/o al menos un derivado de los mismos están presentes en la verdura crucífera con alto contenido de glucosinato (por ejemplo, brócoli con alto contenido de glucosinato) para su uso en los métodos y usos de la presente invención actúan, modificando una proteína de señalización extracelular. Se entenderá que esto no se considera el modo exclusivo de operación del brócoli descrito en este documento con el propósito de tratar o prevenir enfermedades cardiovasculares.

60 Como se usa en este documento, la referencia a una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinato) y/o al menos un derivado del mismo, se refiere al brócoli que tiene un mayor nivel de al menos un compuesto fitoquímico seleccionado de una lista que comprende: 4-metilsulfinilbutil glucosinato, 3-metilsulfinilpropil glucosinato, 4-metiltiobutil glucosinato; 3-metilpropil glucosinato, sulforafano, erucina, sativina, iberina, β -feniletilisotiocianato (PE-ITC), 3-metilpropil isotiocianato. Se

describe en el presente documento una composición que comprende una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo para usar en el manejo de la salud cardiovascular o la progresión de la enfermedad cardiovascular o mejorar la salud cardiovascular y el bienestar modulando una proteína de señalización extracelular. De manera adecuada la proteína de señalización puede ser, pero no se limita a, uno o más de, el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o insulina.

Se describe en el presente documento un método para controlar la salud cardiovascular o la progresión de la enfermedad cardiovascular o mejorar la salud y el bienestar cardiovascular de un sujeto, método que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo de modo que dichas una o más proteínas de señalización extracelulares se modifiquen covalentemente.

Se describe en el presente documento una composición que comprende una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo para usar en la reducción de los niveles de marcadores inflamatorios y proteínas asociadas con inflamación, tal como por ejemplo la proteína C reactiva (CRP) y las citocinas asociadas con la inflamación, incluidas, entre otras, la interleucina 6 (IL-6).

Se describe en el presente documento un método para reducir los niveles de marcadores inflamatorios y proteínas asociadas con inflamación (tal como, por ejemplo, CRP y citocinas asociadas con inflamación, que incluyen pero no se limitan a IL-6), método que comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva de una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (TAL como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo de manera que dichas una o más proteínas de señalización extracelular se modifiquen covalentemente. Se describe en el presente documento una composición que comprende una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo para usar en la mejora o el control del nivel de colesterol en suero de un mamífero, tal como el nivel de colesterol total (TC) y/o el nivel de lipoproteína-colesterol de baja densidad (colesterol LDL). En particular, el nivel de colesterol en suero de mamíferos, por ejemplo del colesterol total (TC) y/o del colesterol LDL puede reducirse o evitarse su aumento (es decir, mantenerse a niveles saludables), por ejemplo, en comparación con el nivel en un sujeto no tratado con una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo.

Se describe en el presente documento un método para mejorar o controlar el nivel de colesterol en suero de un mamífero (tal como el nivel de colesterol total (TC) y/o el nivel de colesterol LDL) cuyo método comprende consumir una cantidad efectiva de una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo de modo que dichas una o más proteínas de señalización extracelular se modifiquen covalentemente. En particular, el nivel de colesterol en suero de mamíferos, por ejemplo del colesterol total (TC) y/o el colesterol LDL pueden reducirse o evitarse que aumenten (es decir, se mantengan en niveles saludables), por ejemplo en comparación con el nivel en un sujeto no tratado con una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo.

Se describe en el presente documento una composición que comprende una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo para usar en el tratamiento o prevención de la inflamación cardiovascular.

Se describe en el presente documento una composición que comprende una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo para usar en la reducción del riesgo cardiovascular.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para reducir el riesgo cardiovascular en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición que comprende una verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato (tal como un brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo para usar en la reducción de triglicéridos en suero totales (TG).

Como se usa en el presente documento, en su sentido más amplio, el término trastorno cardiovascular o enfermedad cardiovascular se refiere a cualquier trastorno o enfermedad del corazón o vasculatura. Los términos trastorno cardiovascular y enfermedad cardiovascular se usan en el presente documento de manera intercambiable. Más específicamente, el término trastorno cardiovascular como se usa en el presente documento se refiere a un trastorno crónico que afecta el corazón o la vasculatura que tiene una etiología compleja seleccionada, por ejemplo, de uno o más de: edad, dieta, factores ambientales y/o predisposición genética. Ejemplos de tales trastornos son: angina, arteriosclerosis, cardiomiopatía o inflamación cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de la arteria

coronaria, enfermedad de la arteria carótida, ataque cardíaco (trombosis coronaria, infarto de miocardio), enfermedad de la arteria periférica, accidente cerebrovascular.

Aspectos preferibles

5 La verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato de la presente invención puede proporcionarse como un brócoli con alto contenido de glucosinolato como se describe en los documentos WO99/52345 y PCT/GB2009/001648.

10 Alternativamente, la verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato puede ser una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato distinto del brócoli, cuya verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato puede prepararse de acuerdo con las enseñanzas descritas en los documentos WO99/52345 y PCT/GB2009/001648.

15 De manera adecuada, la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) para usar en la presente invención comprende mayores niveles de uno o más glucosinolatos y/o uno o más isotiocianatos.

20 En una realización, la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo para usar en la presente invención comprende mayores niveles de uno o más de los siguientes compuestos: 4-metilsulfinilbutilo glucosinolato (MSB), 3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP), 4-metiltiobutil glucosinolato; 3-metiltiopropil glucosinolato.

25 En una realización, la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo para usar en la presente invención comprende mayores niveles de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB) y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP).

30 Preferiblemente, la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo para usar en la presente invención tiene un nivel de 4-metilsulfinilbutilo glucosinolato (MSB) que tiene un nivel de 2 a 3 veces del 4-metilsulfinilbutilo glucosinolato (MSB) encontrado en una verdura crucífera estándar (tal como un brócoli estándar) cultivado en condiciones similares.

35 Preferiblemente, la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo para usar en la presente invención tiene un nivel de 4-3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP) que es 2 a 3 veces el nivel de 4-3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP) encontrado en una verdura crucífera estándar (tal como un brócoli estándar) cultivado en condiciones similares.

40 En una realización, la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo para usar en la presente invención comprende mayores niveles de uno o más de los siguientes compuestos: sulforafano, erucina, sativina, iberina, β -feniletilisotiocianato (PE-ITC), 3-metiltiopropil isotiocianato.

45 De manera adecuada, dicha verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) y/o un derivado del mismo se puede proporcionar en un régimen dietético establecido a una dosis adecuada que se sabe que produce un efecto fisiológico deseado.

50 En una realización, la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) y/o sus derivados se consume en una cantidad para proporcionar glucosinolato en una cantidad de aproximadamente 60-140 micromol/día, de manera adecuada 70-140 micromol/día, de manera adecuada 75-140 micromol/día, de manera adecuada 80-135 micromol/día, de manera adecuada 90-135 micromol/día. De manera adecuada el brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato y/o un derivado del mismo se consume en una cantidad para proporcionar glucosinolato en una cantidad de aproximadamente 20 micromol/día o más, 30 micromol/día o más, 40 micromol/día o más, 50 micromol/día o más, 60 micromol/día o más, 75 micromol/día o más, de manera adecuada aproximadamente 79 micromol/día o más, de manera adecuada aproximadamente 100 micromol/día, de manera adecuada aproximadamente 130 micromol/día, de manera adecuada aproximadamente 140 micromol/día.

55 Preferiblemente, la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) y/o un derivado del mismo tiene un nivel de glucosinolato que es de 2 a 3 veces el nivel que se encuentra en una verdura crucífera estándar (tal como un brócoli estándar) cultivado en condiciones similares. La verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) para uso en la presente invención comprende al menos un glucosinolato y/o al menos un derivado del mismo, en una cantidad de 20 a 100 micromol/g en peso seco. Preferiblemente, al menos aproximadamente 25 μ moles/g en peso seco, al menos aproximadamente 30 μ moles/g en peso seco, al menos aproximadamente 50 μ moles/g en peso seco o al menos aproximadamente 75 μ moles/g en peso seco.

60 De manera adecuada, en una realización, preferiblemente la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) de acuerdo con la presente invención tiene 4-metilsulfinilbutilo glucosinolato (MSB) y/o 3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP) en una cantidad de al menos 10 micromol/g en peso seco. Más preferiblemente al menos aproximadamente 14 μ moles/g en peso seco, al menos aproximadamente 16

µmoles/g en peso seco, al menos aproximadamente 20 µmoles/g en peso seco, al menos aproximadamente 25 µmoles/g en peso seco, al menos aproximadamente 30 µmoles/g en peso seco, al menos aproximadamente 50 µmoles/g en peso seco o al menos aproximadamente 75 µmoles/g en peso seco.

5 El término "modificación de una proteína de señalización extracelular" como se usa en el presente documento significa que altera la función de señalización natural de la proteína de señalización. El término "modificar" puede significar inhibir o mejorar la función de señalización de la proteína de señalización extracelular. En una realización, el término "modificación" significa inhibir la función de señalización de la proteína de señalización extracelular.

10 En una realización, preferiblemente el sujeto tiene un genotipo que incluye el gen de glutatión S-transferasa mu 1 (*GSTM1*) y/o el gen glutatión S-transferasa theta 1 (*GSTT1*) y/o el glutatión S-transferasa pi 1 (*GSTP1*) gen.

15 Los términos "reductor" o "reducido" y otras derivaciones de "reducir" como se usan en el presente documento significan que hay una disminución en el valor en un sujeto tratado con una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) de acuerdo con la presente invención en comparación con un sujeto que no ha sido tratado con una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato).

20 En una realización preferida, la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato es un brócoli con alto contenido de glucosinolato.

Derivados

25 El término derivado como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto presente en la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) que se deriva de un glucosinolato. En realizaciones preferidas, el derivado puede ser un isotiocianato. Los isotiocianatos son compuestos fitoquímicos que contienen azufre con la fórmula general R-NCS.

30 Los isotiocianatos se producen naturalmente como conjugados de glucosinolatos en verduras crucíferas.

Los isotiocianatos de interés particular en la presente invención incluyen los siguientes: 4-metilsulfinilbutilo (también conocido como sulforafano o SF); 4-metiltiobutilo (también conocido como erucina); 4-mercaptobutilo (también conocido como sativina); β-feniletilisotiocianato (PE-ITC); iberina (también conocida como IB) y 3-metiltiopropilo.

35 En una realización, se prevé que la erucina y el 3-metiltiopropilo pueden ser isotiocianatos particularmente preferidos solos o en combinación.

En una realización, el 3-metiltiopropilo es un isotiocianato preferido.

40 En otra realización, sativina puede ser el isotiocianato preferido.

En una realización, se prefiere 4-metilsulfinilbutilo (sulforafano).

Glucosinolatos

45 Los glucosinolatos son una clase de compuestos orgánicos que contienen azufre, nitrógeno y un grupo derivado de la glucosa. Se presentan como metabolitos secundarios de muchas plantas del orden Brassicales (especialmente en la familia *Brassicaceae*), tal como las verduras crucíferas.

50 Los glucosinolatos son aniones solubles en agua y pertenecen a los glucósidos. Cada glucosinolato contiene un átomo de carbono central que está unido a través de un átomo de azufre al grupo glicona (formando una cetoxima sulfatada) y a través de un átomo de nitrógeno a un grupo sulfato. Además, el carbono central está unido a un grupo lateral; diferentes glucosinolatos tienen diferentes grupos laterales.

55 Se sabe que alrededor de 120 glucosinolatos diferentes se producen naturalmente en las plantas.

Los glucosinolatos de acuerdo con la presente invención son preferiblemente alifáticos.

60 En la presente invención se prevé que uno o más de los siguientes glucosinolatos pueden ser importantes: 4-metilsulfinilbutil glucosinolato, 3-metilsulfinilpropil glucosinolato, 4-metiltiobutil glucosinolato y 3-metiltiopropil glucosinolato.

65 En una realización, el glucosinolato es preferiblemente 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB) y/ 3-metilsulfinilpropil o glucosinolato (MSP).

Verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato o brócoli con alto contenido de glucosinolato

De manera adecuada, los términos "verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolato" o "brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolato" significan una verdura crucífera o un cultivo de brócoli, respectivamente, con un mayor nivel de glucosinolatos en comparación con una variedad tradicional de esa verdura crucífera o de brócoli.

El término "alto contenido de glucosinolato" puede significar que la verdura crucífera (tal como el brócoli con alto contenido glucosinolato) y/o al menos un derivado del mismo tiene un nivel de 4-metilsulfinilbutilo glucosinolato (MSB) y/o de metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP) que es de 2 a 3 veces el nivel de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB) y/o metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP) que se encuentra en una verdura crucífera estándar (tal como un brócoli estándar) cultivado en condiciones similares.

De manera adecuada, el término "alto nivel de glucosinolato" puede significar que la verdura crucífera (tal como el brócoli) comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco. De manera adecuada, el término alto contenido de glucosinolato significa que la verdura crucífera (tal como el brócoli) comprende al menos aproximadamente 10 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 14 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 16 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 20 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 25 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 30 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 50 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 75 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco.

La verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede ser una como se describe en Mithen et al., *Theor. Appl. Genet.* (2003) 106, 727-734; Sarikamis et al., *Molecular Breeding* (2006) 18, 219-228, o en el documento WO 99/52345.

En una realización, la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede comprender 4-metilsulfinilbutil glucosinolato y/ 3-metilsulfinilpropilo o glucosinolato a concentraciones de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada de aproximadamente 14 y aproximadamente 100 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada de aproximadamente 16 y aproximadamente 100 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 100 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada de entre aproximadamente 30 y aproximadamente 100 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco.

Por ejemplo, el nivel de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato en una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) por ejemplo, puede estar entre aproximadamente 8 y aproximadamente 55 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada entre aproximadamente 10 y aproximadamente 55 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco. De manera adecuada el nivel de 4-metilsulfinilbutil glucosinolato en una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato), por ejemplo, puede ser de al menos aproximadamente 8 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 10 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 15 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco. Esto contrasta fuertemente con las verduras crucíferas (en particular el brócoli) disponibles en tiendas minoristas que generalmente tienen niveles de este glucosinolato en la región de 4-5 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco.

Por ejemplo, el nivel de 3-metilsulfinilpropil glucosinolato en una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato), por ejemplo, puede estar entre aproximadamente 1.5 y aproximadamente 10 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco. De manera adecuada, el nivel de 3-metilsulfinilpropilo glucosinolato en una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato), por ejemplo, puede tener al menos aproximadamente 1.5 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 2 $\mu\text{moles/g}$ de peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 3 $\mu\text{moles/g}$ de peso seco, adecuadamente al menos aproximadamente 4 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 5 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco. Esto contrasta fuertemente con las verduras crucíferas (como el brócoli) disponibles en tiendas minoristas que generalmente tienen niveles de este glucosinolato en la región de 0.5-1 $\mu\text{moles/g}$ de peso seco.

En una realización, los niveles de glucosinolatos en la verdura crucífera (tal como el brócoli) se determinan examinando todas las partes comestibles de la planta, tales como las inflorescencias y los tallos comestibles para el brócoli. En otra realización, el nivel de glucosinolatos en la verdura crucífera (tal como el brócoli) se determina examinando solo las hojas o solo las inflorescencias o solo las raíces.

Por ejemplo, cuando la verdura crucífera es una en la que las hojas se comen principalmente, como la rúcula, la ensalada de rúcula, jaramago, rúcula silvestre, col rizada o repollo, luego se determina preferiblemente el nivel de glucosinolatos en la verdura crucífera examinando solamente las hojas.

Cuando la verdura crucífera es una en la que las inflorescencias se comen principalmente, tales como el brócoli, las coles de Bruselas o la coliflor, por ejemplo, entonces preferiblemente el nivel de glucosinolatos en la verdura crucífera se determina examinando solo las inflorescencias.

5 Cuando la verdura crucífera es una en la que las raíces se comen principalmente, tales como el rábano o el nabo, por ejemplo, entonces preferiblemente el nivel de glucosinolatos en la verdura crucífera se determina examinando solo la parte comestible de la raíz.

10 Preferiblemente, son al menos las inflorescencias de brócoli (o solo las inflorescencias de brócoli) las que se usan en la presente invención.

15 El término "alto nivel de glucosinolatos" puede significar que las inflorescencias de verduras crucíferas o raíces comestibles u hojas comestibles contienen el alto nivel de glucosinolatos, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco. De manera adecuada el término alto contenido de glucosinolatos significa que las inflorescencias o raíces u hojas de verduras crucíferas comprenden al menos aproximadamente 10 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 14 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, al menos aproximadamente 16 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 20 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 25 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 30 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 50 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada a menos aproximadamente 75 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco.

25 El término "alto nivel de glucosinolatos" puede significar que las inflorescencias de brócoli contienen el alto nivel de glucosinolatos, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco. De manera adecuada el término alto contenido de glucosinolatos significa que las inflorescencias de brócoli comprenden al menos aproximadamente 10 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 14 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, al menos aproximadamente 16 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 20 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 25 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 30 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 50 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco, de manera adecuada al menos aproximadamente 75 $\mu\text{moles/g}$ en peso seco.

30 Se entenderá que el término verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolatos (tal como el brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolatos) se refiere no solo al material vegetal en su estado natural fresco, es decir, como cabezas enteras, tales como inflorescencias de brócoli y tallos, sino también a la verdura crucífera (tal como el brócoli) cuando ha sido sometida a una o más etapas de procesamiento adicionales tales como, por ejemplo, floración, congelación rápida individual (IQF), maceración, homogeneización, secado, congelación, compactación etc.

35 Además, será evidente que la verdura crucífera que tiene un alto nivel de glucosinolatos (tal como el brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolatos) puede combinarse con una o más de otras verduras y/o productos vegetales, incluyendo uno o más verduras crucíferas adicionales con alto contenido de glucosinolatos.

40 Verduras crucíferas

45 La persona experta sabrá que se conocen plantas que comprenden glucosinolatos distintos del brócoli con alto contenido de glucosinolatos. El glucosinolatos está presente en plantas del orden Capparales. Este orden incluye alrededor de 18 familias, de las cuales *Brassicaceae* y *Capparaceae* son las dos más grandes.

Las verduras crucíferas (por ejemplo, cultivos de verduras crucíferas) de la familia *Brassicaceae* que contienen glucosinolatos incluyen los siguientes cultivos de verduras crucíferas:

- 50
- brócoli
 - rúcula (incluyendo *Sisymbrium officinales*; *Eruca sativa* (Ensalada de rúcula), *Diplotaxis eruroides* (jaramago), *Diplotaxis tenuifolia* (rúcula silvestre) y *Bunias orientalis* (rúcula turca)); y
 - berros (incluidos *Rorripa nasturtium aquaticum* y *Nasturtium officinale*).
 - coliflor,

55

 - col rizada,
 - nabo,
 - coles,
 - coles de Bruselas,
 - repollo y

60

 - rábano.

El brócoli que tiene un alto nivel de glucosinolatos se puede combinar con una o más verduras crucíferas y/o productos de verduras crucíferas, incluyendo uno o más cultivos de verduras crucíferas.

65 Extracto

Se describe en el presente documento una composición para usar en la presente invención que comprende un extracto de la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato), cuyo extracto también tiene un alto nivel de glucosinolato.

Preferiblemente, el extracto es una sustancia o mezcla de sustancias obtenidas mediante la extracción total o parcial de una verdura crucífera fresca con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) como se define en el presente documento (incluida una verdura crucífera cruda (tal como el brócoli crudo)) o extrayendo todo o parte de una verdura crucífera procesada (tal como el brócoli procesado) como se define en el presente documento.

La extracción puede llevarse a cabo utilizando un disolvente tal como etanol o agua. En una realización, preferiblemente el extracto es un extracto acuoso.

Individuo/sujeto

Como se usa en el presente documento, los términos "individuo" y "sujeto" se refieren a vertebrados, particularmente miembros de la especie mamífera. El término incluye, entre otros, animales domésticos, animales para deporte, primates y seres humanos. En una realización, preferiblemente el sujeto es un ser humano.

Usos terapéuticos

La verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede usarse en el tratamiento o prevención de uno o más de los siguientes: angina, arteriosclerosis, miocardiopatía o inflamación cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad de la arteria carótida, ataque cardíaco (trombosis coronaria, infarto de miocardio), presión arterial alta/hipertensión, hipercolesterolemia/hiperlipidemia, enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular.

Se puede usar una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) en el tratamiento o prevención de la arteriosclerosis.

Se describe en el presente documento una composición que comprende una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) para su uso en el tratamiento y/o prevención de angina, arteriosclerosis, miocardiopatía o inflamación cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad coronaria, enfermedad de la arteria carótida, ataque cardíaco (trombosis coronaria, infarto de miocardio), presión arterial alta/hipertensión, hipercolesterolemia/hiperlipidemia, enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular.

Se describe en el presente documento un método para tratar y/o prevenir: angina, arteriosclerosis, miocardiopatía o inflamación cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad de la arteria carótida, ataque cardíaco (trombosis coronaria, infarto de miocardio), presión arterial alta/hipertensión, enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato).

Se describe en el presente documento una composición que comprende uno o más compuestos fitoquímicos y/o al menos un derivado de los mismos (en particular uno o más glucosinolatos y/o isotiocianatos) o una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) para su uso en el mejoramiento o control del nivel de colesterol en suero de mamífero en el que el compuesto fitoquímico y/o derivado de los mismos o la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) modifica una proteína de señalización extracelular. En particular, el nivel de colesterol total (TC) y/o colesterol LDL se puede reducir o evitar que aumente (es decir, se mantenga a niveles saludables), por ejemplo, en comparación con el nivel en un sujeto no tratado con compuestos fitoquímicos y/o al menos un derivado o la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato).

Se describe en el presente documento un método para mejorar o controlar el nivel de colesterol en suero de mamífero que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición (preferiblemente una composición farmacéutica) que comprende uno o más compuestos fitoquímicos y/o al menos un derivado de los mismos (en particular uno o más glucosinolatos y/o isotiocianatos) o una cantidad efectiva de verduras crucíferas con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) en el que el compuesto fitoquímico y/o un derivado del mismo o verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) modifica una proteína de señalización extracelular.

Trastorno cardiovascular (CVD)

Como se usa en este documento, en su sentido más amplio, el término trastorno cardiovascular o enfermedad cardiovascular se refiere a cualquier trastorno o enfermedad del corazón o vasculatura. Los términos trastorno cardiovascular y enfermedad cardiovascular se usan en el presente documento de manera intercambiable.

5 Más específicamente, el término trastorno cardiovascular como se usa en el presente documento se refiere a un trastorno crónico que afecta el corazón o la vasculatura que tiene una etiología compleja seleccionada, por ejemplo, de una o más de edad, dieta, factores ambientales y/o predisposición genética. Ejemplos de tales trastornos son: angina, arteriosclerosis, cardiomiopatía o inflamación cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad de la arteria carótida, ataque cardíaco (trombosis coronaria, infarto de miocardio),
10 enfermedad de la arteria periférica, accidente cerebrovascular.

El término "prevenir un trastorno cardiovascular" puede significar que uno o más de los factores de riesgo cardiovascular (como se define a continuación) se tratan y/o previenen y/o reducen en un sujeto al que se le administra la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato), es decir, en comparación con un sujeto o sujetos a los que no se les ha administrado la verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como el brócoli con alto contenido de glucosinolato) de acuerdo con la presente invención.

20 Factores de riesgo cardiovascular

La lista a continuación define lo que generalmente se consideran que son factores de riesgo cardiovascular, es decir, factores que ponen a una persona, en forma singular o colectiva en riesgo de desarrollar CVD o de tener un evento cardiovascular (CV).

25	Edad	La tabla se basa en edades de 49-69 años; esto da como resultado una ligera subestimación del riesgo en menores de 70 años.
	Sexo	Los hombres y las mujeres tienen diferentes niveles de riesgo.
	Presión arterial sistólica	≥140 mm de Hg * ≥160 mm de Hg **
	Presión arterial diastólica	≥90 mm de Hg * ≥100 mm de Hg **
30	Colesterol total	> 240 mg/dL (6.2 mmol/L) **
	Colesterol HDL	<40 mg/dL en hombres <50 mg/dL en mujeres (1.0 mmol/L)* (1.2 mmol/L)*
	Fumador	Se debe considerar la exposición al tabaco
	Glucosa	≥6.1 mmol/L - <7 mmol/L (= glucosa alterada en ayunas) *
35	Hipertrofia del ventrículo izquierdo (LHV)	Definir LVH en ECG (esto no se verificará en nuestros voluntarios).
	Obesidad central:	Caucásicos: hombres ≥102 cm *mujeres: ≥88 cm *Asiáticos: hombres ≥90 cm *mujeres: ≥ 80cm *
	De origen en el sur de Asia	En caso afirmativo, el riesgo aumenta en un factor de 1.5
40	Antecedentes familiares de CVD	Si hay antecedentes familiares significativos, el riesgo aumenta en un factor de 1.5
	Triglicéridos en suero	≥1.7 mmol/L*

* El voluntario tiene una probabilidad de caer en el grupo de riesgo del 10-20%

** El voluntario tiene una probabilidad de caer en el grupo de riesgo > 20%

45 Los factores de riesgo cardiovascular forman los parámetros integrales en el evaluador de riesgo cardíaco, por ejemplo, un algoritmo que calcula el riesgo de una persona de desarrollar CVD a partir de un conjunto de valores biológicos y fisiológicos obtenidos de ellos [58].

Se puede encontrar una calculadora de riesgo cardiovascular adecuada en <http://www.patient.co.uk/showdoc/40000133/> y también se imparte en una edición especial de Heart (véase "JBS2: Joint British Societies' Guidelines on Prevention of Cardiovascular Disease in Clinical Practice" – preparado por la British Cardiac Society, British Hypertension Society, Diabetes UK, HEART KU, Primary Care Cardiovascular Society, The Stroke Association (Heart 2005, Vol 91: v1-v52; doi 10.1136/hrt.2005.079988 (Edición especial)). El algoritmo utilizado en JBS2 y más detalles con respecto al evaluador de riesgo cardiovascular se pueden encontrar en Anderson et al., Circulation 1991; 83: 356-62.

55 Las Figuras 2a y 2b en el presente documento muestran gráficos de predicción de riesgo cardiovascular que se pueden usar en lugar de o junto con el evaluador de riesgos enseñado anteriormente. Estos cuadros se describen en una edición especial de Heart (véase "JBS2: Joint British Societies' Guidelines on Prevention of Cardiovascular Disease in Clinical Practice" - preparado por la British Cardiac Society, British Hypertension Society, Diabetes UK, HEART KU, Primary Care Cardiovascular Society, The Stroke Association (Heart 2005, Vol 91: v1-v52; doi 10.1136/hrt.2005.079988 (Edición especial)). Estas tablas son para estimar el riesgo de enfermedad cardiovascular (CVD) (infarto de miocardio no mortal y accidente cerebrovascular, coronario y muerte por accidente cerebrovascular y nueva angina de pecho) para personas que aún no han desarrollado enfermedad coronaria (CHD) u otra enfermedad aterosclerótica mayor.

- 5 Para estimar el riesgo total de 10 años de un individuo de desarrollar CVD usando los cuadros de predicción de riesgo cardiovascular que se muestran en las Figuras 2a y 2b, se elige la tabla para el sexo del sujeto, así como el periodo de tiempo como fumador y la edad. Dentro de este cuadrado, el nivel o riesgo se define de acuerdo con el punto en el que se encuentran las coordenadas de la presión arterial sistólica y la relación entre el colesterol total y el colesterol HDL. Si no hay un resultado de colesterol HDL disponible, supóngase que este es 1.0 mmol/L y la escala de lípidos se puede usar solo para el colesterol total.
- 10 Los individuos de mayor riesgo se definen como aquellos cuyo riesgo de CVD a 10 años excede el 20%, que es aproximadamente equivalente a un riesgo de CHD > 15% durante el mismo periodo. El cuadro también ayuda a identificar a las personas cuyo riesgo de CVD a 10 años aumenta moderadamente en el intervalo del 10-20% y aquellas en las que el riesgo es inferior al 10% durante 10 años. La presión arterial inicial y el primer colesterol total aleatorio (no en ayunas) y colesterol HDL pueden usarse para estimar un riesgo individual.
- 15 Los expertos en la técnica conocen calculadoras alternativas de riesgo cardiovascular. A modo de ejemplo, solo QRISK es un puntaje de riesgo de enfermedad cardiovascular diseñado específicamente para la población del Reino Unido y ASSIGN está diseñado para una población escocesa (véase, por ejemplo, Hippisley-Cox et al BMJ (doi: 10.1136/bmj.39261.471806.55) páginas 1-12). Un experto en la materia conocerá otras calculadoras de riesgo cardiovascular adecuadas.
- 20 Los factores de riesgo cardiovascular que pueden modificarse mediante la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) se seleccionan de uno o más del grupo que consiste en:
- 25
- presión arterial sistólica,
 - presión arterial diastólica,
 - colesterol total,
 - colesterol LDL,
 - rigidez arterial,
- 30
- inflamación,
 - nivel de IL6,
 - nivel de proteína C reactiva (CRP).
- 35 La inflamación y los niveles elevados de IL6 y CRP juegan un papel en el aumento del riesgo de CVD. En una realización, la inflamación puede evaluarse midiendo los niveles de IL6 y/o CRP.
- En una realización de la presente invención, el uso de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato puede reducir los niveles de inflamación y/o marcadores de inflamación y/o IL6 y/o CRP.
- 40 La rigidez arterial se ha establecido como un predictor independiente de CVD. La rigidez arterial se puede determinar midiendo la velocidad de la onda del pulso (PWV) o el índice de aumento (Aix). Además, se ha demostrado que el índice de aumento (Aix) es un fuerte marcador de riesgo independiente para la enfermedad de las arterias coronarias y se ha demostrado que la velocidad de la onda del pulso (PWV) es un predictor independiente de morbilidad y mortalidad en pacientes hipertensos.
- 45 En una realización de la presente invención, el uso de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato puede reducir la rigidez arterial y/o las mediciones de PWV y/o las mediciones de Aix.
- 50 Preferiblemente, uno o más de la presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, colesterol LDL (es decir, colesterol total menos colesterol HDL y menos triglicéridos en suero) o colesterol total es/se reducen en sujetos tratados con una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato), en comparación con los sujetos de control.
- 55 De manera adecuada, la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir la presión arterial sistólica en el sujeto tratado, de manera adecuada la presión arterial sistólica puede reducirse a <160 mm de Hg, preferiblemente a <140 mm de Hg.
- 60 De manera adecuada la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir la presión arterial sistólica en el sujeto tratado en aproximadamente 1-20 mm de Hg, de manera adecuada en aproximadamente 2-10, de manera adecuada en aproximadamente 4-10 mm de Hg, de manera adecuada por aproximadamente 4-6 mm de Hg. De manera adecuada la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir la presión arterial sistólica en el sujeto tratado en al menos aproximadamente 3 mm de Hg, de manera adecuada en al menos aproximadamente 4 mm de Hg, de manera adecuada en al menos

aproximadamente 5 mm de Hg, de manera adecuada aproximadamente 6 mm de Hg, de manera adecuada aproximadamente 10 mm de Hg.

5 De manera adecuada, la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir la presión arterial diastólica en el sujeto tratado, de manera adecuada la presión arterial diastólica puede reducirse a <100 mm de Hg, preferiblemente a <90 mm de Hg.

10 De manera adecuada la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir la presión arterial diastólica en el sujeto tratado en aproximadamente 1-20 mm de Hg, de manera adecuada en aproximadamente 2-10, de manera adecuada en aproximadamente 3-10 mm de Hg, de manera adecuada en aproximadamente 3-5 mm de Hg. De manera adecuada la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir la presión arterial diastólica en el sujeto tratado en al menos aproximadamente 2 mm de Hg, 3 mm de Hg, de manera adecuada en al menos aproximadamente 4 mm de Hg, de manera adecuada en al menos aproximadamente 5 mm de Hg, de manera adecuada en aproximadamente 6 mm de Hg, de manera adecuada en aproximadamente 10 mm de Hg.

20 De manera adecuada la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir el colesterol total en el sujeto tratado, de manera adecuada el colesterol total puede reducirse a <240 mg/dL (6.2 mmol/L).

25 De manera adecuada la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir el colesterol total en el sujeto tratado en aproximadamente 0.2-3.0, de manera adecuada en aproximadamente 0.3-1.0, de manera adecuada en aproximadamente 0.3-0.6 mmol/L, de manera adecuada en aproximadamente 0.4-0.5 mmol/L. De manera adecuada la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir el colesterol total en el sujeto tratado en al menos aproximadamente 0.2, tal como en al menos aproximadamente 0.3, tal como en al menos aproximadamente 0.4, tal como en al menos aproximadamente 0.5 mmol/L.

30 De manera adecuada la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir el colesterol LDL en el sujeto tratado, de manera adecuada el colesterol LDL puede reducirse a < 3.5 mmol/L (para los hombres) o a < 3.3 mmol/L (para las mujeres).

35 De manera adecuada la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir el colesterol LDL en el sujeto tratado en aproximadamente 0.1-1.0 mmol/L, de manera adecuada en aproximadamente 0.2-0.7 mmol/L, de manera adecuada en aproximadamente 0.2-0.5 mmol/L, de manera adecuada en aproximadamente 0.3-0.4 mmol/L. De manera adecuada la administración de una verdura crucífera con alto contenido de glucosinolato (tal como un brócoli con alto contenido de glucosinolato) puede reducir el colesterol LDL en el sujeto tratado en al menos aproximadamente 0.2 mmol/L, de manera adecuada en al menos aproximadamente 0.3 mmol/L, de manera adecuada en al menos aproximadamente 0.4 mmol/L, de manera adecuada en al menos aproximadamente 0.5 mmol/L.

45 En un aspecto de la presente invención, el uso de verduras crucíferas con alto contenido de glucosinolato de acuerdo con la presente invención conduce a una reducción general del riesgo de CVD (es decir, el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular) al moderar (usualmente reduciendo) los factores de riesgo individuales (tales como el nivel de colesterol LDL, el nivel de colesterol total, la presión arterial sistólica y/o la presión arterial diastólica) utilizados en la evaluación del riesgo de CVD.

50 **Hiperlipidemia**

La hiperlipidemia es la condición de niveles anormalmente elevados de cualquiera o todos los lípidos y/o lipoproteínas en la sangre.

55 Los lípidos (moléculas solubles en grasa) se transportan en una cápsula de proteína, y el tamaño de esa cápsula, o lipoproteína, determina su densidad. La densidad de lipoproteínas y el tipo de apolipoproteínas que contiene determina el destino de la partícula y su influencia en el metabolismo.

60 Las anomalías de lípidos y lipoproteínas son comunes en la población general, y se consideran un factor de riesgo modificable para la enfermedad cardiovascular debido a su influencia en la aterosclerosis.

Hipercolesterolemia

65 La hipercolesterolemia (literalmente: colesterol alto en sangre) es la presencia de altos niveles de colesterol en la sangre. Es un trastorno metabólico que puede contribuir a la enfermedad cardiovascular. Está estrechamente relacionado con los términos "hiperlipidemia" (niveles elevados de lípidos en la sangre).

Hipertensión/presión arterial alta

La hipertensión o presión arterial alta es una afección médica crónica en la que la presión arterial sistémica está elevada. Es lo opuesto a la hipotensión. Se clasifica como primaria (esencial) o secundaria.

La hipertensión persistente es uno de los factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares, que incluyen accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca y aneurisma arterial.

La invención se describirá ahora, solo a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

Figuras

La Figura 1 muestra un resumen del estudio realizado para determinar el efecto de la administración de glucosinolatos en los factores de riesgo asociados con la CVD.

La Figura 2 muestra el cuadro de predicción de riesgo de CVD de las Joint British Societies para hombres no diabéticos.

La Figura 3 muestra un resumen del protocolo de detección realizado, incluidos los detalles de las muestras tomadas. La Figura 4 muestra el metabolismo del 4-metilsulfonilbutil glucosinolato y sulforafano. Al ingresar a los enterocitos, el sulforafano (SF) se conjuga rápidamente con glutatión, se exporta a la circulación sistémica y se metaboliza a través de la vía del ácido mercaptúrico. Dentro del entorno de bajo nivel de glutatión del plasma, el conjugado SF-glutatión puede escindirse, posiblemente mediado por *GSTM1*, lo que conduce a la circulación de SF libre en el plasma. Este SF libre puede modificar las proteínas plasmáticas, incluidas las moléculas de señalización, tales como TGF β , EGF e insulina.

La Figura 5 muestra el LDA de un conjunto independiente de datos de microarreglos de la próstata.

Análisis discriminante lineal (LDA) utilizando el tejido de próstata TURP benigno (B) y maligno (M) (resección transuretral de la próstata) para este estudio como muestras de entrenamiento para clasificar las muestras de células de próstata epiteliales microdisecionadas capturadas con láser (LCD) (acceso GEO: GDS1439), que consiste en muestras benignas (Be), cáncer primario (PCa) y cáncer metastásico (MCa). El LDA se realizó en una lista de genes que distinguía las muestras de TURP benignas y malignas como se describe en los Métodos. En el presente documento, se muestra el primer discriminante lineal (LD1).

La Figura 6 muestra el efecto de la intervención dietética en la transcripción génica.

a. Número de sondas que difieren entre los genotipos positivo y nulo de *GSTM1* ($P \leq 0.005$, prueba t de dos muestras modificada de Welch) en tejido TURP de próstatas benignas (Ben) y malignas (Mal), y tejido de biopsia transrectal guiada por ultrasonido (guiada por TRUS) de voluntarios antes de la intervención (Pre), después de 6 meses de dieta rica en brócoli (Broc) y después de 6 meses de dieta rica en guisantes (Guisantes). b. Número de sondas que difieren entre las muestras de biopsia guiada por TRUS antes de la intervención y después de 6 meses con dietas ricas en brócoli (6B), 6 meses con guisantes (6P), 12 meses con brócoli (12B) y 12 meses con guisantes (12 P) ($P \leq 0.005$, prueba t pareada de dos muestras modificada de Welch). El sombreado corresponde a los diferentes cortes de pliegue aplicados. Véase la Tabla 2 para obtener detalles completos de los números de sonda, los valores P y las tasas medias de descubrimiento falso.

La Figura 7 muestra la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) de insulina incubada con y sin SF en plasma humano.

Cromatogramas de LC-MS de iones extraídos (m/z 1183.6-1184.1) de insulina-SF MH_5^{5+} en (A) insulina no modificada (20 $\mu\text{g/mL}$) en control de plasma humano y (B) plasma humano incubado con insulina (20 $\mu\text{g/mL}$) y SF 50 μM durante 4 h a 37 °C, que muestra la aparición de dos conjugados diferentes de insulina-SF con tiempos de retención de 6.46 y 7.08 min. Los espectros mejorados de iones del producto (EPI)-MS de estos dos conjugados de insulina-SF se muestran en la Figura 8.

La Figura 8 muestra el espectro de iones del producto mejorado (EPI)-MS de los dos conjugados de insulina-SF. Los espectros de iones del producto MS^2 de (A) picos de tiempo de retención de 6.46 min y (B) de 7.08 min a partir del análisis LC-MS de plasma humano incubado con insulina bovina y SF 50 μM durante 4 h a 37 °C. En (A) y (B) m/z 1183.9 corresponde a insulina-SF MH_5^{5+} y en (A) m/z 235.0 corresponde a Gly-SF, el aminoácido del terminal N de la cadena de insulina A y en (B) m/z 325.2 corresponde a Phe-SF, el aminoácido del terminal N de la cadena de insulina B.

La Figura 9 muestra LC-MS de TGF β 1 incubado con y sin SF.

Cromatogramas iónicos extraídos (MS) de masas precursoras que representan el péptido del terminal N no modificado de TGF β 1 (m/z 768.5) y el péptido del terminal N modificado (m/z 877.2) A de m/z 768.2-769.2 de TGF β 1 tratado con DMSO, B de m/z 768.2-769.2 de TGF β 1 tratado con SF, C de m/z 876.7-877.7 de TGF β 1 tratado con DMSO y D de m/z 876.7-877.7 de TGF β 1 tratado con SF.

La Figura 10 muestra la modificación del terminal N de TGF β 1 por SF.

Los espectros de MS/MS de m/z 768.7 representan el péptido del terminal N no modificado de TGF β 1 con un tiempo de retención de 23.43 min (A) y m/z 877.2 que representa una forma modificada de TGF β 1 observada únicamente en muestras tratadas con SF con el tiempo de retención 30.85 minutos (B). Téngase en cuenta que la serie de iones y permanece igual mientras que la serie de iones b se desplaza (Δ) indicando una modificación del terminal N de masa 217 ± 0.8 Da.

La Figura 11 muestra la activación de la transcripción mediada por TGF β 1/Smad por SF.

Las células NIH3T3 que contienen un plásmido CAGA12-luc se trataron solo con TGFβ1, TGFβ1 y DTT 10 mM, que interrumpe el dímero de TGFβ1 activo, o TGFβ1 y SF 2 μM. Todas las muestras se incubaron previamente durante 30 minutos y se dializaron adicionalmente durante 4 h para que la concentración final de SF fuera de 34 nM. Como control negativo adicional, las células no recibieron tratamiento o solo SF 34 nM, que no lograron inducir luciferasa. La quimioluminiscencia se normalizó a la concentración de proteína de cada muestra (para más detalles, véase Métodos). Este es un experimento representativo de un total de cuatro experimentos similares realizados. Los datos mostrados son la media (sem) de tres réplicas.

La Figura 12 muestra el efecto del compuesto puro y los extractos totales de rúcula sobre la ruta de señalización de TGF-β en células epiteliales de adenocarcinoma A549.

Los extractos de rúcula que han sido tratados térmicamente para que no se produzcan isotiocianatos muestran una supresión de la señalización de TGF beta. La erucina parece más eficiente en la sobrerregulación de la señalización de TGF beta que la de SF.

La Figura 13 muestra un análisis de transferencia Western de células Caco-2 para SMAD2 fosforilada después del tratamiento con extractos de brócoli y/o TGFβ1. Panel A SMAD2 fosforilado; Panel B GAPDH. Carriles 1, 2-control; 3, 4 TGFβ1; 5,6 - 0 min; 7,8 - 4 min; 9 - 1 min; 10 - 1 min + TGFβ (2 μg/L).

La Figura 14 muestra los cebadores y las sondas que se diseñaron usando Applied Biosystems Primer Express (<http://www.appliedbiosystems.com/>) junto con condiciones de PCR para usar con un procedimiento de PCR en tiempo real basado en Covault y colegas para el análisis de genotipos [21].

La Figura 15 muestra las consecuencias funcionales de las interacciones entre las ITC y los péptidos de señalización, que muestran que la incubación de las ITC con EGF puede suprimir la señalización de EGF en las células BPH, un modelo de tejido prostático hiperplásico. Los datos presentados muestran que la incubación previa de EGF con 4-metilsulfonilbutil ITC (SF) en condiciones que se sabe que causan modificación peptídica reduce la cantidad del receptor fosforilado en comparación con EGF solo. Se esperaba que esto produzca la inhibición de la vía de señalización de EGF, con consecuencias antiinflamatorias.

Las Figuras 16 y 17 procianidinas (a una dosis de 2 μM) pueden inhibir la IL-6 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) en el modelo celular HUVEC; la procianidina se obtuvo de un extracto de piel de uva (GE).

La Figura 18 muestra una célula de hiperplasia prostática benigna (BPH-1) (que no es una célula cancerosa) que muestra que cuando se agregan los factores de crecimiento EGF e insulina, aumenta el nivel de pAKT.

La Figura 19 muestra una célula cancerosa PC3 cultivada en suero de ternera fetal (FCS) y tratada con el ITC, SF. Como se puede observar a partir de los resultados en el control, está presente una gran cantidad de pAKT. Cuando se trató con niveles de 2 μM, se observó una reducción significativa en pAKT. El SF estaba actuando a través de proteínas de señalización extracelulares (tales como la insulina) en el suero de ternera fetal.

La Figura 20 muestra que los resultados en la Figura 19 se debieron a las proteínas de señalización extracelulares en el FCS. En la Figura 20, los resultados se muestran sin FCS. Como se puede ver sin FCS SF no funcionó para reducir pAKT.

La Figura 21 muestra los resultados de la transferencia Western. A: inmunohistoquímica de células PC-3 que muestran la expresión de pAKT (coloración roja). B: inmunohistoquímica de células PC-3 después de la incubación en SF 2 μM durante 1 h que muestra la inhibición de la expresión de pAKT (sin coloración roja).

Ejemplos

Diseño del estudio

El estudio es un estudio paralelo aleatorio con hombres y mujeres fumadores y no fumadores mayores de 50 años que se considera que tienen un riesgo leve a moderado de desarrollar CVD o tener un evento CV. Este riesgo leve a moderado se define como una probabilidad del 10-20% de desarrollar CVD en los próximos 10 años y puede calcularse mediante los cuadros de evaluación de riesgo de CVD de las Joint British Societies (JBS 2) [58] (Figura 2), que se basan en la puntuación de riesgo de Framingham [59]. Los voluntarios son emparejados por género mientras son asignados a uno de los 3 grupos de estudio. Un grupo consume 400 g de brócoli estándar cada semana durante 12 semanas; el segundo grupo consume 400 g de brócoli con alto contenido de glucosinolato cada semana durante 12 semanas, mientras que el tercer grupo consume 400 g de guisantes cada semana durante 12 semanas. El brócoli y los guisantes se consumen por encima de la dieta estándar del voluntario. Para evaluar la dieta habitual de los voluntarios, se les pide que mantengan dos diarios de dietas de 7 días, uno antes de la intervención y el otro hacia el final de su intervención. Se realizan una serie de pruebas fisiológicas en los voluntarios antes y después de la intervención (línea base - semana 0 y semana 12); se toman muestras de sangre para determinar su perfil lipídico, así como una serie de indicadores de riesgo de CVD. El esquema del estudio se muestra en la Figura 1.

La población de estudio consta de tres grupos de hombres y mujeres fumadores y no fumadores de 50 años de edad y mayores (n = 22 por grupo de brócoli; n = 10 para el grupo de guisantes de control) que tienen un riesgo leve a moderado de desarrollar CVD o tener un evento de CV (definido en los criterios de inclusión a continuación) durante los próximos 10 años. Se recluta un número igual de hombres y mujeres, fumadores y no fumadores. Cada grupo de voluntarios también tiene una distribución uniforme de números con eliminación de GSTM1 (ya que constituyen aproximadamente la mitad de la población, esto se logra mediante el uso de la técnica de aleatorización adaptativa covariable [60]).

Los voluntarios se emparejan por género, tabaquismo y genotipo (los primeros 10 voluntarios se asignan aleatoriamente a uno de los tres grupos). El diario de la dieta se utiliza para definir consumidores habituales de verduras crucíferas en mayor cantidad (> 3 porciones por semana) o menor cantidad (<1 porción por semana). Los voluntarios son asignados aleatoriamente a uno de los tres grupos de intervención dietética:

1. Se le pide al grupo de brócoli estándar que consuma 4 porciones adicionales (100 g cada una) de brócoli estándar por semana como parte de su dieta normal.
2. Se le pide al grupo de brócoli 'HG' que consuma 4 porciones adicionales (100 g cada una) de una variedad especial de brócoli, cultivada selectivamente por su contenido mejorado de glucosinolato, por semana como parte de su dieta normal.
3. Se le pide al grupo de control de guisantes que consuma 4 porciones adicionales (100 g cada una) de guisantes Birds Eye® por semana como parte de su dieta normal.

Se pide a los voluntarios que modifiquen sus dietas habituales durante un total de 12 semanas al comer el brócoli estándar, el brócoli HG o los guisantes. Esto es para permitir detectar cualquier cambio en los marcadores bioquímicos del riesgo de CVD, particularmente la concentración de colesterol total, el colesterol LDL y la presión arterial. Los voluntarios pueden elegir qué día comer las verduras, pero se les pide que lleven un registro de cuándo consumen las verduras.

Factores de riesgo cardiovascular

Los voluntarios reclutados tenían un riesgo leve a moderado de desarrollar CVD o de tener un evento CV en los próximos 10 años [61-63]. La lista a continuación define lo que generalmente se consideran factores de riesgo cardiovascular, es decir, factores que ponen a una persona en riesgo de desarrollar CVD o tener un evento CV. Los siguientes parámetros se utilizan para evaluar la idoneidad de los voluntarios para el estudio. Forman los parámetros integrales en el evaluador de riesgo cardíaco, un algoritmo que calcula el riesgo de una persona de desarrollar CVD a partir de un conjunto de valores biológicos y fisiológicos obtenidos de ellos [58]. El evaluador de riesgo cardiovascular se puede encontrar en <http://www.patient.co.uk/showdoc/40000133/> y también se enseña en una edición especial de Heart (véase "JBS2: Joint British Societies' Guidelines on Prevention of Cardiovascular Disease in Clinical Practice" – preparado por la British Cardiac Society, British Hypertension Society, Diabetes UK, HEART UK, Primary Care Cardiovascular Society, The Stroke Association (Heart 2005, Vol 91: v1-v52; doi 10.1136/hrt.2005.079988 (Edición especial)).

35	Edad	La tabla se basa en edades de 49-69 años; esto da como resultado una ligera subestimación del riesgo en menores de 70 años.
	Sexo	Los hombres y las mujeres tienen diferentes niveles de riesgo.
	Presión arterial sistólica	≥140 mm de Hg * ≥160 mm de Hg **
	Presión arterial diastólica	≥90 mm de Hg * ≥100 mm de Hg **
	Colesterol total	> 240 mg/dL (6.2 mmol/L) **
40	Colesterol HDL	<40 mg/dL en hombres <50 mg/dL en mujeres (1.0 mmol/L)* (1.2 mmol/L)*
	Fumador	Se debe considerar la exposición al tabaco
	Glucosa	≥6.1 mmol/L - <7 mmol/L (= glucosa alterada en ayunas) *
45	Hipertrofia del ventrículo izquierdo (LHV)	Definir LVH en ECG (esto no se verificará en nuestros voluntarios).
	Obesidad central:	Caucásicos: hombres ≥102 cm *mujeres: ≥88 cm *Asiáticos: hombres ≥90 cm *mujeres: ≥ 80cm *
	De origen en el sur de Asia	En caso afirmativo, el riesgo aumenta en un factor de 1.5
	Antecedentes familiares de CVD	Si hay antecedentes familiares significativos, el riesgo aumenta en un factor de 1.5
50	Triglicéridos en suero	≥1.7 mmol/L*

* El voluntario tiene una probabilidad de caer en el grupo de riesgo del 10-20%

** El voluntario tiene una probabilidad de caer en el grupo de riesgo > 20%

Los voluntarios caen dentro de este grupo de leve a moderado sin que su participación en el proyecto comprometa su salud o sin que tomen ningún medicamento. La calculadora se usa una vez que se obtienen todos los resultados de la detección. El cálculo de la potencia (véase la sección de estadísticas) se basa en la concentración de colesterol total, incluido el colesterol LDL (es decir, el colesterol total menos el colesterol de lipoproteína de alta densidad (colesterol HDL) y menos los triglicéridos en suero (TG) y/o los valores de presión arterial. Aunque el promedio nacional del Reino Unido es 5.7 mmol/L [65] los voluntarios son reclutados con un valor de colesterol de al menos ≥5 mmol/L ya que los estándares establecidos por el JBS 2 sugieren tratar a las personas con valores tan bajos como ≤4 mmol/L [58]. No hay evidencia que sugiera que los cambios en la dieta no se verán en valores inferiores a 5,7 mmol/L. En el estudio que analiza el consumo de brotes de brócoli, los valores basales de colesterol de los participantes son de 4.5 mmol/L y 4.6 mmol/L para hombres y mujeres, respectivamente, y todavía se observa una disminución en el colesterol total [32].

De acuerdo con la British Hypertensive Society (BHS), las presiones arteriales sistólica y diastólica mencionadas anteriormente se clasifican como levemente hipertensivas [66]. Los datos de estudios anteriores que examinan el grupo de edad a ser reclutado (≥ 50 años), muestran que los voluntarios con presiones sanguíneas en este rango más alto pueden ser difíciles de reclutar y, por lo tanto, el valor para nuestros propósitos de reclutamiento se reduce a la presión arterial óptima, 120/80 mm de Hg y superior, como lo define la BHS.

El estado de fumador es un problema importante asociado con el riesgo de CVD y, por lo tanto, el estado de cualquier voluntario refleja la exposición de por vida al tabaco. Por ejemplo, un voluntario que ha fumado cinco cigarrillos al día durante 8 años, probablemente tendrá una menor exposición al tabaco que alguien que fumó 40 cigarrillos al día durante 20 años hasta hace 3 años. Los criterios de inclusión y exclusión se han establecido en consecuencia.

Calculadora del evaluador de riesgo cardiaco

Las Figuras 2a y 2b demuestran el gráfico de predicción de riesgo de CVD de las JBS 2 para hombres y mujeres no diabéticos, respectivamente. El objetivo es reclutar voluntarios que caigan en el riesgo 10-20% de desarrollar CVD en los próximos 10 años, lo que equivale a sus BP y TC sistólicos: los valores del HDL que caen dentro del rango designado por la sección inferior más clara de los cuadros. Las personas que generalmente caen en el intervalo $> 20\%$ generalmente serían recomendadas para alguna forma de terapia más drástica que el estilo de vida y los cambios en la dieta, antihipertensivos, disminución de lípidos, reducción de glucosa y otras terapias de protección cardiovascular para reducir el riesgo general de CV de sus GP.

Criterios de inclusión

- Se reclutaron hombres y mujeres de ≥ 50 años para el estudio: serán aceptables puntajes de 10-20% para participar en el estudio.

- Colesterol total ≥ 5.0 mmol/L;

- Mediciones de presión arterial,

- sistólica ≥ 120 mm de Hg;
- diastólica ≥ 80 mm de Hg;

- BMI ≥ 20 ;

- Fumadores y no fumadores;

Criterio de exclusión

- Diabéticos diagnosticados;

- Glucosa en ayunas > 6 mmol/L;

- Presión arterial $< 90/50$ o $95/55$ si es sintomático; $> 160/100$;

- Enfermedad renal crónica;

- Aquellos en cualquier terapia de reducción de lípidos como estatinas, secuestrantes de ácidos biliares, inhibidores de la absorción de colesterol y ácido nicotínico;

- Aquellos que han sufrido un evento cardiovascular como accidente cerebrovascular, infarto de miocardio o ataques isquémicos trans;

- Enfermedad vascular periférica, incluida la claudicación;

- Consumo de suplementos de aceite de pescado (a menos que el voluntario esté dispuesto a suspender su uso 4 semanas antes del inicio de la prueba);

- Participación paralela en otro proyecto de investigación que involucra intervención dietética y/o muestreo de fluidos/materiales biológicos;

- Cualquier persona relacionada o viviendo con algún miembro del equipo de estudio;

- Participación en otro proyecto de investigación que involucra muestreo de sangre en los últimos cuatro meses; la sangre de ambos estudios no debe exceder los 470 mL;

◦ IMC <20

◦ IMC > 40

◦ Colesterol total en ayunas > 8.0 mmol/L;

◦ Enfermedad gastrointestinal (excluyendo hernia de hiato) a menos que la intervención/procedimiento sintomático o del estudio esté contraindicado;

◦ Ir de vacaciones por más de 7 días en cualquier período o dentro de las 2 semanas posteriores a su cita clínica en el CRTU;

◦ Actualmente sufre o ha sufrido lesiones y cirugía de cuello y garganta.

Intercambio de información (1) - Unidad de Nutrición Humana (HNU) - Visita 1 para los voluntarios.

Después de recibir los detalles del estudio, todos los voluntarios reciben un mínimo de 72 horas (3 días) para considerar si desean participar en el estudio. Aquellos que deseen participar después de este período de consideración están invitados a asistir a la HNU para un examen de elegibilidad luego de un ayuno nocturno de al menos 8 horas. Se aconseja a los voluntarios que deben beber tanta agua como necesiten durante este período de ayuno. Se les recuerda que traigan una muestra de orina en la mitad del período desde su primera orina de la mañana en el recipiente provisto en el primer intercambio de información. La orina del período medio no se analiza hasta después de que se haya firmado el formulario de consentimiento. Los voluntarios deben llegar dentro de las 2 horas posteriores a la recolección de la muestra de orina, ya que esta es una especificación requerida para la validez de la prueba de tira reactiva de orina. También se recuerda a los voluntarios que traigan detalles de cualquier medicamento recetado, remedios herbales o suplementos dietéticos (es decir, nombre del medicamento, dosis tomada, etc.).

Examen de elegibilidad - HNU - Visita 2 para los voluntarios.

Una enfermera de HNU completa un cuestionario de salud, mide y registra la presión arterial, el pulso, la altura, el peso y la circunferencia de la cintura, el índice de masa corporal (BMI) calculado, verifica el análisis de orina (Combur⁹ Test®, Roche Diagnostics Ltd) y se toman 19,5 mL de sangre para recuento sanguíneo completo, perfil lipídico completo, glucosa, proteína C reactiva, urea y electrolitos, albúmina. Luego se usa un volumen de 5 mL de sangre para el genotipado (GSTM1, GSTT1 y GSTP1).

Si el BIM es <20 o >40, el voluntario queda excluido del estudio.

Asignación al azar de los voluntarios

Los voluntarios se asignan al azar a un método adaptativo covariante, también conocido como el método de minimización [60]. El objetivo principal de este método es minimizar las diferencias entre los grupos de tratamiento, lo cual es vital cuando se realizan estudios con un número relativamente pequeño de voluntarios y grupos de tratamiento que igualan o numeran las covariantes (edad, sexo, tabaquismo, etc.) como es el caso en este estudio [67]. Este método se puede usar después de que un pequeño número de voluntarios se asignan al azar a sus brazos de tratamiento, luego cada nuevo voluntario se asigna secuencialmente a un grupo teniendo en cuenta la asignación de los voluntarios anteriores [60].

Los resultados del estudio se refieren a 24 voluntarios en total; 10 en el grupo de brócoli HG, 8 en el grupo de brócoli estándar y 7 en el grupo de guisantes.

Los voluntarios no saben qué brócoli consumirán. Los datos producidos se analizan mediante pruebas T pareadas y/o ANCOVA de 1 vía como se cubre en la sección 19, Estadísticas.

Intercambio de información (2) - HNU - Visita 3 para los voluntarios

Una vez reclutados para el estudio, a los voluntarios se les asigna un segundo número de código.

Citas clínicas 1 y 2 - Unidad de Investigación y Ensayos Clínicos (CRTU en la UEA) - Visitas 4 y 5 para los voluntarios

Todas las mediciones y muestras son realizadas por enfermeras. El voluntario ayuna durante al menos 8 horas y se abstiene de todos los productos con cafeína durante 24 horas antes de su cita clínica. Los voluntarios que fuman se abstienen de fumar un cigarrillo durante aproximadamente una hora antes de tomar todas las medidas. El voluntario es llevado a una habitación de estudio tranquila en la CRTU, donde se realiza el conjunto de mediciones fisiológicas previas a la intervención (línea base, semana 0). La primera tarea es evaluar la salud general del voluntario antes de proceder a las mediciones. Se establece si se ha tomado o cambiado algún medicamento desde su última visita

asociada con el estudio (ya sea evaluación o cita clínica 1) y si han experimentado algún evento adverso (AE)/evento adverso grave (SAE) que no hayan sido ya divulgados por teléfono, carta o correo electrónico. Una vez que se recopila toda la información, si la hay, la enfermera a punto de registrar las mediciones evalúa si el voluntario puede continuar. La enfermera que toma la información es responsable de completar la documentación necesaria asociada con cualquier AE o SAE. Si el voluntario no puede continuar, dependiendo de la naturaleza de la información obtenida, se acordó una fecha alternativa o el voluntario queda excluido del estudio.

Antes de realizar las mediciones, se toma la presión arterial del voluntario en ambos brazos. También se toman las medidas de altura, peso, cadera y cintura del voluntario. Estas mediciones son necesarias para la medición de la velocidad de la onda del pulso. El primer método es la toma de muestras de sangre. Se toma un volumen de 18 mL de sangre para medir el perfil lipídico; glucosa en ayunas, CRP, FBC, albúmina. Además de estas muestras, se toman alícuotas de sangre para producir suero y/o plasma para análisis de vitamina D (vit D), IL6 y ELISA de hs-CRP. Los voluntarios tienen sus mediciones ambulatorias de presión arterial (BP) tomadas cada 10 minutos. Los voluntarios usan el brazalete durante poco más de una hora, lo que permite obtener 6 lecturas de BP a partir de las cuales se determina la BP media. Esto se repite 12 semanas después del valor basal (después de la intervención, semana 12).

La segunda medición es la PWV usando el Vicorder (Skidmore Medical Ltd). Esta es la primera de dos mediciones de rigidez arterial. Para este procedimiento, se les pide a los voluntarios que se queden quietos y se relajen en una habitación tranquila y con temperatura regulada por hasta 30 minutos. Después de hasta 30 minutos en reposo, se toma a los voluntarios la BP en reposo, después de lo cual se coloca un brazalete de aproximadamente una pulgada de grosor alrededor del cuello con la sección inflable en contacto con la arteria carótida (solo esta pequeña sección se infla durante la medición y no todo el brazalete) y alrededor de la parte superior del muslo de una pierna para medir la arteria femoral (aproximadamente 4 pulgadas de grosor). Se desaconseja que el voluntario hable o duerma mientras se toman las medidas, ya que esto puede interferir con las lecturas. Una vez que se unen los brazaletes, la enfermera realiza cuatro mediciones físicas, desde el punto medio del brazalete carótido hasta el punto medio del brazalete femoral (cm); muesca esternal superior: punto medio del brazalete femoral (cm); muesca esternal superior: muesca esternal inferior (cm) y muesca esternal inferior: punto medio del brazalete femoral (cm).

La enfermera tomará tres lecturas de PWV.

El procedimiento final es la medición del Alx usando el sistema de tonometría de aplanamiento SphygmoCor (Atcor Medical Pty Ltd). El voluntario permanece acostado o podría sentarse para este procedimiento. El brazo del voluntario debe estar estable y para permitir esto, el brazo está apoyado sobre una mesa o cama, y la muñeca está apoyada y ligeramente flexionada (ya sea con una toalla enrollada pequeña o con la mano de la enfermera). Es importante que la muñeca del voluntario sea plana y no se sostenga en ángulo.

Esta medición se repite tres veces para obtener tres conjuntos de datos. Esta medida, como las otras, se repite 12 semanas después del inicio.

Cumplimiento

Se pide a los voluntarios que completen una hoja de registro semanal de verduras durante el período de intervención de 12 semanas, registrando una marca cada vez que comen su porción de verduras cada semana. Se espera que esto ayude al cumplimiento durante la intervención dietética. Las hojas de registro de verduras también se usan con el diario de dieta de 7 días como un medio para controlar el cumplimiento.

Evaluación de la dieta

La dieta habitual en los tres grupos se mide ya que el grupo de control puede consumir altos niveles de verduras crucíferas como parte de su dieta normal. Esta información es útil para explicar los factores de confusión que pueden producir los resultados. Esta información también es útil para identificar los niveles de otros grupos de nutrientes como la ingesta fitoquímica o el consumo de pescado azul y si esto tiene algún efecto en los resultados. Es importante que los voluntarios no adapten su dieta de ninguna manera, por lo que se hizo hincapié en la importancia de no aumentar sus porciones de crucíferas o cualquier otro tipo de verduras, especialmente una vez que están en la intervención. Los voluntarios tienen instrucciones de registrar su consumo de alimentos, bebidas y suplementos consumidos durante un período de 7 días. Hacia el final de la intervención dietética de 12 semanas, se completa nuevamente un segundo diario de dieta de 7 días para evaluar el cumplimiento de la intervención. Los diarios de ingesta de alimentos se analizan utilizando 'Diet Cruncher' y las tablas de composición de alimentos del Reino Unido (McCance and Widdowson's The Composition of Foods, resumen de la sexta edición. Food Standards Agency (2002). Cambridge: Royal Society of Chemistry. ISBN 0-85404-428- 0). La ingesta de alimentos de los diarios se coloca en Diet Cruncher v1.6.1 (www.waydownsouthsoftware.com/) y se analizan las diferencias en la composición de nutrientes entre los tres grupos de intervención al inicio del estudio y 12 semanas después de la intervención.

Brócoli

El brócoli con alto contenido de glucosinolato (HG) es una variedad de cultivo híbrido que tiene un nivel mejorado de glucosinolato llamado glucorafanina (precursor del sulforafano). La glucorafanina es otro nombre para el 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB).

5 El brócoli con alto contenido de glucosinolato (HG) utilizado en el estudio tiene 6.1 ± 0.65 micromol/g en peso seco del glucosinolato 3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP) y 16.7 ± 0.36 micromol/g en peso seco del glucosinolato 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB). Para evitar dudas, la glucoiberina es otro nombre para el 3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP).

10 El brócoli estándar (a veces denominado en el presente documento "Ironman") utilizado en el estudio tiene 0.9 ± 0.07 micromol/g en peso seco del glucosinolato 3-metilsulfinilpropil glucosinolato (MSP) y 5.64 ± 0.50 micromol/g en peso seco del glucosinolato 4-metilsulfinilbutil glucosinolato (MSB).

15 Los dos tipos de brócoli se distinguen por su número, el brócoli 1 y el brócoli 2. Sin embargo, los científicos que realizan el estudio o los voluntarios que participan en el estudio no saben, cuál de ellos era la variedad HG y cuál era la variedad estándar. Las muestras se envasan en porciones de 100 g y se almacenan congeladas a -18°C . El brócoli se entrega congelado al voluntario en sus hogares. Se le pide al voluntario que cocine el brócoli congelado por hasta 5 minutos y los guisantes por hasta 3 minutos.

20 Directrices de cocción para el brócoli congelado

Las porciones de brócoli se cuecen al vapor durante hasta 5 minutos y los guisantes durante hasta 3 minutos. Es importante que los voluntarios no cocinen en exceso el brócoli ya que esto provocaría una absorción retardada de los isotiocianatos producidos.

25 Estudios anteriores han demostrado los niveles de cocción requeridos para maximizar el nivel de ITC ingeridos (datos no publicados). Los niveles de glucosinolato y los isotiocianatos equivalentes en el híbrido de brócoli con alto contenido de glucosinolato se han medido previamente en IFR, Mithen et al., (2003). Los niveles corresponden a un aumento de 3-4 veces en comparación con el brócoli estándar de supermercado.

30 Métodos:

Mediciones fisiológicas

35 Estas incluyen PWV, Alx y BP ambulatorias. Para garantizar mediciones reproducibles y precisas, todos los voluntarios se miden en condiciones similares. Es importante que el voluntario esté relajado (acostado o sentado) y se haya abstenido de cafeína, cigarrillos, comidas pesadas o ejercicio antes de la medición. Se alienta a todos los voluntarios a usar ropa holgada y cómoda en sus días de citas clínicas.

40 PWV es uno de los parámetros más antiguos utilizados para determinar la rigidez arterial [68]. La rigidez arterial se ha establecido como un predictor independiente de CVD [68, 69]. El PWV se mide con el dispositivo Vicorder de Skidmore Medical. La velocidad de la onda del pulso (m/s) de la medición se presenta con la desviación estándar (PWV +/- SD). La desviación estándar debe ser igual o inferior al 10% de la velocidad, por ejemplo, si la PWV = 8.0 m/s, la SD debería ser <0.8 . Si este no es el caso, la medición se repite hasta que se obtienen 3 valores que satisfacen este criterio [70].

45 El Alx es un método simple y sensible para medir la rigidez arterial y se utiliza para corroborar las mediciones de PWV. La medición se lleva a cabo utilizando un tonómetro de aplanamiento utilizando un dispositivo de SphygmoCor. El índice de calidad es un número de 100 que se deriva de una serie de parámetros de control de calidad, incluida la altura promedio del pulso y la variación de la altura del pulso. Si el número es superior a 85, la lectura es aceptable. Si está entre 75-85, está en el límite. Si es inferior a 75, la lectura es inaceptable [70].

50 El control ambulatorio de la presión arterial (ABPM) es un método no invasivo para obtener lecturas de la presión arterial durante un período prolongado de tiempo mientras el paciente este un entorno de vida libre, lo que se espera que sea un verdadero reflejo de su presión arterial. Muchos estudios han confirmado que la presión arterial medida durante un período sostenido y hasta 24 horas es superior a la presión arterial tomada en clínica para predecir futuros eventos cardiovasculares [71]. Los estudios han demostrado que el aumento de las lecturas de la presión arterial en ABPM se correlacionan más fuertemente con el daño del órgano terminal que las mediciones únicas, por ejemplo, hipertrofia ventricular izquierda [72, 73]. También son un método eficaz para superar la hipertensión de bata blanca que puede ser un problema al intentar evaluar la presión arterial real de un voluntario.

60 Muestreo bioquímico

65 Las siguientes muestras y volúmenes de sangre se toman en el orden que se muestra a continuación (véase la Figura 3). En total, se tomaron 55.5 mL de sangre completa de los voluntarios durante todo el curso de la intervención. Esto puede haber aumentado en 14.5 mL si el voluntario regresó para una cita de revisión que requiere que se tome una segunda muestra de sangre. La enfermera tuvo como objetivo recolectar la secuencia completa de muestras de sangre cada vez:

ES 2 776 472 T3

Examen de elegibilidad (HNU) = 19.5 mL:

5 Muestra 1 = 1 x 3.5 mL de sangre para suero = 3.5 mL

- Glucosa

Muestra 2 = 1 x 3.5 mL para suero = 3.5 mL

- 10
- Perfiles lipídicos en suero

Muestra 3 = 1 x 3.5 mL para plasma = 3.5 mL

- 15
- Albúmina, U + E y CRP

Muestra 4 = 1 x 4 mL para plasma = 4 mL

- Recuento de sangre completa

20 Muestra 5 = 1 x 5 mL de sangre para plasma = 5 mL

- Genotipado (GSTP1, GSTT1 y GSTM1)

25 En el examen se toma una muestra de sangre de 5 mL de la que se extrajo el ADN genómico usando el protocolo del minikit de ADN QIAamp (Qiagen Inc). Las muestras fueron doblemente encriptadas para proteger la identidad del voluntario. Las muestras de ADN extraídas de sangre completa se amplifican mediante PCR en tiempo real utilizando el método de Cotton et al., (2000), para determinar la presencia o ausencia de los genotipos GSTM1 y GSTT1. También se determina la frecuencia de los alelos variantes para GSTP1.

30 Cita clínica 1 y 2 : 2 x 18 mL

Muestra 1 = 1 x 3.5 mL para suero = 3.5 mL

- 35
- Glucosa y CRP

Muestra 2 = 1 x 5 mL para suero = 5 mL

- Perfiles lipídicos en suero

40 Muestra 3 = 1 x 3.5 mL para plasma = 3.5 mL

- Albúmina y FBC

45 Muestra 4 = 6 mL de sangre para plasma/suero = 6 mL

- IL6, vit D (25-hidroxi-vit D) y hs-CRP

50 Las muestras de sangre para el análisis por ELISA se colocan en alícuotas en un recipiente de vacío y se dejan reposar a temperatura ambiente durante 30-60 minutos para producir suero. Los tubos se centrifugan a 2200 x g durante 15 minutos y el suero se divide en alícuotas en seis-diez crioviales de 1.5 mL previamente marcados para cada uno de los análisis, IL6, vit D y hs-CRP. Estos crioviales se colocan inmediatamente en hielo seco y se almacenan a -80 °C hasta su análisis.

55 Si se usa plasma para los ELISA, la sangre completa transferida a tubos de sangre recubiertos con EDTA se centrifuga a 1210 x g a temperatura ambiente durante 10 minutos. La capa de plasma se retira cuidadosamente y se transfiere a seis-diez crioviales de 1.5 mL previamente marcados para cada uno de los análisis, IL6, vit D y hs-CRP. Estos crioviales se colocan inmediatamente en hielo seco hasta que se transportan de forma segura y se almacenan a -80 °C hasta el análisis.

60 Los ELISA estándar de Quantikine e IDS se usan para el análisis de IL6, vitamina D y hs-CRP.

- IL6 - Quantikine D6050;
- hs-CRP - Quantikine ELISA Kit-DCRP00.

La interleucina 6 (IL6) y la proteína C reactiva (CRP) son ambos marcadores fisiológicos sensibles de inflamación sistémica. IL6 es una molécula de señalización multifuncional que puede actuar de forma proinflamatoria y antiinflamatoria. Es liberada por una variedad de células en respuesta a un trauma y/o daño tisular, lo que resulta en inflamación [74]. La CRP es una proteína de fase aguda que también se encuentra en niveles elevados como resultado de la inflamación. De hecho, la CRP, que se produce en el hígado por los hepatocitos, está regulada por los niveles de IL6 [75]. Se ha sugerido que la persistencia de un estado inflamatorio es la causa de una gran cantidad de enfermedades crónicas relacionadas con la edad [76] y cada vez hay más pruebas que sugieren que la inflamación y los niveles elevados de IL6 y CRP juegan un papel importante en la CVD [77]. Varios estudios transversales grandes han concluido que los niveles elevados de CRP en plasma es uno de los predictores independientes más fuertes de CVD [78]. La medición de CRP de alta sensibilidad (hs-CRP) proporciona una mayor precisión en la medición de niveles bajos de CRP. Después de un estímulo, los niveles de CRP pueden aumentar 10.000 veces a partir de valores circulantes de 50 µg/L hasta 500 mg/L en casos extremos [79].

Dado que la inflamación está asociada con la CVD y el riesgo de CVD, los niveles de estos marcadores inflamatorios clave se miden en voluntarios para determinar un vínculo entre los niveles de IL6, hs-CRP, colesterol total y las medidas fisiológicas que se ven afectadas por el proceso inflamatorio, como resultado del consumo de verduras crucíferas.

Vitamina D (vit D) (25-hidroxi-vit D) - IDS AC-57F-1

La vitamina D se asocia tradicionalmente con la salud ósea; sin embargo, ahora se sabe que se ha vuelto cada vez más importante para el funcionamiento óptimo del sistema cardiovascular [80]. Los datos emergentes sugieren que el estado de la vitamina D juega un papel importante en el desarrollo de CVD, con una deficiencia que aumenta la probabilidad de afecciones como hipertensión, diabetes, síndrome metabólico, hipertrofia ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca congestiva e hipertrofia vascular crónica [80-82]. La vit D existe en dos formas, vit D₂ (ergocalciferol) y vit D₃ (colecalciferol), la primera que se encuentra en las plantas y es un producto de la irradiación ultravioleta B (UVB) del ergosterol, la última de la irradiación de 7-deshidrocolesterol en la epidermis humana [81]. La vitamina D₂ se puede consumir como suplemento o en alimentos fortificados, mientras que la vitamina D₃ es producida por humanos o consumida en forma de pescado azul [81]. En el hígado, la vit D se convierte en 25-hidroxi-vit D (25(OH)-vit D) que refleja la ingesta de vit D y la producción endógena y, por lo tanto, es el compuesto que debe evaluarse para determinar el estado total de la vit D. En un estudio transversal con 15.088 personas en el registro nacional de cohortes NHANES III (3^{era} Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición [83]), se encontró que había una relación inversa entre la 25(OH)-vit D y la hipertensión, diabetes mellitus, hipertrigliceridemia y obesidad [84].

Hay muchos otros estudios que coinciden con este hallazgo y como este estudio está examinando los marcadores de riesgo cardiovascular, se evalúa el estado de la vitamina D en nuestra cohorte para establecer un vínculo nosotros mismos. Los voluntarios son evaluados en cuanto a si caen dentro de los grupos de deficiencia de vitamina D (< 37.4 nmol/L) o repletos (> 37.4 nmol/L) [85] y cómo esto se relaciona con los cambios en la concentración de colesterol total y las medidas fisiológicas que se toman.

Resultados

Los resultados se proporcionan para el efecto de los glucosinolatos sobre el colesterol total, el colesterol LDL, la presión arterial (BP) sistólica; presión arterial (BP) diastólica y riesgo de enfermedad cardiovascular (CVD).

Tabla A:

	Ironman (n=8) (brócoli estándar)	HG1 (n = 10) brócoli con alto contenido de glucosinolatos	Guisantes (n=7) (control)
Colesterol total	ns	- 0.47 mmol/L; p = 0.009	ns
Colesterol LDL	ns	-0.3 mmol/L; p = 0.027	ns
Colesterol HDL	ns	ns	ns
Triglicéridos en suero	ns	ns	ns
BP sistólica	ns	-5.0 mm de Hg; p = 0.037	ns
BP diastólica	ns	-4.0 mm de Hg; p = 0.01	ns
Riesgo cardiovascular	ns	-1.6%; p=0.008	ns

El riesgo de CVD, como se discutió anteriormente, se calcula usando datos sobre la presión arterial, el perfil lipídico y varios factores demográficos como se detalló anteriormente. Los médicos utilizan ampliamente este evaluador de riesgos para estimar el porcentaje de riesgo de CVD en los próximos 10 años.

La Tabla A anterior muestra los resultados para la presión arterial (PB) sistólica, la presión arterial (PB) diastólica, el colesterol total, el colesterol LDL en mmol/L y el riesgo de CVD (% de eventos en los próximos diez años) con guisantes, brócoli estándar "Ironman" y tratamientos con brócoli con alto contenido de glucosinolatos (HG1). El valor p es de una prueba T emparejada. P <0.05 es significativo, P > 0.05 no es significativo (ns).

Como se puede observar claramente, el brócoli con alto contenido de glucosinolato (en comparación con el brócoli estándar y/o el control de guisantes) da como resultado una reducción significativa en la presión arterial (BP) sistólica, presión arterial (BP) diastólica, colesterol total, colesterol LDL y riesgo de CVD en los sujetos evaluados.

5 Notablemente, los guisantes (control negativo) y el brócoli estándar no dan como resultado ningún cambio significativo en la presión arterial (BP) sistólica, presión arterial (BP) diastólica, el colesterol total, el colesterol LDL o el riesgo de enfermedad cardiovascular.

10 El brócoli con alto contenido de glucosinolato también produce una reducción significativa en el colesterol total, mientras que los guisantes y el brócoli estándar no produjeron ningún cambio significativo en los niveles de colesterol total.

15 Ejemplo 2: Efecto del consumo de brócoli con alto contenido de glucosinolato en las vías de señalización celular en pacientes con cáncer de próstata

Sujetos y diseño del estudio

20 Veintidós voluntarios varones de 57-70 años (Tabla 1) con un diagnóstico previo de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIN), la etapa *in situ* preinvasiva de adenocarcinoma prostático, fueron reclutados por un urólogo consultor en Norfolk y Norwich University Hospital NHS Trust. El diagnóstico histológico fue realizado por dos histopatólogos consultores, que tenían un interés especial en la patología de la próstata. La aprobación ética para el ensayo se obtuvo del Comité de Ética de Investigación de Norfolk. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. Los voluntarios fueron excluidos si se sometieron a una terapia quimiopreventiva, recibían medicamentos de reemplazo de testosterona o inhibidor 5 alfa reductasa, tenían una infección activa que requería tratamiento, tenían un índice de masa corporal (BMI) <18.5 o > 35, o eran diabéticos. Los sujetos fueron asignados a un ensayo de intervención dietética paralela de 12 meses que consta de dos grupos de intervención dietética: (i) consumir 400 g de brócoli por semana o (ii) consumir 400 g de guisantes por semana, además de su dieta normal. Los niveles de antígeno prostático específico en plasma (PSA) se cuantificaron antes del estudio de intervención y después de seis y 12 meses en el Norfolk and Norwich University Hospital con el uso de un inmunoensayo de PSA total. Los voluntarios evitaron los alimentos que se sabe que contienen glucosinolatos durante 48 horas antes de cada cita de biopsia para evitar efectos agudos.

35 Además de la biopsia con aguja guiada por ecografía transrectal (TRUS) de la próstata obtenida de los voluntarios inmediatamente antes del estudio de intervención, y después de seis y doce meses, también se obtuvieron tejidos de resección transuretral de la próstata (RTUP) 18 benignos y 14 malignos del Banco de Tejidos Humanos del Norfolk & Norwich University Hospital Partners in Cancer Research.

Intervención dietética

40 Se entregaron verduras a los voluntarios mensualmente. Se les proporcionó un vaporizador y los voluntarios recibieron una demostración por parte de los cocineros de la dieta en el Institute of Food Research sobre cómo cocinar las verduras. Las porciones de brócoli se cocinaron al vapor durante 4-5 minutos y las porciones de guisantes se cocinaron al vapor durante 2-3 minutos. Los guisantes congelados (Guisantes Birds Eye Garden, <http://www.birdseye.co.uk/>) se compraron en un punto de venta local. Para garantizar la consistencia en el contenido de glucosinolato en el brócoli congelado proporcionado a los voluntarios, el brócoli requerido para el estudio de intervención se cultivó en un lote en una granja experimental ADAS en Terrington, cerca de King's Lynn, Reino Unido (<http://www.adas.co.uk/>) y procesado por Christian Salvesen (Bourne, Lincolnshire, Reino Unido, <http://www.salvesen.co.uk/>). Se blanqueó a 90.1 °C durante 74 s, se congeló a -30 °C y se empaquetó en porciones de 100 g, luego se almacenó a -18 °C hasta que el voluntario lo vaporizó. El brócoli era una variedad con alto contenido de glucosinolatos [19, 20]. Los niveles, media (SD), de 4-metilsulfonilbutil y 3-metilsulfonilpropil glucosinolatos (los precursores de SF e IB, respectivamente) fueron 10.6 (0.38) y 3.6 (0.14) μmolesg^{-1} en peso seco, respectivamente, en comparación con 4.4 (0.12) y 0.6 (0.01) μmolesg^{-1} en peso seco en brócoli comprado en puntos de venta locales. Aunque el nivel de glucosinolatos fue más alto que en el brócoli estándar, el blanqueamiento antes de congelar la mirosinasa vegetal desnaturalizada, por lo tanto, los niveles de SF e IB derivados de la dieta con brócoli con alto contenido de glucosinolato serían similares o inferiores a los obtenidos del brócoli fresco con mirosinasa funcional. Los niveles de glucosinolatos de indol fueron similares tanto en brócoli con alto contenido de glucosinolatos como en brócoli estándar.

Control de cumplimiento y evaluación de la dieta

60 Los voluntarios completaron hojas de verificación semanales durante el período de intervención de 12 meses para identificar cuándo se comieron las porciones de verduras. Cada dos semanas, los voluntarios fueron contactados por teléfono y se les preguntó sobre el cumplimiento de la dieta. Los voluntarios completaron un diario de dieta de consumo estimado de siete días al inicio del estudio y después de seis meses utilizando medidas domésticas como una indicación del tamaño de la porción. La ingesta de alimentos de los diarios se introdujo en Diet Cruncher v1.6.1

(www.waydownsouthsoftware.com/) y se analizaron las diferencias en la composición de nutrientes entre los dos grupos de intervención al inicio del estudio y seis meses después de la intervención.

Genotipado

5 El ADN genómico se extrajo de sangre completa o de muestras de tejido usando minikit de ADN QIAamp de Qiagen con tratamiento con RNasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (<http://www.qiagen.co.uk/>). El genotipo *GSTM1* (NM_000561) se determinó utilizando un procedimiento de PCR en tiempo real basado en Covault y colaboradores, utilizando cebadores y sondas específicas del gen y se cuantificaron en relación con un control de genes de dos copias, una región en IVS10 de cáncer de mama 1, gen de inicio temprano (*BRCA1*, NM_007294) [21].
10 Los cebadores y las sondas se diseñaron utilizando Applied Biosystems Primer Express (<http://www.appliedbiosystems.com/>) y se proporcionan con condiciones de PCR en la Figura 14. Los datos se analizaron con el software de cuantificación absoluta de Applied Biosystems.

15 Extracción de ARN e hibridación de microarreglos

El ARN total se aisló de las muestras de banco de tejidos TURP y las biopsias de aguja guiadas por TRUS de los voluntarios con el uso de mini kits RNeasy de QIAGEN® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (<http://www.qiagen.co.uk/>). La cantidad de ARN resultante se midió usando un espectrofotómetro (Beckman). La calidad del ARN se determinó usando el Bioanizador Agilent 2100 (<http://www.agilent.co.uk/>). Las muestras de ARN de biopsias de RTUP de próstatas benignas y malignas y de biopsias guiadas por TRUS de ambos grupos de sujetos (guisantes y brócoli) al inicio del estudio, y a los seis y 12 meses después de la intervención se hibridaron en microarreglos Affymetrix Human U133 Plus 2.0 (<http://www.affymetrix.com/>) por el Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC, <http://arabidopsis.info/>). La síntesis de ADNc bicatenario y la generación de ADNc marcado con biotina se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante (Affymetrix, <http://www.affymetrix.com/>). Se comprobó la calidad del ARNc final antes de la fragmentación y la hibridación en las matrices.

Uno de los 22 voluntarios fue diagnosticado con adenocarcinoma prostático en la biopsia basal del estudio y fue retirado del estudio. Once muestras de las biopsias basales, dos muestras de las biopsias de seis meses y tres muestras de las biopsias de 12 meses no produjeron ARN de buena calidad y/o ARNc suficiente y no se hibridaron. Además, un voluntario mostró adenocarcinoma prostático en la biopsia de seis meses; las muestras posteriores se eliminaron del estudio. La intensidad de fluorescencia para cada matriz se capturó con un GeneChip® Scanner 3000 7G. Se usó el software operativo Affymetrix GeneChip® (GCOS) para cuantificar cada matriz U133 Plus 2.0. Los datos del microarreglo en este documento cumplen con la información mínima sobre un criterio experimental de microarreglos (MIAME) y se depositan en Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/aer/>; número de acceso E-MEXP- 1243).

Análisis de datos de microarreglos

40 Los archivos de datos sin procesar (CEL) se cargaron en el software ADN-Chip Analyzer (dChip, <http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>, fecha de construcción en septiembre de 2006) para la normalización, la generación de valores de expresión y análisis estadístico. Después de la normalización utilizando el método de normalización de conjunto invariante, los niveles de expresión de la sonda se calcularon utilizando el modelo de solo PM. Para identificar los genes que estaban cambiando entre grupos, se aplicaron diferentes umbrales de valor de P de dos colas calculados por la prueba t modificada de dos muestras de Welch en dChip. Las pruebas t pareadas o no pareadas se realizaron según fuera apropiado. Para corregir las pruebas múltiples, se estimó la tasa de descubrimiento falso (FDR) por permutación en dChip y la mediana de 100 permutaciones informadas para cada una de las comparaciones (1000 permutaciones en muestras seleccionadas tuvieron poco efecto en los cálculos de FDR). El agrupamiento no supervisado se realizó sobre muestras benignas y malignas utilizando la correlación de rango 1 como métrica de distancia en una lista de genes de 3697 sondas. Estas sondas satisfacían dos criterios: primero, que el coeficiente de variación (CV) estaba entre 0.5 y 1000; y en segundo lugar, que el porcentaje de llamadas de Presencia fue superior al 20% en todas las muestras benignas y malignas de TURP.

55 Para el propósito de la clasificación de las muestras, 19 microarreglos de células epiteliales microdisecionadas (LCD) de captura con láser (GEO Acceso: GDS1439, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) y 32 microarreglos benignos y malignos de TURP se normalizaron juntos y la expresión basada en el modelo se calculó como se describió anteriormente en dChip. Las muestras de LCD se obtuvieron de seis muestras de tejido prostático benigno, cinco muestras de adenocarcinoma de próstata primario clínicamente localizadas, dos réplicas de las cinco muestras de cáncer primario después del agrupamiento, cuatro muestras de adenocarcinoma de próstata metastásico y dos réplicas de las cuatro muestras de cáncer de próstata metastásico después del agrupamiento [22]. La clasificación de las muestras de células epiteliales LCD se realizó luego usando análisis discriminante lineal (LDA) basado en las muestras benignas y malignas de TURP como muestras de entrenamiento. La LDA se realizó utilizando 442 sondas que tenían una diferencia de intensidad de señal superior a 100 unidades entre las muestras benignas y malignas de TURP y eran significativamente diferentes a $P \leq 0.01$ por la prueba t de dos muestras modificada de Welch. Para identificar las rutas que son las más presentadas en las listas de genes expresados diferencialmente, se realizaron análisis funcionales utilizando MAPPFinder y GenMAPP v2.1 (<http://www.genmapp.org/>).

Incubación de péptidos con isotiocianatos

5 Incubaciones de SF o IB con insulina bovina (P01308, Sigma-Aldrich), factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGF, P01133, R&D Systems, <http://www.rndsystems.com/>) y factor de crecimiento transformante humano recombinante beta 1 (TGFβ1, P01137, R&D Systems) se realizaron en solución salina tamponada con fosfato de sodio (pH 7,4) o plasma sanguíneo humano a 37 °C durante 0.5-24 h. El plasma se trató previamente mediante ultrafiltración para eliminar las proteínas de alto peso molecular (filtro Microcon Ultracel YM-30, MWCO 30,000). Las muestras se analizaron directamente por LC-MS/MS o por análisis LC-MS/MS de digeridos trípticos de bandas de electroforesis en gel.

Análisis directo por LC-MS/MS de péptidos incubados con isotiocianatos

15 El sistema LC utilizado fue un Shimadzu serie 10AD VP (Shimadzu, <http://www.shimadzu.com/>). La columna era un ACE 300 C18, 150 x 2.1 mm (tamaño de partícula de 5 μm) usado a 40 °C. La fase móvil A era ácido fórmico al 0,1% en agua, fase B móvil, ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo y el caudal fue de 0.25 mL/min. Se usó un gradiente lineal de 25% de B a 35% de B durante 0 a 5 min, luego un gradiente adicional de 35% de B a 99% de B durante 6 min seguido de 99% de B durante 4 min. La columna se volvió a equilibrar durante un total de 3 min. El volumen de inyección estaba entre 5-20 μL. Todos los experimentos de MS se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas de trampa de iones lineal de triple cuadrupolo híbrido 4000 QTRAP utilizando el software Analyst versión 1.4.1 (Applied Biosystems, <http://www.appliedbiosystems.com/>) equipado con una fuente de Turbolon utilizada en modo de electroaspersión de iones positivos. El voltaje capilar de la sonda se optimizó a 4200 V, la temperatura de desolvatación se ajustó a 400 °C, el gas de cortina, el gas de nebulización y el gas turbo aerosol se ajustaron a 40, 10 y 20, respectivamente (valores arbitrarios). El potencial de desagrupamiento se incrementó entre 50-120 V. Se utilizó nitrógeno para la disociación inducida por colisión (CID). El ancho del pico se estableció en Q1 y Q3 a 1.0 Th (medido a media altura) para todos los experimentos de MS y MS/MS. Los espectros se obtuvieron en el rango m/z 800-2000 con tiempos de barrido de 1-2 segundos. Operando en modo LIT, se activó la captura Q0 y se usó el tiempo de llenado dinámico, la velocidad de barrido se ajustó a 250 Th/s para exploraciones de iones de producto mejorado (EPI), el tiempo de excitación fue de 150 ms, la energía de excitación de 25 V y la barrera de entrada de 4 V. Para la adquisición del espectro de EPI, se seleccionaron los iones precursores de interés para conjugados de SF con insulina (m/z 1183.9 MH₅⁵⁺), EGF (m/z 1088.8, MH₅⁶⁺) y TGFβ (m/z 1981.9, MH₅¹³⁺), la energía de colisión se incrementó entre 30-120 V y los espectros se obtuvieron en el rango m/z 100-1500 con un tiempo de barrido de 1.9 segundos. Las configuraciones de MS³ fueron idénticas a las de MS², excepto que la energía de colisión fue de 50-80 V y el potencial de desagrupamiento fue de 50-80 V.

Análisis de LC-MS/MS de TGFβ1 incubado con SF después de electroforesis y digestión tríptica

40 Se incubaron partes alícuotas de 1 μg de la proteína TGFβ1, suministrada con albúmina de suero bovino como vehículo, con DMSO o 1,2 μmoles de SF durante 30 minutos a 37 °C y se corrieron sobre geles desnaturizantes Bis-Tris NuPAGE al 4-12% (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/>). Las bandas se cortaron y se digirieron con tripsina (Promega, <http://www.promega.com/>) después de la reducción con ditiotreitól (DTT) y alquilación con yodoacetamida (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/>). Los péptidos extraídos se liofilizaron y se redisolviéron en acetonitrilo al 1%, ácido fórmico al 0,1% para análisis por espectrometría de masas. El análisis de LC-MS/MS se realizó usando un espectrómetro de masas LTQ (Thermo Electron Corporation, <http://www.thermo.com/>) y un sistema de HPLC de nanoflujo (Surveyor, Thermo Electron). Los péptidos se aplicaron a una precolumna (C18 pepmap100, LC Packings, <http://www.lcpackings.com/>) conectada a una columna analítica C18 de 8 cm autoempaquetada (resina BioBasic ThermoElectron; PicoTip 75 μm de diámetro interno, punta de 15 μm, New Objective, <http://www.newobjective.com/>). Los péptidos se eluyeron mediante un gradiente de acetonitrilo del 2 al 30% en ácido fórmico al 0,1% durante 40 min a un caudal de aproximadamente 250 nL min⁻¹. La adquisición de dependiente de los datos de MS/MS consistió en la selección de los cinco iones más abundantes en cada ciclo: relación masa/carga por MS (m/z) 300 a 2000, señal mínima 1000, energía de colisión 25, 5 golpes repetidos, 300 seg de exclusión. En todos los casos, el espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo de iones positivos con una fuente de nano aspersión y una temperatura capilar de 200 °C, no se empleó gas de revestimiento; el voltaje de la fuente y los voltajes de enfoque fueron optimizados para la transmisión de angiotensina. Los datos sin procesar se procesaron utilizando BioWorks 3.3 (Thermo Electron Corporation). Las búsquedas se realizaron con Mascot (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com/>) contra SPTrEMBL (4719335 secuencias) restringidas por taxonomía a Homo sapiens (68982 secuencias), se permitieron residuos de metionina oxidada y carbamidometil cisteína como modificaciones variables, como se hizo con la SF putativa. La tolerancia al error del ión original fue de ± 1.2 Da y la tolerancia de masa del fragmento fue de ± 0.6 Da, se permitió una escisión perdida. Se realizaron rutinariamente búsquedas tolerantes a errores en Mascot contra TGFβ y se prepararon cromatogramas de iones extraídos y se preparó una inspección manual de espectros usando Qual Browser y BioWorks 3.3 (Thermo Electron Corporation).

Ensayo del gen indicador de luciferasa

65 Las células NIH 3T3 transfectadas de manera estable con un plásmido CAGA12-luc, que responde a la activación de Smad [23], se cultivaron en DMEM suplementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10%, penicilina al 1%,

estreptomycin al 1%, L-glutamina al 1% y 0.4 mg/mL de geneticina. Las células se sembraron en medio de crecimiento completo en una placa de cultivo de tejidos de seis pozos durante 24 h, después de lo cual se reemplazó el medio con medio bajo en suero (FCS al 0.5%) que contenía uno de los tres tratamientos: (1) TGFβ1 (para lograr una concentración final de 2 ngmL⁻¹) en tampón de PBS, (2) TGFβ1 + DTT 10 mM en tampón de PBS, (3) TGFβ1 + SF 2 μM en tampón de PBS. Para simular la farmacocinética de SF, todas las muestras de prueba se incubaron a 37 °C durante 30 minutos antes de la diálisis, realizada en tampón PBS durante 4 horas usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer MWCO 3.5 K (PIERCE, <http://www.piercenet.com/>). La diálisis redujo la concentración de SF hasta 34 nM. Como controles adicionales, las células se trataron con PBS sin TGFβ1 y PBS con SF (34 nM). La actividad de luciferasa se determinó 16 h después del tratamiento usando el ensayo del gen reportero de luciferasa (Roche Applied Science, <http://www.roche.com/>) en un lector de placas contador de múltiples etiquetas Perkin Elmer Wallac Victor 21420 (<http://las.perkinelmer.com/>). En resumen, las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron en tampón de lisis celular suministrado con el ensayo. La quimioluminiscencia se cuantificó inmediatamente después de la adición del sustrato del ensayo de luciferasa. Los valores de luciferasa se normalizaron a la concentración de la proteína cuantificada usando el ensayo BCA (Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/>). El experimento se repitió cuatro veces, con tres réplicas de cada tratamiento por experimento. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de 1 vía con el software estadístico, R [24].

Resultados

20 Comparación de la expresión génica de muestras de tejido de TURP benignos y malignos

Se compararon perfiles globales de expresión génica en tejido de TURP de próstata benigno y maligno resecado quirúrgicamente usando ARN extraído de tejido heterogéneo (tal como se pretendía usar en el estudio de intervención). La agrupación no supervisada distinguió inequívocamente las muestras benignas y malignas. Los análisis de las rutas para los genes que fueron significativamente diferentes entre los dos grupos se llevaron a cabo con el uso del software GenMapp, e identificaron las rutas que con frecuencia se informan perturbadas durante la carcinogénesis (Tablas 2a y 3a). Para validar aún más los métodos de análisis de datos y determinar si los datos de microarreglos de tejido heterogéneo macroscópico son comparables a los datos generados a partir de células epiteliales LCD, se analizaron conjuntos de datos independientes de células epiteliales LCD (Acceso GEO: GDS1439) de cáncer de próstata benigno, localizado y metastásico. Se utilizaron muestras benignas y malignas como un conjunto de entrenamiento para análisis discriminantes lineales (LDA) y los datos independientes como conjuntos de prueba, y se descubrió que el modelo LDA distinguía correctamente las muestras de células epiteliales LCD benignas, localizadas y metastásicas (Figura 5). Por lo tanto, este estudio preliminar proporciona validación para el enfoque de los análisis estadísticos de los datos de la matriz.

35 Variación en los niveles plasmáticos de PSA

Los niveles de PSA antes de la intervención estaban en un rango similar al informado previamente para hombres de un rango de edad equivalente diagnosticado con HGPIIN [25]. No hubo asociación significativa con el genotipo de GSTM1, y no hubo cambios consistentes en los niveles de PSA después de seis o 12 meses dentro de cualquiera de los brazos del estudio de intervención (Tabla 1).

Diferencias en la expresión génica global entre individuos positivos y nulos para *GSTM1*

45 Inicialmente se genotiparon las muestras de tejido de TURP resecaadas y se compararon los perfiles de expresión génica entre los genotipos positivos y nulos para *GSTM1* dentro de las muestras benignas y malignas. Se encontraron pocas diferencias entre los genotipos, con tasas de descubrimiento falsas medianas altas similares (Figura 6a, Tabla 3b). Del mismo modo, se compararon los perfiles de expresión génica obtenidos de biopsias con aguja de la próstata de hombres nulos y positivos para *GSTM1* que habían sido diagnosticados previamente con HGPIIN y se encontraron pocas diferencias.

55 Luego se compararon los perfiles de expresión génica entre genotipos de *GSTM1* en tejido de biopsia con aguja de veintiún hombres que habían sido reclutados para el estudio de intervención dietética. A ocho de los hombres de este estudio se les pidió que consumieran 400 g de guisantes congelados cocinados al vapor por semana, y a los otros trece se les pidió que consumieran 400 g de brócoli congelado cocinados al vapor por semana, pero que por lo demás consumieran su dieta normal. La dieta se evaluó con diarios de dieta de siete días antes de la intervención y después de seis meses. No se encontraron diferencias significativas en los componentes de la dieta, aparte del consumo de brócoli y guisantes (Tabla 4). Se encontraron muchas diferencias en la expresión del gen de la próstata entre los hombres nulos y positivos para *GSTM1* que habían estado en la dieta del brócoli durante seis meses, pero pocas diferencias, si es que las hubo, en la expresión génica entre hombres nulos y positivos para *GSTM1* que habían estado en la dieta del guisante (Figura 6a, Tabla 3b). Para investigar las posibles consecuencias de las diferencias en la expresión génica entre los genotipos de *GSTM1* después de la dieta rica en brócoli, se analizaron estos datos a través de GenMapp. Se identificaron tres vías, el receptor de EGF, la adipogénesis y el receptor de TGFβ, en los que los genes se produjeron con una frecuencia más alta de lo que ocurrirían por casualidad (Tabla 2b).

65 Cambios en la expresión génica antes y después de la intervención dietética

Se utilizaron pruebas t pareadas para identificar genes que habían cambiado en la expresión entre 0 y 6 meses y 0 y 12 meses en muestras de biopsia de individuos dentro de cada brazo de la intervención para cuantificar los cambios en la expresión con el tiempo. Dentro del brazo del brócoli, se restringieron los análisis a los individuos positivos para *GSTM1*. Se encontró que después de 6 meses y 12 meses había más cambios en la expresión dentro del brazo rico en brócoli que en el brazo rico en guisantes (Figura 6b, Tabla 3c). Los análisis de la ruta con genes que cambiaron en la expresión entre 0 y 12 meses identificaron cambios solo en la ruta del receptor de andrógenos en el brazo rico en guisantes, mientras que en el brazo rico en brócoli se identificó la ruta del receptor de andrógenos junto con varias otras rutas de señalización, incluida la señalización de insulina, vías del receptor de TGFβ y EGF (Tabla 2c). Los análisis con genes que cambiaron en la expresión entre 0 y 6 meses en el brazo de brócoli también identificaron cambios en la vía del receptor de TGFβ (P ajustado = 0.001), señalización de insulina (P ajustado = 0.035) y señalización del receptor de EGF (P ajustado = 0.068).

Por lo tanto, la evidencia del efecto del consumo de brócoli en la modulación de la señalización de TGFβ y EGF se ha obtenido en dos análisis independientes: en primer lugar, la comparación de los perfiles de expresión génica de individuos positivos y nulos para *GSTM1* que habían consumido la dieta rica en brócoli durante seis meses y, en segundo lugar, los análisis emparejados de perfiles de expresión génica de biopsias obtenidas a los 0 y 12 meses de individuos positivos para *GSTM1* que habían consumido la dieta rica en brócoli. Es importante tener en cuenta que estos análisis no comparten ningún conjunto de datos de matriz.

Interacciones químicas entre péptidos de TGFβ1, insulina y del EGF e isotiocianatos del brócoli

Habiendo demostrado que el consumo de brócoli modula varias vías de señalización celular, se buscó una explicación. La incubación de péptidos de insulina, EGF y TGFβ1 con los isotiocianatos SF o IB en PBS pH 7.4 a 37 °C durante un período de 0.5 a 24 horas produjo una evidencia consistente de la formación de un conjugado unido covalentemente del péptido respectivo y el ITC. Esto se investigó más a fondo para determinar su relevancia fisiológica al realizar las mismas incubaciones en plasma humano sin proteínas de alto PM. El análisis de LC-MS/MS mostró la aparición de uno o más picos de LC-MS adicionales cuando SF o IB se incubaron con los péptidos. Por ejemplo, en la Figura 7, un cromatograma de iones extraídos (m/z 1183.9, correspondiente a insulina-SF MH₅⁺) muestra la aparición de dos conjugados de insulina-SF en comparación con la incubación del control. El análisis de MS² de estos picos (Figura 8) confirmó la presencia de dos iones de fragmentos de diagnóstico en m/z 235 y m/z 325 correspondientes a la adición de SF a los dos aminoácidos del terminal N de Gly-SF y Phe-SF de insulina. Se obtuvieron resultados similares para identificar Gly-IB (m/z 221) y Phe-IB (m/z 311) de la incubación (datos no mostrados). Se obtuvo evidencia comparable para la formación de conjugados de EGF con SF en plasma humano correspondiente a la adición de SF al residuo de asparaginas del terminal N (m/z 309) de EGF.

Para proporcionar información adicional de las modificaciones al TGFβ1, se adoptó un enfoque complementario. Se incubaron alícuotas de 1 µg de la proteína con DMSO o 1,2 µmoles de SF durante 30 minutos a 37 °C y se separaron por electroforesis SDS-PAGE. Las bandas fueron cortadas y digeridas con tripsina antes del análisis por LC-MS/MS. TGFβ1 se identificó robustamente en bandas de 25 kDa correspondientes al dímero activo. El péptido del terminal N, ALDTNYCFSSTEK se identificó a partir de iones originales m/z 768.5 tanto en muestras tratadas con DMSO (control) como tratadas con SF (Figura 9). Se observó un ion precursor m/z 877.2 solo en muestras tratadas con SF. El análisis por MS/MS de ambos iones precursores reveló una fuerte serie de picos de fragmentos que eran comunes a ambos iones precursores (Figura 10). Estos patrones de fragmentación son consistentes con la serie del ion y no modificado para el péptido ALDTNYCFSSTEK (incluida la carbamidometil cisteína +57) y la serie del ion ab desplazada en 217.4 ± 0.8 Da en la muestra tratada con SF. Estos resultados apoyan fuertemente una modificación del terminal N para TGFβ1 por SF. La adición de SF daría como resultado una adición de masa de 177, como se observa con los análisis de LC-MS de TGFβ1 intacto, como se describió anteriormente. Es muy probable que la adición de 217, en oposición a 177, se deba a la reacción posterior de la tiourea con yodoacetamida, agregada a la mezcla de reacción para alquilar enlaces de disulfuro reducidos, para dar como resultado una mezcla de carbamidoilsulfanilacetamidas isoméricas, que experimentan ciclación y pérdida de NH₃ para producir las iminotiazolidinonas correspondientes.

Mejora de la señalización de TGFβ1 después de la incubación previa con sulforafano

Como se ha demostrado que los derivados de tiourea de las proteínas producidas por los isotiocianatos modifican las propiedades fisicoquímicas y enzimáticas [26,27], se buscó evaluar si la modificación de SF de las proteínas de señalización extracelular tenía consecuencias funcionales. El enfoque se hizo en la señalización de TGFβ1 debido a su profundo papel en el mantenimiento de la homeostasis tisular a través del control de la proliferación celular y el comportamiento [28, 29]. La transcripción mediada por Smad inducida por TGFβ1 se cuantificó en células NIH3T3 transfectadas de manera estable con un plásmido CAGA12-luc, en el que la actividad de luciferasa se puede medir tras la activación de proteínas de Smad [30]. La exposición de las células a la actividad luciferasa inducida por TGFβ1 fue como se esperaba. Cuando las células se expusieron a TGFβ1 que se había incubado previamente con concentraciones fisiológicamente apropiadas de SF (2 µM) durante 30 minutos seguidos de diálisis, para simular la farmacocinética del plasma de SF [14], hubo un aumento en la transcripción mediada por Smad en comparación con la exposición a TGFβ1 solo (Figura 11). La exposición de las células al SF residual (34 nM) no dio lugar a una transcripción mejorada, lo que sugiere que SF induce la activación de Smad indirectamente, de acuerdo con las

observaciones previas de que el SF se une al ligando mismo. También es concebible que SF pueda interactuar con el dominio extracelular del receptor para alterar la señalización secuencia abajo.

Incubación de ITC con EGF

5 Un ejemplo adicional de las consecuencias funcionales de las interacciones entre ITC y péptidos de señalización se presenta en la Figura 15, que muestra que la incubación de ITC con EGF puede suprimir la señalización de EGF en células BPH, un modelo de tejido prostático hiperplásico. EGF se une y fosforila el receptor de EGF que activa la vía de señalización secuencia abajo. Los datos presentados muestran que la preincubación de EGF con 4-metilsulfonilbutil ITC (SF) en condiciones que se sabe que causan modificación peptídica reduce la cantidad de receptor fosforilado en comparación con EGF solo. Se esperaría que esto produzca la inhibición de la vía de señalización de EGF, con consecuencias antiinflamatorias.

Combinación de ITC y procianidinas

15 Primero se liofilizó la ensalada de rúcula y se extrajeron los ITC en PBS (200 mg en 5 mL de PBS). La cuantificación por HPLC mostró que esto contenía alrededor de 100 µM de sulforafano, 200 µM de iberina y una cantidad desconocida de otros ITC.

20 El experimento consiste en 10 tratamientos de muestra, todos realizados por triplicado biológico. Las células HUVEC se trataron con los tratamientos a continuación durante 45 minutos antes de agregar 10 ng/mL de TNF α en los tratamientos 2-10. Después de 6 horas, se recogieron los medios y lisados de proteínas y se almacenaron a -20 °C. Luego se hizo ELISA Quantikine de IL-6 (R&D Systems) en el medio y se cuantificó BCA (Sigma) para el contenido de proteína celular.

25 Los tratamientos son (los nombres entre paréntesis son los nombres de la muestra en los gráficos de la Figura 16):

- 1) Control (C)
- 30 2) Control (TNF)
- 3) 2 µg/mL de procianidinas GE (GE)
- 35 4) extracto de rúcula 1 µM (1RkE)
- 5) extracto de rúcula 5 µM (5RkE)
- 6) extracto de rúcula 10 µM (10RkE)
- 40 7) extracto de rúcula 25 µM (25RkE)
- 8) 2 µg/mL de procianidinas GE + extracto de rúcula 1µM (GE + 1RkE)
- 9) 2 µg/mL de procianidinas GE + extracto de rúcula 5µM (GE + 5RkE)
- 45 10) 2 µg/mL de procianidinas GE + extracto de rúcula 10µM (GE + 10RkE)

Los resultados del experimento se muestran en las Figuras 16 y 17.

50 Producción de una variedad de cultivo con altos niveles de 3-metiltiopropil (3-MTP) glucosinolato

Para producir una variedad de cultivo de una planta (por ejemplo, brócoli u otra variedad de *B. oleracea*) con altos niveles de 3-metiltiopropil glucosinolato, se necesitaría combinar los alelos nulos del locus GSL-ELONG de *B. oleracea* con los alelos nulos en el locus GSL-ALK de *B. oleracea* [52-54]. Una posible fuente de alelos adecuados sería *B. drepanensis*, *B. macrocarpa*, *B. rupestris* o *B. villosa*, todos los cuales son miembros del complejo de la especie *B. oleracea* n = 9. Se pueden usar marcadores moleculares adecuados para estos alelos para mejorar la velocidad de introgresión de estos alelos en un contexto genético agronómico comercial.

60 Discusión

Hasta donde se sabe, este es el primer estudio de intervención dietética para analizar los perfiles globales de expresión génica dentro de un tejido objetivo antes y después de una intervención de 12 meses, y para estratificar los perfiles de expresión génica mediante el genotipo. Si bien no se observaron cambios consistentes en los niveles de PSA en plasma durante el período de 12 meses de la intervención, se pudieron cuantificar cambios extensos en la expresión génica. Se encontró poca evidencia para apoyar mecanismos potenciales derivados de modelos animales y celulares para explicar los datos de observación de que el consumo de brócoli puede reducir el riesgo de cáncer, pero

considerable evidencia de la perturbación de varias vías de señalización que están asociadas con carcinogénesis e inflamación (Tabla 2b y c) Es posible que el efecto neto de la perturbación de estas vías pueda reducir el riesgo de proliferación celular y mantener la homeostasis celular y tisular. Es de considerable interés que la intervención con el brócoli se asocie con la perturbación de la señalización de TGF β 1, EGF e insulina, cada una de las cuales se ha asociado con carcinogénesis prostática [31-35], además de carcinogénesis en otros sitios [28, 36, 37], e inflamación asociada con infarto de miocardio [38]. Es de destacar que el consumo de brócoli también se asoció con alteraciones en el procesamiento del ARNm.

Es probable que los principales productos bioactivos derivados del brócoli sean los isotiocianatos, incluidos el sulforafano y la iberina. Se ha demostrado que tienen una multitud de actividades biológicas en modelos celulares compatibles con la actividad anticancerígena [15]. Sin embargo, estos estudios implican en gran medida exponer las células a concentraciones de SF e IB muy superiores a las que ocurren transitoriamente en el plasma después del consumo de brócoli, y están mediadas por la actividad intracelular de los ITC, por ejemplo, perturbando el estado redox intracelular, el agotamiento de glutatión y perturbación del complejo Keap1-Nfr2. Nos preguntamos si estos procesos ocurrirían *in vivo*, ya que cualquiera de los ITC que ingresan a las células se inactivaría inmediatamente a través de la conjugación con glutatión que estaría presente en una concentración relativamente alta. Por lo tanto, se exploró si la actividad biológica de los ITC puede estar mediada a través de su interacción química con péptidos de señalización dentro del entorno extracelular del plasma, que tiene una baja concentración de glutatión. Se demostró que las ITC forman fácilmente tioureas con proteínas de señalización en el plasma mediante la unión covalente con el residuo del terminal N. Es probable que los ITC reaccionen químicamente con otras proteínas plasmáticas y se justifica un análisis global de las modificaciones de proteínas plasmáticas por parte de los ITC. También es posible que se produzcan otros tipos de modificación química de las proteínas plasmáticas por los ITC, tales como la unión covalente a través de residuos de cisteína y lisina [39,40].

Estudios previos han demostrado que las tioureas derivadas de isotiocianato modifican las propiedades fisicoquímicas y enzimáticas de las proteínas parentales [26, 27]. Por lo tanto, es posible que la perturbación de las vías de señalización en la próstata esté mediada por modificaciones de proteínas que se producen en el entorno extracelular. Se proporcionó más evidencia para esta hipótesis al demostrar que la incubación previa de TGF β 1 con una concentración fisiológica apropiada de SF (2 μ M durante 30 minutos), seguida de diálisis durante 4 h para simular la farmacocinética de SF, da como resultado una transcripción mejorada mediada por Smad. Como la transcripción mediada por TGF β 1/Smad inhibe la proliferación celular en células no transformadas [31, 41], la mejora de la transformación mediada por Smad por SF sería coherente con la actividad anticancerígena del brócoli, además del riesgo reducido de infarto de miocardio [10, 38]. En ciertas circunstancias, la mejora de la señalización de TGF β se ha asociado con la progresión tumoral dentro de las células ya iniciadas, aunque las vías precisas por las cuales esto está mediado no se han resuelto por completo [42]. Es potencialmente el efecto neto de los cambios en varias vías, a diferencia del TGF β 1, que puede ser la base de la reducción observada tanto en el cáncer como en el infarto de miocardio a través del consumo de brócoli/crucíferas.

Un estudio previo ha demostrado que los isotiocianatos pueden inhibir la señalización de EGF, pero sin una explicación mecanicista [43]. En el estudio actual, se mostró que SF se unirá al ligando de EGF, y esto puede ser la base de estos resultados y los reportados previamente [43]. Además, la modificación química de las proteínas de señalización por los ITC puede complementarse con la modificación de las proteínas receptoras, tal como se ha demostrado anteriormente para el receptor TRPA1 [39, 40].

La perturbación de las vías de señalización se determina adicionalmente por el genotipo de *GSTM1*. La interacción entre la dieta y *GSTM1* en la expresión génica puede explicar parcialmente los resultados contradictorios de aquellos estudios de control de caso que carecen de evaluación dietética y que han asociado o no el genotipo nulo para *GSTM1* con un mayor riesgo de cáncer de próstata [44-47]. La actividad de la enzima de *GSTM1* cataliza tanto la formación como la escisión de los conjugados SF-glutatión [48]. Se sugiere que después del transporte al plasma desde los enterocitos, la actividad de *GSTM1* (que se origina ya sea por el recambio de las células hepáticas [49] o la fuga de los linfocitos periféricos [50]) cataliza la escisión del conjugado SF-glutatión dentro del ambiente de bajo nivel de glutatión del plasma [51] para determinar el grado de SF libre que está disponible para la modificación de proteínas, tal como se discutió anteriormente, y que no se excreta a través del metabolismo del ácido mercaptúrico (Figura 4). Por lo tanto, los bajos niveles de SF, como se esperaría del consumo dietético normal de brócoli, pueden conducir a cambios sutiles en la señalización celular, que, con el tiempo, dan como resultado cambios profundos en la expresión génica. De esta manera, consumir una porción de brócoli por semana si se es positivo para *GSTM1*, o más de uno es nulo para *GSTM1* [14], puede contribuir a una reducción en el riesgo de cáncer.

Además de la información que proporciona este estudio sobre el efecto del consumo de brócoli en la expresión génica, se considera que este estudio puede tener implicaciones más amplias. Primero, se demostró que las biopsias rutinarias de próstata con aguja pueden usarse para análisis globales de expresión génica además de la evaluación histológica, y que es posible monitorear los cambios en la expresión con el tiempo. Es notable que los hombres dentro de ambos brazos dietéticos del estudio tuvieron cambios significativos en la vía del receptor de andrógenos. Es posible que estos cambios en la señalización de andrógenos estén asociados con el envejecimiento e independientemente de las dietas, o que hayan sido inducidos por un componente común de la dieta rica en brócoli y rica en guisantes. Hasta donde se sabe, no hay datos sobre la tasa de cambio en la señalización de andrógenos en hombres de esta edad con HGPIN.

Esta observación sugiere que se justifica un estudio adicional. El análisis de la tasa de cambio de la expresión génica de hombres diagnosticados con HGPIN o cáncer de próstata localizado a través de biopsias secuenciales puede proporcionar biomarcadores confiables para medir la probabilidad de carcinogénesis y progresión hasta cáncer agresivo, y complementar el examen histológico de biopsias con aguja y la medición de los niveles de PSA en plasma. En segundo lugar, la estratificación de los perfiles globales de expresión génica por genotipo ha sido informativa, y este enfoque podría extenderse a otros genes para diseccionar patrones de expresión génica en la próstata u otros tejidos. Por último, es concebible que otros compuestos fitoquímicos de la dieta, tales como los derivados polifenólicos, también puedan interactuar químicamente con los péptidos de señalización en el plasma, de manera similar al mecanismo de acción sugerido de los isotiocianatos.

En conclusión, se considera que este estudio ha proporcionado una base mecanicista para la reducción del riesgo de cáncer de próstata a través del consumo de brócoli, como lo sugieren los estudios epidemiológicos.

Los voluntarios fueron asignados aleatoriamente a una dieta rica en brócoli o rica en guisantes. Después de seis meses no hubo diferencias en la expresión génica entre los individuos positivos y nulos para glutatión S-transferasa mu 1 (*GSTM1*) en la dieta rica en guisantes, sino diferencias significativas entre los genotipos de *GSTM1* en la dieta rica en brócoli, asociada con el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFβ1) y vías de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF). La comparación de las biopsias obtenidas antes y después de la intervención reveló que se produjeron más cambios en la expresión génica en individuos con una dieta rica en brócoli que en aquellos con una dieta rica en guisantes. Si bien hubo cambios en la señalización de andrógenos, independientemente de la dieta, los hombres en la dieta de brócoli tuvieron cambios adicionales en el procesamiento de ARNm y la señalización de TGFβ1, EGF e insulina. También se proporcionó evidencia de que el sulforafano (el isotiocianato derivado del 4-metilsulfonilbutil glucosinolato que se acumula en el brócoli) interactúa químicamente con los péptidos TGFβ1, EGF e insulina para formar tioureas, y mejora la transcripción mediada por TGFβ1/Smad.

Conclusiones

Los hallazgos presentados en este documento sugieren que el consumo de brócoli interactúa con el genotipo de *GSTM1* para dar como resultado cambios complejos en las vías de señalización asociadas con inflamación y carcinogénesis en la próstata. Se propone que estos cambios pueden estar mediados por la interacción química de isotiocianatos con péptidos de señalización en el plasma. Este estudio proporciona, por primera vez, evidencia experimental obtenida en humanos para respaldar estudios de observación de que las dietas ricas en verduras crucíferas pueden reducir el riesgo de cáncer de próstata y otras enfermedades crónicas.

Tabla 1. Características de los voluntarios y niveles de PSA en plasma

Edad	BMI	GSTM1	PSA (ng/mL)		
			Intervención previa	6 meses	12 meses
Intervención con Brócoli					
68	29	nulo	4.6	5.4	5.3
68	27	nulo	3.1	3.2	2.9
64	26	nulo	9.4	3.5	2.9
63	31	nulo	6.5	7.9	7.2
66	28	nulo	0.9	1.3	0.9
		Media (sd)	4.9 (3.25)	4.3 (2.50)	3.84 (2.44)
57	27	positivo	5.5	5.5	5.7
66	30	positivo	13.6	16.8	13.4
(continuación)					
Edad	BMI	GSTM1	PSA (ng/mL)		
			Intervención previa	6 meses	12 meses
69	27	positivo	6.9	3.8	3.7
62	23	positivo	2.2	2.2	1.9
59	29	positivo	10.8	10.4	11.2
68	25	positivo	9.7	12.5	7.2
64	32	positivo	6.4	6.1	6.6
63	27	positivo	7.9	9	10.8

			Media (sd)	7.9 (3.5)	8.3 (4.85)	7.56 (3.95)
Intervención con guisantes						
70	28	nulo	4.1	4.2	4.4	
65	24	nulo	7.5	9.3	8.2	
59	24	nulo	9.3	10.8	8	
61	35	nulo	1.1	1.1	1.1	
57	26	nulo	5.5	5.4	5.2	
			Media (sd)	5.5 (3.15)	6.2 (3.92)	5.4 (2.92)
70	23	positivo	8.9	5.2	N/A*	
61	29	positivo	2.3	2.2	2.5	
57	30	positivo	3.5	5.5	4.9	
			Media (sd)	4.9 (3.52)	4.3 (1.82)	3.7 (1.70)

Uno de los 22 voluntarios fue diagnosticado con adenocarcinoma prostático en la biopsia basal del estudio (intervención previa) y fue retirado del estudio.

*Este voluntario desarrolló adenocarcinoma de próstata seis meses después de la intervención y fue retirado del estudio.

Tabla 2. Análisis de la vía del tejido de biopsia de próstata.

Vía	Genes cambiados/Genes en MAPP	Valor <i>P</i> ajustado*
a. Tejido de TURP benigno comparado con maligno		
Adhesión focal	57/187	<0.001
Receptor de TGFβ	47/151	0.002
Ejercicio circadiano	20/48	0.006
Metabolismo de ácidos grasos	24/80	0.012
Regulación de la síntesis de prostaglandinas	14/31	0.026
Unión de actina	53/213	0.028
GCRP clase A tipo rodopsina	15/262	0.05
b. <i>GSTM1</i> positivos comparados con <i>GSTM1</i> nulos después de seis meses de intervención con brócoli		
EGFR1	76/177	<0.001
Adipogénesis	52/130	0.026
Receptor de TGF-beta	58/151	0.039

(continuación)

c. Muestras emparejadas antes y después de la intervención dietética de 12 meses

0 - 12 meses con guisantes

Receptor de andrógeno	18/112	0.042
-----------------------	--------	-------

0 - 12 meses con brócoli **

Procesamiento de ARNm	40/125	< 0.001
Receptor de andrógeno	33/112	< 0.001
Receptor de TGFβ	39/151	0.004
Señalización de Insulina	38/159	0.014
Muesca delta	24/85	0.019
Señalización de Wnt	28/109	0.02

0 - 12 meses con brócoli **

EGFR1	40/177	0.02
IL-2	21/76	0.036

EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; GPCR, receptores acoplados a proteína G; IL-2, interleucina 2; TGFβ, factor de crecimiento transformante beta; TURP: resección transuretral de la próstata; Wnt, sitio de integración de MMTV de tipo sin alas. Se muestran las vías en GenMAPP que están enriquecidas en las listas de genes que diferencian los grupos. Solo se muestran las vías con valores de P ajustados ≤ 0.05. Además, el número de genes que cambian entre los grupos que pertenecen a estas vías se muestra junto con el número total de genes que constituyen la vía. El análisis de la vía se realizó en las listas de genes generadas en dChip que fueron estadísticamente significativas (P ≤ 0.05, prueba t de dos muestras pareadas o no pareadas modificadas por Welch) entre los dos grupos. No se usó corte de pliegue. Para obtener detalles sobre las listas de genes, véase la Tabla 3. * Los valores de P se calcularon en GenMAPP utilizando una estadística no paramétrica con base en 2000 permutaciones de los datos y se ajustó adicionalmente para múltiples pruebas mediante el ajuste de Westfall-Young. ** Voluntarios positivos para *GSTM1*, n = 4.

Tabla 3. Sondas expresadas diferencialmente en tejido de próstata

	Veces que cambia	P < 0.05*	P < 0.005*	P < 0.0005*
(a) Diferencias entre tejido de TURP benigno y maligno				
Benigno vs Maligno	>1.0	3810 (353)	683 (7)	124 (0)
	>1.5	1081 (59)	400 (2)	104 (0)
	>2.0	277 (7)	140 (0)	54 (0)
(b) Diferencias entre genotipos positivos y nulos para <i>GSTM1</i>				
Benigno (TURP)	>1.0	661 (538)	19 (17)	0 (0)
	>1.5	160 (186)	7 (14)	0 (0)
	>2.0	50 (40)	1 (3)	0 (0)
Maligno (TURP)	>1.0	686 (431)	8 (13)	0 (0)
	>1.5	244 (152)	4 (8)	0 (0)
	>2.0	44 (33)	1 (3)	0 (0)
Intervención previa	>1.0	730 (484)	26 (9)	0 (0)
	>1.5	252 (79)	16 (3)	0 (0)
	>2.0	43 (9)	8 (1)	0 (0)
(continuación)				
(b) Diferencias entre genotipos positivos y nulos para <i>GSTM1</i>				
6 meses con brócoli	>1.0	7976 (351)	434 (4)	17 (0)
	>1.5	2790 (91)	268 (2)	14 (0)
	>2.0	316 (8)	31 (0)	1 (0)
6 meses con guisantes	>1.0	220 (220)	6 (4)	0 (0)
	>1.5	33 (41)	5 (3)	0 (0)
	>2.0	5 (10)	1 (1)	0 (0)
(c) Diferencias entre muestras emparejadas				
0 - 12 meses con brócoli	>1.0	2857 (96)	151 (0)	1 (0)
	>1.5	1243 (12)	141 (0)	1 (0)

(c) Diferencias entre muestras emparejadas

	>2.0	213 (0)	62 (0)	1 (0)
0 - 12 meses con guisantes	>1.0	1199 (42)	19 (0)	0 (0)
	>1.5	495 (18)	19 (0)	0 (0)
	>2.0	81 (1)	4 (0)	0 (0)

Se muestran los números de sonda que han satisfecho los criterios de comparación de veces que cambia y cortes del valor P. Los números entre paréntesis representan la tasa media de descubrimiento falso calculada en dChip después de 100 permutaciones de las muestras.

* Los valores P se calcularon en dChip mediante una prueba t de dos muestras modificada por Welch. n = 18 para benigno, n = 14 para maligno; n = 4 para GSTM1 (+) benigno, n = 14 para GSTM1 (-) benigno; n = 5 para GSTM1 (+) maligno, n = 9 para GSTM1 (-) maligno; n = 7 para GSTM1 (+) Intervención previa, n = 3 para GSTM1 (-) Intervención previa; n = 6 para GSTM1 (+) 6 meses con brócoli, n = 5 para GSTM1 (-) 6 meses con brócoli; n = 3 para GSTM1 (+) 6 meses con guisante y n = 5 para GSTM1 (-) 6 meses de intervención con guisante.

** Los valores P se calcularon en dChip mediante una prueba t pareada de dos muestras modificada por Welch, n = 4 para cada una de las intervenciones dietéticas.

Tabla 4. Análisis dietético de la ingesta diaria promedio de nutrientes

Variable	Línea base	6 meses	Valor P *
Dieta rica en guisantes (n=7)			
Gras (g)	93.76 (32.97)	90.99 (25.83)	0.831
Proteína (g)	87.50 (15.15)	95.77 (33.31)	0.526
CHO (g)	240.04 (79.85)	242.94 (72.97)	0.872
Energía (KJ)	9081.88 (2480.80)	9506.00 (2405.38)	0.738
Alcohol (g)	12.65 (9.87)	25.07 (35.42)	0.415
Colesterol (mg)	353.57 (74.43)	345.29 (201.06)	0.930
Vitamina C (mg)	81.00 (66.05)	79.43 (62.58)	0.846
Vitamina E (mg)	8.24 (5.64)	7.15 (3.60)	0.395
Vitamina D (µg)	3.77 (3.25)	3.84 (1.76)	0.949
β-Caroteno (mg)	1.94 (1.57)	3.22 (2.29)	0.184
Folato (µg)	261.00 (89.36)	332.86 (214.50)	0.489
Hierro (mg)	11.73 (4.36)	13.32 (4.92)	0.555
Selenio (µg)	50.14 (13.01)	49.14 (23.08)	0.923
(continuación)			
Dieta rica en guisantes (n=7)			
Guisantes (g)	8.57 (10.23)	57.41 (18.86)	0.001
Brócoli (g)	18.49 (30.89)	9.90 (13.61)	0.431
GSL estimado (µmol)	9.36 (15.63)	5.01 (6.88)	0.431
Dieta rica en Brócoli (n=11)			
Gras (g)	90.93 (29.27)	91.57 (33.70)	0.929
Proteína (g)	96.99 (20.02)	96.97 (21.26)	0.996
CHO (g)	276.28 (76.03)	296.18 (72.99)	0.305
Energía(KJ)	9633.45 (2311.35)	9980.73 (2286.62)	0.488
Alcohol (g)	9.75 (7.20)	10.48 (9.70)	0.841

Colesterol (mg)	337.27 (168.29)	298.46 (123.99)	0.211
Vitamina C (mg)	262.55 (175.83)	303.00 (188.52)	0.590
Vitamina E (mg)	11.31 (5.73)	11.14 (4.82)	0.924
Vitamina D (µg)	5.22 (3.17)	3.65 (1.08)	0.076
Beta Caroteno (mg)	4.07 (3.01)	3.63 (2.53)	0.667
Folato (µg)	477.82 (188.20)	491.36 (193.47)	0.762
Hierro (mg)	14.29 (2.09)	14.09 (2.25)	0.916
Selenio (µg)	77.09 (29.89)	68.82 (26.22)	0.304
Guisantes (g)	4.16 (5.51)	7.60 (8.46)	0.227
Brócoli (g)	25.89 (24.49)	55.84 (7.71)	0.002
GSL estimado µmol	13.10 (12.39)	79.30 (10.94)	<0.0001

5 Las variables mostradas se dan en unidades medias (SD) por día. GSL se refiere a los precursores de glucosinolato de sulforafano e iberina (es decir, 4-metilsulfinilbutil y 3-metilsulfinilpropil glucosinolato, respectivamente). Un análisis similar entre individuos positivos y nulos para GSTM1 no mostró diferencias en la ingesta de la dieta después de 6 meses dentro de una intervención rica en brócoli o rica en guisantes. * Los valores P se calcularon en Minitab usando una prueba t pareada.

Ejemplo 3

10 Los factores de crecimiento interactúan con los receptores en la superficie celular para afectar la regulación de genes y proteínas y, por lo tanto, la proliferación celular dentro de la célula a través de vías de señalización celular. Una vía de señalización celular importante se conoce como señalización PI3K/pAKT. En esta vía, los factores de crecimiento tales como la insulina, EGF y TGFβ interactúan con los receptores de la superficie celular, lo que resulta en la fosforilación de una proteína conocida como AKT. La activación de esta vía juega un papel vital en la supervivencia celular al estimular el metabolismo, la síntesis de proteínas, la síntesis de ADN y la proliferación celular, e inhibir la apoptosis. El grado de activación normalmente está limitado por la proteína PTEN que atenúa la fosforilación de AKT. En muchos tipos de cáncer, PTEN está mutado, de modo que existe una activación constitutiva de AKT que conduce a la rápida proliferación celular y formación de tumores. La inhibición de la señalización de pAKT es un objetivo importante de la industria farmacéutica. La pérdida de PTEN ocurre en hasta el 60% de los cánceres de próstata metastásicos.

20 Existe un vínculo entre pAKT y la génesis tumoral.

25 La activación de pAKT se puede observar en la línea celular de cáncer de próstata PC-3 mediante transferencia Western (véase la Figura 19). Esto se debe en parte a que las células PC-3 son muy sensibles a los factores de crecimiento presentes en el suero de ternera fetal (FCS), que es parte del medio de cultivo normal, debido a la falta de un gen PTEN funcional para atenuar la fosforilación de AKT. Por el contrario, en la línea celular no cancerosa BPH-1, que posee un gen PTEN funcional, la fosforilación de AKT solo ocurre después de la exposición a factores de crecimiento adicionales tales como insulina o EGF (véase la Figura 18).

30 La incubación de células PC-3 con SF durante una hora reduce la expresión de pAKT (Figura 19), particularmente a los niveles de dosificación de 2 µM. Los datos para las células PC-3 + SF + FCS (suero de ternera fetal) se muestran en la expresión constitutiva de control (sin SF) de pAKT. La adición de SF 2 µM suprime pAKT, mientras que hay una respuesta variable a 10 µM. Los inventores también han observado supresión a 0.5 µM (datos no mostrados).

35 La supresión de pAKT se pierde a concentraciones más altas, cuando habría una interrupción considerable.

40 Si las células PC-3 se cultivan en medio de cultivo sin FCS, todavía hay expresión de pAKT, aunque a un nivel reducido (véase la Figura 20), pero no hay inhibición adicional por la adición de SF. Esto sugiere que SF puede estar interactuando con los factores de crecimiento en el FCS para evitar una mayor fosforilación de AKT, en lugar de actuar dentro de la célula.

45 Por lo tanto, la conjugación entre isotiocianatos y varios factores de crecimiento importantes conduce a la inhibición de los factores de crecimiento que puede estar asociada con la actividad anticancerígena, particularmente en tejidos en los que ha habido una mutación en el gen PTEN que conduce a la hiperactivación de la señalización mediada por pAKT, que se asocia con la proliferación celular y el crecimiento tumoral.

Transferencia Western

Las células BPH-1 o PC-3 se cultivaron en placas de cultivo celular de 10 cm o placas de cultivo de 6 pozos hasta que alcanzaron una confluencia del 80% y se levantaron usando tampón TE (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Después de 24 h, de tratamiento con células SF se lavó tres veces con PBS frío y se trató con tampón RIPA durante 2 minutos en hielo, seguido de centrifugación a 13000 g a 4 °C durante 10 minutos y el sobrenadante se recogió para transferencia Western. La proteína se separó en geles de poliacrilamida al 10% NuPage por electroforesis y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Se probaron las membranas con anticuerpos primarios obtenidos de Cell Signaling® a una dilución de 1:1000: mAb de conejo Phospho-Akt (Ser⁴⁷³) (# 4060L) y mAb de conejo AKT (pan) (# 4685).

Se usó GAPDH como control de carga para todas las transferencias. Las proteínas se visualizaron con el kit de quimioluminiscencia SuperSignal West.

La figura 21 muestra los resultados de la transferencia Western. A: inmunohistoquímica de células PC-3 que muestran expresión de pAKT (coloración roja). B: inmunohistoquímica de células PC-3 después de la incubación en SF 2 µM durante 1 h que muestra la inhibición de la expresión de pAKT.

Todas las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva anterior se incorporan en el presente documento como referencia. Varias modificaciones y variaciones de los métodos y sistemas descritos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos relacionados están destinados a estar dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

1. Referencias

1. Allender, S., et al. Coronary heart disease statistics. 2008 [cited 2009 15/07/09]; Disponible en: www.heartstats.org.
2. Coronary heart disease. Health care 2009 [cited 2009 06/05/2009]; Disponible en: <http://www.dh.gov.uk/en/Healthcare/NationalServiceFrameworks/Coronaryheartdiseases/>.
3. Schaefer, E.J., Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am J Clin Nutr*, 2002. 75(2): páginas 191-212.
4. Libby, P. y P.M. Ridker, Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation*, 1999. 100(11): páginas 1148-50.
5. Plutzky, J., Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Am J Cardiol*, 2001. 88(8A): páginas 10K-15K.
6. Ross, R., Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, 1999. 138(5 Pt 2): páginas S419-20.
7. Tracy, R.P., Inflammation in cardiovascular disease: cart, horse, or both? *Circulation*, 1998. 97(20): páginas 2000-2.
8. Lampe, J.W., Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr*, 1999. 70(3 Suppl): páginas 475S-490S.
9. Barberger-Gateau, P., et al., Fish, meat, and risk of dementia: cohort study. *BMJ*, 2002. 325(7370): páginas 932-3.
10. Kalmijn, S., et al., Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol*, 1997. 42(5): páginas 776-82.
11. Morris, M.C., et al., Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 2003. 60(7): páginas 940-6.
12. Ambrosone, C.B., et al., Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype. *J Nutr*, 2004. 134(5): páginas 1134-8.
13. Feskanich, D., et al., Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(22): páginas 1812-23.
14. Fowke, J.H., et al., Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. *Cancer Res*, 2003. 63(14): páginas 3980-6.
15. Miller, A.B., et al., Fruits and vegetables and lung cancer: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*, 2004. 108(2): páginas 269-76.
16. Neuhauser, M.L., et al., Fruits and vegetables are associated with lower lung cancer risk only in the placebo arm of the beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. 12(4): páginas 350-8.
17. Verhoeven, D.T., et al., Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1996. 5(9): páginas 733-48.
18. Voorrips, L.E., et al., Vegetable and fruit consumption and risks of colon and rectal cancer in a prospective cohort study: The Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Epidemiol*, 2000. 152(11): páginas 1081-92.
19. Milner, J.A., Molecular targets for bioactive food components. *J Nutr*, 2004. 134(9): páginas 2492S-2498S.
20. Surh, Y.J., Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(10): páginas 768-80.
21. Cornelis, M.C., A. El-Sohehy, y H. Campos, GSTT1 genotype modifies the association between cruciferous vegetable intake and the risk of myocardial infarction. *Am J Clin Nutr*, 2007. 86(3): páginas 752-8.
22. Law, M.R., N.J. Wald, y S.G. Thompson, By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ*, 1994. 308(6925): páginas 367-72.

23. Mirmiran, P., et al., Fruit and vegetable consumption and risk factors for cardiovascular disease. *Metabolism*, 2009. 58(4): páginas 460-8.
24. Suido, H., et al., A mixed green vegetable and fruit beverage decreased the serum level of low-density lipoprotein cholesterol in hypercholesterolemic patients. *J Agric Food Chem*, 2002. 50(11): páginas 3346-50.
- 5 25. Takai, M., et al., [LDL-cholesterol-lowering effect of a mixed green vegetable and fruit beverage containing broccoli and cabbage in hypercholesterolemic subjects]. *Rinsho Byori*, 2003. 51(11): páginas 1073-83.
26. Tucker, K.L., et al., Dietary intake pattern relates to plasma folate and homocysteine concentrations in the Framingham Heart Study. *J Nutr*, 1996. 126(12): páginas 3025-31.
- 10 27. Ganji, V. y M.R. Kafai, Frequent consumption of milk, yogurt, cold breakfast cereals, peppers, and cruciferous vegetables and intakes of dietary folate and riboflavin but not vitamins B-12 and B-6 are inversely associated with serum total homocysteine concentrations in the US population. *Am J Clin Nutr*, 2004. 80(6): páginas 1500-7.
28. Nettleton, J.A., et al., Dietary patterns are associated with biochemical markers of inflammation and endothelial activation in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr*, 2006. 83(6): páginas 1369-79.
- 15 29. Wu, L. y B.H. Juurlink, The impaired glutathione system and its up-regulation by sulforaphane in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 2001. 19(10): páginas 1819-25.
30. Wu, L., et al., Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(18): páginas 7094-9.
31. Kim, S.Y., et al., Kale juice improves coronary artery disease risk factors in hypercholesterolemic men. *Biomed Environ Sci*, 2008. 21(2): páginas 91-7.
- 20 32. Murashima, M., et al., Phase 1 study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts. *Biofactors*, 2004. 22(1-4): páginas 271-5.
33. Yochum, L., et al., Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol*, 1999. 149(10): páginas 943-9.
- 25 34. van Poppel, G., et al., Brassica vegetables and cancer prevention. *Epidemiology and mechanisms. Adv Exp Med Biol*, 1999. 472: páginas 159-68.
- 35 35. Conaway, C.C., et al., Disposition of glucosinolates and sulforaphane in humans after ingestion of steamed and fresh broccoli. *Nutr Cancer*, 2000. 38(2): páginas 168-78.
36. Steinmetz, K.A. y J.D. Potter, Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control*, 1991. 2(6): páginas 427-42.
- 30 37. Steinmetz, K.A. y J.D. Potter, Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control*, 1991. 2(5): páginas 325-57.
38. Sarikamis, G., et al., High glucosinolate broccoli: a delivery system for sulforaphane. *Molecular Breeding*, 2006. 18(3): páginas 219-228.
- 35 39. Mithen, R., et al., Development of isothiocyanate-enriched broccoli, and its enhanced ability to induce phase 2 detoxification enzymes in mammalian cells. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003. 106(4): páginas 727-734.
40. Gasper, A.V., et al., Glutathione S-transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. *Am J Clin Nutr*, 2005. 82(6): páginas 1283-91.
41. Traka, M., et al., Broccoli consumption interacts with GSTM1 to perturb oncogenic signalling pathways in the prostate. *PLoS ONE*, 2008. 3(7): página e2568.
- 40 42. Awasthi, Y., R. Sharma, y S. Singhal, Human glutathione S-transferases. *Int J Biochem*, 1994. 26: páginas 295-305.
43. Ryberg, D., et al., Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung ADN adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*, 1997. 18(7): páginas 1285-9.
44. Lakatta, E., et al., Human aging: changes in structure and function. *J Am Coll Cardiol.*, 1987. 1987(10 (suppl A)): páginas 42A-47A.
- 45 45. Sutton-Tyrrell, K., et al., Aortic stiffness is associated with visceral adiposity in older adults enrolled in the study of health, aging, and body composition. *Hypertension*, 2001. 38(3): páginas 429-33.
46. Laurent, S., et al., Aortic stiffness is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in hypertensive patients. *Hypertension*, 2001. 37(5): páginas 1236-41.
- 50 47. Weber, T., et al., Arterial stiffness, wave reflections, and the risk of coronary artery disease. *Circulation*, 2004. 109: páginas 184-189.
48. Blacher, J., et al., Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients. *Hypertension*, 1999. 33(5): páginas 1111-7.
49. Blacher, J., et al., Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease. *Circulation*, 1999. 99(18): páginas 2434-9.
- 55 50. Laurent, S. y P. Boutouyrie, Arterial stiffness: a new surrogate end point for cardiovascular disease? *J Nephrol*, 2007. 20 Suplemento 12: páginas S45-50.
51. O'Brien, E., et al., Use and interpretation of ambulatory blood pressure monitoring: recommendations of the British hypertension society. *BMJ*, 2000. 320(7242): páginas 1128-34.
- 60 52. Laurent, S., et al., Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*, 2006. 27(21): páginas 2588-605.
53. Kelly, R.P., R. Tunin, y D.A. Kass, Effect of reduced aortic compliance on cardiac efficiency and contractile function of in situ canine left ventricle. *Circ. Res*, 1992. 71: páginas 490-502.
54. Ohtsuka, S., et al., Chronically decreased aortic distensibility causes deterioration of coronary perfusion during increased left ventricular contractility. *J. Am. Coll. Cardiol*, 1994. 24: páginas 1406-1414.
- 65 55. Smulyan, H. y M.E. Safar, Systolic blood pressure revisited. *J. Am. Coll. Cardiol*, 1997. 29: páginas 1407-1413.

56. Rajkumar, C., et al., Hormonal therapy improves arterial compliance in post menopausal women. *J. Am. Coll. Cardiol*, 1997. 39: páginas 350-356.
57. Nichols WW y O.R. MF., Theoretical, experimental and clinical principles. *McDonald's Blood Flow in Arteries* 1998, London: Arnold.
58. Wood, D.A., et al., JBS2: Joint British guidelines on prevention of cardiovascular disease in clinical practice. *Heart*, 2005. 91(Suplemento V): páginas V1-52.
59. Wilson, P.W., et al., Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*, 1998. 97(18): páginas 1837-47.
60. Taves, D.R., Minimization: a new method of assigning patients to treatment and control groups. *Clin Pharmacol Ther*, 1974. 15(5): páginas 443-53.
61. Jacobs, D.R., Jr., et al., High density lipoprotein cholesterol as a predictor of cardiovascular disease mortality in men and women: the follow-up study of the Lipid Research Clinics Prevalence Study. *Am J Epidemiol*, 1990. 131(1): páginas 32-47.
62. Wald, N.J. y M.R. Law, Serum cholesterol and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis*, 1995. 118 Suppl: páginas S1-5.
63. Werner, R.M. y T.A. Pearson, LDL-cholesterol: a risk factor for coronary artery disease--from epidemiology to clinical trials. *Can J Cardiol*, 1998. 14 Suppl B: páginas 3B-10B.
64. Hutton, J., et al., Cardiovascular Disease in England: Opportunities and Challenges Over the Next Ten Years. *Cardio and vascular coalition*, ed. C.D.i. England. 2008, York: York Health Economic Consortium, University of York.
65. Uren, N. y S. Collins. High cholesterol level (hypercholesterolaemia). 2008 04/07/2008 [cited 2009 19/05/2009]; Available from: <http://www.netdoctor.co.uk/diseases/facts/hypercholesterolemia.htm>.
66. Williams, B., et al., British Hypertension Society guidelines for hypertension management 2004 (BHS-IV): summary. *BMJ*, 2004. 328(7440): páginas 634-40.
67. Kang, M., B.G. Ragan, y J.H. Park, Issues in outcomes research: an overview of randomization techniques for clinical trials. *J Athl Train*, 2008. 43(2): páginas 215-21.
68. Khoshdel, A.R., et al., Better management of cardiovascular diseases by pulse wave velocity: combining clinical practice with clinical research using evidence-based medicine. *Clin Med Res*, 2007. 5(1): páginas 45-52.
69. Boutouyrie, P., S. Laurent, y M. Briet, Importance of arterial stiffness as cardiovascular risk factor for future development of new type of drugs. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008. 22(3): páginas 241-6.
70. Asmar., R., ed. *Arterial Stiffness and Pulse Wave Velocity: Clinical Applications*. ed. E.s.e. medicals. 1999, Elsevier SAS: Paris.
71. White, W., Importance of aggressive blood pressure lowering when it may matter most. *Am J Cardiol.*, 2007. 100(3A): páginas 10J-16J.
72. Clement, D., M. De Buyzere, y D. De Bacquer, et al., Prognostic value of ambulatory blood-pressure recordings in patients with treated hypertension. *N Engl J Med*, 2003. 348(24): páginas 2407-15.
73. McGrath, B., Ambulatory blood pressure monitoring. *Med J Aust*, 2002. 176(12): páginas 588-92.
74. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): páginas 115-26.
75. Yudkin, J.S., y et al., C - reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(4): páginas 972-8.
76. Ershler, W.B., W.H. Sun, y N. Binkley, The role of interleukin-6 in certain age-related diseases. *Drugs Aging*, 1994. 5(5): páginas 358-65.
77. Volpato, S., et al., Cardiovascular disease, interleukin-6, and risk of mortality in older women: the women's health and aging study. *Circulation*, 2001. 103(7): páginas 947-53.
78. Ridker, P.M., Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*, 2003. 107(3): páginas 363-9.
79. Pepys, M.B. y G.M. Hirschfield, C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*, 2003. 111(12): páginas 1805-12.
80. Zittermann, A., Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Prog Biophys Mol Biol*, 2006. 92(1): páginas 39-48.
81. Holick, M.F., Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, 2007. 357(3): páginas 266-81.
82. Lee, J.H., et al., Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol*, 2008. 52(24): páginas 1949-56.
83. (online), U.D.o.H.a.H.S. National Health and Nutrition Examination Survey Data. National Centre for Health statistics [cited 2009 09/07/09]; Available from: <http://www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm>.
84. Martins, D., et al., Prevalence of cardiovascular risk factors and the serum levels of 25-hydroxyvitamin D in the United States: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med*, 2007. 167(11): páginas 1159-65.
85. Wang, T.J., et al., Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*, 2008. 117(4): páginas 503-11.
86. Stroewsand, G., Bioactive Organosulfur Phytochemical in Brassica oleracea Vegetables - A review. *Food Chemistry Toxicology*, 1995. 33: páginas 537-543.

Listado de secuencias

<110> Plant Bioscience Limited

<120> Utilización
 <130> P037755WO
 5 <140> PCT/GB2010/052200
 <141> 2010-12-23
 10 <150> GB 0922505.3
 <151> 2009-12-23
 <160> 7
 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 13
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys
 1 5 10

25 <210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador directo (GSTM1)
 <400> 2
 35 ggagacagaa gaggagaaga ttcg 24
 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso (GSTM1)
 45 <400> 3
 tgcccagctg catatggtt 19
 <210> 4
 <211> 28
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda (GSTM1)
 55 <400> 4
 tccatggtct ggttctccaa aatgtcca 28
 <210> 5
 60 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Cebador directo (Gen de control BRCA1)

ES 2 776 472 T3

<400> 5
gtctgctttt acatctgaac ctctgt 26

5 <210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador inverso (Gen de control BRCA1)

<400> 6
agccctgagc agtcttcaga ga 22

15 <210> 7
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sonda (Gen de control BRCA1)

<400> 7
actctcacac ccagatgctg cttcacct 28

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una verdura crucífera (*Brassicaceae*) que tiene un glucosinolato y/o al menos un derivado del mismo en una cantidad de 20 a 100 μ moles/g en peso seco para usar en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular (CVD) o para uso en la promoción de salud cardíaca y/o cardiovascular en un sujeto humano, en el que al menos un derivado del mismo se selecciona de al menos uno de: 4-metilsulfinilbutil glucosinolato, 3-metilsulfinilpropil glucosinolato, 4-metiltiobutil glucosinolato, 3-metiltiopropil glucosinolato, sulforafano, erucina, sativina, iberina, β -feniletilisotiocianato (PE-ITC), 3-metiltiopropil isotiocianato en el que la verdura crucífera (*Brassicaceae*) es brócoli y dichos sujetos se definen como aquellos cuyo riesgo de CVD a 10 años es del 10% al 20%.
- 10 2. Una verdura crucífera para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enfermedad cardiovascular se selecciona entre angina, arteriosclerosis, cardiomiopatía o inflamación cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad de la arteria carótida, ataque cardíaco (trombosis coronaria, infarto de miocardio), enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular.
- 15 3. Una verdura crucífera para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en el tratamiento de uno o más factores de riesgo cardiovascular.
- 20 4. Una verdura crucífera para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el factor de riesgo cardiovascular es hipercolesterolemia.
- 25 5. Una verdura crucífera para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para uso en el mejoramiento o control de uno o más del nivel de colesterol LDL, el nivel de colesterol HDL, el nivel de colesterol total, el nivel de vitamina D y/o presión arterial.
- 30 6. Una verdura crucífera para uso de acuerdo con la reivindicación 5, para uso en el mejoramiento o control del nivel de colesterol en suero.
- 35 7. Una verdura crucífera para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el nivel de colesterol total (TC) y/o colesterol LDL se reduce o evita que aumente en comparación con el nivel en un sujeto al que no se le administra dicha composición.
- 40 8. Una verdura crucífera (*Brassicaceae*) que tiene un glucosinolato y/o al menos un derivado del mismo en una cantidad de 20 a 100 μ moles/g en peso seco para uso en el mejoramiento o control del nivel de colesterol en suero de mamífero, o para tratar o prevenir la hipercolesterolemia en un sujeto humano en el que al menos un derivado del mismo se selecciona de al menos uno de: 4-metilsulfinilbutil glucosinolato, 3-metilsulfinilpropil glucosinolato, 4-metiltiobutil glucosinolato, 3-metiltiopropil glucosinolato, sulforafano, erucina, sativina, iberina, β -feniletilisotiocianato (PE-ITC), 3-metiltiopropil isotiocianato en el que la verdura crucífera (*Brassicaceae*) es brócoli y dichos sujetos se definen como aquellos cuyo riesgo de CVD a 10 años es del 10% al 20%.
9. Una verdura crucífera para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el nivel de colesterol total (TC) y colesterol LDL se reduce o se evita que aumente.

FIGURA 1

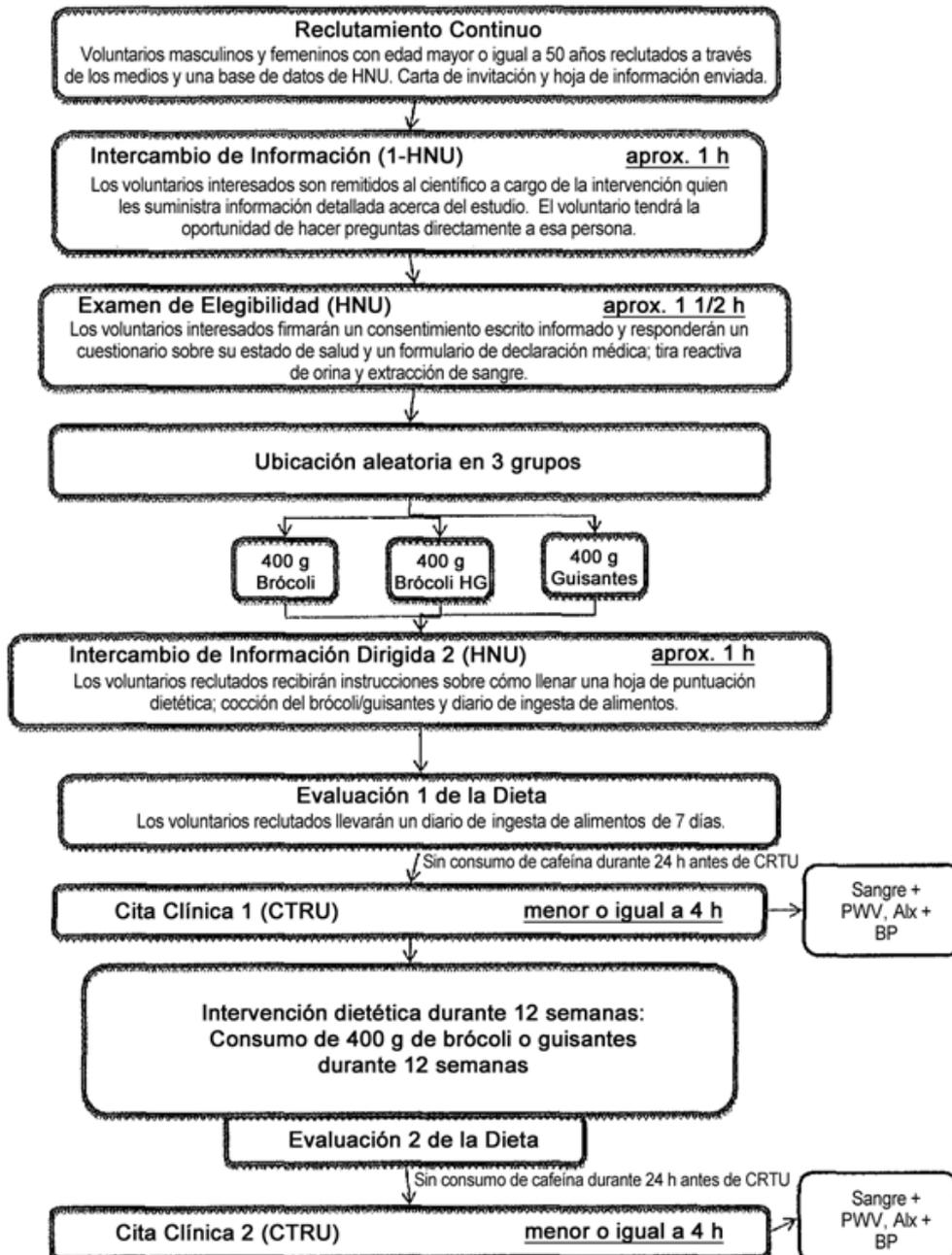


FIG. 2a

-  riesgo de CVD <10% durante los próximos 10 años
-  riesgo de CVD 10-20% durante los próximos 10 años
-  riesgo de CVD >20% durante los próximos 10 años

Hombres no diabéticos

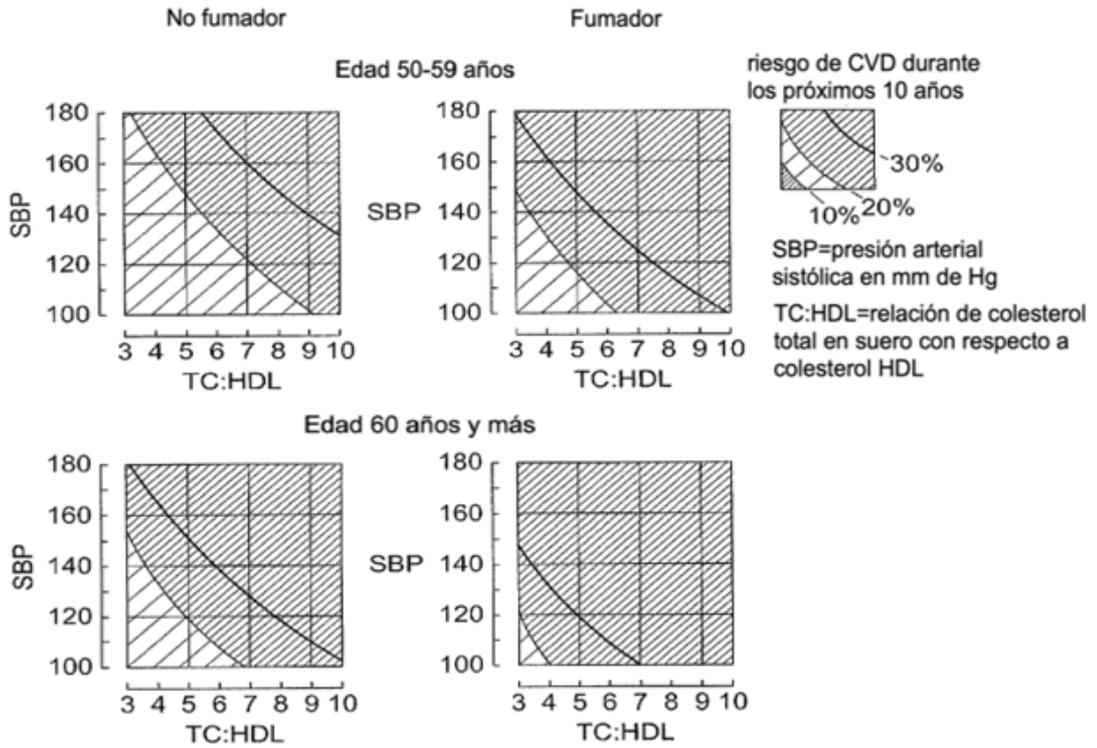


FIG. 2b

Mujeres no diabéticas

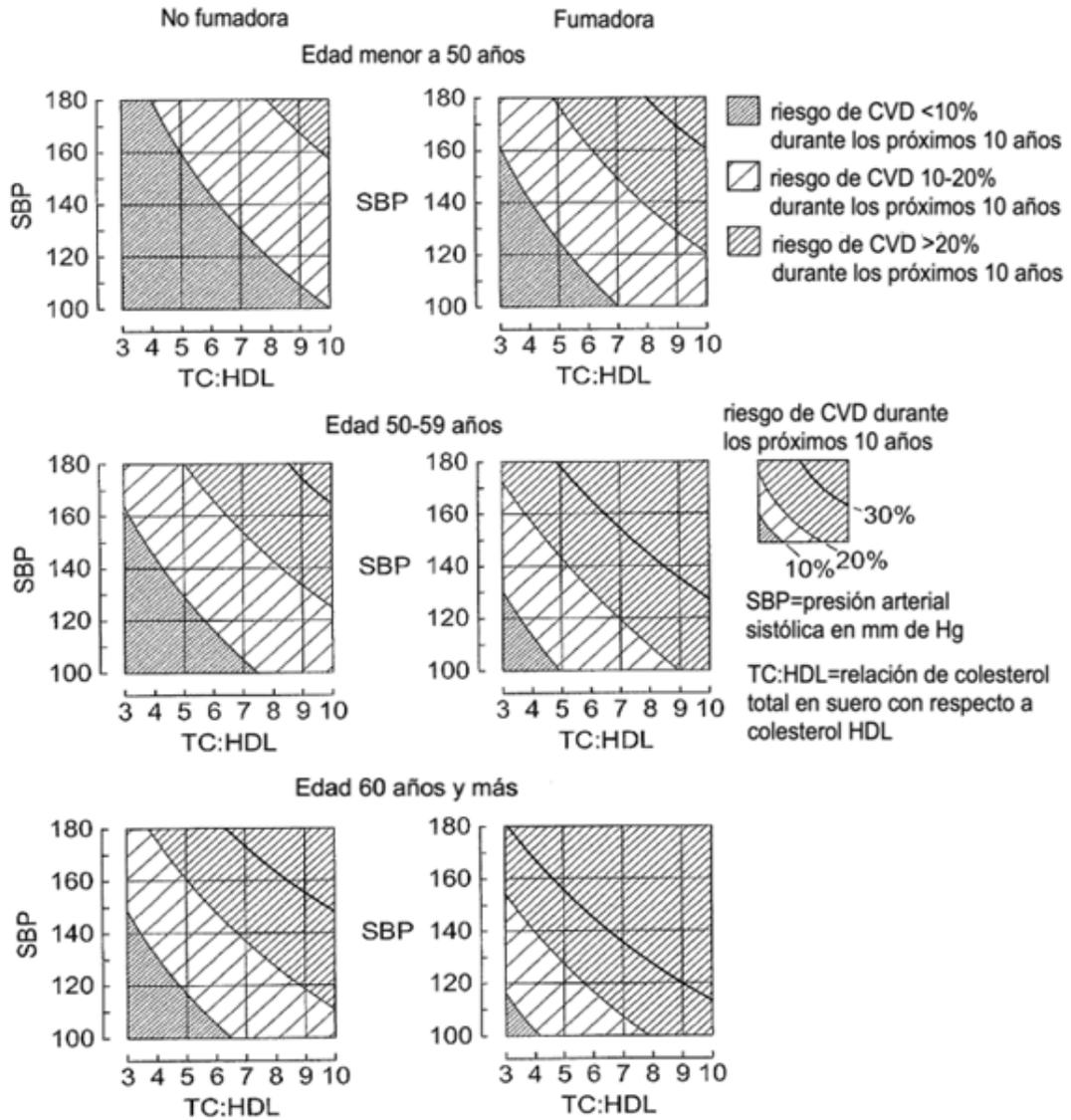
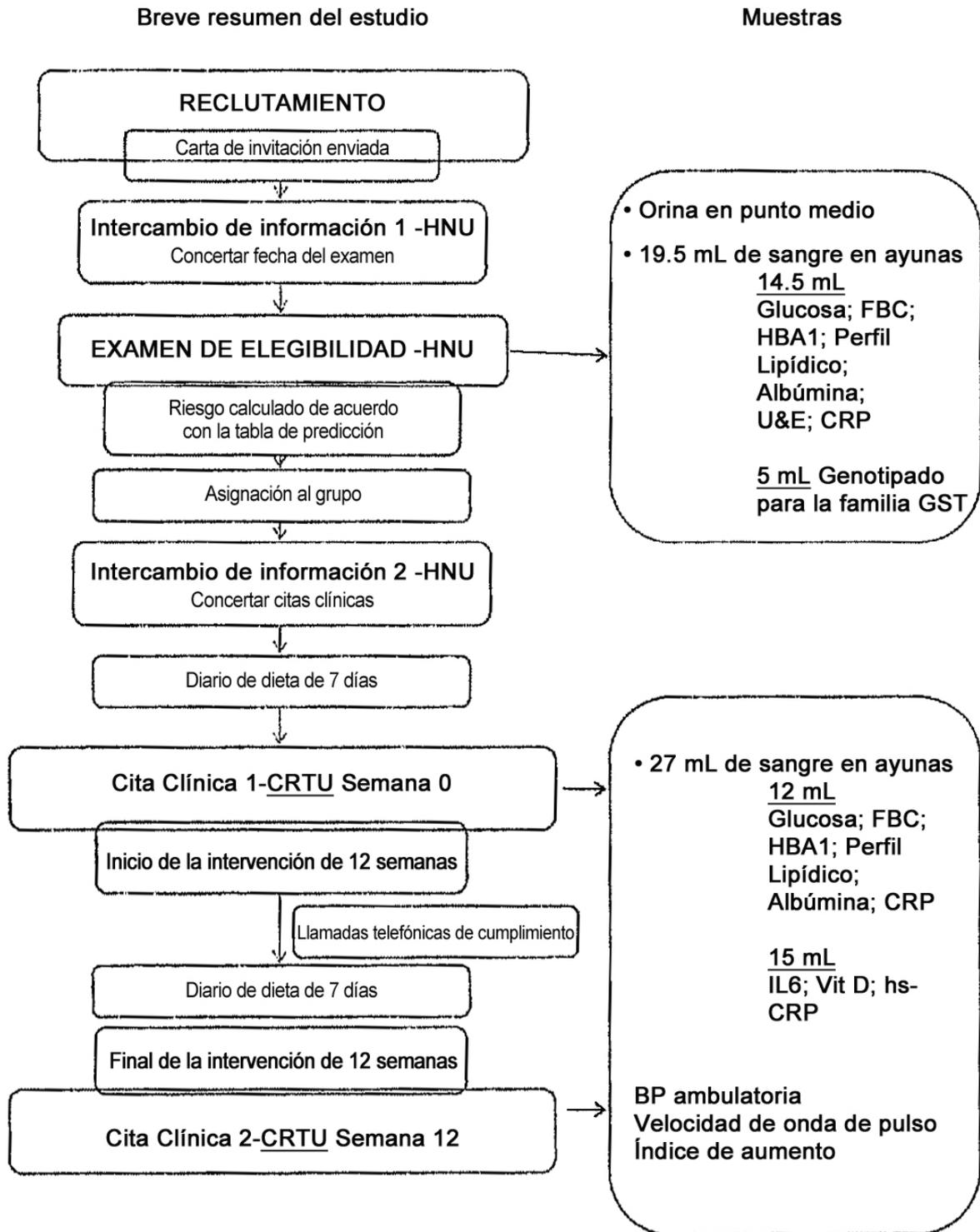


FIGURA 3



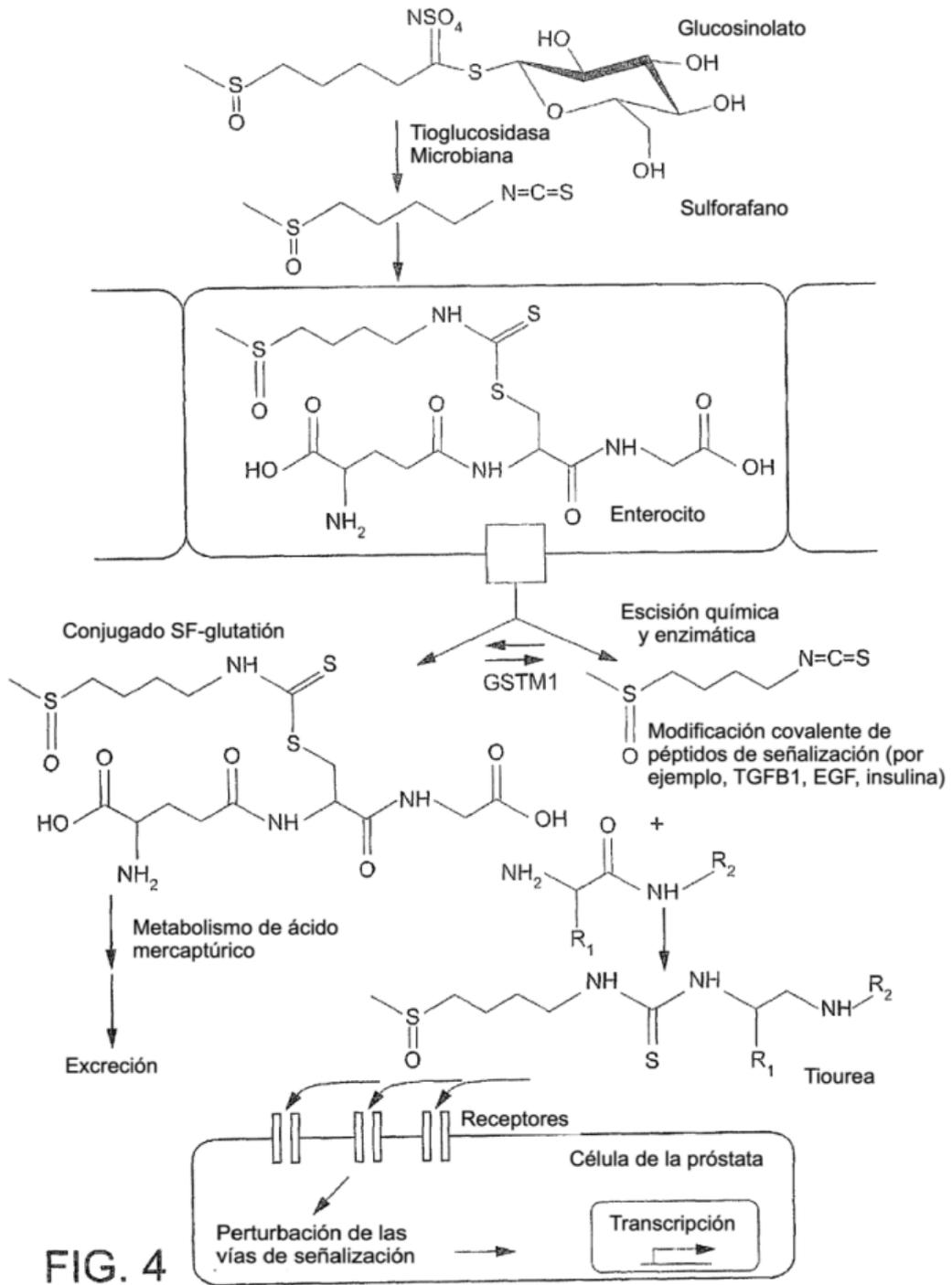


FIG. 4

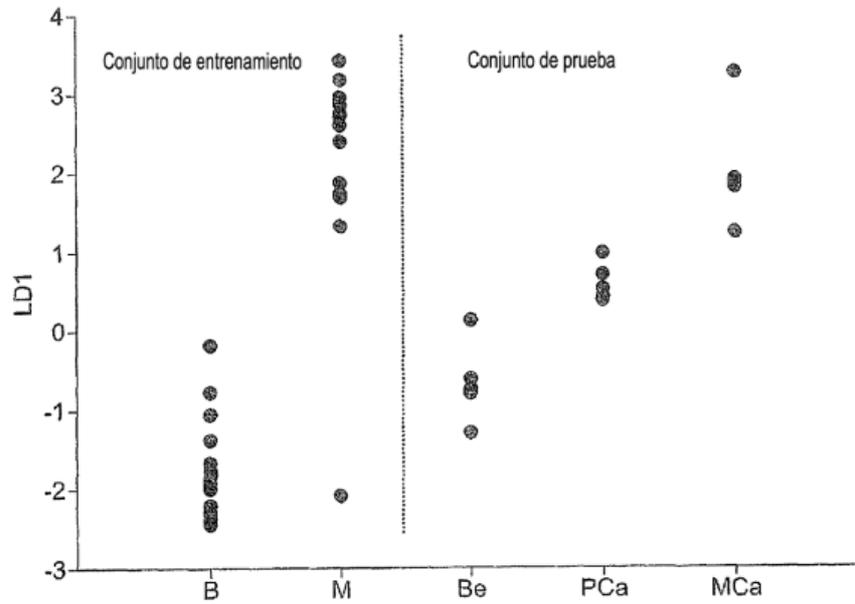


FIG. 5

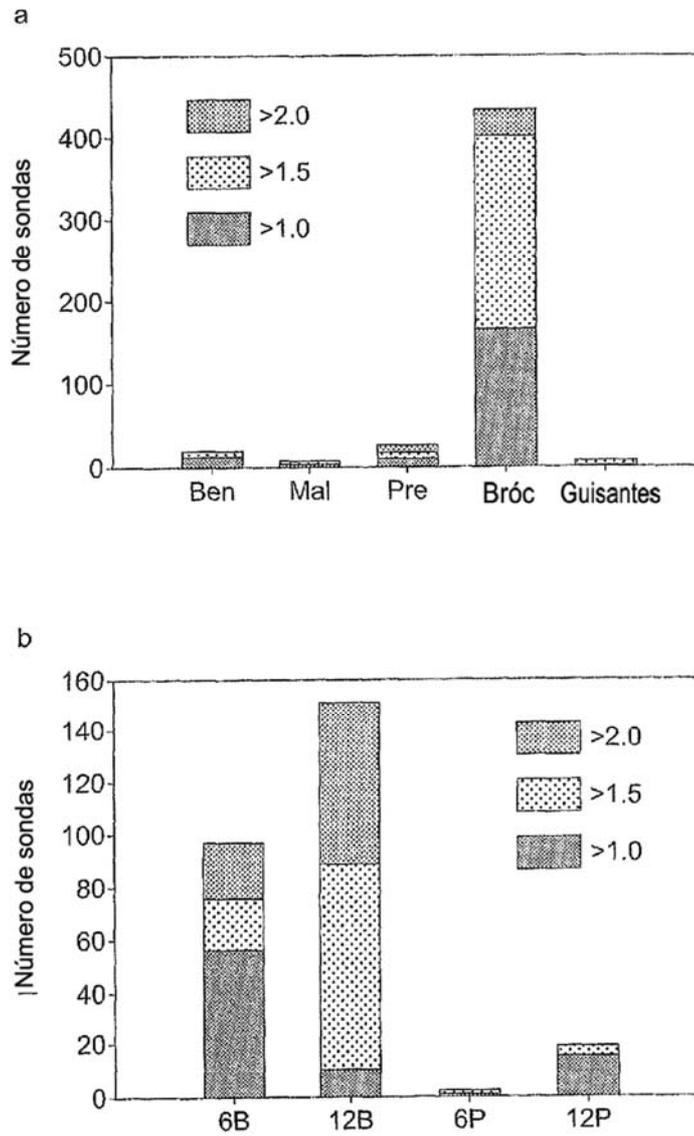


FIG. 6

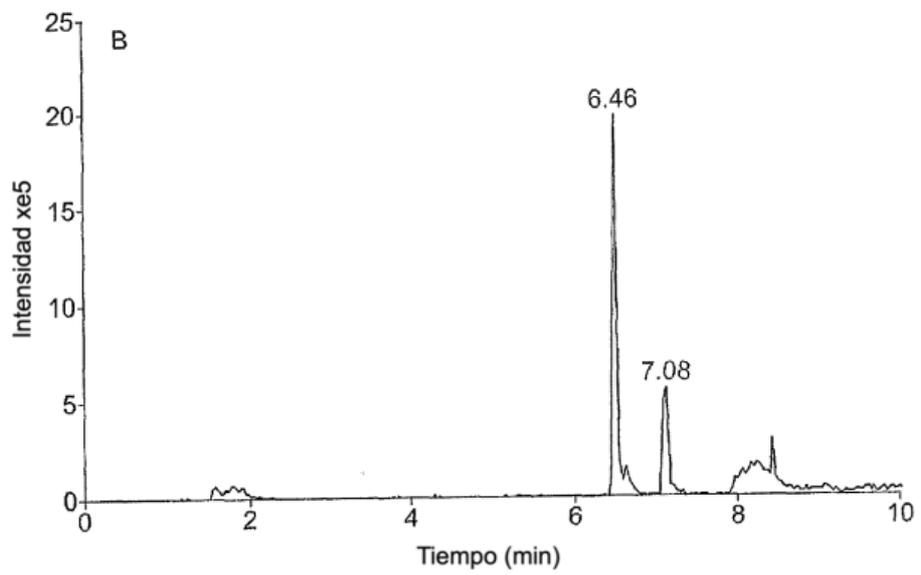
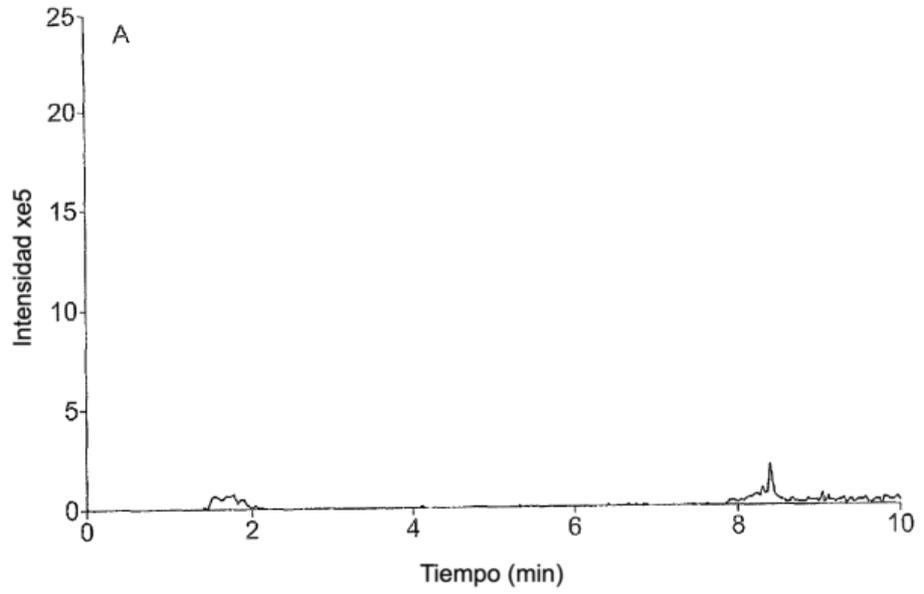


FIG. 7

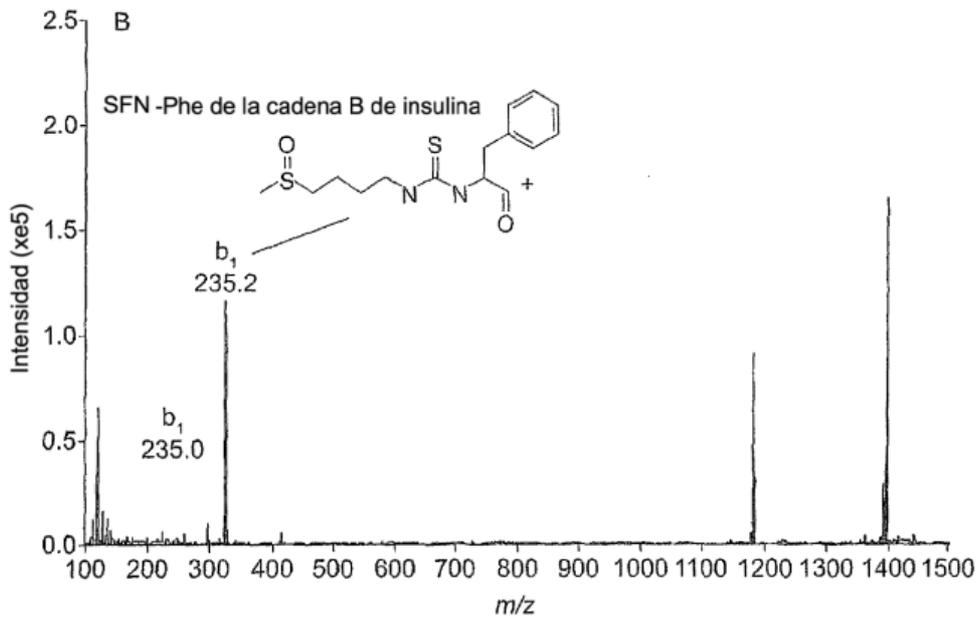
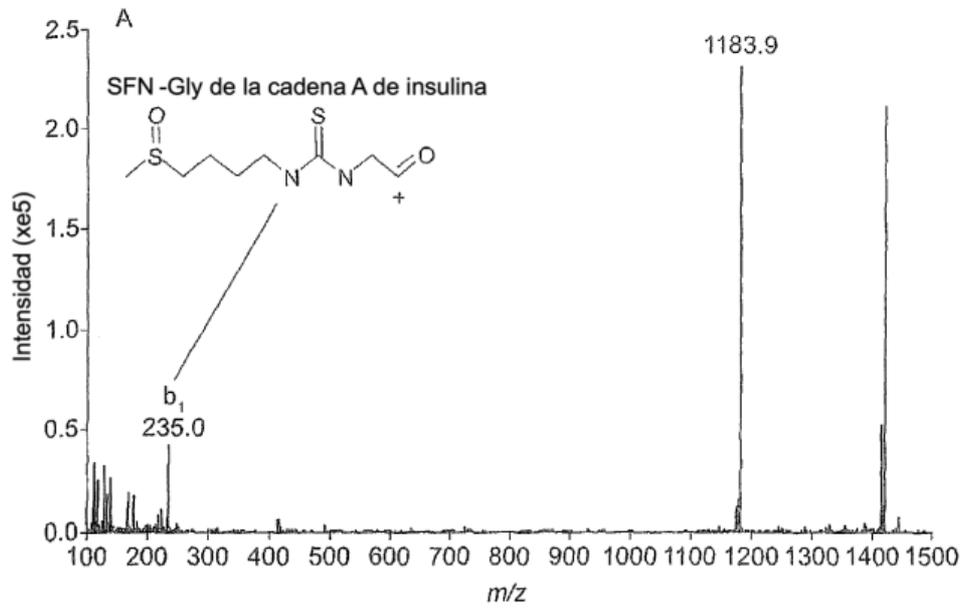


FIG. 8

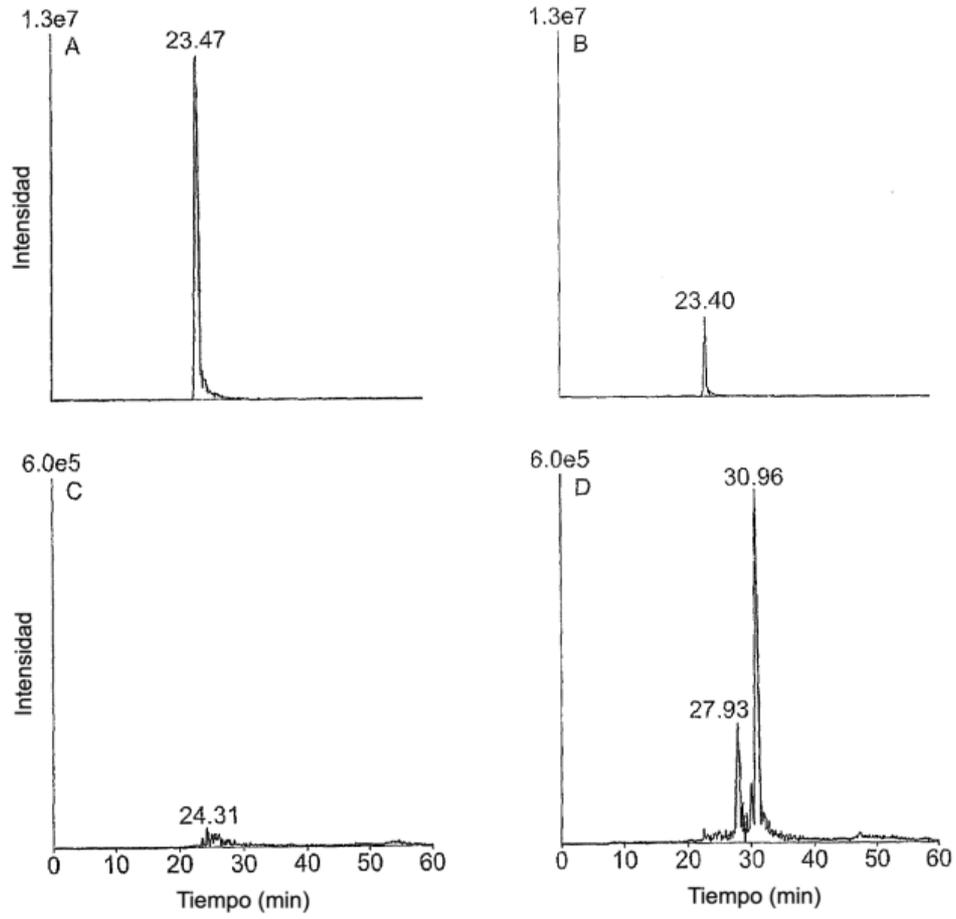


FIG. 9

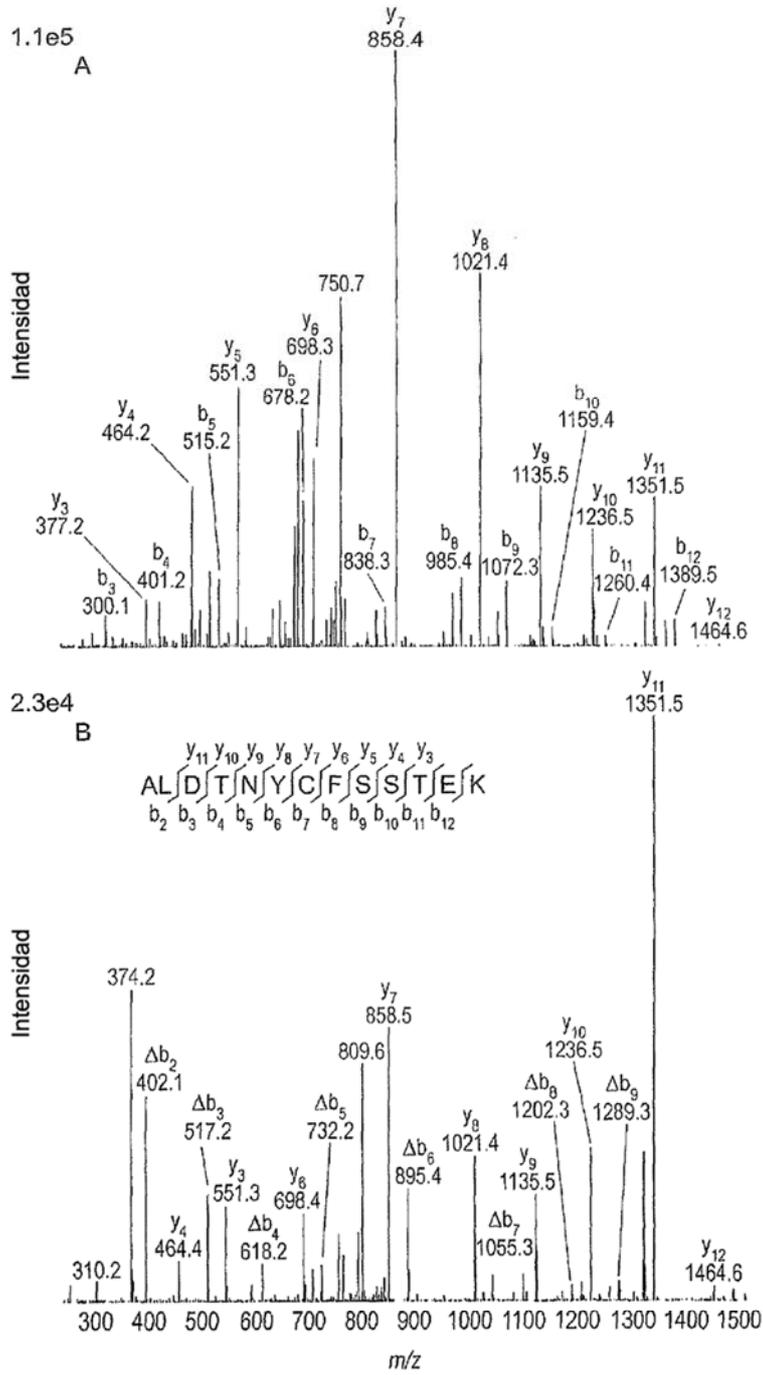


FIG. 10

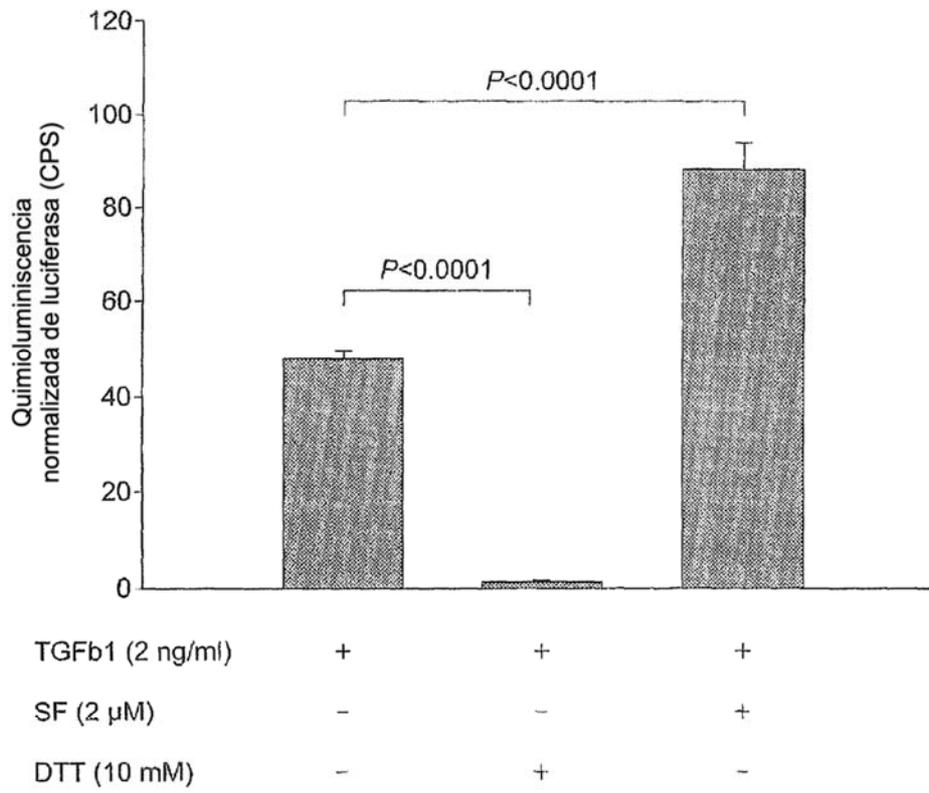


FIG.11

Efecto del compuesto puro y extractos totales sobre la vía de señalización de TGF- β en células de adenocarcinoma epitelial A549

expresión de proteínas p-smad 2 en células A549 tratadas con TGF- β

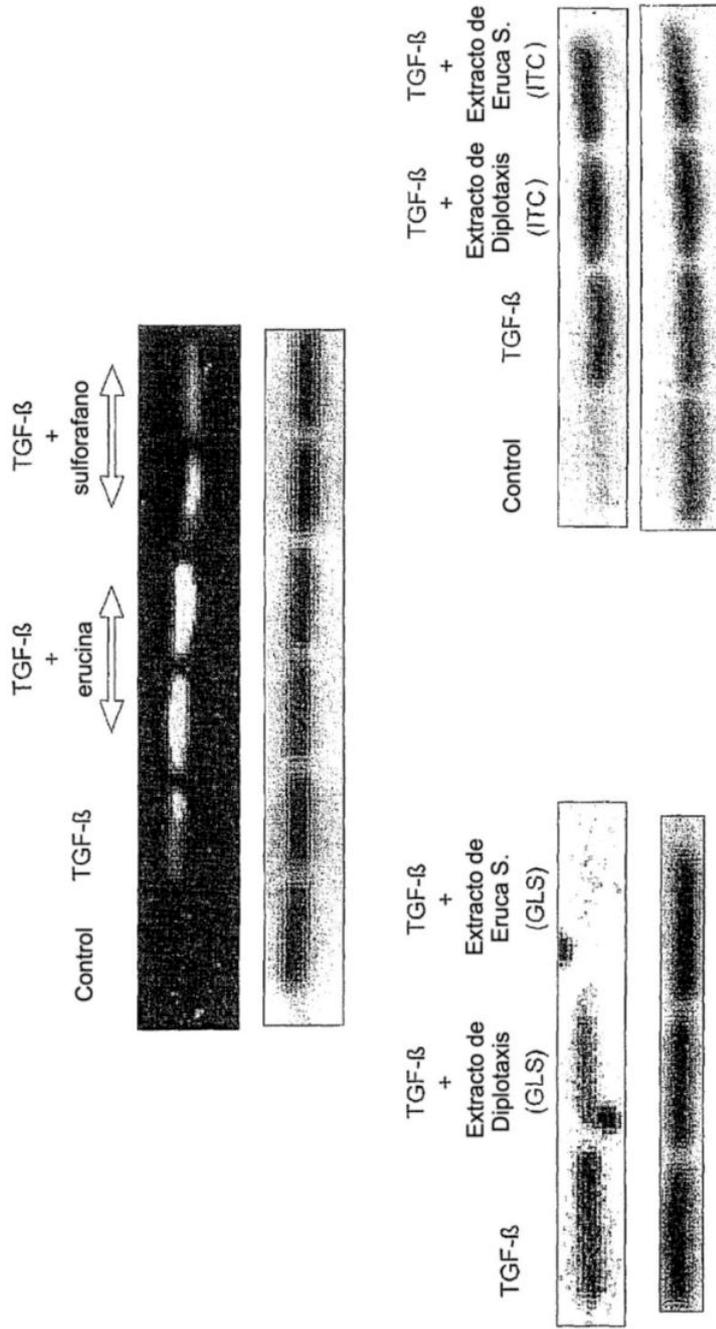


FIG. 12

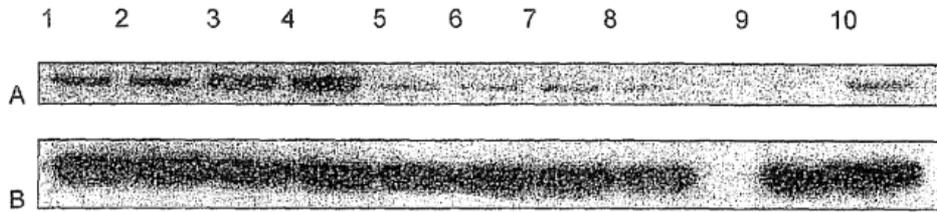


FIG. 13

Cebadores y sondas para análisis de genotipo

Gen	Secuencia	Cebador y sonda (nM)
GSTM1 - glutatión S-transferesa M1		
F	5'- GGAGACAGAAGAGGAGAAGATTCG -3'	500
R	5'- TGCCCAGCTGCATATGGTT -3'	500
P	5'- TCCATGGTCTGGTTCTCCAAAATGTCCA -3'	200
Gen de control (<i>BRCA1</i>)		
F	5'- GTCTGCTTTTACATCTGAACCTCTGT -3'	500
R	5'- AGCCCTGAGCAGTCTTCAGAGA -3'	500
P	5'- ACTCTCACACCCAGATGCTGCTTCACCT -3'	200

Se muestran las secuencias y concentración de cebadores directo (F) e inverso (R) y sondas fluorogénicas (P) para la determinación de la eliminación del gen GSTM1. Las sondas se marcaron con un colorante informador 5', FAM (6-carboxifluoresceína) y un colorante inactivador 3', TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina). Se llevaron a cabo reacciones por triplicado en un volumen total de 25 µL/pozo que consistía en Universal MasterMix, cebadores y sondas y 50 ng de ADN. Activación de Amplitaq Gold durante 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de PCR de desnaturalización durante 15 s a 95°C e hibridación/extensión durante 1 min a 60°C.

FIG. 14

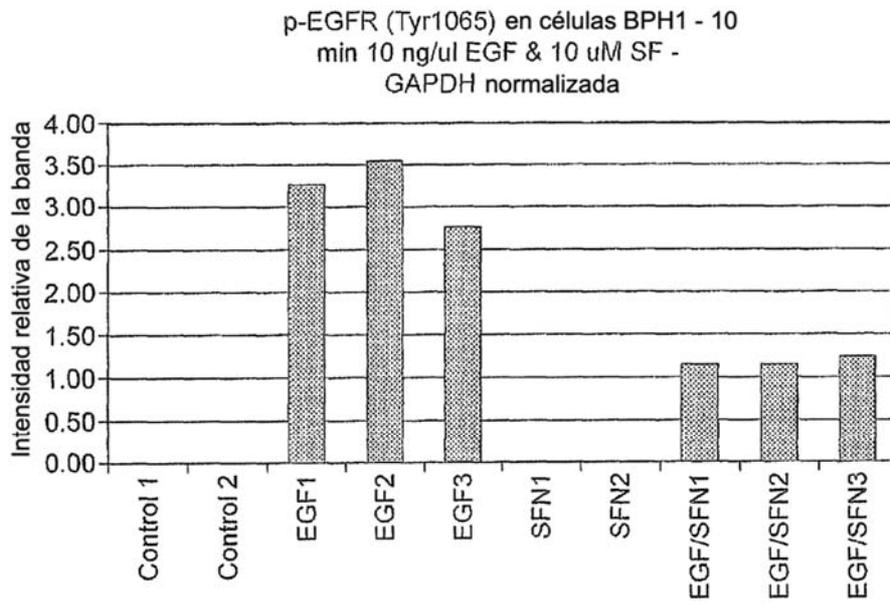


FIG. 15

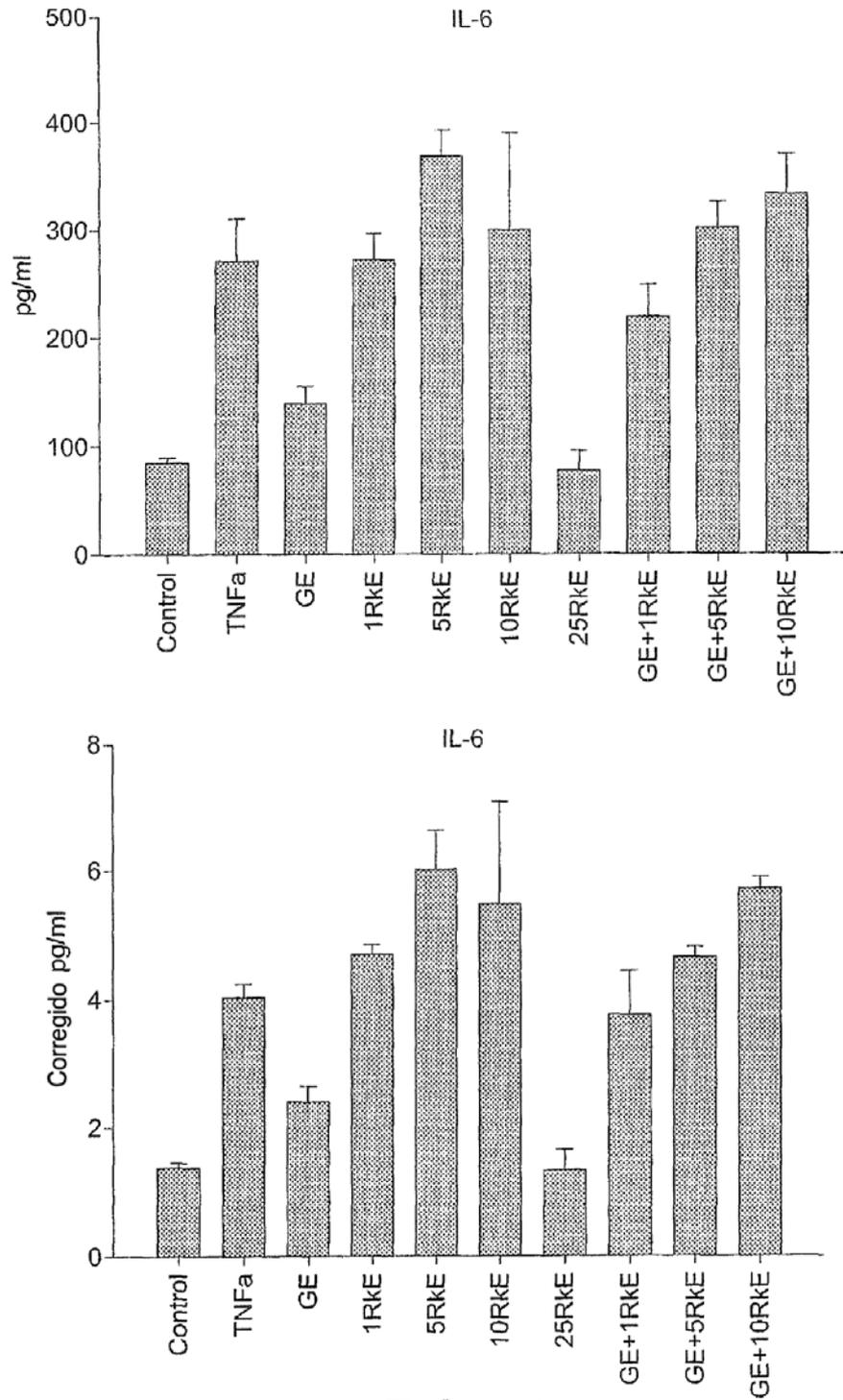
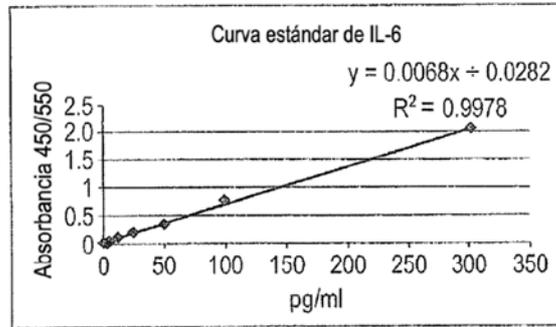


FIG. 16

Calibración con BSA

pg/ml Proteína	Abs 550nm	Fondo restado
0	0.046	0.031
3.12	0.034	0.019
6.25	0.059	0.044
12.5	0.119	0.104
25	0.237	0.222
50	0.375	0.36
100	0.785	0.77
300	2.049	2.034

a= 0.0068
b= 0.0282



	O.D 450nm	Fondo restado	pg/ml	ug proteína/100 ul	corregida pg/ml
C1	0.652	0.606	84.97059	57.67	1.473
C2	0.683	0.637	89.52941	66.56	1.345
C3	0.628	0.582	81.44118	62.00	1.314
TNFa-1	1.751	1.705	246.5882	64.94	3.797
TNFa-2	2.225	2.179	316.2941	75.00	4.217
TNFa-3	1.773	1.727	249.8235	61.78	4.044
GE-1	1.145	1.099	157.4706	63.78	2.469
GE-2	0.947	0.901	128.3529	61.22	2.097
GE-3	0.97	0.924	131.7353	51.17	2.575
1RkE-1	1.765	1.719	248.6471	51.50	4.828
1RkE-2	2.095	2.049	297.1765	63.17	4.705
1RkE-3	1.918	1.872	271.1471	59.72	4.540
5RkE-1	2.504	2.458	357.3235	67.89	5.263
5RkE-2	2.77	2.724	396.4412	62.61	6.332
5RkE-3	2.483	2.437	354.2353	55.56	6.376
10RkE-1	2.033	1.987	288.0588	50.00	5.761
10RkE-2	2.77	2.724	396.4412	57.44	6.901
10RkE-3	1.55	1.504	217.0294	58.33	3.721
25RkE-1	0.522	0.476	65.85294	53.94	1.221
25RkE-2	0.745	0.699	98.64706	53.00	1.861
25RkE-3	0.53	0.484	67.02941	47.72	1.405
GE+1RkE-1	1.793	1.747	252.7647	55.94	4.518
GE+1RkE-2	1.412	1.366	196.7353	60.72	3.240
GE+1RkE-3	1.491	1.445	208.3529	59.67	3.492
GE+5RkE-1	2.287	2.241	325.4118	68.39	4.758
GE+5RkE-2	2.141	2.095	303.9412	68.06	4.466
GE+5RkE-3	1.955	1.909	276.5882	59.00	4.688
GE+10RkE-1	2.087	2.041	296	54.11	5.470
GE+10RkE-2	2.604	2.558	372.0294	64.33	5.783
GE+10RkE-3	2.341	2.295	333.3529	57.39	5.809

FIG. 17



FIG. 18

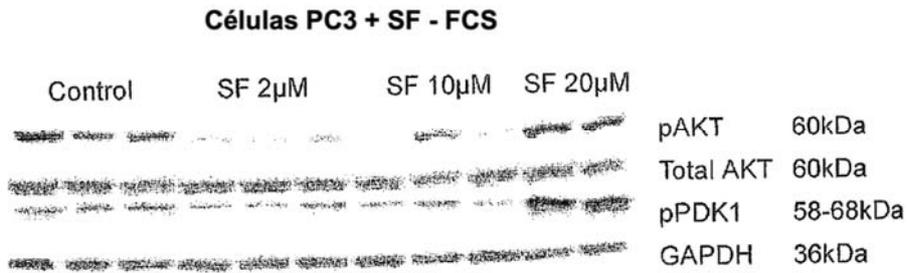


FIG. 19

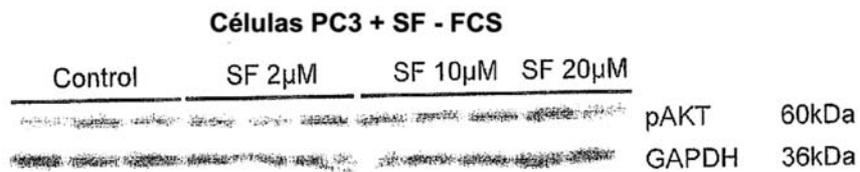


FIG. 20

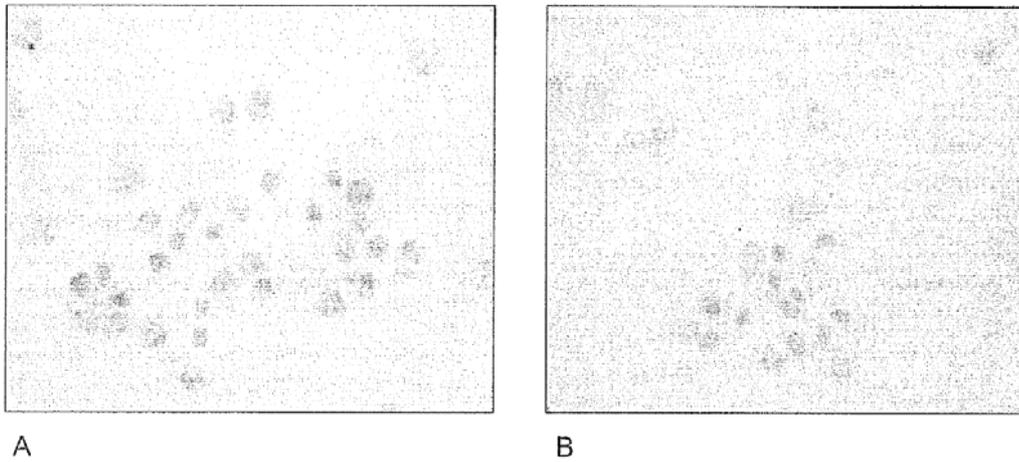


FIG. 21