

TESIS DEFENDIDA POR

**Virginia Villa Cruz**

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

*Director del Comité*

---

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

*Miembro del Comité*

---

Dra. María Lucila del Carmen Lares  
Reyes

*Miembro del Comité*

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

*Miembro del Comité*

---

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua  
Chávez

*Coordinador del programa de posgrado  
en Biotecnología Marina*

---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

*Director de Estudios de Posgrado*

14 de Septiembre de 2009

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**EFFECTO DEL BRÓCOLI Y SULFORAFANO EN DIETA DE TILAPIA  
(*Oreochromis niloticus*) SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO PROVOCADO  
POR HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

VIRGINIA VILLA CRUZ

Ensenada, Baja California, México. Septiembre de 2009.

**RESUMEN** de la tesis de **Virginia Villa Cruz**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California, México. Septiembre 2009.

**EFFECTO DEL BRÓCOLI Y SULFORAFANO EN DIETA DE TILAPIA  
(*Oreochromis niloticus*) SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO PROVOCADO POR  
HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Rafael Vázquez Duhatl  
Director de tesis

El sistema enzimático de citocromo P450 en peces es de suma importancia debido a su participación en la metabolización de compuestos xenobióticos contaminantes como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Durante la biotransformación de los PAHs, se producen metabolitos reactivos que pueden inducir a cáncer. Por otro lado, la actividad catalítica del citocromo P450 induce la producción de quinonas y semiquinonas que originan a su vez especies reactivas de oxígeno (ROS) por ciclado de electrones. Se ha reportado que los vegetales crucíferos como el brócoli, inciden sobre la biotransformación de PAHs, al inhibir la expresión de enzimas de la fase I (familia de citocromo P450) é inducen las enzimas de la fase II. En este trabajo evaluamos el efecto de dietas enriquecidas con brócoli y sulforafano, como quimioprotectores, sobre el sistema metabólico de detoxificación de tilapias cultivadas y tratadas con el carcinogénico benzo[a]pireno. El diseño experimental se desarrolló en dos partes: primero se realizó la exposición de los peces a B[a]P para determinar la concentración y tiempo de exposición de mayor efecto; en la segunda parte, los peces se alimentaron con dietas enriquecidas con brócoli y/o sulforafano durante 30 días y posteriormente se inyectaron con B[a]P. Los resultados obtenidos, nos indicaron un incremento en la actividad del citocromo P450 con la exposición a B[a]P. Los niveles basales de actividad citocromo P450 y peroxidación de lípidos incrementaron significativamente como consecuencia de dietas enriquecidas con brócoli y sulforafano. Después de la exposición a benzo[a]pireno, la actividad del citocromo P450 fue más alta en los peces alimentados con brócoli y sulforafano cuando se compararon con los peces control. Por otro lado, las actividades de las enzimas antioxidantes tuvieron variaciones pero sin diferencias significativas a los grupos control. En el trabajo de tesis se discute el efecto de la dieta diseñada en la modulación de las enzimas pertenecientes a fase I y fase II del mecanismo de detoxificación. La más relevante de las conclusiones es la posibilidad de proteger a los organismos del efecto de los contaminantes con el diseño de dietas y lo cual representa una interesante alternativa tecnológica.

**Palabras Clave:** Citocromo P450, Hidrocarburos aromáticos policíclicos, Benzo[a]pireno, Especies reactivas de oxígeno, Brócoli y Sulforafano.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Virginia Villa Cruz** as a partial requirement to obtain the DOCTOR IN SCIENCES degree in BIOTECHNOLOGY MARINE. Ensenada, Baja California, México. September 2009.

**EFFECT OF SULFORAPHANE AND BROCCOLI IN DIETS OF TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) ON THE OXIDATIVE STRESS BROUGHT ABOUT BY POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS.**

The enzymatic system cytochrome P450 in fish is very important due to its participation in the detoxification of xenobiotic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). During the biotransformation of PAHs, they produce reactive metabolites (B[a]P intermediates) which can be carcinogens. On the other hand, the cytochrome P450 catalytic activity induces the production of quinones and semiquinones, which originate reactive oxygen species (ROS) by electron recycling. It has been reported that cruciferous vegetables such as broccoli inhibit the enzyme expression of the family of cytochrome P450 and induce the synthesis the activity enzymes involved in the metabolic phase II. In this dissertation, the effect of diets enriched with broccoli and sulforaphane, is evaluated as chemoprotectors on the detoxification metabolic systems of Nile tilapia, treated with the carcinogenic benzo(a)pyrene. The experimental design was developed in two parts: first, the exposition of the fish to benzo(a)pyrene in order to determine the effect of exposure time and concentration. In the second part, the fish were fed over 30 days with diets containing broccoli and/or sulforaphane. Then, it was intraperitoneally injected with B[a]P. The obtained results indicate an increase in the CYP450 activity with some level of benzo[a]pyrene. The basal levels of cytochrome P450 activity and lipid peroxidation significantly increased as result of diets enriched with broccoli and sulforaphane. After the exposition to benzo[a]pyrene, cytochrome P450 activity was higher in the fish fed with broccoli and sulforaphane when they were compared with the control fish. On the other hand, activities of antioxidant enzymes also showed some variations, but without significant differences how the control fish. In this dissertation, the effects of a designed diet able to modulate the enzymes involved in the phase-I and phase-II detoxification mechanism, are discussed. The main conclusion is the potential protection of aquaculture organism against pollution by using special diets, which shows to be an interesting technological alternative.

**Keywords:** Cytochrome P450, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Benzo[a]pyrene, Reactive oxygen species, Broccoli and Sulforaphane.

## Dedicatorias

Mi corazón dedica esta tesis a mis hermanas: *Ussy y Julia Villa Cruz*. Dicen que las hermanas mayores son tu guía, ellas lo han sido y lo seguirán siendo por siempre en mi vida.

Con mucho cariño para mi madre: *Adelfa Cruz* y a mi padre *Don Rubén Villa*, que, aunque en tiempos separados impulsaron mi formación.

A mi esposo: *Didier* por ser el amor de mi vida y mi amigo. Siempre voy a estar agradecida con la vida de haberte puesto en mi camino.

A mi suegra *Lolita* y mi cuñada *Rosy*, gracias por brindarme una segunda familia.

A todos mis sobrinos: *Christian, Ricardo, Henry (q.e.p.d), Verónica, Jorge, Adalberto, David, Moisés, Ilse, César, Dereck y Ervin*, para que ningún obstáculo les impida seguir adelante.

**A DIOS**

## Agradecimientos

Un agradecimiento muy especial a mi director de tesis el *Dr. Rafael Vázquez Duhalt*, por aceptar ser el capitán de un barco en hundimiento, por levantarlo y dirigirlo profesionalmente hacia la meta.

A mi comité de tesis: *Dra. Meritxell Riquelme Pérez*, *Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro* y *Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes* por ser mis guías en este proceso de formación académica.

Al *Dr. Jorge de la Rosa Vélez (q.e.p.d.)* por su atención personal y asesoría profesional a este trabajo de tesis.

A la *Dra. Pilar Sánchez Saavedra*, por brindarme su amistad, por orientarme y siempre creer en mí.

Al *M. C. Eduardo Morales Guerrero*, por el apoyo y ayuda con el equipo HPLC. Además de brindarme su amistad.

Agradezco al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)*, el apoyo económico otorgado durante el desarrollo de la tesis, mediante la beca, con número de registro 163308.

A mis amigos: *Coco y Gissel*, por caminar junto conmigo y nunca rendirse por mi forma de ser. A mi amigo *Jorge*, por llorar, reír, enojarnos y muchas otras cosas más, que es difícil expresarlo en dos líneas, pero lo más importante es que te llevo en mi corazón y te agradezco que me hayas dado la oportunidad de conocerte. Y a toda mi flotilla de amigas y amigos, que por no omitir a ninguno, omito a todos.

## CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	v
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	ix
<b>Capítulo I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
I.1 Antecedentes.....	14
I.1.1 Influencia de los PAHs sobre el estrés oxidativo.....	14
I.1.2 Efecto de PAHs sobre el citocromo P450.....	16
I.1.3 Efecto de sulforafano (SF) y brócoli.....	19
<b>Capítulo II. Objetivos e hipótesis.....</b>	<b>22</b>
<b>Capítulo III. Materiales y métodos.....</b>	<b>24</b>
III.1 Organismo de estudio.....	24
III.2 Estrategia experimental.....	25
III.3 PARTE I. Efecto del B[a]P sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes.....	26
III.4 PARTE 2. Efecto de dietas enriquecidas con sulforafano y brócoli en tilapias expuestas intraperitonealmente a B[a]P sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes.....	27
III.5 Exposición a B[a]P y sacrificio de los peces.....	28
III.6 Preparación de las muestras biológicas y enzimáticos.....	29
III.6.1 Preparación de la fracción microsomal.....	29
III.6.2 Determinación de la actividad etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD).....	29
III.6.3 Determinación de la actividad catalasa (CAT).....	30
III.6.4 Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD).....	30
III.6.5 Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa (GST).....	31
III.6.6 Análisis de peroxidación de lípidos (LPO).....	31
III.6.7 Determinación de proteína.....	32
III.6.8 Análisis estadísticos.....	32
<b>Capítulo IV. Resultados.....</b>	<b>33</b>
IV.1 PARTE I. Efecto del B[a]P sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes.....	33
IV.1.1 Determinación del vehículo para la disolución de PAHs.....	33
IV.1.2 Efecto de diferentes PAHs sobre la actividad del citocromo P450 de tilapia.....	34

## CONTENIDO (Continuación)

	Página
IV.1.3 Efecto individual de B[a]P sobre la actividad de citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia.....	36
IV.1.4 Efecto de B[a]P sobre la actividad de citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia.....	38
IV.1.5 Efecto dosis-tiempo de B[a]P sobre la actividad de citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia.....	40
IV.2 PARTE 2. Efecto de dietas enriquecidas con sulforafano y brócoli en tilapias expuestas intraperitonealmente a B[a]P.....	43
IV.2.1 Efecto de dietas enriquecidas con brócoli o sulforafano sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes.....	43
IV.2.2 Efecto de dietas enriquecidas con brócoli o sulforafano sobre el citocromo P450 y enzimas antioxidantes durante el tiempo de exposición a B[a]P.....	46
<b>Capítulo V. Discusiones</b> .....	50
V.1.1 Determinación del vehículo para la disolución de PAHs.....	50
V.1.2 Efecto de diferentes PAHs sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia.....	51
V.1.3 Efecto de B[a]P sobre la actividad de citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia.....	53
V.1.4 Efecto dosis-tiempo de B[a]P sobre la actividad de citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia.....	55
V.2 PARTE 2. Efecto de dietas enriquecidas con sulforafano y brócoli en tilapias expuestas intraperitonealmente a B[a]P.....	55
V.2.1 Efecto de dietas enriquecidas con brócoli o sulforafano sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes.....	55
V.2.2 Efecto de dietas enriquecidas con brócoli o sulforafano sobre el citocromo P450 y enzimas antioxidantes después de la exposición a B[a]P.....	58
<b>Capítulo VI. Conclusiones</b> .....	60
<b>Bibliografía</b> .....	62
<b>Apéndices</b> .....	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura molecular de algunos PAHs.....	4
2	Metabolismo de xenobióticos, fase I y fase II.....	5
3	Metabolismo de B[a]P.....	8
4	Ciclo redox de producción de ROS.....	9
5	Mecanismo de acción de superóxido dismutasa (SOD).....	10
6	Conversión de glucosinolato a isotiocianato por la acción enzimática de mirosina.....	12
7	El SF inhibe las enzimas de la fase I responsables de la activación de carcinogénicos y activa las enzimas de la fase II, a través del factor de transcripción Nrf2 que es responsable de múltiples procesos de desintoxicación.....	13
8	Descripción física de tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	24
9	Sistema de biofiltro para el cultivo de tilapia.....	25
10	Inyección intraperitoneal de B[a]P a tilapia y sacrificio de los peces.....	28
11	Obtención de la muestra hepática de tilapia.....	28
12	Actividad EROD en hígado de tilapia inyectada con aceite de maíz o DMSO.....	33
13	Efecto de la actividad EROD en hígado de tilapia inyectada con diferentes tipos de PAHs .....	34
14	Efecto de la actividad SOD en hígado de tilapia inyectada con PAHs.....	35

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
15	Peroxidación de lípidos en hígado de tilapias inyectadas con PAHs.....	36
16	Efecto individual de B[a]P: EROD, SOD y CAT en hígado de tilapia expuesta durante 3 días comparada con el control (DMSO únicamente).....	37
17	Actividad EROD, SOD y CAT, en extracto de hígado de tilapia expuesta durante 3 días a B[a]P.....	39
18	Expresión de la actividad EROD en hígado de tilapia expuesta a concentraciones de B[a]P en diferentes tiempos de exposición.....	41
19	Expresión de la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas SOD y CAT, en tilapia expuesta a concentraciones de B[a]P en varios periodos de exposición.....	42
20	Peroxidación de lípidos en hígado de tilapia expuesta a concentraciones de B[a]P en diferentes tiempos de exposición.....	43
21	Evolución de la actividad CYP450 en tilapia, alimentada con diferentes dietas, después de la administración a B[a]P.....	47
22	Evolución de las actividades de superóxido dismutasa, catalasa y peroxidación de lípidos, después de la administración de B[a]P, en tilapia alimentadas con diferentes dietas.....	48
23	Evolución de la actividad glutatión-S-transferasa, después de la administración de B[a]P en tilapia, alimentadas con diferentes dietas.....	49
24	Estructura y tamaño del alimento formulado para la alimentación de tilapia.....	78
25	Recipientes para almacenamiento del alimento formulado para tilapia.....	78
26	Inducción del citocromo P450.....	79

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Niveles basales de diferentes actividades enzimáticas en extracto de hígado de tilapia alimentadas durante 30 días con diferentes composiciones de dietas.....	45
VI	Formulación y contenido de ingredientes de la dieta para tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).....	77

# Capítulo I

---

## I. INTRODUCCIÓN

---

La pesca, actividad practicada desde tiempos remotos y de la cual millones de personas alrededor del mundo dependen directa o indirectamente para obtener sus medios de subsistencia, actualmente se encuentra en su límite de rendimiento (70%). Por lo cual, la humanidad en su naturaleza de preservarse, está en continua búsqueda de técnicas que le permitan producir suficiente alimento para la demanda de toda la población.

Para compensar la limitación de la producción pesquera, un gran esfuerzo se ha realizado para incrementar la producción de peces por acuicultura (FAO, 1974). La acuicultura se considera como una alternativa idónea para la producción de alimentos de origen acuático. En todo el mundo, la tasa media de crecimiento anual ha sido del 8.8 % desde 1970 a 2004, muy superior a los crecimientos de la pesca de captura y los sistemas de producción de carne de cría, con crecimientos anuales de sólo el 1.2 % y del 2.8% respectivamente (FAO 2007).

En Estados Unidos en el 2004, la producción de acuicultura incrementó significativamente en un 6.9 % en volumen y en un 7.7 % en valor comercial con respecto a las cifras consideradas para 2002 (FAO 2007). Los países pertenecientes a la región de Asia-Pacífico, representaron el 91.5 % de la cantidad producida en el 2004 y el 80.5 % de su valor total. Por otra parte, la producción acuícola de China, representa el 69.6 % del volumen total y el 51.2 % del valor total en la producción del mundo (FAO 2007).

Con este notable y significativo crecimiento de la acuicultura, la producción actual se eleva a 46 millones de toneladas comparada con 54 millones de toneladas de la pesca de captura (FAO 2007).

En México, desde hace décadas se empezaron las investigaciones sobre acuicultura fomentando el desarrollo de instituciones para promover y controlar el cultivo de peces (FAO 1974). Se crearon ambiciosos programas que contemplan el establecimiento de centros de acuicultura en todos los estados del país, así como granjas de producción comercial y centros de acuicultura costera, para aprovechar los 2.8 millones de hectáreas de aguas interiores en donde se pueden establecer cultivos (La ciencia desde México, 1997).

En el 2003, con el propósito de apoyar proyectos para el mejoramiento productivo y para el fortalecimiento de las organizaciones sociales, se creó el Programa de Acuicultura y Pesca dentro de la Alianza Contigo, el cual aportó 122.8 millones de pesos para 241 proyectos, en beneficio de 24730 productores (Plan Nacional de Desarrollo, informe 2003). Dentro de este mismo Plan, hoy en día se maneja el fondo mexicano para el desarrollo pesquero y acuícola nacional, donde destaca la creación del Programa de Rector de Pesca y Acuicultura.

Aunque la acuicultura en México todavía no es una actividad fuerte, es importante que México se involucre con mayor fuerza en ella. De acuerdo a un informe de la Dependencia de Estudios de Perspectivas Mundiales de la FAO, donde se anticipan las tendencias mundiales en materia de alimentos, nutrición y agricultura de los próximos 30 años, se señala que el incremento en el consumo de pescado por persona no podrá ser soportado sólo por la actividad de pesca, sino que tendrá que auxiliar de la acuicultura (Agricultura: Hacia el 2015/30). Con esto se destaca la importancia de la acuicultura como alternativa de alimentación para la población a nivel mundial.

Sin embargo, uno de los principales problemas a que se enfrentan los acuicultores, es la contaminación de los cuerpos de agua por sustancias químicas derivada de actividades antropogénicas. Esta contaminación es generada por la actividad industrial, asentamientos humanos, agricultura y ganadería, y acentuada por, la falta de cultura ambiental de la sociedad.

En México, la actividad industrial genera grandes cantidades de aguas residuales que en su mayor proporción no son tratadas (INEGI, 2008; SEMARNAT-CONAGUA, 2005). Sólo el 25% de las aguas residuales son tratadas; es decir, no se descontaminan 3 de cada 4 litros de agua. Esto es, el 75% restante el agua tiene diferentes grados de contaminación. Se reportó que en 2006 se recolectaron por medio de alcantarillado, 206 m<sup>3</sup>/seg de aguas residuales provenientes de los centros urbanos; 36 % de éstas recibió tratamiento y del caudal procedente de la industria sólo se trató el 15%. Por su parte, la contaminación agrícola se debe principalmente al uso de agroquímicos en el cultivo como: fertilizantes, herbicidas, insecticidas, fungicidas y nematocidas. Otro tipo de contaminación son los residuos sólidos urbanos, para los cuales se reportó una producción de 36.8 millones de toneladas en 2007, siendo los principales generadores el Estado de México y el Distrito Federal. Estas actividades han producido y liberado al ambiente cientos de contaminantes orgánicos, como bifenilos policlorados (PCBs), pesticidas organoclorados (OCPs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs) y dibenzo-dioxinas (PCDDs) (Oost *et al.*, 2003). Todos y cada uno de ellos, pueden causar serios problemas en todos los niveles tróficos, por lo que hoy en día estos contaminantes se consideran un riesgo para la salud pública.

Las actividades industriales, por su lado, generan una gran diversidad de contaminantes. Dentro de ellos, los PAHs (Figura 1) pueden encontrarse en altas concentraciones en los sistemas acuáticos. Investigaciones realizadas, reportan que algunos tipos de PAHs pueden causar enfermedades crónicas, degenerativas y de respuesta mutagénica, carcinogénica y teratogénica en organismos acuáticos.

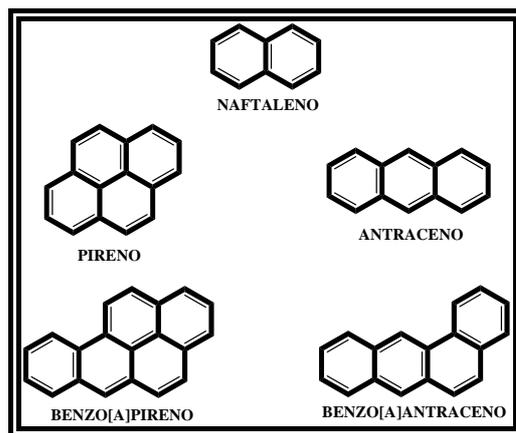


Figura 1. Estructura molecular de algunos PAHs.

El benzo[a]pireno (B[a]P) es uno de los PAHs más estudiados en especies acuáticas, especialmente en peces, y es considerado como modelo representativo de la familia de los PAHs. Es un xenobiótico peligroso por su alta toxicidad, por su amplia distribución, por su baja biodegradación, alta persistencia en el suelo y su efecto dañino a organismos. También, por su carácter hidrofóbico y capacidad de bioacumularse causando daños como mutagénesis y cáncer (Anders *et al.*, 2005; Antón y Lizaso, 2001; Kleinow *et al.*, 1998; Toxic Air Contaminant Identification, 1997).

El tamaño molecular de hidrocarburos es un factor clave para su bioacumulación (Varanasi y Stein, 1991). Debido a esto, el B[a]P de 5 anillos aromáticos, comparado con naftaleno tiene una degradación más lenta (Alberts, 1995; Wammers y Peters, 2005) y, tiende a acumularse en los tejidos de organismos. Además, los PAHs en el ambiente, se encuentran formando mezclas complejas, lo que origina que su degradación se haga más lenta (Anuradha *et al.*, 2008).

Para que un xenobiótico como los PAHs pueda producir efecto adverso en la salud de los organismos, tienen primero que ser activados metabólicamente. Stephen (1994) menciona que la biotransformación de xenobióticos se lleva a cabo en dos fases (Figura 2).

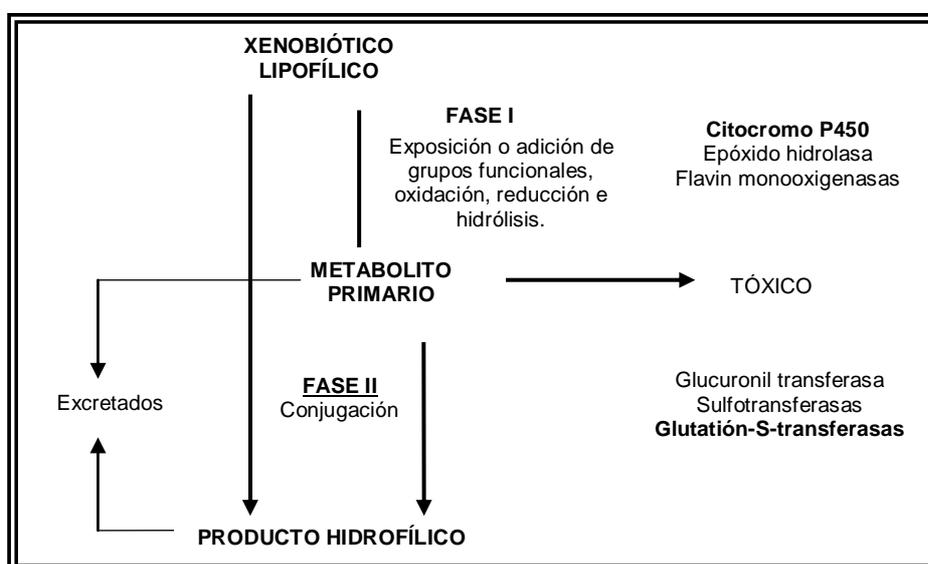


Figura 2. Metabolismo de xenobióticos, fase I y fase II, (Stephen, 1994).

La fase I comprende la oxidación, reducción ó hidrólisis de la molécula original. El principal sistema responsable de la oxidación de sustratos está constituido por el sistema citocromo P450 (CYP) que en realidad es una familia de hemoproteínas con actividad de monooxigenasas. En los mamíferos, el CYP se encuentra presente en la mitocondria y en diversos tipos de membranas

celulares, siendo particularmente activo en el hígado y específicamente abundante en el retículo endoplasmático liso (microsomas).

En la fase II, participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación de los xenobióticos con diversas moléculas de naturaleza endógena tales como ácido glucorónico, sulfatos, acetatos, el glutatión o algunos aminoácidos. Las enzimas que están involucradas en este proceso son principalmente, la UDP-glucuronosiltransferasa (UDPGTSs) y la glutatión-S-transferasa (GSTs). La ruta principal para compuestos electrofílicos es la conjugación con glutatión, mientras que los compuestos nucleofílicos son conjugados con ácido glucorónico. El objetivo final de ambas fases es transformar los compuestos xenobióticos en compuestos hidrofílicos y así facilitar su excreción a través de la orina o la bilis (Stephen, 1994; Oost *et al.*, 2003; Orellana y Guajardo, 2004).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el B[a]P pueden ser metabolizados a un intermediario reactivo mediante dos mecanismos principales (figura 3): el primer mecanismo involucra la sustracción de 2 electrones, catalizada por el citocromo P450 formándose un epóxido (2) altamente reactivo seguido de la reacción de la epóxido hidrolasa formando un B[a]P-dihidrodiol (3). Posteriormente, un compuesto con la configuración trans-7,8-diol-9,10-epóxido (4), el cual puede inducir la formación de aductos (Figura 3) y formar una unión estable que genera un procarcinógeno. Un segundo mecanismo de activación comprende la sustracción de un electrón, catalizada también por un citocromo P450 para formar radicales catiónicos, los cuales pueden unirse al ADN y otras macromoléculas. Los radicales quinonas y semiquinonas, compuestos que pueden ser sustratos de oxidasas de función múltiple (MFO) en presencia de NAD(P)H y posiblemente intervenir en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), vía el ciclo redox (Mitchelmore *et al.*, 1998).

ROS comprenden todas las moléculas que contienen oxígeno altamente reactivo, incluyendo los radicales libres. Los tipos de ROS incluyen el radical hidroxilo, el radical anión superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlet, radical óxido nítrico, radical hipoclorito y varios peróxidos lipídicos. Estas especies son capaces de reaccionar con lípidos de la membrana, ácidos nucleicos, lípidos, enzimas y otras moléculas pequeñas resultando en daño celular (Percival, 1998).

En el ciclo redox (Figura 4) el compuesto inicial es reducido primeramente por NAPH reductasa dependiente (1) para producir un radical xenobiótico. Este radical dona su electrón no apareado al  $O_2$  produciendo anión superóxido ( $O_2^-$ ) regresando al compuesto inicial el cual puede repetir el ciclo. En este ciclo hay dos eventos, un reductor ha sido oxidado y un radical ha sido producido. El  $O_2^-$  puede ser usado por la SOD (2) para producir peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y, a su vez, este puede ser catalizado por la catalasa o glutatión peroxidasa para producir  $O_2$  y  $H_2O$ . A partir del  $O_2^-$  puede seguir la formación de un radical  $\cdot OH$  el cual puede reaccionar con el ADN y provocar su oxidación (Mitchelmore *et al.*, 1998; Oost *et al.*, 2003).

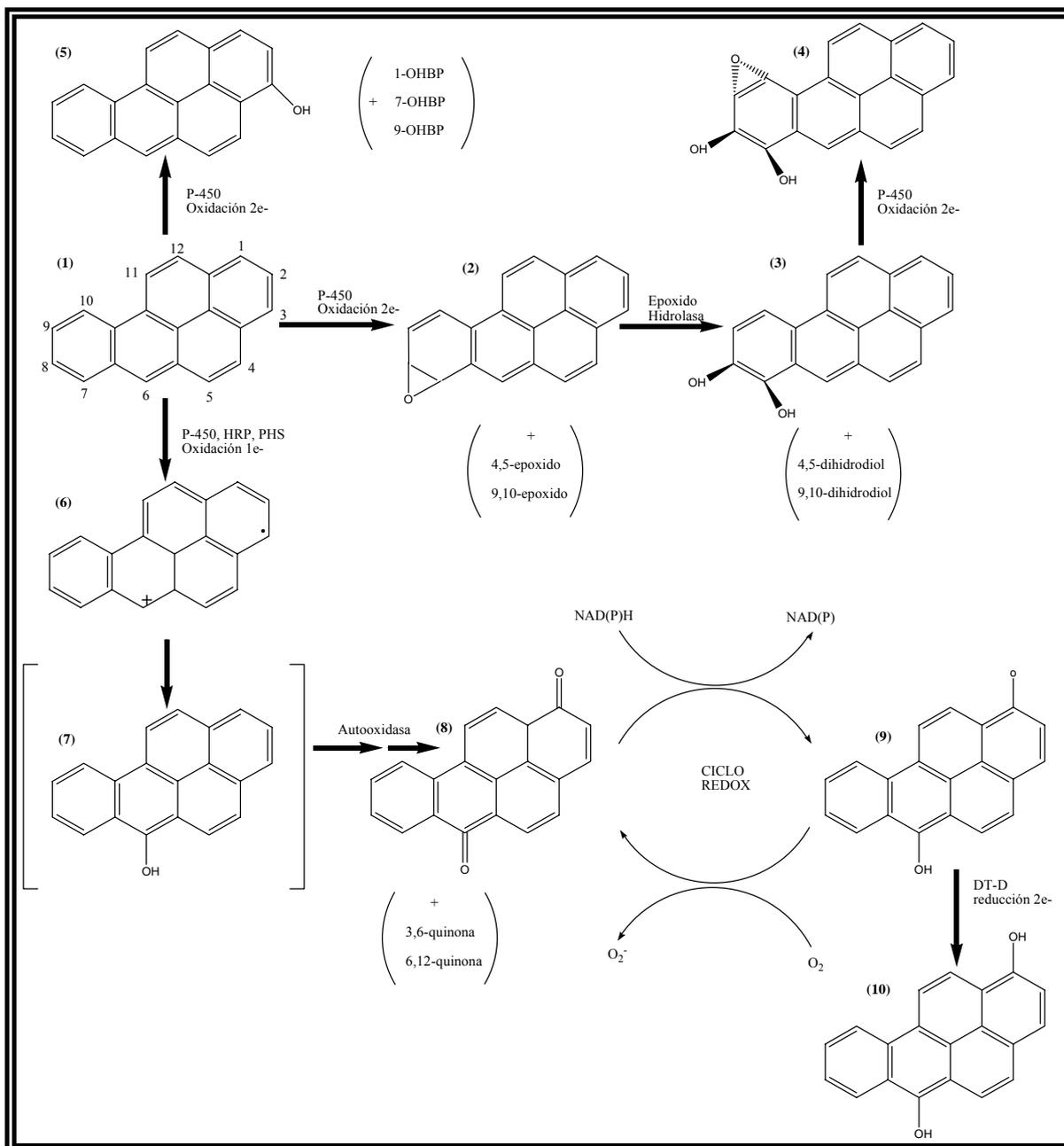


Figura 3. Metabolismo de B[a]P. (1) B[a]P, (2) B[a]P-7,8-epóxido, (3) B[a]P-7,8-dihidrodiol, (4) B[a]P-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido, (6) B[a] cation, (7) 6-hidroxi B[a]P, (8) Quinona, (9) Semiquinona.

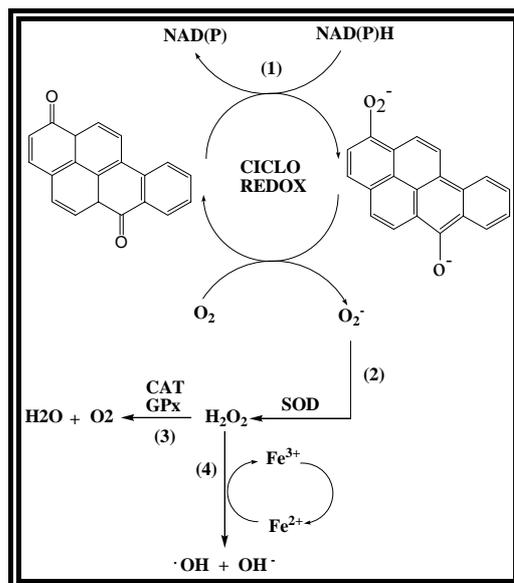


Figura 4. Ciclo redox de producción de ROS (Mitchelmore *et al.*, 1998).

El sistema de defensa que combate las especies reactivas de oxígeno incluye enzimas antioxidantes, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) (Oost *et al.*, 2003). Otra defensa no enzimática incluye vitaminas liposolubles como  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno, así como moléculas de bajo peso molecular tales como ácido ascórbico, catecolaminas y glutatión (Percival, 1998; Lee *et al.*, 2004).

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que contiene Cu-Zn o Mg en su sitio activo, siendo entonces una metaloproteína. SOD dependiente de Cu-Zn se encuentra en el citosol, mientras que la dependiente de Mg se encuentra en mitocondria. El poder antioxidante de SOD radica en que cataliza la conversión del radical superóxido a peróxido de hidrógeno (Figura 5) (Stallings *et al.*, 1992).

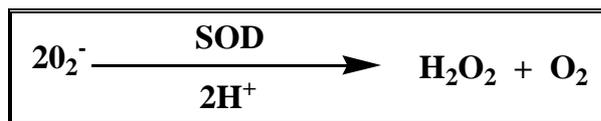


Figura 5. Mecanismo de acción de superóxido dismutasa (SOD)

Las enzimas SOD juegan un papel antioxidante fundamental, su importancia está indicada por su presencia en todos los organismos aerobios examinados. Adicionalmente, la velocidad de las dismutaciones catalizadas por SOD es cercana a su límite de difusión, haciéndola una de las enzimas más activas (Helmunt, 1991; Oost *et al.*, 2003).

La enzima catalasa (CAT) fue identificada en 1811, cuando Thénard observó que tanto tejidos de animales y plantas, así como también, ciertos metales divididos finamente, poseían la propiedad de descomponer peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). En 1863 Schönbein consideró que todas las enzimas ejercían esta acción. Sin embargo, esto fue contradicho por, Jacobson, Bourquelot y Loew; los cuales demostraron que la descomposición del peróxido era realizada por una enzima específica. Loew nombró a esta enzima como catalasa (Sumner y Somers 1947). La catalasa convierte al  $\text{H}_2\text{O}_2$  en oxígeno y agua (Lee *et al.*, 2004; Fridovich 1998).

La superóxido dismutasa y la catalasa se consideran como primera defensa en contra de la toxicidad del oxígeno (Pandey *et al.*, 2003). Generalmente, estas dos enzimas se utilizan juntas ya que se ha observado una respuesta de inducción simultánea en las actividades de ambas cuando se exponen a contaminantes (Dimitrova *et al.*, 1994). Sin embargo, también se ha observado que un exceso de producción de radical anión superóxido inhibe la actividad de CAT (Kono y Fridovich, 1982). Por otro lado, Pandey y colaboradores (2003) observaron que

no hay este tipo de relación entre las enzimas, ya que encontraron que los niveles de SOD en todos los tejidos ensayados fueron más altos que los niveles de actividad CAT. Otro grupo de enzimas que juega un papel muy importante en prevenir daños oxidativos en tejidos, es la familia de glutatión-S-transferasas (GST).

En el área ambiental hay dos puntos importantes que se deben considerar, uno es el efecto causado por los contaminantes tóxicos y, el otro, la prevención del efecto a dichos contaminantes. En el segundo punto, la aplicación o utilización de condiciones que ayuden a organismos a contender contra la contaminación y proteger su salud, es un tema de suma importancia en el campo de la producción pecuaria y acuícola, considerando que una disminución de los efectos de contaminantes sobre organismos, repercutiría en la producción de alimentos en términos cuantitativos y cualitativos.

Investigaciones hechas en cáncer han reportado que la inhibición del metabolismo de citocromo P450 (fase I), puede reducir el riesgo de cáncer, provocado por compuestos como B[a]P, produciendo menos formas de B[a]P carcinogénicas (Steinkellner *et al.*, 2001). La reducción de la actividad CYP está relacionada con una ingesta de dietas ricas en vegetales y frutas, (más de 400 g/día), lo cual previene en al menos un 20% el cáncer, siendo los vegetales más efectivos que las frutas (Park y Pezzuto, 2002).

Dentro de los vegetales, el consumo de brócoli (*Brassica oleracea*), miembro de la familia de las crucíferas, donde se encuentra el repollo y la coliflor, se ha reportado como benéfico para la salud, derivado de su efecto quimioprotector. Concretamente, se le atribuye un efecto protector sobre diversos tipos de cáncer: pulmón, próstata, mama, endometrio, útero, y tumores relacionados con el tracto gastrointestinal del estómago, hígado y colon (Wang *et al.*, 2004).

Los vegetales crucíferos contienen un grupo específico de constituyentes, los glucosinolatos (GLS), los cuales tienen una estructura común que comprende un grupo  $\beta$ -D-tioglucofano, un grupo oxima sulfonada y una cadena lateral que contiene metionina, fenilalanina o aminoácidos de cadenas ramificadas. Los GLS no son bioactivos hasta que ellos son hidrolizados enzimáticamente a isotiocianatos (ITC).

De los glucosinolatos (GLS) que existen en el brócoli, se ha puesto especial atención a la glucorofanina, la cual es transformada por la mirosinasa a sulforafano (SF). La reacción hidrolítica es catalizada por mirosinas endógenas (Figura 6) que se expresan como consecuencia de la ruptura de las células de las plantas durante el cosechado, procesado o masticado (Zhang y Talalay, 1994, Juge *et al* 2007). Este compuesto activo biológicamente es reconocido como una de las más importantes sustancias naturales con propiedades anticarcinogénicas (Fimognari y Hrelia, 2007; Boroswki y Szajdek, 2008).

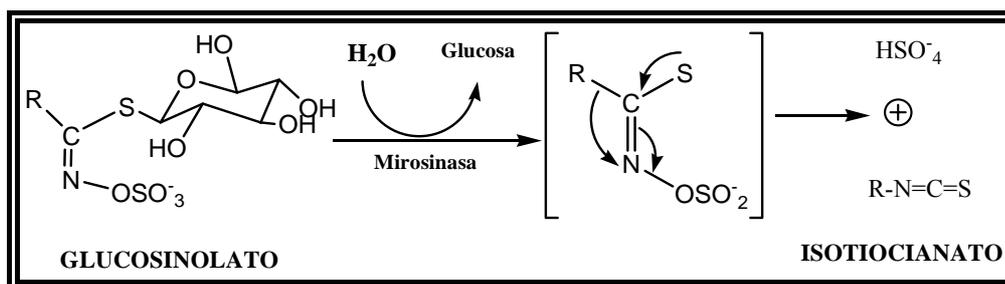


Figura 6. Conversión de glucosinolato a isotiocianato por la acción enzimática de la mirosinasa (Shapiro *et al.*, 2001).

La acción protectora del sulforafano, se atribuye al aumento de la excreción de intermediarios reactivos y, por ende, a una desintoxicación carcinogénica, bloqueando acontecimientos iniciales en la carcinogénesis. Se sugiere que el SF logra estos eventos, mediante dos mecanismos (Figura 7): la inhibición de las enzimas de la fase I y la inducción de las enzimas de la fase II (Myzak y Dashwood, 2006).

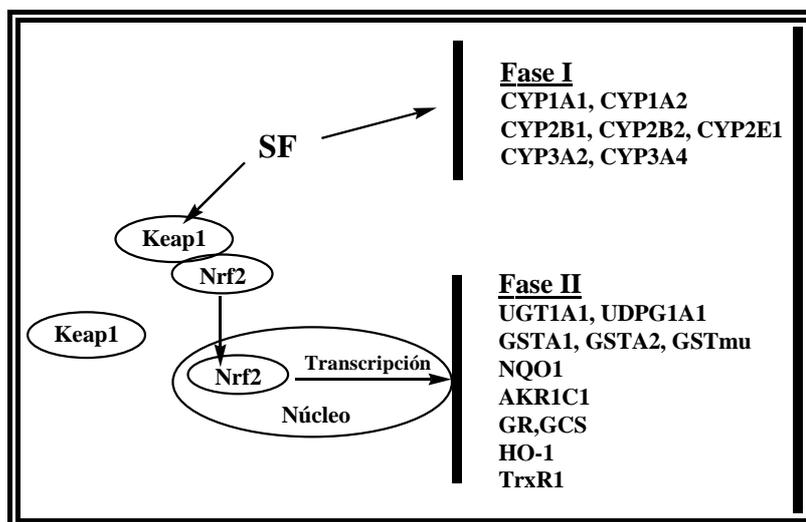


Figura 7. El SF inhibe las enzimas de la fase I responsables de la activación de carcinogénicos y activa las enzimas de la fase II, a través del factor de transcripción Nrf2 que es responsable de múltiples procesos de desintoxicación (Juge *et al.*, 2007).

## I.1 Antecedentes

### I.1.1 Influencia de los PAHs sobre el estrés oxidativo

Como hemos visto, los PAHs son compuestos altamente resistentes a la degradación al ambiente, especialmente aquellos de más de 4 anillos aromáticos. Esto ha creado un interés por sus efectos tóxicos en los ecosistemas y la salud pública. Uno de los intereses de investigación sobre los PAHs, es su efecto sobre el estrés oxidativo que pueden inducir en organismos acuáticos.

Diferentes estudios han revelado que la presencia de contaminantes en ambientes acuáticos puede incrementar la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS), induciendo un daño oxidativo a los sistemas biológicos (Livingstone 2003; Ferreira *et al.*, 2005).

Özcan y Üner (2000) reportaron que la presencia de contaminantes induce cambios en la respuesta de enzimas antioxidantes en hígado de tilapia; así como también, cambios en la peroxidación de lípidos. Generalmente se ha reportado que la expresión de superóxido dismutasa (SOD) en peces expuestos a contaminantes inducen cambios en la respuesta de la enzima, manifestándose como un incremento en su actividad (Jifa *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004). Por su parte, la expresión de catalasa (CAT) es muy variada en presencia o ausencia de contaminantes (Jifa *et al.*, 2006; Stephensen *et al.*, 2000). También se han reportado más estudios con otras enzimas o indicadores del daño oxidativo derivado de la exposición de peces a contaminantes:

Au *et al.* (1999), reportan cambios hepatocitológicos como incremento en los gránulos de lipofucsina y peroxisomas (entre otros) en *Solea ovata* expuesta a concentraciones de B[a]P, siendo la medición de los gránulos de lipofucsina un indicativo de la peroxidación lipídica.

Achuba y Osakwe (2003), estudiaron biomarcadores de estrés oxidativo en el músculo, hígado, riñón, corazón, branquias e intestino del pez gato (*Clarias gariepinus*) expuesto a varias dosis de petróleo de Nigeria en dispersión de agua durante 0, 7, 14, 21 y 28 días. Los biomarcadores de estrés oxidativo que utilizaron fueron peroxidación de lípidos, actividades de catalasa y superóxido dismutasa. Ellos encontraron que hubo un incremento en la peroxidación de lípidos tanto dependientes del tiempo como dependientes de la dosis. Así mismo, observaron una correlación de peroxidación de lípidos con actividad catalasa y superóxido dismutasa en todos los tejidos ensayados, por lo que consideraron que actividades totales de superóxido dismutasa y catalasa pueden ser tomadas como potentes mediadores de estrés químico en *C. gariepinus*, ya que sus actividades fueron generalmente más altas en peces expuestos que en peces no expuestos (controles). También consideran que como el petróleo induce esos cambios enzimáticos, los hidrocarburos del petróleo pueden ser considerados como potentes mediadores en la generación de radicales libres en peces. El incremento en las actividades de estas enzimas en todos los tejidos pudiera ser una respuesta de protección del pez a hidrocarburos del petróleo que inducen radicales libres.

Zhang *et al.* (2004) observaron el efecto de exposición crónica al 2,4-diclorofenol en el hígado de *Carassius auratus* (pez de agua dulce). Ellos reportan que las actividades SOD y CAT fueron afectadas durante los 40 días de exposición a diferentes concentraciones de 2,4-diclorofenol (0.005, 0.01, 0.05, 0.1 y 1.0 mg/l). Se observó un incremento en la actividad SOD cuando los peces fueron expuestos a las concentraciones de entre 0.005 y 0.01 mg/l. En concentraciones mayores (0.5 y 1.0 mg/l) fue observada una inhibición de la actividad SOD. Con respecto a CAT, se obtuvo un ligero incremento a 0.05 y 0.01 mg/l y una tendencia a caer ligeramente en las concentraciones más altas, pero aún se conservó por arriba del control.

### **I.1.2 Efecto de PAHs sobre el citocromo P450**

Los PAHs pueden afectar la reproducción de organismos acuáticos (Hall y Oris, 1991; Casillas *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1998). Hoffman y colaboradores (2006) reportaron que la reproducción del pez cebra es afectada por la exposición de B[a]P en el agua, alterando la transcripción de genes importantes en la regulación de la reproducción (ej. Vitelogenina).

La exposición a PAHs revela cambios hepatocitológicos como son el incremento en los gránulos de lipofucsina, peroxisomas, mitocondrias, lípidos, lisosomas, proliferación ligera del sistema ER y disminución de glicógeno. En una exposición dosis-respuesta de estos hidrocarburos, la actividad EROD (actividad del CYP), mostró variaciones y cambios en densidades numéricas de gránulos de lipofucsina y peroxisomas. Los gránulos de lipofucsina, son un indicativo de peroxidación lipídica (Au *et al.*, 1999). Relacionado a esto, se ha demostrado que el CYP1A (subfamilia del citocromo P450) tiene alta expresión en peces expuestos a contaminantes (Gorbi y Regoli, 2004; Nacci *et al.*, 2002; Quabius *et al.*, 2002).

Solhaug *et al.* (2004), utilizando microscopía de fluorescencia y citometría de flujo; demostraron que los hidrocarburos aromáticos, inducen apoptosis (muerte celular) en células Hepa1c1c7, producen acumulación de la proteína 53, y formación de la forma activa de la caspasa-3, rompiendo de ésta el sustrato intracelular, poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y fragmentación de ADN. Mencionan que incrementa la expresión de CYP1A, lo cual corresponde con su relativa respuesta de apoptosis. También, la exposición a B[a]P produce una acumulación de la proteína p53.

Au *et al.* (1999) observaron los cambios de actividad EROD en *Solea ovata* (pez demersal) en dos experimentos. El primer experimento consistió en la exposición del pez a B[a]P (5mg/kg del peso del pez) vía intraperitoneal durante 1, 3, 5 y 7 días, para observar los cambios en actividad EROD sobre el tiempo. El

segundo experimento consistió en la exposición del pez a diferentes concentraciones de B[a]P (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg/kg de peso del pez durante 3 días, esto lo hicieron para observar los cambios cuantitativos de actividad EROD a diferentes concentraciones. El B[a]P fue disuelto en 0.1 ml de DMSO. Los resultados encontrados fueron un incremento en la actividad EROD desde el primer día de inyección hasta el tercer día en donde empieza a disminuir en los días posteriores. Por análisis de varianza, utilizando la prueba de Dunnett's, encontraron que la actividad EROD fue significativamente más alta que los niveles de los controles (inyección del pez sólo con DMSO) en el día 1 y día 3 después de la inyección. Para la exposición fija de 3 días, los niveles de efecto no observables y los niveles de efectos observables más bajos fueron en 1 y 5 mg/kg de peso del pez, respectivamente.

Por su parte, Willett *et al.* (2000) observaron la comparación entre metabolismo y excreción de benzo[a]pireno en dos especies de pez gato (*Ictalurid catfish*), debido a que las dos especies tienen diferencias en las enzimas de biotransformación de ambas fases I y II, y habilidad para formar aductos PAHs-DNA. Para esto, las especies fueron expuestas a dosis intraperitoneal con 10 mg/kg B[a]P en aceite de maíz (2.5 mg/ml). Los controles recibieron solamente aceite de maíz. De esto, colectaron los hígados de 4 animales por tratamiento en 6, 24, 72 y 168 horas después de la dosis.

Zapata-Pérez *et al.* (2000), reportaron un incremento en el contenido de citocromo P450 (43 a 240%) y actividad EROD (85 a 160 %) en microsomas con respecto a controles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a sedimentos contaminados con PCBs, pesticidas organoclorados y PAHs de 5 lugares localizados en la costa de la bahía de Chetumal, México.

Por otra parte, en Hong Kong estudiaron la expresión del citocromo P450 en branquias, intestino e hígado de tilapia (*Oreochromis mossambicus*) expuesta a sedimentos de costas. La evaluación de la expresión del citocromo fue hecha

por RNAm CYP1A. Los resultados mostraron que el intestino e hígado fueron los tejidos que mostraron una respuesta más importante a inducción del CYP1A (Wong *et al.*, 2001).

Se han recolectado peces de puertos contaminados y no contaminados por PCBs (Nacci *et al.*, 2002). Los peces fueron inyectados intraperitonealmente con dosis de B[a]P 5mg/kg (dosis nominal) y 50mg/kg (dosis alta), separando cada dosis por grupo. Después de 10 días los peces fueron sacrificados. Los peces fueron mantenidos en hielo para la extracción de los hígados, los cuales se mantuvieron congelados y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 3 meses antes de los análisis. Los hígados provenientes de peces machos fueron usados para mediciones de actividades enzimáticas, mientras que los hígados de los peces hembras fueron usados para las mediciones de solamente una enzima (actividad CYP medida como EROD). Con estos procedimientos, encontraron que el B[a]P tiende a incrementar la actividad EROD, este efecto fue más bajo en peces procedentes de sitios contaminados por PCBs, que en los peces del sitio no contaminado. El sexo pareció afectar la actividad EROD, la actividad EROD inducida por B[a]P fue más baja en peces hembras que en peces machos y no incrementó significativamente en peces hembras del sitio contaminado (Nacci *et al.*, 2002).

Hay trabajos donde reportan la utilización de biomarcadores, como lo son la actividad EROD, la actividad glutatión-S-transferasa (GST), y la actividad sorbitol deshidrogenada (SSDH), como indicadores del impacto de PAHs sobre tilapia (*Oreochromis mossambicus*). En uno de estos trabajos se menciona que la inducción de CYP1A por PAHs de tamaño molecular pequeño ( $\leq$  a 4 anillos aromáticos) como criseno, fenantreno, pireno y naftaleno es irregular y dependiente de la especie. Con respecto a GST, esta actividad fue alta, en un 33%, en muestras de tilapia expuestas a mayor concentración de fenantreno que los peces expuestos a menor concentración. Por otro lado, SSDH mostró un comportamiento inverso a la actividad GST. Se concluye en este trabajo que la

tilapia es un buen organismo modelo para monitorear la contaminación por PAHs en aguas tropicales debido a que presenta una alta biotransformación de PAHs (Shailajá y D´Silva, 2003).

Otras investigaciones que se han realizado se centran sobre la forma en que los peces son expuestos a los contaminantes (PAHs, exposición por dieta o disolución en agua). Hembras de la especie *S. aurata* fueron expuestas a B[a]P por vía agua y alimento. El tratamiento con agua incluyó los siguientes grupos: (a) control (solamente se adicionó el vehículo, 20µL acetona/L); (b) 100 µg B[a]P/L; (c) 200µg B[a]P/L; (d) 300µg B[a]P/L; (e) 500µg B[a]P/L. El tratamiento con alimento incluyó: (a) control (1ml aceite de maíz/100g peso seco del alimento); (b) 100µg B[a]P/g peso seco del alimento. Se tomaron muestras en diferentes días (0, 5, 10, 15 y 20). Los resultados obtenidos muestran que la actividad CYP1A fue detectada en células endoteliales de arterias hepáticas o venas de los peces expuestos a B[a]P, mientras que no fue detectada dentro del citoplasma del hepatocito. Además la exposición a altas concentraciones de B[a]P incrementó la inmunoreactividad hepatocito CYP1A (Ortiz-Delgado *et al.*, 2005).

### **I.1.3 Efecto de sulforafano (SF) y brócoli**

Barceló *et al.* (1998) mencionan que el sulforafano inhibe marcadamente el rompimiento de cadenas de DNA originado por carcinogénicos como N-nitrosodimetilamina y 2-amino-3-metilimidazol[4,5-f]quinolino. Considerando la habilidad del SF a inhibir la genotoxicidad induciendo las actividades CYP2E1 así como CYP1A2, proponen que esta actividad puede contribuir a una actividad quimioprotectora.

En hepatocitos de ratas expuestas a SF por 48 y 72 horas, la actividad GST-1-chloro-2,4-dinitrobenceno se incrementó de 2 a 3 veces con respecto al control. Por su parte, la actividad EROD de 6 a 72 horas después de la adición de SF mostró una inhibición dependiendo de la dosis, empezando en 6 horas con 5  $\mu\text{mol}$  y alcanzando más del 80% después de 24 horas con tratamiento de 25  $\mu\text{moles}$  de SF. Con esto observan y evidencian que la inducción de la fase II e inhibición de la fase I, juntos juegan un papel importante en la quimioprotección del SF (Mahéo *et al.*, 1997).

El SF regula la expresión y función de diferentes genes de citocromo P450 (CYP). En hepatocitos de ratas, el SF inhibió la expresión de CYP1A1 y 2B1/2. En hepatocitos de humanos, SF disminuyó los niveles de RNAm de CYP3A4, reduciendo la actividad de CYP3A4. Por otro lado, el SF no tuvo efecto contra CYP1A2, una enzima implicada en la activación metabólica de aminas heterocíclicas. Además, el SF tiene variedad en el tipo de inducción de enzimas de la fase II. En células HepG2 de humanos, el SF incrementó la actividad de RNAm de UDP-glucosiltransferasa (UGT), CYP1A1 y glutatión-S-transferasa (GST) A1, NAD(P)H:quinona óxido-reductasa 1 (NQO1) y proteína UGT1A1. En células de murino Hepalc1c7 tratadas con SF, también se incrementó GST y NQO1. En hepatocitos de ratas, SF indujo el RNAm de GSTA1/2 y GSTP1. En humanos SF indujo el RNAm de GSTA1/2 y GSTM1 (Fimognari y Hrelia, 2007).

Ole Vang *et al.* (2001) analizaron la modulación del metabolismo de xenobióticos, incluyendo la actividad de la enzima citocromo P450, en ratas alimentadas con dietas a base de brócoli proveniente de diferentes cultivos. La técnica manejada fue ratas alimentadas durante tres semanas con dieta control (sin brócoli) y después se alimentaron una semana con dieta + brócoli (el brócoli lo liofilizaron y después lo mezclaron con buffer de fosfato salino, posteriormente lo volvieron a liofilizar y colocaron el 10% de brócoli en la dieta). Los resultados que encontraron muestran un incremento en la actividad de

EROD, MROD (metilresorufin-O-deetilasa) en hígado, EROD (etoxiresorufin-O-deetilasa), MROD y PROD (pentoxiresorufin-O-deetilasa) en colon, y solamente PROD en riñón. En conclusión, el trabajo muestra que el 10% de brócoli incluido en la dieta induce las actividades de CYP1A, 2B y 3A en hígado de rata y CYP1A en colon. Aunque la respuesta depende de la muestra de brócoli usada, indicando que la ingesta de diferentes muestras de brócoli comercial puede afectar la capacidad metabolizante de xenobióticos.

Finalmente, la actividad quimioprotectora del sulforafano parece tener un efecto rápido como lo han analizado Hu *et al.* (2004). Ellos midieron la metabolización del SF en ratas, a las cuales se les dio una dosis de 50  $\mu\text{mol}$  de SF suspendido en aproximadamente 0.5 ml de aceite de maíz. La farmacocinética del SF fue seguida después de la dosis oral de 50  $\mu\text{mol}$  de SF. La vida media del SF en plasma fue de alrededor de 2.2 h. La disminución de la concentración en plasma de SF se lleva a cabo en 1 hora con un pico cerca de los 20  $\mu\text{mol}$  a 4 h después de la dosis. El análisis de genes para GST, indicó que incremento significativamente en 4 horas con un pico a las 12 horas.

## Capítulo II

---

### II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

---

#### Objetivo general

Estudiar el efecto del brócoli y del sulforafano en dieta de tilapia (*Oreochromis niloticus*) sobre el estrés oxidativo provocado por hidrocarburos aromáticos policíclicos.

#### Objetivos particulares

1. Evaluar diferentes vehículos para ser empleados en la disolución de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.
2. Estudiar el efecto de diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes.
3. Evaluar el efecto del brócoli y del sulforafano en la dieta de tilapia sobre la actividad del citocromo P450, perteneciente a la fase I del metabolismo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.
4. Evaluar el efecto del brócoli y del sulforafano en la dieta de tilapia sobre la actividad de las enzimas antioxidantes.
5. Estudiar el efecto del brócoli y del sulforafano en la dieta de tilapia sobre el daño oxidativo a lípidos.
6. Estudiar el efecto del brócoli y del sulforafano en dieta de tilapia sobre la actividad glutatión-S-transferasa (GST) perteneciente a la fase II del metabolismo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

## Hipótesis

- La administración de brócoli y sulforafano en la dieta de tilapia (*Oreochromis niloticus*) disminuirá o evitará el estrés oxidativo provocado por hidrocarburos aromáticos policíclicos.
  
- La administración de brócoli y sulforafano en la dieta de tilapia (*Oreochromis niloticus*) disminuirá la actividad del citocromo P450 provocado por hidrocarburos aromáticos policíclicos.

## Capítulo III

---

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### III.1 Organismo de estudio

Para los ensayos se utilizó el pez tilapia (*Oreochromis niloticus*), el cual ha sido reportado como indicador biológico por sus características de resistencia a contaminantes (Shailajá y D'Silva, 2003). Además de ser una especie de gran importancia económica en México, también se considera el organismo de mayor uso en la acuicultura, así como organismo de mayor captura (Zapata-Pérez *et al.*, 2004).

Tilapia (nombre genérico del grupo, que comprende los géneros *Tilapia*, *Sarotherodon* y *Oreochromis*), es una especie originaria de África y pertenece a la familia de los cíclidos. Esta familia se diferencia de la gran mayoría de los peces dulceacuícolas por la presencia de un sólo orificio nasal a cada lado de la cabeza y que sirve simultáneamente como entrada y salida de la cavidad nasal (Figura 8).

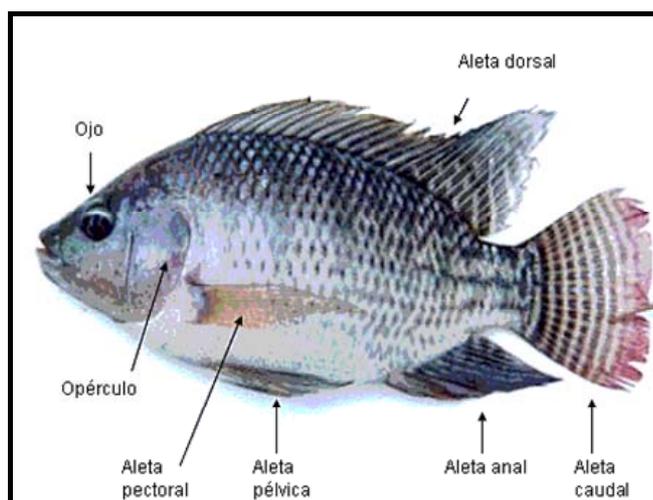


Figura 8. Descripción física de tilapia (*Oreochromis niloticus*).  
<http://www.mundotilapia.es.tl>

### III.2 Estrategia experimental

El desarrollo del trabajo experimental se dividió en dos partes: En la primera parte, se determinó el efecto de un compuesto carcinogénico (B[a]P) sobre diferentes actividades enzimáticas. En la segunda parte, se estudió el efecto de una alimentación rica en brócoli y sulforafano en la quimioprotección contra la acción tóxica del B[a]P.

Las tilapias juveniles (*Oreochromis niloticus*) fueron adquiridas en Acuicultura del Desierto, una granja comercial de peces de la localidad de Ensenada Baja California, México. Se trabajó con una población de peces sexualmente indiferenciada. Estos fueron distribuidos en el invernadero aleatoriamente en tanques individuales de 200 litros de capacidad, los cuales estuvieron conectados a un sistema de biofiltro con recirculación (Figura 9). La temperatura fue controlada a  $26 \pm 2$  °C y se mantuvo una aireación continua e intercambio de agua en un 20% cada 24 horas. Los peces se alimentaron diariamente y se mantuvieron en inanición 24 horas antes del sacrificio. Un período de aclimatación de una semana fue necesario antes de empezar cada experimento.



Figura 9. Sistema de biofiltro para el cultivo de tilapia.

### **III.3 PARTE I. Efecto del B[a]P sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes**

Con el fin de seleccionar el mejor vehículo para disolver y manejar el B[a]P, se experimentó con DMSO y Aceite de Maíz (reportados en la literatura) observando su efecto sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes. Esto se realizó con 5 organismos por tratamiento.

Se compararon el pireno, naftaleno, B[a]P y el antraceno disueltos en DMSO como vehículo, con el fin de determinar su efecto sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes del pez expuesto a diferentes xenobióticos. Fueron utilizados 5 organismos por tratamiento, este consistió en la adición de 100 mg de PAHs/kg de peso del pez, debido a un peso promedio de los peces.

Para determinar el efecto del B[a]P/kg a menor concentración de los experimentos antes ensayados, se usó 50 mg B[a]P/kg de peso del pez, y se ensayó con mayor número de organismos (10 organismos). Se mantuvo el control con peces inyectados con DMSO.

Se determinaron las diferencias de las actividades enzimáticas y de citocromo P450 entre cada pez, así como el efecto del tiempo de almacenamiento. Esto se planteó así debido a la comparación de resultados de los experimentos iniciales. Para esto, se utilizaron 5 organismos por tratamiento (DMSO y 50 mg B[a]P/kg de peso del pez).

En todos los experimentos, los peces fueron sacrificados 3 días después de la inyección de PAHs.

Se determinó el efecto de la dosis de B[a]P sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes. El B[a]P fue administrado a diferentes dosis 0.1, 1, 10, 50 y 100 mg/kg y los peces de cada tratamiento así como sus controles, fueron sacrificados en diferentes tiempos de exposición post-inyección

(12 horas, 1, 3, 7 y 14 días) y muestras de hígado (n=5) se colectaron. Estos fueron almacenados a -20°C para los análisis posteriores.

### **III.4 PARTE 2. Efecto de dietas enriquecidas con sulforafano y brócoli en tilapias expuestas intraperitonealmente a B[a]P sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes**

Un total de 270 peces con un peso promedio de 141 ( $\pm$  9.48) g y un tamaño promedio de 20.6 ( $\pm$  0.98) cm fueron utilizados. Estos se separaron en grupos de 30 organismos, los cuales fueron aleatoriamente asignados en 9 tanques de 200 litros de capacidad. Estos tanques estaban conectados a un biofiltro con sistema de recirculación. La temperatura fue controlada ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y se mantuvo una aireación continua, con un 20% de intercambio de agua cada 24 horas. Los peces fueron aclimatados al menos una semana antes de iniciar el experimento, tiempo en que ellos fueron alimentados con una dieta comercial (Purina S. A de C. V., Cd. de Obregón, México).

Para el experimento, se alimentaron los peces por un mes con las dietas preparadas (apéndice A). Estas fueron: control, dieta normal; tratamiento 1, dieta 30 % brócoli; tratamiento 2, dieta con 8 micromoles de sulforafano por gramo de peso seco de dieta. Al término del mes se les inyectó 100 mg de B[a]P en DMSO y los tiempos de muestreo fueron 0, 12, 24, 36, 48, y 72 horas después de la inyección. El experimento se realizó por triplicado.

### III.5 Exposición a B[a]P y sacrificio de los peces

Para la exposición, los peces se capturaron en una red e inmediatamente fueron inyectados intraperitonealmente con 100  $\mu$ l del contaminante (100 mg de B[a]P), (Figura 10a). A los tiempos determinados después de la inyección del contaminante, el sacrificio de los peces consistió en atravesar una tijera por la parte posterior de la cabeza hasta llegar al cerebro y deshacerlo (Figura 10b). Después, se extrajo el hígado de cada pez (Figura 11), todos los hígados de un mismo tratamiento se mezclaron, excepto para la determinación de las diferencias entre cada pez en donde los hígados se trataron por separado. La muestra biológica se almacenó a -20 °C para los análisis posteriores.



Figura 10. Inyección intraperitoneal de B[a]P a tilapia (A) y sacrificio de los peces (B).



Figura 11. Obtención de la muestra hepática de tilapia.

## **III.6 Preparación de las muestras biológicas y extractos enzimáticos**

### **III.6.1 Preparación de fracción microsomal**

Los hígados (0.5 g) se homogenizaron en buffer de extracción (sacarosa 0.125 M, EDTA 1 mM, tris 50 mM pH 7.2, inhibidor de tripsina tipo II 1 mg/ml y dithiothreitol 1 mM) en un homogenizador (Tissue-Tearor modelo 985-370). La muestra obtenida fue centrifugada (Eppendorf 5804R) a 15 000 g por 20 min a 4 °C con la finalidad de la separación de la grasa y de residuos celulares. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 105 004 g por 1 h 30 min a 4 °C en una ultracentrífuga (Sorval con rotor AH-629). El sobrenadante fue decantado y el pellet microsomal fue resuspendido en buffer de fosfatos 100 mM (pH 7.6) conteniendo 20 % glicerol (Cavanagh *et al.*, 2000).

### **III.6.2 Determinación de la actividad etoxiresorufin-*O*-deetilasa (EROD)**

La actividad EROD fue determinada de acuerdo a una modificación del método de Burke y Mayer, (1974).

La mezcla de reacción en 500 µl contenía: Tris 10X (500 mM pH 7.2), microsomas (150 µg), ERR (50 µM), NADH (2.8 mM) y agua destilada desionizada. El tiempo de incubación fue de 30 min a 37 °C. Las reacciones se detuvieron con 500 µl de metanol 100 % frío y se centrifugaron a 6000 g por 20 min a 4 °C. Para las lecturas en el HPLC se utilizaron 50 µl del sobrenadante.

El equipo de HPLC usado fue Agilent serie 1100, equipado con una columna Zorbax 300SB-C<sub>18</sub> analítica de 150 mm x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula. Las mediciones fueron hechas por medio de un detector de longitud de onda múltiple (MWD Agilent G1365B) a una longitud de onda de 230 nm y un

detector de fluorescencia (Agilent G1321A) con excitación a 560 nm y una emisión a 585 nm. La elución se realizó de la siguiente manera: se inició con 4 min de elución isocrática con el solvente A (52 % v/v de buffer de fosfatos 20 mM, pH 6.8, 45 % de metanol al 70 % y 3 % de acetonitrilo), después un gradiente lineal de 20 min al solvente B (metanol 100 %). El flujo de corrida fue de 0.8 ml/min.

### **III.6.3 Determinación de la actividad catalasa (CAT)**

La actividad catalasa fue determinada por el método de Aebi (1985). La mezcla de reacción consistió de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 50 mM en bufer de fosfato 50 mM, pH 7.0, en un volumen final de 1 ml. La reacción fue iniciada por la adición del extracto de hígado. La disminución de la absorbancia del  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue medida en un espectrofotómetro (HACH DR4000) a 240 nm y la actividad CAT fue calculada usando  $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Las unidades de actividad fueron definidas como  $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  descompuesto por minuto.

### **III.6.4 Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)**

Los extractos de hígado fueron obtenidos con buffer frío de cloruro de potasio 50 mM y centrifugación a 15000 g durante 30 min. La actividad SOD se estimó en el sobrenadante por la medición de la inhibición de la auto-oxidación del pirogalol, de acuerdo al método de Marklund y Marklund (1974) modificado por Zhang y colaboradores (2005). La actividad SOD en extracto de hígado fue ensayada en una solución de buffer de fosfato 50 mM (pH 8.24) conteniendo 3 mM de pirogalol (disuelto en HCl 10 mM). La velocidad de auto-oxidación del

pirogalol fue medida en un espectrofotómetro (HACH DR 4000) a 325 nm. Una unidad de actividad SOD se definió como la cantidad de enzima que inhibe el 50% de la velocidad de oxidación del pirogalol en 1 ml de solución a 25 °C. Los resultados fueron expresados como Unidades/mg de proteína.

### **III.6.5 Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa (GST)**

La actividad GST fue estimada de acuerdo al método de Habig y colaboradores (1974). Este método consiste en la conjugación de 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) con glutatión reducido (GSH) catalizado por la GST. La formación del conjugado GSH-CDNB fue analizada a 340 nm de absorbancia y se cuantificó usando un coeficiente de extinción molar de  $9.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La mezcla de reacción en buffer de fosfato 100 mM y pH 6.5, contenía GSH 1 mM y CDNB 1 mM.

### **III.6.6 Análisis de peroxidación de lípidos (LPO)**

El análisis de LPO fue determinado por el método de Utley y colaboradores (1967) modificado por Fatima y colaboradores (2000). El daño peroxidativo a lípidos se llevó a cabo con la presencia de radicales libres que origina el producto de malondialdehido (MDA), el cual fue determinado por el método del ácido tiobarbitúrico (TBA). El tejido (0.1 g) fue homogenizado en solución fría de cloruro de potasio 0.15 M y centrifugado a 3000 rpm por 10 min a 4 °C. Posteriormente, 1.0 ml de sobrenadante fue incubado a 37 °C por 60 min en un agitador metabólico. Una alícuota de 1.0 ml del mismo sobrenadante fue incubado a 0 °C, el cual sirvió como control de la reacción. Después de una hora

de incubación, se adicionó 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % y 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67 %, se mezcló y se centrifugó. Posteriormente, los tubos que contenían el sobrenadante fueron llevados a ebullición por 10 min en un “baño maría”, para finalmente enfriarlos a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 535 nm y la actividad LPO fue expresada como equivalentes de MDA por gramo de tejido. Las unidades de actividad LPO fueron  $\mu$ moles of MDA por minuto.

### **III.6.7. Determinación de proteína**

La cuantificación de proteína se realizó utilizando el reactivo Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (No. Cat. 500-0006) que se basa en el método de Bradford (1976). La curva estándar fue elaborada con albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar.

### **III.6.8. Análisis estadísticos**

Para la primera parte del trabajo experimental, se aplicó un análisis de varianza (ANDEVA) Kruskal-Wallis ( $\alpha=0.05$ ) y una prueba de comparación múltiple de Kruskal-Wallis (valor Z) con el programa NCSS y PASS (2000). Para el efecto de dietas enriquecidas con sulforafano y brócoli en tilapias expuestas intraperitonealmente a B[a]P sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes, se aplicó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (STATISTIC versión 6.1).

## Capítulo IV

---

### IV. RESULTADOS

---

#### IV.1 PARTE I. Efecto de PAHs sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes en hígado de tilapias

##### IV.1.1 Determinación del vehículo para la disolución de PAHs

Los vehículos utilizados para la disolución de los PAHs y aplicación intraperitonealmente a tilapias fueron: aceite de maíz y DMSO. Las tilapias inyectadas con aceite de maíz presentaron mayor valor de actividad citocromo P450, determinada como actividad EROD, ( $16.091 \pm 0.264$ ), sin embargo éste valor no fue significativamente diferente a los resultados obtenidos en tilapias inyectadas con DMSO ( $14.029 \pm 0.156$ ) como se observa en la siguiente figura.

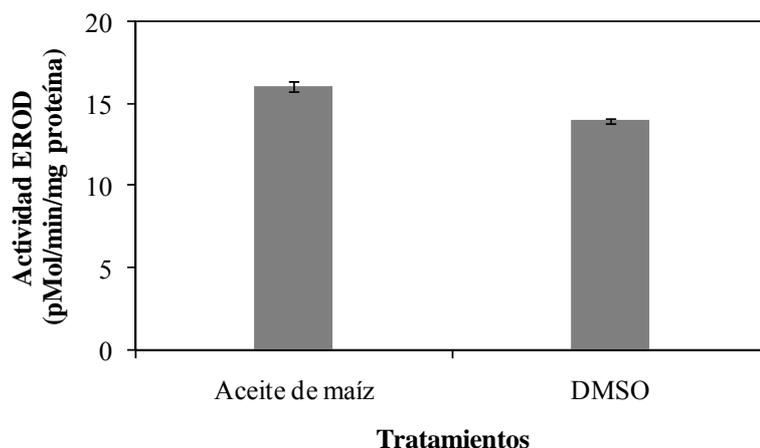


Figura 12. Actividad EROD en hígado de tilapia inyectada con aceite de maíz o DMSO

#### IV.1.2 Efecto de diferentes tipos de PAHs sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes

Para evaluar el efecto de diferentes xenobióticos sobre la respuesta del citocromo P450 y enzimas antioxidantes, se utilizaron 4 diferentes compuestos (pireno, naftaleno, antraceno y B[a]P) pertenecientes a la familia de los PAHs.

En los resultados se pueden observar que la actividad EROD incrementó significativamente ( $252.477 \pm 7.615$ ) en las muestras de hígado de tilapia expuestas a B[a]P (Figura 13). Por otra parte, los organismos tratados con pireno, naftaleno y antraceno presentaron una baja actividad EROD ( $4.427 \pm 1.275$ ,  $6.881 \pm 1.517$  respectivamente), comparables a la respuesta mostrada por el vehículo solo ( $12.217 \pm 1.124$ ). Sin embargo, la respuesta con el carcinógeno B[a]P fue significativamente más alta (Figura 13).

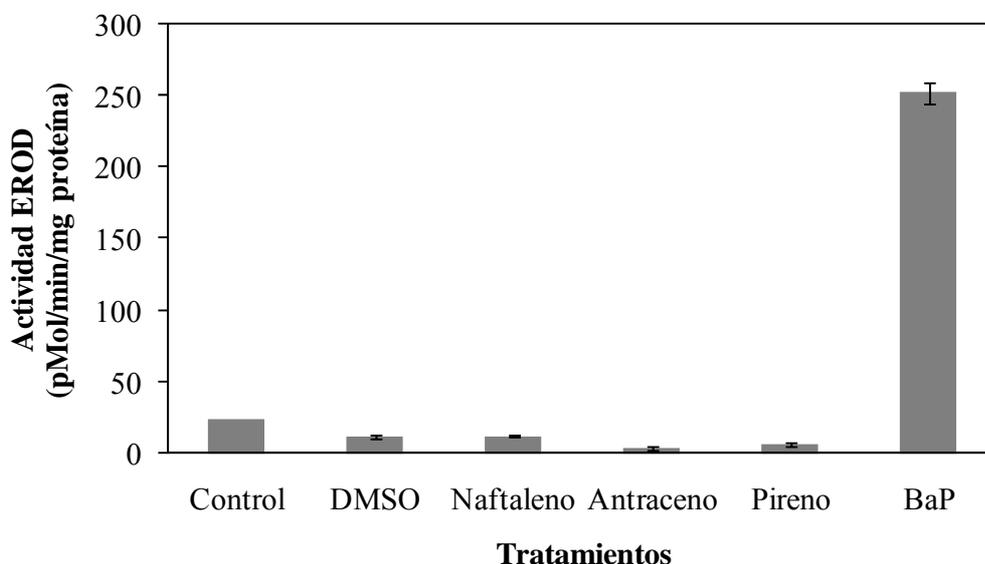


Figura 13. Efecto de la actividad EROD en hígado de tilapia inyectada con diferentes tipos de PAHs.

La actividad SOD se incrementó en los organismos inyectados con naftaleno, siendo éstos estadísticamente diferentes a los otros PAHs ensayados, mismos que entre ellos no expresaron cambios significativos (Figura 14). Por otra parte, la peroxidación de lípidos incrementó en los organismos tratados con antraceno comparado al grupo control. Los demás PAHs no presentaron cambios en la peroxidación de lípidos en los organismos con respecto al control (Figura 15).

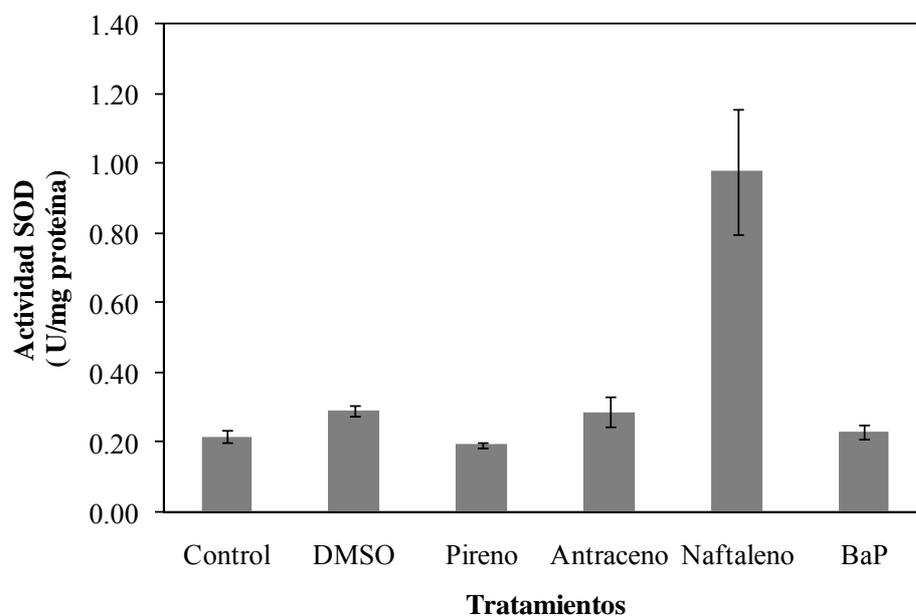


Figura 14. Efecto de la actividad SOD en hígado de tilapia inyectada con PAHs.

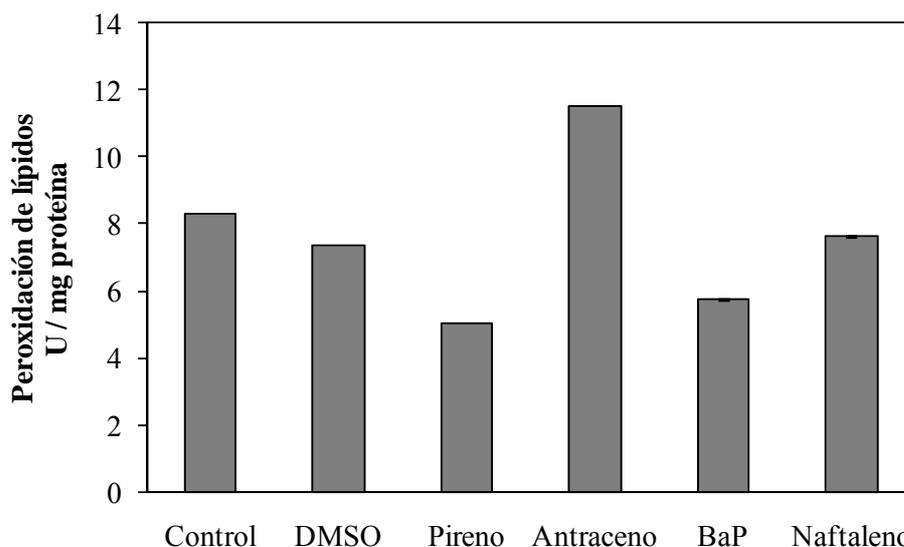


Figura 15. Peroxidación de lípidos en hígado de tilapias inyectadas con PAHs.

Después de observar los datos obtenidos, se decidió utilizar a B[a]P en los siguientes ensayos, ya que induce a una mayor respuesta en la actividad del citocromo P450.

#### **IV.1.3 Efecto individual de B[a]P sobre la actividad de citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia**

El efecto de B[a]P sobre la actividad del CYP450 se analizó en hígados individuales. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas entre los hígados de tilapias tratadas con (B[a]P), así también entre las muestras de hígado de tilapias inyectadas con DMSO (considerado como control). Sin embargo entre los tratamientos (BaP1, BaP2, BaP3, BaP4 y BaP5) y las muestras controles (DMSO1, DMSO2 y DMSO3) si hubo diferencias significativas. En el análisis de los resultados de actividad superóxido dismutasa y catalasa no son significativamente diferentes al control (Figura 16).

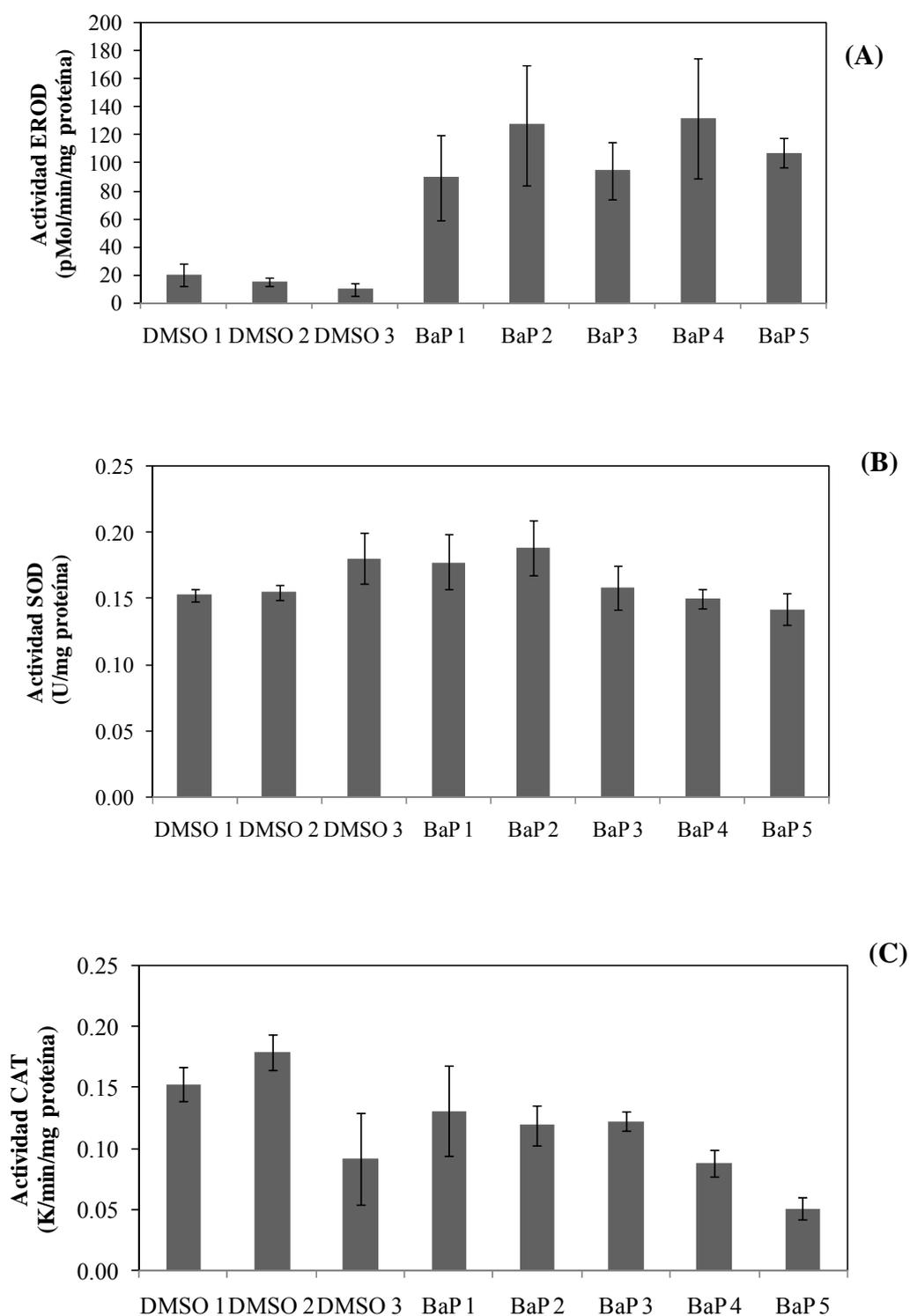


Figura 16. Efecto individual de B[a]P: EROD (A), SOD (B) y CAT (C) en hígado de tilapia expuesta a 50 mg/ B[a]P kg de peso del pez, durante 3 días comparada con el control (DMSO únicamente).

Con la respuesta observada, se decidió a seguir los futuros experimentos con una mezcla de hígados proveniente de 5 ó 10 números de peces (dependiendo de la disponibilidad de los peces por parte de los proveedores) y disminuir la concentración del contaminante para observar el efecto en las actividades enzimáticas.

#### **IV.1.4 Efecto de B[a]P sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia**

El efecto de B[a]P (100 mg/Kg de peso del pez) sobre la actividad del CYP450 se analizó en una mezcla homogénea de hígados. Se obtuvieron valores de CYP450 de 252.48 pmol/min/mg en las muestras de hígado de tilapias expuestas a B[a]P, actividad CYP450 superior a las obtenidas en las muestras controles: DMSO (tilapias inyectadas con DMSO) y controles (tilapias sin inyección), mismas que entre ellas no hubo diferencias estadísticas significativas (Figura 17). En general, con una dosis de 100 mg B[a]P/kg de peso del pez la actividad EROD fue mayor que lo obtenido con DMSO y control. Con respecto a la actividad SOD y CAT no hubo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Figura 17).

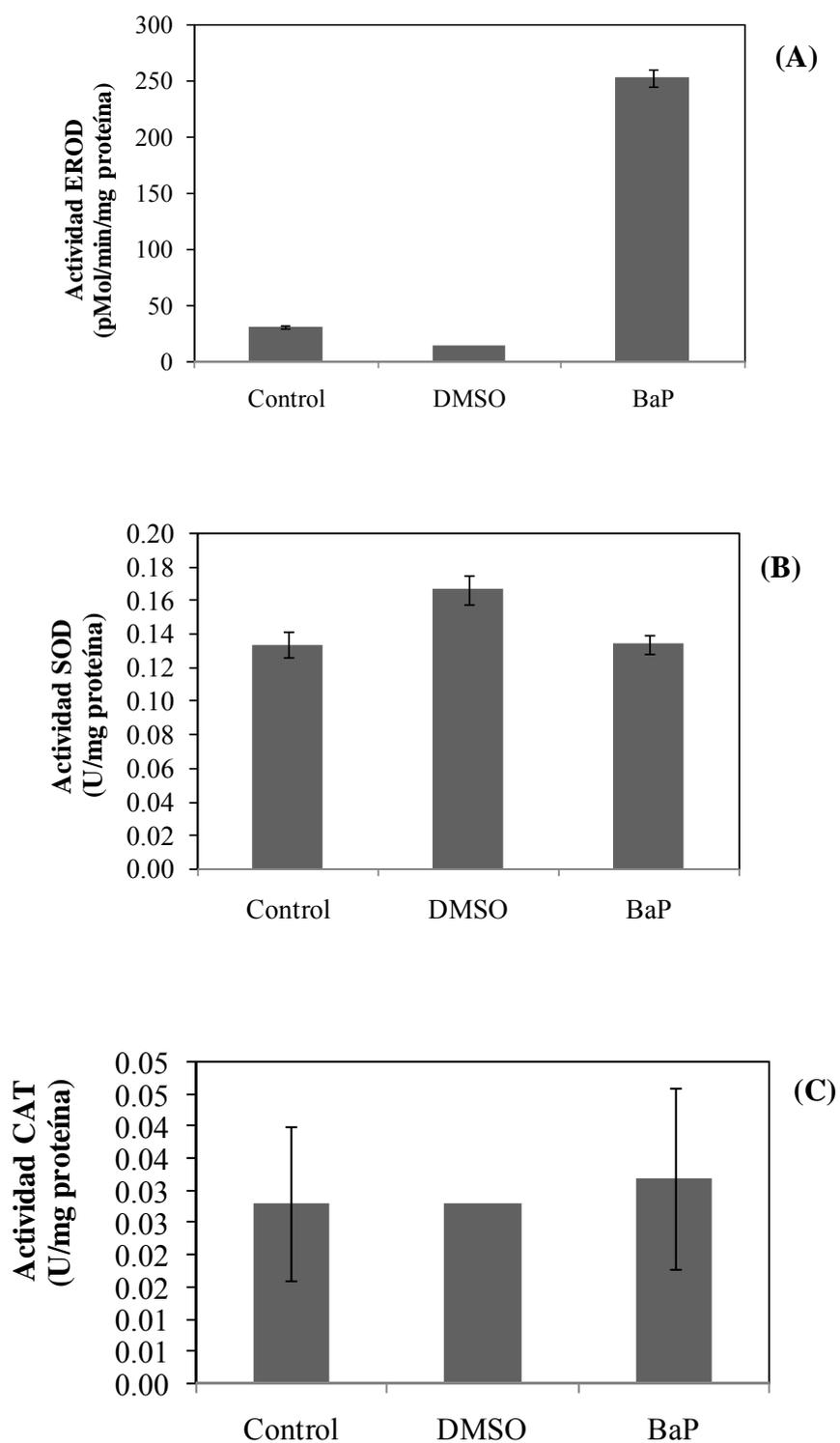


Figura 17. Actividad EROD (A), SOD (B) y CAT (C), en hígado de tilapia expuesta durante 3 días a B[a]P (50 mg/kg de peso del pez).

#### **IV.1.5 Efecto dosis-tiempo de B[a]P sobre la actividad de citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia**

El comportamiento en la actividad EROD se muestra en la figura 18. A concentraciones bajas (0.1 mg y 1 mg) de B[a]P no expresa cambios considerables con respecto el control (DMSO), inclusive la concentración de 10 mg de B[a]P presenta el mismo comportamiento, con un ligero incremento de la actividad a los 14 días de exposición. Con respecto a las concentraciones altas (50 y 100 mg de B[a]P), hay una marcada evidencia que la actividad EROD incrementa con respecto a la concentración del contaminante, alcanzando la mayor actividad al tercer día de exposición a B[a]P. En forma general, los resultados muestran un incremento de la actividad EROD dependiente de las concentraciones del contaminante en los niveles más altos de exposición. Esto es muy evidente, ya que se observa la marcada tendencia del aumento en la actividad al incrementarse la concentración del contaminante, como se observa con los resultados en peces que recibieron la dosis de 100 mg B[a]P/kg de peso del pez.

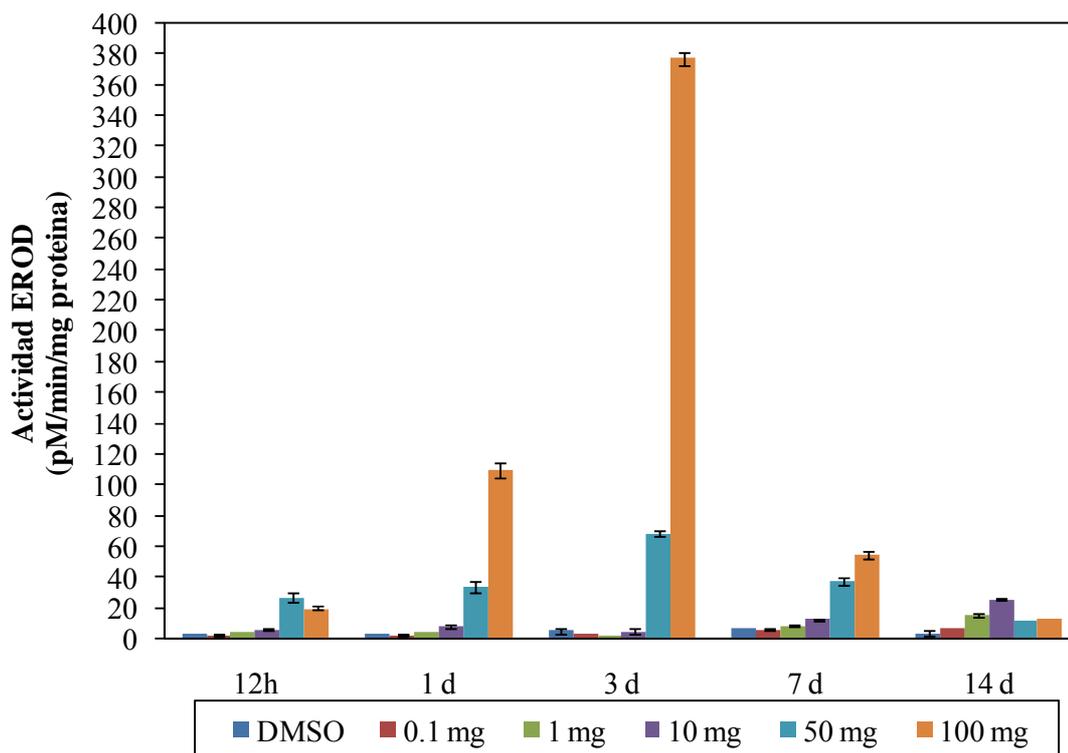


Figura 18. Expresión de la actividad EROD en hígado de tilapia expuesta a concentraciones de B[a]P en diferentes tiempos de exposición.

La actividad de las enzimas antioxidantes después de la administración de B[a]P en tilapia, mostraron cambios en su perfil de actividad enzimática (Figura 19). La actividad de SOD mostró un incremento significativo en la concentración de 10 mg B[a]P/kg de peso del pez, alcanzando un valor máximo en el Día 1 de exposición, con las concentraciones de 0.1 y 50 mg B[a]P/kg de peso del pez se observó el incremento de la actividad al Día 3, en ambas concentraciones la actividad fue disminuyendo conforme avanzó el tiempo de exposición al contaminante. La respuesta en la actividad CAT mostró un incremento a concentraciones altas de exposición a B[a]P. La máxima actividad se obtiene a las 12 horas después de la exposición al contaminante. Con respecto a la concentración los valores máximos de actividad se obtienen con 50 y 100 mg de

B[a]P/kg de peso de pez. En la peroxidación de lípidos (Figura 20), se observa un ligero incremento de LPO a una concentración de 10 mg de B[a]P, con una expresión máxima en el Día 14.

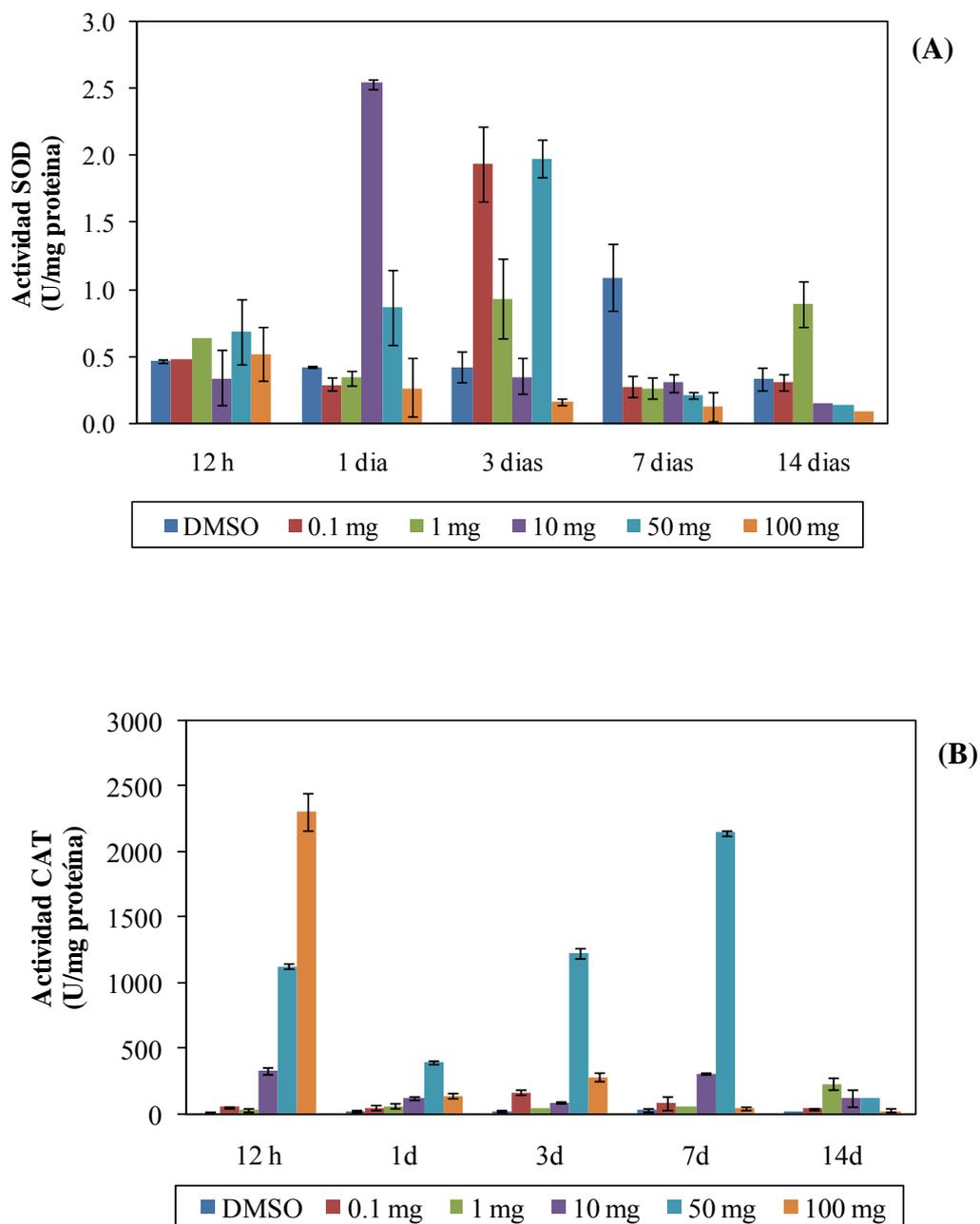


Figura 19. Expresión de la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas SOD (A) y CAT (B), en tilapia expuesta a diferentes concentraciones de B[a]P en varios periodos de exposición.

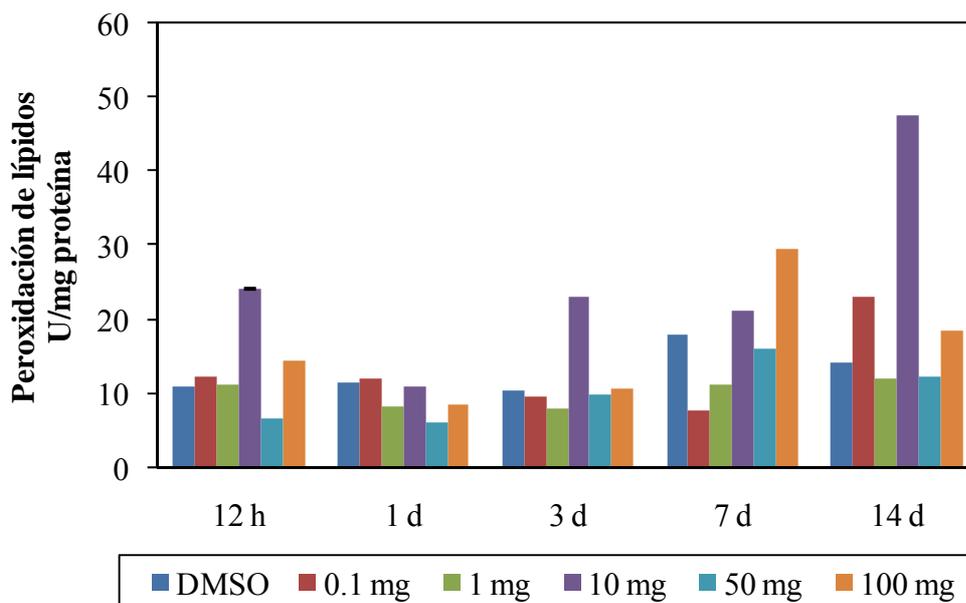


Figura 20. Peroxidación de lípidos en hígado de tilapia expuesta a distintas concentraciones de B[a]P en diferentes tiempos de exposición.

## IV.2 PARTE 2. Efecto de dietas enriquecidas con sulforafano y brócoli en tilapias expuestas intraperitonealmente a B[a]P

### IV.2.1 Efecto de dietas enriquecidas con brócoli o sulforafano sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes

Los peces fueron alimentados durante 30 días con tres dietas diferentes, una dieta contenía brócoli, la otra dieta contenía sulforafano y una tercera dieta control que contenía alfalfa (como sustituyente del brócoli).

En los resultados obtenidos, podemos relacionar los niveles basales del citocromo P450 y enzimas antioxidantes (tabla I). La actividad EROD (medición enzimática del citocromo P450) en dietas enriquecidas con brócoli, tuvo un incremento de aproximadamente 2 veces la actividad con respecto a dietas control y las dietas con sulforafano incrementaron significativamente la actividad EROD hasta 5 veces más.

En la fase II, los niveles de glutatión-S-transferasa fueron ligeramente reducidas por sulforafano y en menor proporción por brócoli presente en la dieta de los peces (tabla I).

Los niveles de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y peroxidación de lípidos) fueron estimados en extracto de hígado de tilapia alimentadas con dietas conteniendo brócoli o sulforafano (tabla I). En este trabajo, los peces alimentados con dietas enriquecidas con brócoli, tuvieron un incremento significativo en la actividad catalasa, mientras que no se observaron cambios en los peces alimentados con dietas enriquecidas con sulforafano. Con respecto a la actividad superóxido dismutasa, se observó una disminución de la actividad en ambos tratamientos; mientras que en la peroxidación de lípidos, no se detectaron cambios significativos.

Tabla I. Niveles basales de diferentes actividades enzimáticas en extracto de hígado de tilapia alimentadas durante 30 días con diferentes composiciones de dietas<sup>a</sup>.

Actividades enzimáticas	Control	Brócoli (T1)	Sulforafano (T2)
CYP450 EROD (pmol/min/mg proteína)	6.72 ± 2.2	13.5 ± 1.2 (200%) <sup>b</sup>	35.4 ± 1.4 (526%)
Catalasa CAT (U/mg proteína)	17.9 ± 3.1	28.4 ± 3.6 (159%)	19.3 ± 3.8 (108%)
Peroxidación lipídica LPO (U/mg proteína)	18.2 ± 2	20.5 ± 5 (111%)	22 ± 3 (122%)
Superóxido dismutasa SOD (U/mg proteína)	154 ± 5	113 ± 11 (73%)	98 ± 11 (64%)
Glutación-S-transferasa GST (U/mg proteína)	18.4 ± 2.7	11,4 ± 0.6 (62%)	16.7 ± 1.3 (91%)

<sup>a</sup> Los peces fueron alimentados durante 30 días con dietas balanceadas con 30% brócoli (T1) ó 0.55 mg kg<sup>-1</sup> de sulforafano, antes de la inyección con B[a]P.

<sup>b</sup> Porcentaje con respecto al valor de control.

#### **IV.2.2 Efecto de dietas enriquecidas con brócoli o sulforafano sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes después de la exposición de tilapias a B[a]P**

Para evaluar la evolución en las actividades de citocromo P450 y enzimas antioxidantes después de la exposición a B[a]P, las tilapias se alimentaron con dietas enriquecidas con brócoli o sulforafano durante 30 días. Posteriormente fueron tratadas con una inyección intraperitoneal de B[a]P ( $100 \mu\text{g g}^{-1}$  peso del pez) y las actividades enzimáticas fueron determinadas en diferentes tiempos (0, 12, 24, 36, 48 y 72 h) después de la inyección.

La expresión de los niveles de CYP450, medida como actividad EROD, mostró un incremento significativo en 12 h después de la inyección con B[a]P (Figura 21). En este mismo tiempo, los niveles de CYP450 fueron más altos en los peces alimentados con dietas enriquecidas con sulforafano (T2), que los peces alimentados con brócoli (T1) y ambos tratamientos mostraron valores más altos que los observados en el grupo control. Después, los valores de actividad CYP450 disminuyeron lentamente hasta alcanzar los valores iniciales después de 48 h. Durante este período, la dieta enriquecida con brócoli mantuvo niveles más altos de actividad EROD y por un período más largo que el tratamiento con sulforafano y los peces control.

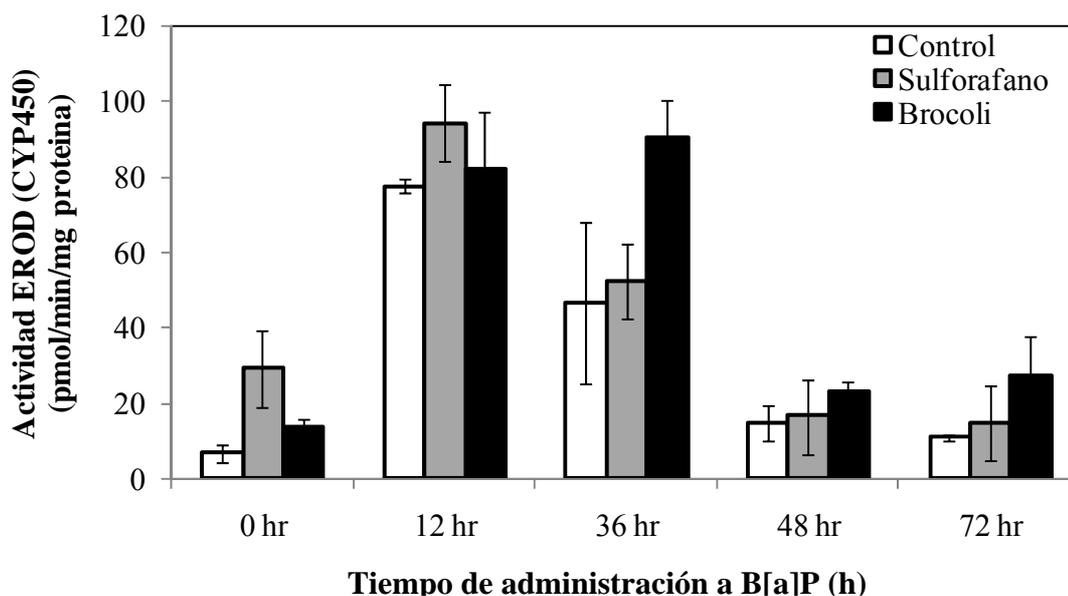


Figura 21. Evolución de la actividad CYP450 en tilapia, alimentada con diferentes dietas, después de la administración a B[a]P. La actividad fue evaluada como actividad EROD correspondiente a la actividad CYP1A1. Las muestras de 24 h mostraron valores inciertos y no fueron considerados.

La actividad superóxido dismutasa no mostró diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla I), sin embargo, después de la administración de B[a]P se detectó un incremento en la actividad SOD en todos los tratamientos, alcanzando los valores máximos después de 24 h y regresando a los niveles basales hasta las 72 h (Figura 22). La actividad catalasa presentó un comportamiento similar, observándose un incremento de la actividad en todos los tratamientos, incluyendo en los peces controles, alcanzando valores máximos entre las 24 y 36 h después de la administración de B[a]P (Figura 22). En el caso de la respuesta de la peroxidación de lípidos, medida como contenido de malondialdehído (MDA), no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de las dietas y después de la administración de B[a]P (Figura 22).

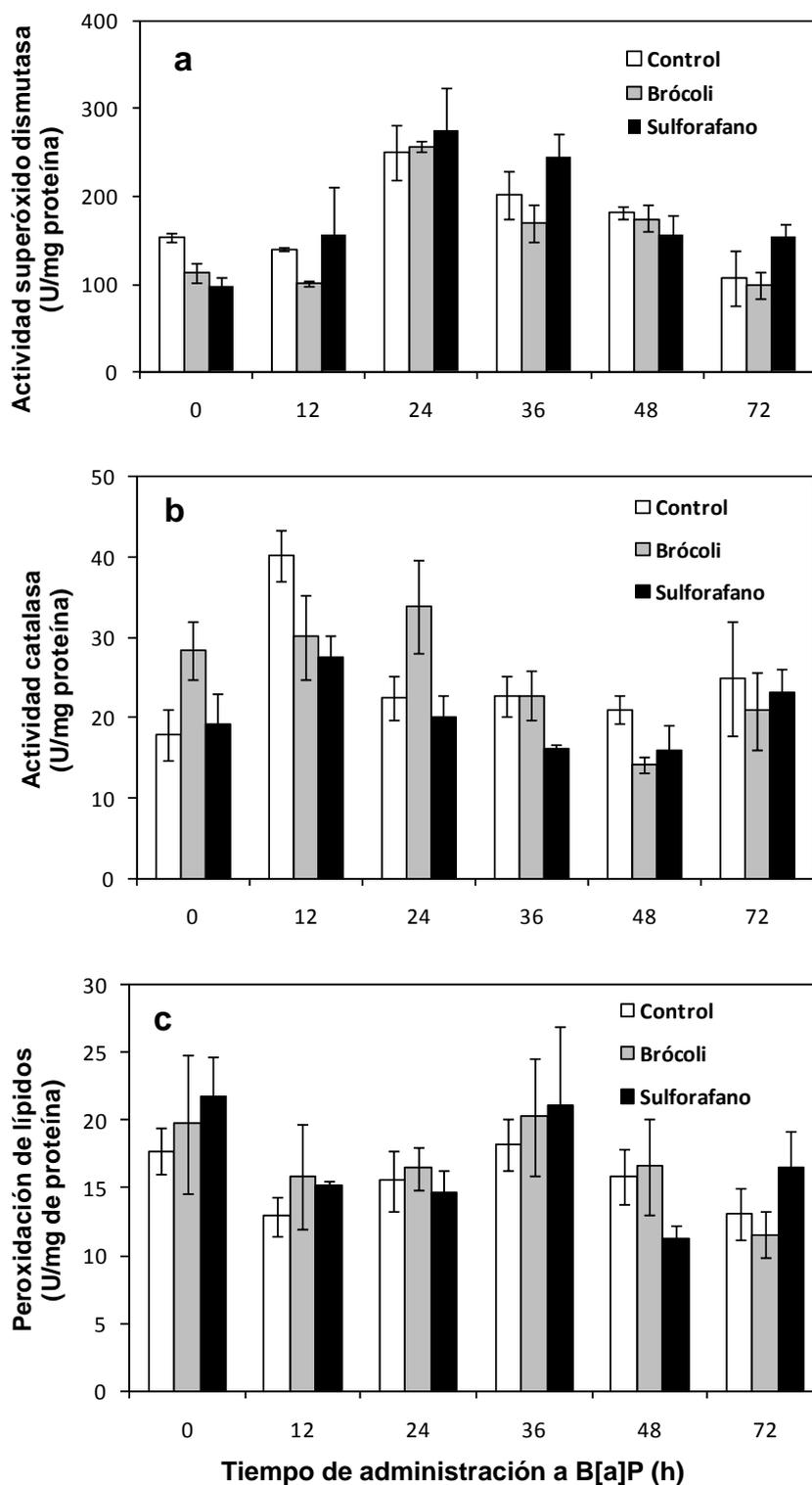


Figura 22. Evolución de las actividades de superóxido dismutasa (a), catalasa (b) y peroxidación de lípidos (c), después de la administración de B[a]P, en tilapia alimentadas con diferentes dietas.

Para la fase II, glutatión-S-transferasa (GST) fue determinada en diferentes tiempos después de la administración a B[a]P (Figura 23). En todos los tratamientos de las dietas, incluyendo el control, hubo una disminución rápida de la actividad GST durante las primeras 12 h después de la administración de B[a]P.

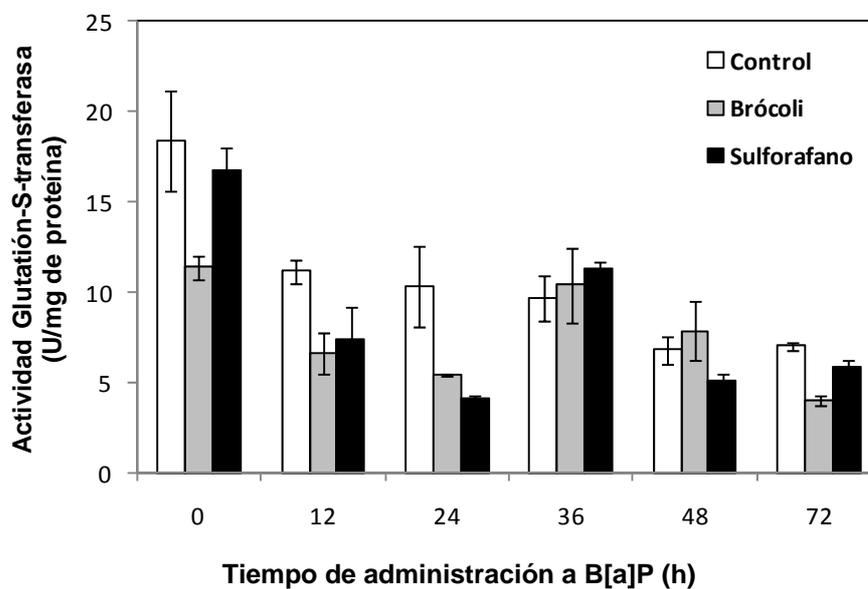


Figura 23. Evolución de la actividad glutatión-S-transferasa, después de la administración de B[a]P en tilapia, alimentadas con diferentes dietas.

## Capítulo V

---

### V. DISCUSIÓN

---

#### V.1.1 Determinación del vehículo para la disolución de PAHs

Los PAHs se encuentran habitualmente en estado sólido y son altamente resistencia a agentes químicos y otro tipo de ataques por la estructura de anillos aromáticos conjugados que presentan. Además de ser compuestos lipofílicos por lo que tienen una solubilidad baja en agua, dicha solubilidad decrece al ir aumentando el peso molecular y el tamaño de la molécula, con el consiguiente aumento del carácter lipofílico (Antón y Lizaso 2001). Debido a esto, se utilizaron sustancias que puedan disolver a los PAHs para su distribución homogénea en los peces y que no afectaran la respuesta propia del contaminante a utilizar. Para esto, se estudiaron dos vehículos frecuentemente reportados en la literatura: aceite de maíz y dimetilsulfóxido (DMSO). La actividad CYP450 detectada en ambas sustancias están en concordancia con el trabajo de Nacci *et al.* (2002) quienes reportan que el aceite de maíz, administrado vía intraperitoneal a peces produce una respuesta en la actividad CYP450 de peces, pero ésta es despreciable comparada con la influencia al incremento de la actividad del citocromo P450 debida a la exposición del pez a B[a]P. Esto nos indica, que ambos vehículos expresan cierta actividad EROD, pero este incremento no afectará la determinación del efecto de la exposición al contaminante.

### **V.1.2 Efecto de diferentes tipos de PAHs sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia**

Organismos acuáticos como las tilapias están expuestas a diferentes contaminantes en su medio ambiente. Se ha referenciado en algunos trabajos que peces capturados de diferentes puertos marinos, presentan contaminantes pertenecientes a la familia de los PAHs (Stephensen *et al.*, 2000). El número de posibles PAHs es enorme, pero se han clasificados en base a su distribución en la naturaleza, como son: naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzoantraceno, benzo(a)pireno, perileno y coroneno (Antón y Lizaso 2001). De estos PAHs, nosotros evaluamos 4: naftaleno, pireno, antraceno y B[a]P, para elegir el xenobiótico que proporcione la mayor respuesta de la actividad CYP450 analizado en hígado de tilapia.

Se trabajó con el tejido hepático de tilapia debido a que el CYP450 se encuentra principalmente en el retículo endoplasmático y mitocondrial del hígado en peces (Emel Arinç *et al.*, 2000).

Los organismos inyectados con 100 mg B[a]P /Kg de peso del pez y analizados después de 3 días, obtuvieron la mayor actividad CYP450. La inducción del CYP450 ha sido demostrada en numerosos estudios, en los cuales microsomas hepáticos de peces tratados con PAHs como B[a]P, muestran incremento en las actividades catalíticas del CYP450 (Stegeman y Lech, 1991). Este hecho, ha propiciado la determinación de los niveles de CYP450 como una respuesta de los organismos a la presencia de contaminantes en el ambiente acuático (Siroká y Brastichová 2004). El marcado incremento en la actividad CYP450 derivado de B[a]P nos permite observar el efecto de éste hidrocarburo sobre la actividad enzimática de CYP450 y además, surge la necesidad de estudios posteriores sobre éste PAHs ya que se ha distinguido que presenta una fuerte actividad carcinogénica. Es importante señalar que los PAHs en general,

son sospechosos de ser carcinogénicos en un grado u otro, aunque el nivel sea muy bajo (Antón y Lizaso 2001).

A pesar que se obtuvo un incremento en la actividad CYP450, los datos obtenidos en las actividades enzimáticas de SOD y CAT presentaron cambios en su actividad pero con un incremento no significativo. Estos resultados no son comparativos con ningún otro reportado en la literatura, ya que la máxima concentración de PAHs utilizado ha sido de 50 mg B[a]P /Kg de peso del pez (Akcha *et al.*, 2000; Nacci *et al.*, 2002; Gorbi y Regoli, 2004).

### **V.1.3 Efecto de B[a]P sobre la actividad de citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia**

Como se observó en los resultados anteriores, la concentración de 100 mg B[a]P/kg peso del pez incrementó la actividad del CYP450, medido por actividad etoxiresorufin-*O*-deetilasa (EROD), pero a esta concentración del hidrocarburo los resultados de las actividades enzimáticas no presentaron un marcado incremento. En este experimento, con una dosis menor (50 mg B[a]P/kg peso del pez) la actividad CYP450 también reflejó un incremento, aunque en menor proporción. Lo que nos indicó que el B[a]P es un inductor de la enzima CYP450 en peces.

Existe una relación entre la metabolización de xenobióticos orgánicos y las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se obtienen como subproductos (Livingston, 1991). Los resultados en las enzimas ensayadas (SOD y CAT), se esperaba un aumento en la actividad SOD y CAT, sin embargo, se expresa valores entre los mostrados por control y DMSO (valores basales). Se sabe que cuando hay un exceso de anión superóxido en el ambiente, la actividad SOD causa una oxidación de la cisteína dentro de la enzima lo que produce una

disminución de la actividad enzimática (Bartowiak *et al.*, 1981; Dimitrova *et al.*, 1994 y, Özcan y Üner 2000). Como SOD y CAT están íntimamente relacionadas, esto conlleva al comportamiento de la actividad catalasa en los tratamientos. Si la actividad SOD y CAT aumentaran al aumentar la concentración del contaminante, se llegaría a una concentración de contaminante tal que se podría producir un exceso de anión superóxido y entonces una inhibición de la actividad SOD.

#### **V.1.4 Efecto dosis-tiempo de B[a]P sobre la actividad de citocromo P450 y enzimas antioxidantes en tilapia**

Se analizaron la expresión de CYP1A, enzimas antioxidantes y daño a lípidos en peces expuestos intraperitonealmente a diferentes concentraciones de B[a]P en diferentes tiempos después de la exposición. Con esto se obtuvieron las cinéticas de respuesta de la tilapia a diferentes concentraciones de contaminantes inyectados por vía intraperitoneal.

En forma general, el B[a]P induce una respuesta del CYP450. El CYP450 determinado por actividad EROD, incrementó notablemente con el aumento en la concentración de B[a]P. Estos resultados están ampliamente en concordancia con los reportados para la especie *Fundulus heteroclitus*, en donde se presenta una relación en la concentración de B[a]P y la respuesta en la actividad EROD. Concentraciones de 50 mg/kg de peso del pez inducen una mayor expresión en la actividad EROD comparándolos con concentraciones de 5 mg/kg de peso del pez (Nacci *et al.*, 2002). Con respecto al tiempo de exposición del pez a B[a]P, la actividad EROD incrementó notablemente en el Día 3, misma que fue disminuyendo conforme avanzó el tiempo de exposición (figura 17).

Se considera que un incremento en la actividad CYP1A, medida por EROD, puede influir en la activación de la ruta de traducción de la señal AHR (arilo hidrocarburo receptor, por sus siglas en inglés), (Stegeman y Hahn, 1994; Whyte *et al.*, 2000). Entonces, en este trabajo y de acuerdo con lo propuesto por Nacci *et al.* (2002), la actividad EROD puede ser un indicativo de la regulación AHR que induce enzimas en la fase I, que pueden usar B[a]P como sustrato (considerando la biotransformación de xenobióticos, fase I y II). Esto sugiere que la exposición a B[a]P puede incrementar su activación en hígado de tilapia.

Se ha observado que peces presentes en cuerpos de agua contaminadas, tienen una alta expresión del gen de CYP1A (perteneciente a la familia CYP450), cuantificado por expresión de proteína o por la medición catalítica de CYP1A que presenta actividades etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD) y benzo[a]pireno hidrolasa (Payne y Penrose, 1975; Stegeman *et al.*, 1987; Van Veld *et al.*, 1990). Gorbi y Regoli (2004) reportan que la actividad EROD es dependiente de la concentración del contaminante presente en el organismo.

El B[a]P estimuló cambios en las actividades enzimáticas antioxidantes. Un aumento en las concentraciones de B[a]P y el tiempo prolongado de exposición produjeron cambios en las actividades de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST), mientras que en daño oxidativo, medido como la peroxidación de lípidos, no se expresaron cambios significativos. Los PAHs al ser metabolizados producen productos fenólicos o quinonas, los cuales pueden formar especies reactivas de oxígeno (ROS), (Ingelman-Sundberg y Hagbjörk, 1982). Los ROS comprenden todas las moléculas conteniendo oxígeno altamente reactivo, incluyendo los radicales libres. Los tipos de ROS incluyen el radical hidroxilo, el radical anión superóxido, peróxido hidrógeno, oxígeno singlet, radical óxido nítrico, radical hipoclorito y varios peróxidos lípidos (Percival, 1998). Así, en el lenguaje el metabolito diol benzo[a]pireno formado por la acción microsomal sobre el B[a]P, estimula la producción de NAD(P)H que produce el radical hidroxilo (Lemaire *et*

*al.*, 1994). En organismos acuáticos los ROS se producen como subproductos, originados al metabolizar xenobióticos en la fase I del metabolismo (Livingstone, 1991).

## **V.2 PARTE 2. Efecto de dietas enriquecidas con sulforafano y brócoli en tilapias expuestas intraperitonealmente a B[a]P**

### **V.2.1 Efecto de dietas enriquecidas con brócoli o sulforafano sobre la actividad del citocromo P450 y enzimas antioxidantes**

Vegetales crucíferos como el brócoli contienen sustratos que modulan el metabolismo de xenobióticos. La inducción de CYP450 es de mayor importancia para el metabolismo de agentes carcinogénicos químicos y para los efectos anticarcinogénicos del brócoli y su fitoquímico el sulforafano. En tilapias alimentadas con dietas enriquecidas con brócoli y/o sulforafano se obtuvo un incremento en la actividad CYP450, siendo más alto en peces alimentados con dietas enriquecidas con sulforafano que con brócoli. Podemos considerar que el efecto de un componente puede ser modificado cuantitativamente dependiendo si se encuentra en forma pura o como parte de una mezcla compleja. Por lo que, aunque en el brócoli se encuentre el glucosinolato sulforafano, también existen otros tipos de glucosinolatos y otras sustancias activas que pueden intervenir en la respuesta del brócoli.

Entonces este estudio mostró claramente que la mayor inducción de la actividad CYP450 fue dependiente del sulforafano como componente puro del brócoli y que a pesar de que el brócoli también expresó una inducción de la

actividad CYP450, esta inducción pudo ser subestimada por otros componentes presentes en el brócoli. Evidentemente podemos considerar que el brócoli y el sulforafano alteraron la actividad de CYP450 (enzimas metabolizante de xenobióticos) en hígado de tilapias, esto está en concordancia con experimentos hechos con humanos (Steinkellner *et al.*, 2001) o en ratas (Ole Vang *et al.*, 2001).

Recientemente, algunos estudios muestran que el brócoli o el sulforafano pueden causar una inhibición de algunos pero no todos los CYP450's. Por otra parte, se han reportado incrementos en las actividades CYP450 cuando fitoquímicos del brócoli (sulforafano y glucosinolatos) son incluidos en la dieta (Paolini *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2004; Perocco *et al.*, 2006). Ole Vang y colaboradores (2001) analizaron la actividad del citocromo P450, en ratas alimentadas durante tres semanas con dieta control (sin brócoli) y posteriormente se alimentaron una semana con dieta adicionada con 10% de brócoli. Paolini y colaboradores (2004) concluyeron que la dieta enriquecida con brócoli induce las actividades de CYP1A, 2B y 3A en hígado de rata y CYP1A en colon. Además reportaron una inducción significativa de la fase I de monooxigenasas de función mixta microsomal en pulmones de ratas, medido por siete actividades de citocromo específicos (incluyendo actividad CYP1A1 ó EROD). Los tratamientos consistieron en una dosis única o dosis repetidas (diariamente por 4 días consecutivos) de glucorofanina (glucosinolato precursor de sulforafano). Ellos observaron una inducción significativa de la actividad EROD (CYP1A1) con niveles de 14 veces más alta en dosis única o dosis repetidas. Perocco y colaboradores (2006) observaron este mismo efecto en hígado de ratas, con un incremento en las actividades de diferentes isoformas del citocromo P450 (CYP1A1/2, CYP3A1/2 y CYP2E1). Sus resultados indicaron que la actividad monooxigenasa CYP1A EROD incrementó significativamente de 4 y 3 veces en hígado de machos y hembras, respectivamente.

Nosotros consideramos que la inducción del complejo multienzimático citocromo P450, podría considerarse como benéfico para la detoxificación,

porque esta transformación es la primera parte de biotransformación de PAH, seguido por la fase II de conjugación para su eliminación del organismo.

El sulforafano en forma pura se conoce como un potente inductor natural de enzimas de la fase II (Zhang *et al.*, 1992; Juge *et al.*, 2007). Sin embargo, en la fase II, también actúa la enzima NADPH:quinona oxidoreductasa, la cual también es inducida por SF (Zhang y Callaway 2002). En peces el SF no tiene un efecto inductor sobre la actividad GST.

Brócoli y sulforafano incrementan la actividad CAT en hígado de tilapias. Recientes investigaciones han encontrado que sustancias bioactivas aisladas del brócoli poseen una actividad antioxidante mayor comparada con guisantes, paprika, remolachas y lechuga (Eberhardt *et al.*, 2005; Borowski *et al.*, 2008). Esta propiedad antioxidante del brócoli se ha confirmado que se relaciona con compuestos activos biológicamente como fenoles y vitaminas C (Borowski *et al.*, 2008). Por otra parte, aunque el sulforafano no es directamente un antioxidante o prooxidante, hay evidencia substancial que indica que el sulforafano actúa indirectamente para incrementar la capacidad antioxidante de células animales y su habilidad para combatir el estrés oxidativo (Juge *et al.*, 2007).

Muchos componentes bioactivos del brócoli pueden actuar directamente como antioxidantes y el papel de la actividad antioxidante del sulforafano, se puede atribuir a diferentes mecanismos incluyendo, el incremento de los niveles de glutatión reducida, regulación de las enzimas de la fase II y efectos en las enzimas redox (Zhang *et al.*, 2005).

### **V.2.2 Efecto de dietas enriquecidas con brócoli o sulforafano sobre el citocromo P450 y enzimas antioxidantes después de la exposición a B[a]P**

Los contaminantes ambientales, en particular los carcinogénicos como los PAHs se consideran que son los responsables del desarrollo de cáncer en humanos y en animales (Bosetti *et al.*, 2005). Una disminución en la conversión de PAHs a metabolitos reactivos decrece el riesgo de formación de aductos PAHs-DNA y en consecuencia disminuye la carcinogénesis. Por lo que, una inhibición de la actividad de las enzimas de la fase I es una importante estrategia quimioprotectora.

Los resultados en este trabajo indicaron claramente que la actividad CYP450 inducida por la exposición durante 12 horas a B[a]P no fue inhibida por la presencia de brócoli y/o sulforafano.

La inducción de CYP450 ha sido demostrada en numerosos estudios, en los cuales microsomas hepáticos de peces tratados con PAHs como B[a]P, muestran incremento en las actividades catalíticas del CYP450 (Stegeman y Lech, 1991), otro estudio es el que se hizo con *Oreochromis mossambicus*, en donde los peces que fueron expuestos a PAHs expresaron un incremento de la actividad CYP450 (Shailajá y D'Silva, 2003). Este hecho, ha propiciado la determinación de los niveles de CYP450 como una respuesta de los organismos a la presencia de contaminantes en el ambiente acuático (Siroká y Brastichová 2004).

La inducción de isoenzimas del CYP450 es iniciado por la unión de un xenobiótico específico a un complejo de proteína que comprende el receptor Ah (AhR) y la proteína 90 heat-shock (HSP 90). El complejo se une a un arilo hidrocarburo nuclear transferasa (ARNT) para migrar al núcleo celular. En el núcleo de la célula, el ARNT se une al elemento regulatorio de xenobiótico (XRE) para posteriormente producir la síntesis de RNA mensajeros, resultando

en un incremento de los niveles de proteína de CYP450, como se muestra en el apéndice B, (Oost *et al.*, 2003).

El brócoli y el sulforafano no tuvieron efecto sobre la actividad SOD y CAT, después de la administración de B[a]P un incremento en las actividades SOD y CAT fue detectada. Estos resultados son consistentes con los reportados por Sun y colaboradores (2006), en donde expusieron al pez *Carassius auratus* a fenantreno. Así también, resultados reportados por Akcha y colaboradores (2000), indican que la actividad catalasa de *Mytilus galloprovincialis* incrementa significativamente después de la exposición a B[a]P. Se puede considerar que la respuesta de la actividad SOD y CAT a la administración de B[a]P pueden ser inducidas por un posible incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS), como consecuencia de un incremento en la actividad de CYP450 (Paolini *et al.*, 2004; Perocco *et al.*, 2006).

Hay reportes en la literatura indicando que el sulforafano es un potente inductor de las enzimas de la fase II de biotransformación de xenobióticos (Zhang *et al.*, 1992). Nosotros encontramos sin embargo que la actividad GST, antes y después de la inyección de los peces a B[a]P, disminuyó su actividad. La GST es una familia de proteínas implicadas en la desintoxicación de compuestos mutagénicos, carcinogénicos y tóxicos, durante el metabolismo de la fase II, por conjugación con glutatión en el hígado (Morgenstern *et al.*, 1985). Esta es una superfamilia con muchas isoenzimas y se encuentran ampliamente distribuidas en varios tejidos, pero abundantemente en el hígado (Sherratt y Hayes, 2002). Como la GST está involucrada en la desintoxicación de muchos xenobióticos, su actividad en peces, requiere futuros estudios para entender el impacto de esos componentes en el ambiente acuático.

## Capítulo VI

---

### VI. CONCLUSIONES

---

- Los “vehículos” como aceite de maíz y DMSO no interfieren con la actividad del citocromo P450 (expresado como actividad EROD), en peces inyectados intraperitonealmente con B[a]P.
- La actividad del citocromo P450 (expresado como actividad EROD), se ve afectada fuertemente por la exposición de tilapia a B[a]P en concentración de 100 mg / kg de peso del pez.
- La actividad del citocromo P450, no se ve afectada por la exposición de tilapia a naftaleno, pireno y antraceno en concentraciones de 50 mg / kg de peso del pez.
- El análisis en muestras individuales nos indica que no hay cambios significativos entre cada una de las muestras a analizar, indicándonos que se puede manejar una muestra homogénea para las actividades enzimáticas a analizar.
- La peroxidación de lípidos es un indicativo de daño oxidativo, no se observó un efecto del daño oxidativo provocado por la exposición de tilapia a B[a]P.

- La presencia de brócoli y sulforafano incrementa los niveles basales de la actividad CYP450.
- El pequeño incremento en la actividad catalasa y peroxidación de lípidos se puede relacionar con un incremento de las especies reactivas de oxígeno como consecuencia del incremento de la actividad CYP450.
- El incremento en la actividad CYP450, podría ayudar a mejorar la capacidad desintoxicadora, porque la transformación enzimática es el primer paso antes de la conjugación y eliminación (fase II).
- La protección de organismos derivados de la acuicultura contra efectos de contaminantes por el diseño de dietas especiales que mejoren su capacidad desintoxicadora parece ser una interesante alternativa tecnológica.

## Bibliografía

Achuba, F. I. y Osakwe, S. A., 2003. Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 29:97-103 p.

Aebi H., 1985. Catalase. En: Bergmeyer, H.U. (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, London, 671-684 p.

Agricultura: Hacia el 2015/30. <http://www.fao.org/Noticias/2000/000704-s.htm>

Akcha F., C. Izuela, P. Venier, H. Budzinskia, T. Burgeot, y J-F. Narbonne, 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*. 49(4):269-287 p.

Alberts PH., 1995. En: Hoffman DJ (ed.), *Handbook of Ecotoxicology*. Boca Raton. 330-335 p.

Anders R. J., L. Y. Wickb, y H. Harms, 2005. Principles of microbial PAHs-degradation in soil. *Environmental Pollution*. 133(1):71-84 p.

Antón, A. y J. Lizaso, 2001. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Fundación Ibérica para la seguridad alimentaria. Madrid, España. 255 p.

Anuradha M. D., R. L. Autenrieth, P. Dimitriou-Christidis y T. J. McDonald, 2008. Biodegradation kinetics of select polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs)

mixtures by *Sphingomonas paucimobilis* EPA505. *Biodegradation*. 19:223–233 p.

Au D.W.T., R.S.S. Wu, B.S. Zhon y P.K.S. Lam, 1999. Relationship between ultrastructural changes and EROD activities in liver of fish exposed to Benzo[a]pyrene. *Environmental Pollution*. 104:245-247 p.

Barceló S., K. Macé, A.M.A. Pfeifer y J.K. Chipman, 1998. Production of DNA strand breaks by N-nitrosodimethylamine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in THLE cells expressing human CYP isoenzymes and inhibition by sulforaphane. *Mutation Research*. 402:111–120 p.

Bartowiak A., E. Grzelinska, I.S. Varga y W. Leyco, 1981. Studies on superoxide dismutase from cod (*Gadus morhua*) liver. *International Journal of Biochemistry*. 13:1039-1042 p.

Boroswki J. y A. Szajdek, 2008. Content of selected bioactive components and antioxidant properties of broccoli (*Brassica oleracea* L.). *European Food Research and Technology*. 226:459–465 p.

Bosetti C, P. Boffetta y C. La Vecchia, 2007. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: A quantitative review to 2005. *Ann Oncol*. 18:431–446 p.

Burke, D. M. y R. T. Mayer, 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylchloranthrene. *Drug Metabolism and Disposition*. 2:583-588 p.

Casillas, E., D. Misitano, L.L Johnson, L.D. Rhodes, T.K. Collier, J. C. Stein, T. Korsgaard y A. Jespersen, 1991. Inducibility of spawning and reproductive success of female English sole (*Parophrys vetulus*) from urban and nonurban

areas of Puget Sound, Washington. *Marine Environmental Research*. 31:99–122 p.

Cavanagh, J.E., K.A. Burns, G.J. Brunskill, D.A.J. Ryan, y J.T. Ahokas, 2000. Induction of hepatic cytochrome P-450 1A pikey bream (*Acanthopagrus berda*) collected from agricultural and urban catchments in Far North Queensland. *Marine Pollution Bulletin*. 41:377–384 p.

Dimitrova M.S.T., V. Tsinova y V. Velcheva, 1994. Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 108(1):141-149 p.

Eberhardt M. V., K. Kobira, A. S. Keck, J. A. Juvik, y E. H. Jeffery, 2005. Correlation Analyses of Phytochemical Composition, Chemical, and Cellular Measures of Antioxidant Activity of Broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *italica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:7421-7431 p.

Emel Arinç A. S., y A. Bozcaarmutlu, 2000. Cytochrome P4501A and associated mixedfunction oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment. *Pure and Applied Chemistry*. 72(6):985–994 p.

Park E. J. y J. M. Pezzuto, 2002. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews*. 21: 231–255 p.

FAO, 1974. La Acuicultura en América Latina. Informes de Pesca, no 159, Volumen 1. <http://www.fao.org/docrep/005/ac866s/AC866S00.htm>

FAO, 2007. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, Rome, ISBN 978-92-5-105568-7.

<http://www.fao.org/docrep/009/A0699e/A0699E00.HTM>

Fatima, M., I. Ahmad, I. Sayeed, M. Athar y S. Raisuddin, 2000. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquatic Toxicology*. 49:243-250 p.

Ferreira M., P. Moradas-Ferreira, M.A. Reis-Henriques, 2005. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology*. 71:39-48 p.

Fimognari C. y P. Hrelia, 2007. Review: sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutation Research*. 635:90–104 p.

Fridovich I., 1998. Oxygen toxicity: A radical explanation. *The journal of Experimental Biology*. 201:1203-1209 p.

Goksoyr A, y L. Forlin, 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*. 22:287-312 p.

Gorbi S. y F. Regoli, 2004. Induction of cytochrome P4501A and biliary HAP metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: Seasonal, dose-and-time-response variability in field and laboratory conditions. *Marine Environmental Research*. 58:511-515 p.

Habig, W.H., M.J. Pabst y W.B. Jakoby, 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249:7130-7139 p.

Hahn, M.E., 1998. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 121C:23–53 p.

Hall, A.T. y J.T. Oris, 1991. Anthracene reduces reproductive potential and is maternally transferred during long-term exposure in fathead minnows. *Aquatic Toxicology*. 19:249-264 p.

Helmunt, S., 1991. Oxidative stress, Oxidants and Antioxidants. Academic Press Inc. U.S.A. 280-300 p.

Hoffman J. L. y J. T. Oris, 2006. Altered gene expression: A mechanism for reproductive toxicity in zebrafish exposed to benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology*. 78:332–340 p.

Hu R., H. Vidya, K. Bok-Ryang, C. Chi, W. Bozena, B. Buckley, P. Soteropoulos, P. Toliás, R. P. Hart y A.-N. T. Kong, 2004. En: Vivo Pharmacokinetics and Regulation of Gene Expression Profiles by Isothiocyanate Sulforaphane in the Rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 310(1):263-271 p.

INEGI, 2008. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). “Estadísticas a propósito del día mundial del medio ambiente”. México D.F. <http://www.consumosustentable.org/docs/1380.pdf>

Ingelman-Sundberg, M., y A.-L. Hagbjörk, 1982. On the significance of the cytochrome P-450-dependent hydroxyl radical-mediated oxygenation mechanism. *Xenobiotica*. 12(11):673–686 p.

Johnson, L.L., D. Misitano, S.Y. Sol, G.M. Nelson, B. French, G.M. Ylitalo y T. Hom, 1998. Contaminant effects on ovarian development and spawning success in rock sole from Puget Sound, Washington. *Transactions American Fishes Society*. 127:375–392 p.

Jifa W., Y. Zhiming, S. Xiuxian, W. You, 2006. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 65(2):230-236 p.

Juge N., R. F. Mithen y M. Traka, 2007. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64:1105-1127 p.

Kleinow K.M., M.O. James, Z. Tong y C.S. Venugopalan, 1998. Bioavailability and biotransformation of benzo[a]pyrene in an isolated perfused in situ catfish intestinal preparation. *Environmental Health Prospective*. 106:155-166 p.

Kono Y. y I. Fridovich, 1982. Superoxide radical inhibits catalase. *Journal of Biology and Chemistry*. 257:5751-5761 p.

Kumar, A., S. Qiblawi, A.K. Khan, A.R. Rao, 2004. Chemomodulatory action of *Brassica campestris* (var. Sarason) and the hepatic carcinogen metabolizing enzymes, antioxidant profiles and lipid peroxidation. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*. 5:190-195 p.

1997. La ciencia desde México.

<http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/090/html/oceano11.html>

Lee J., N. Koo y D.B. Min, 2004. Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceutical. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3:21-33 p.

Lemaire P., A. Matthews, L. Förlin y D. R. Livingstone, 1994. Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and

perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics. *Archive Environmental Contamination Toxicology*. 26:191-200 p.

Livingstone, D.R., 1991. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. En: Giles, R. (ed.). *Advances in Comparative and Environmental Physiology*. Springer, Berlin, 45–183 p.

Livingstone D.R., 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 154:427–430 p.

Mahéo K., F. Morel, S. Langouët, H. Kramer, E. Le Ferrec, B. Ketterer, y A. Guillouzo, 1997. Inhibition of Cytochromes P-450 and Induction of Glutathione S-Transferases by Sulforaphane in Primary Human and Rat Hepatocytes. *Cancer Research*. 57:3649-3652 p.

Marklund S. y G. Marklund, 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47:469-474 p.

Miller H.C., G.N. Mills, D.G. Bembo, J.A. MacDonald y C.W. Evans, 1999. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in *Trematomus bernacchi* as an indicator of environmental pollution in Antarctica: assessment by quantitative RT-PCR. *Aquatic Toxicology*. 44:183-193 p.

Mitchelmore C.L., C. Birmelin, J.K. Chipman y D.R. Livingstone, 1998. Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo[a]pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells. *Aquatic Toxicology*. 41:193-212 p.

Morgenstern R., J. W. DePierre y H. Jornvall, 1985. Microsomal Glutathione Transferase. Primary Structure. *The Journal Of Biological Chemistry*. 260(26):13976-13983 p.

Myzak M. y R. H. Dashwood, 2006. Mini-review: Chemoprotection by sulforaphane: Keep one eye beyond Keap1. *Cancer Letters*. 233:208–218 p.

Nacci D. E., M. Kohan, M. Pelletier y E. George, 2002. Effects of benzo[a]pyrene exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like compounds. *Aquatic Toxicology*. 57:203-215 p.

Ole Vang, H. Frandsen, K. T. Hansen, J. N. Sorensen, H. Sorensen y O. Andersen, 2001. Biochemical Effects of Dietary Intakes of Different Broccoli Samples. I. Differential Modulation of Cytochrome P-450 Activities in Rat Liver, Kidney, and Colon. *Metabolism, clinical and experimental*. 50(10):1123-1129 p.

Oost R., J. Beyer y N.P.E. Vermeulen, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13:57-149 p.

Orellana M. y V. Guajardo, 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista Médica de Chile*. 132:85-94 p.

Ortiz-Delgado J.B., H. Segner y C. Sarasquete, 2005. Cellular distribution and induction of CYP1A following exposure of gilthead seabream, *Sparus aurata*, to waterborne and dietary benzo[a]pyrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: an immunohistochemical approach. *Aquatic toxicology*. 75(2):144-161 p.

Özcan E. y K. Üner, 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidants enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 127:291-296 p.

Pandey S., P. Suhel, S. Iqbal, H. Rizwanul, B. Bin-Hafeez y R. Sheikh, 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn). *The Science of the Total Environment*. 309:105-115 p.

Paolini, M., P. Perocco, D. Canistro, L. Valgimigli, G.F. Pedulli, R. Iori, C.D. Croce, G. Cantelli-Forte, M.S. Legator y S.Z. Abel-Rahman, 2004. Induction of cytochrome P450, generation of oxidative stress and in vitro cell-transforming and DNA-damaging activities by glucoraphanin, the bioprecursor of the chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli. *Carcinogenesis*. 25:61-67 p.

Payne, J.F. y W. P. Penrose, 1975. Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in fish by petroleum. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 14:112 p.

Percival M., 1998. Antioxidants. *Review Clinical Nutrition Insights*. 10:1-4 p.

Perocco, P., G. Bronzetti, D. Canistro, L. Valgimigli, A. Sapone, A. Affatato, G.F. Pedulli, L. Pozzetti, M. Broccoli, R. Iori, J. Barillari, V. Sblendorio, M.S. Legator, M. Paolini, S. Abdel-Rahman, 2006. Glucoraphin, the bioprecursor of the widely extolled chemoprotective agen sulforaphane found in broccoli, induces phase-I xenobiotic metabolizing enzymes and increases free radical generation in rat liver. *Mutation Research*. 595:125-136 p.

Plan Nacional de Desarrollo, informe 2003

<http://pnd.calderon.presidencia.gob.mx/index.php?page=sector-rural>

Quabius E. S., D.T. Nolan, H. Segner y S.E. Wendelaar Bonga, 2002. Confinement stress and starvation modulate the induction of EROD activity after dietary exposure to PCB 126 in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 25:109–119 p.

SEMARNAT-CONAGUA, 2005. "Informe de la situación del medio ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales". [http://148.223.105.188:2222/snif\\_portal/index.php?option=com\\_content&task=view&id=52&Itemid=66](http://148.223.105.188:2222/snif_portal/index.php?option=com_content&task=view&id=52&Itemid=66)

Shailajá M.S. y C. D'Silva, 2003. Evaluation of impact of PAHs on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere*. 53:835-841 p.

Shapiro T. A., J. W. Fahey, K. L. Wade, K. K. Stephenson y P. Talalay, 2001. Chemoprotective Glucosinolates and Isothiocyanates of Broccoli Sprouts: Metabolism and Excretion in Humans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 10:501–508 p.

Sherratt, P. J. y J. D. Hayes, 2002. Glutathione S-transferases. En: Ioannides, C. (ed.). *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. Wiley & Sons, Chichester, UK, 319–352 p.

Siroká Z. y J. Drastichová, 2004. Biochemical Markers of Aquatic Environmental Contamination-Cytochrome P450 in fish. A review. *Acta Veterinaria BRNO*. 73:123-132 p.

Solhaug A., M. R. Marit Låg, P. E. Schwarze, T. Husoy y J. A. Holme, 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis*. 25(5):809-819 p.

Stallings W.C., C. Bull, J.A. Fee, M.S. Lah y M.L. Ludwig, 1992. Iron and manganese superoxide dismutases: catalytic inferences from the structures. En: *Molecular Biology of free radical Scavenging systems*. Current communications En cell and Molecular Biology. Scandalios J. Ed. 47-67 p.

Stegeman, J.J. y P.J. Kloepper-Sams, 1987. Cytochrome P-450 isozymes and monooxygenases activity in aquatic animals. *Environmental Health Perspectives*. 71:87-95 p.

Stegeman J. J. y J. J. Lech, 1991. Cytochrome P-450 Monooxygenase Systems in Aquatic Species: Carcinogen Metabolism and Biomarkers for Carcinogen and Pollutant Exposure. *Environmental Health Perspectives*. 90:101-109 p.

Stegeman, J. J., y M. E. Hahn, 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: Current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. En: D. C. Malins and G. K. Ostrander (eds). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. CRC Press, Boca Raton, FL, 87-206 p.

Steinkellner H., S. Rabot, C. Freywald, E. Nobis, G. Scharf, M. Chabicovsky, S. Knasmüller y F. Kassie, 2001. Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutation Research*. 480(481):285–297 p.

Stephen G. G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotico-conjugating enzymes in fish. En: Donald C. M. y Gary K. Ostrander (eds). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. CRC Press, Boca Raton, FL, 37-85 p.

Stephensen E., J. Svavarsson, J. Sturve, G. Ericson, M. Adolfsson-Erici y L. Förlin, 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology*. 48:431–442 p.

Sumner J. B. y G. F. Somers, 1947. *Chemistry and methods of enzymes*. Academic Press Inc. Segunda edición. New York. 207-242 p.

Sun Y., H. Yu, J. Zhang, Y. Yin, H. Shi y X. Wang, 2006. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere*. 63(8):1319-1327 p.

Toxic Air Contaminant Identification. Polycyclic Organic Matter. List Summaries- ARB/SSD/SES, September 1997.

<http://www.nmenv.state.nm.us/aqb/projects/openburn/CAchemfacts/pom.pdf>

Utley H.G., F. Bernheim y P. Hockstein, 1967. Effect of sulfhydryl reagents on peroxidation in microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 118:29-32 p.

Van Veld P.A., J.S. Patton y R.S. Lee, 1990. Absorption and metabolism of dietary xenobiotics by the intestine of fish. *Reviews Aquatic Sciences*. 2:185-203 p.

Varanasi U., y J. E. Stein, 1991. Disposition of xenobiotic chemicals and metabolites in Marine Organisms. *Environmental Health Perspectives*. 90:93-100 p.

Wammers K. H. y C. A. Peters, 2005. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation Rates: A Structure-Based Study. *Environmental Sciences Technology*. 39:2571-2578 p.

Wang L. I., E. L. Giovannucci, D. Hunter, D. Neuberg, L. Su y D. C. Christiani, 2004. Dietary intake of Cruciferous vegetables, Glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a *Caucasian* population. *Cancer Causes and Control*. 15:977-985 p.

Whyte JJ., RE Jung, CJ Schmitt y DE. Tillitt, 2000. Ethoxyresorufin-Odeethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology*. 30(4):347–570 p.

Willett K.L., C. Wilson, J. Thomsen y W. Porter, 2000. Evidence for and against the presence of polynuclear aromatic hydrocarbon and 2,3,7,8-tetrachloro-p-dioxin binding proteins in the marine mussels, *Bathymodiolus* and *Modiolus modiolus*. *Aquatic Toxicology*. 48(1):51-64 p.

Wong Chris K.C., H.Y. Yeung, P.S. Woo y M.H. Wong, 2001. Specific expression of cytochrome P4501A1 gene in gill, intestine and liver of tilapia exposed to coastal sediments. *Aquatic toxicology*. 54:69-80 p.

Zapata-Pérez O., R. Simá-Alvarez, E. Noreña-Barroso, J. Güemes, G. Gold-Bouchot, A. Gold-Bouchot, A. Ortega y A. Albores-Medina, 2000. Toxicity of sediments from Bahía de Chetumal, México, as assessed by hepatic EROD induction and histology in nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Marine Environmental Research*. 50:385-391 p.

Zhang Y. y P. Talalay, 1994. Anticarcinogenic Activities of Organic Isothiocyanates: Chemistry and Mechanisms. *Cancer Research* (Suppl). 54:1976s-1981s.

Zhang Y., P. Talalay, CG Cho y GH. Posner, 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:2399-2403 p.

Zhang Y. y E. C. Callaway, 2002. High cellular accumulation of sulforaphane, a dietary anticarcinogen, is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate. *Biochemistry Journal*. 364:301-307 p.

Zhang J., S. Hua, W. Xiaorong, W. Jichun y W. Yunqun, 2004. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*. 55:167-174 p.

Zhang Y., J. Li, y L. Tang, 2005. Cancer-preventive isothiocyanates: dichotomous modulators of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 38:70-77 p.

## APÉNDICES

### Apéndice A: Formulación y preparación de dietas

Para la alimentación de los peces, se formularon 3 diferentes tipos de dietas (Tabla II). Para la dieta de brócoli (T1) la alfalfa fue sustituida por brotes de brócoli, mientras que en la dieta de sulforafano (T2) el compuesto puro fue adicionado formulando una dieta similar a la dieta control. Para esto, los brotes de brócoli fueron secados a 60°C durante 24 horas. Posteriormente, el brócoli seco fue molido y tamizado antes de usarse, como se reporta en la tabla 8. Todos los ingredientes de las dietas experimentales fueron mezclados con 50% de agua (peso/volumen) hasta que una mezcla pastosa homogénea fue alcanzada. Las dietas fueron estrujadas en frío a través de una máquina para pasta (Pasta Maker; Rosito Bisani, Los Angeles Ca, USA) en pellets de tamaño aproximado de 3 mm (Figura 24), secado a 60 °C durante 24 horas y almacenado a 4°C en contenedores de plástico (Figura 25) con sello hermético hasta su uso.

Tabla II. Formulación y contenido de ingredientes de la dieta para tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Ingredientes	Porcentaje	Dieta Control	Dieta Brócoli	Dieta Sulforafano
		Peso (g)	Peso (g)	Peso (g)
Harina de pescado	25	750	750	750
Harina de soya	10	300	300	300
Harina de maíz	15	450	450	450
Brócoli	30	-----	900	-----
Alfalfa	0.0	900	-----	900
Almidón	8.8	264	264	264
Gelatina	5.0	150	150	150
Aceite de maíz	3.0	90 ml	90 ml	90 ml
Aceite de pescado	2.0	60 ml	60 ml	60 ml
Vitaminas y minerales (Rovimix DSM)	1.5	45	45	45
Stay C	0.2	6	6	6
Total	100	3015	3015	3015



Figura 24. Estructura y tamaño del alimento formulado para la alimentación de tilapia.



Figura 25. Recipientes para almacenamiento del alimento formulado para tilapia.

## Apéndice B. Inducción del citocromo P450

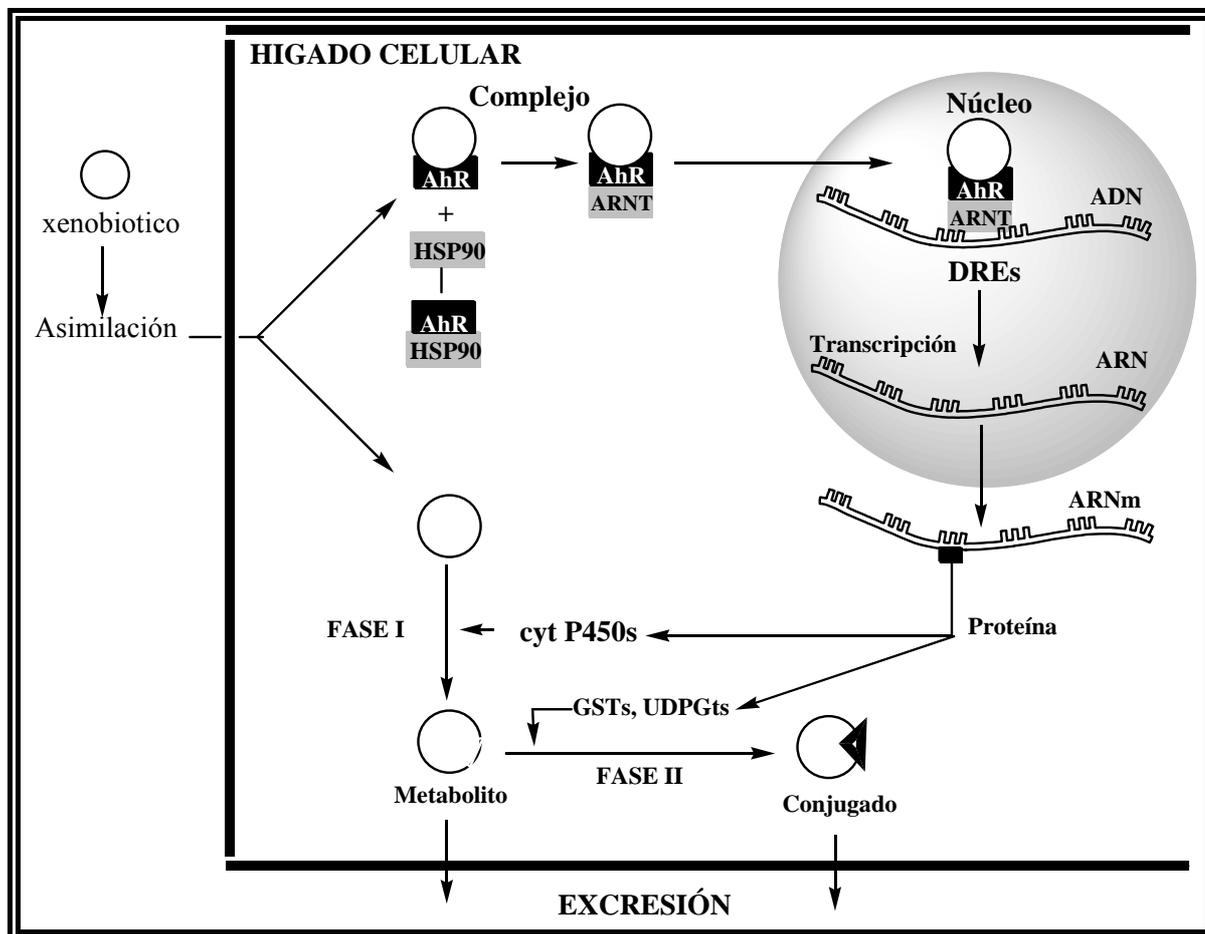


Figura 26. Inducción de isoenzimas del CYP450 mediado por un xenobiótico.

Apéndice C. Publicación científica derivado del trabajo de tesis doctoral

Título: “Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) and its phytochemical sulforaphane in balanced diets on the detoxification enzymes levels of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a carcinogenic and mutagenic pollutant”

Autores: V. Villa-Cruz, J. Dávila, M.T. Viana y R. Vazquez-Duhalt.

Revista: Chemosphere. 74(9):1145-1151.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)

## Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) and its phytochemical sulforaphane in balanced diets on the detoxification enzymes levels of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a carcinogenic and mutagenic pollutant

V. Villa-Cruz<sup>a,1</sup>, J. Davila<sup>a,1</sup>, M.T. Viana<sup>b</sup>, R. Vazquez-Duhalt<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, CICESE, Ensenada BC, Mexico

<sup>b</sup> IIO, Universidad Autónoma de Baja California, Mexico

<sup>c</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 September 2008

Received in revised form 22 November 2008

Accepted 30 November 2008

Available online xxxxx

#### Keywords:

Antioxidant enzymes

Broccoli

Cytochrome P450

Detoxification

PAH

Sulforaphane

### ABSTRACT

Tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) were fed with enriched diets containing broccoli and its phytochemical sulforaphane over 30 d. The levels of cytochrome P450, superoxide dismutase, catalase, lipid peroxidation and glutathione-S-transferase activities were measured. Basal value of cytochrome P450 activity was significantly increased as consequence of the broccoli and sulforaphane enriched diets, while no statistically significant changes were found on catalase and lipid peroxidation activities. After benzo(a)pyrene exposure, the cytochrome P450 activity increased to higher levels in the fish feed with broccoli and sulforaphane when compared with the control fish. Activities of antioxidant enzymes also varied but without significant difference with the control fish. Supported by the lower concentrations of BaP metabolites in bile from fish fed with broccoli or with sulforaphane enriched diets (indicating a better xenobiotic elimination) the cytochrome P450 induction could be considered beneficial for the detoxification because this transformation is the first step for PAH elimination by the phase II system.

The protection of aquaculture organism against pollution effects by designing special diets able to modulate the enzymes involved in the phase-I and phase-II detoxification mechanism are discussed.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Fish farming is the world's fastest-growing sector of agricultural business. Consumer demand for fish products is increasing. At the same time, wild fish stocks are rapidly declining, mainly because of over-fishing. Products from capture fisheries and aquaculture supplied the world with about 106 million tons in 2004. Aquaculture contributes to the world food supply with more than 45.5 million tons (43%) of fish and shellfish annually (FAO, 2007). Aquaculture is developing, expanding and intensifying in almost all regions of the world. Sustaining fish supplies from capture fisheries will, therefore, not be able to meet the growing global demand for aquatic food. Aquaculture appears to have the potential to make a significant contribution to this increasing demand for aquatic food in most regions of the world; however, in order to achieve this, the sector (and aquafarmers) will face significant challenges.

One of these challenges is to contend with polluted waters. The presence of xenobiotics in rivers, lakes and seas has been consid-

ered an inducer of different diseases and undesirable effects on the aquatic life. Some of the reported effects include liver damage (Arukwe et al., 1998), growth retardation (Kennedy and Farrell, 2005), mutations and cancer (Kirby et al., 2000), alteration patterns of reproduction (Maradonna et al., 2004), tissue bioaccumulation (Hellou and Leonard, 2004), persistency through food chain (Rice et al., 2000), survival reduction (Arinç et al., 2000), and the induction or suppression of different enzymatic systems like Cytochrome P450 families (Gorbi and Regoli, 2004).

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) are widespread xenobiotics, mainly produced as consequence of oil spills (Mougin, 2002), but also they are produced naturally (e.g. forest fires). Sixteen PAH compounds have been considered by the US Environmental Protection Agency (EPA) as dangerous pollutants due to their toxicity and carcinogenicity. Benzo(a)pyrene (BaP) is a recalcitrant-lipophilic PAH formed of five benzene rings and widely studied by its carcinogenic and mutagenic properties (Kirby et al., 2000; James et al., 2004).

In general, PAH's are metabolized in two phases. First, a PAH is oxidized by the mutlienzymatic system Cytochrome P450 (CYP450) producing intermediate metabolites (phase I). Then, these intermediates could be conjugated with glutathione or carbohydrates using UDP-glucosyl transferase, sulfotransferase or

\* Corresponding author. Tel.: +52 777 329 1655; fax: +52 777 317 2388.

E-mail address: [vazqduh@ibt.unam.mx](mailto:vazqduh@ibt.unam.mx) (R. Vazquez-Duhalt).

<sup>1</sup> Shared first co-authors. The first two authors contributed equally to the paper and should be considered as first co-authors.

glutathione-S-transferase (phase II). The goal of both metabolic phases is to transform the PAH's to more polar compounds and excrete them to complete the removal or detoxification process (Stephen, 1994). Carcinogenic effect of PAH's is mainly induced by CYP450 metabolism (phase I) which produces BaP intermediates that are able to bind DNA and form adducts (Akcha et al., 2000; Kirby et al., 2000; Nacci et al., 2002). In addition, PAH's may induce an increase in the concentrations of reactive oxygen species (ROS), producing a cellular oxidative stress in different organisms (Valavanidis et al., 2006). This ROS increase could be the origin of lipid damage (Achuba and Osakwe, 2003) and oxidation of protein, carbohydrates, and DNA (Stephensen et al., 2000; Luke et al., 2003; Nogueira et al., 2006).

CYP450 is a mixed function oxygenase system involved in the metabolism of endogenous (e.g. cholesterol, steroids) and exogenous compounds (Pavek and Dvorak, 2008). The presence of BaP interacts with cytosolic aryl hydrocarbon receptors and induces the production of CYP450. The degree of induction of CYP450 has been used as bioindicator for the presence and concentrations of BaP and other xenobiotics (Miller et al., 1999; Arinç et al., 2000; Arzuaga and Elskus, 2002; Flammarion et al., 2002). In fish, CYP450 has primarily been studied as a pollution biomarker of the aquatic environments. However, responses to xenobiotics in fish may differ from those in other species (Siroka and Drastichova, 2004).

Investigations on cancer have reported that the inhibition of CYP450 metabolism (phase I) can reduce cancer risk induced by compounds such as BaP, producing less ultimate carcinogenic BaP forms (Steinkellner et al., 2001). In addition, cruciferous vegetables have been reported to have chemoprotective and antioxidant properties, inducing a retardation of tumor development (Fahey et al., 1997; Mahéo et al., 1997; Hu et al., 2004). This characteristic has been attributed to the presence of isothiocyanate (product from the degradation of glucosinolates) (Zhang et al., 1992; Zhang and Talalay, 1994; Stoewsand, 1995). Diets that include the genus Brassicaceae, also called cruciferous vegetables, (broccoli, cauliflower, cabbage and Brussels sprouts) seems inhibit the induction of cancer by PAHs (Steinkellner et al., 2001).

Glucosinolate compounds are abundant in cruciferous vegetables, and their content varies according to the species, cultivation, and plant tissue. In broccoli, the mean content is  $\sim 1 \text{ mmol g}^{-1}$  fresh weight (Paolini et al., 2004). Glucoraphanin which is the direct precursor of sulforaphane may represent 55% of total glucosinolates. Glucosinolates are enzymatically transformed by myrosinase to isothiocyanates compounds when the plant is injured and tissues are damaged, as in harvest, chow or digestion by intestinal microflora (Fimognari and Hrelia, 2007). Thus, glucoraphanin is enzymatically hydrolyzed by myrosinase to form sulforaphane.

The chemoprotection of sulforaphane against cancer inductors has been studied. Mahéo et al. (1997) treated rats and human hepatocytes with different doses of BaP. They found a retardation of tumor development concomitant with an inhibition of CYP450 family (Phase I) when sulforaphane was applied. Gastric tumor formation, induced by B(a)P, has been significantly reduced (39%) by sulforaphane on a classical mouse forestomach tumor model (Fahey et al., 2002). Fahey et al. (1997) reported the retardation of tumor development, induced by 7,12-dimethylbenzo(a)anthracene in Sprague-Dawley rats treated with extracts of glucosinolates. In addition, Hu et al. (2004) reported the down regulation of CYP1A1 genes in presence of 50  $\mu\text{mol}$  of sulforaphane. The chemoprotector effect of sulforaphane is generally related to the inhibition of metabolic phase I and induction of the enzymes involved in the metabolic phase II (Zhang and Talalay, 1994; Mahéo et al., 1997). Nevertheless, the effect of glucosinolates and sulforaphane are still unclear and controversial (Paolini and Legator, 1992). A strong

induction of CYP450 enzymes (phase I) has been reported as a consequence of the presence of broccoli phytochemicals in the diet (Kumar et al., 2004; Paolini et al., 2004; Perocco et al., 2006). On the other hand, in some cases the phase-II enzymes may also bio-activate several hazardous chemicals.

Unfortunately, seashore and continental waters are contaminated by human activities. These waters are used for aquaculture and may impact the food quality and production. In this work, we evaluated the effect of the broccoli and sulforaphane inclusion, as chemoprotectors, in fish diets on the detoxification metabolic systems of cultivated Nile tilapia exposed to the carcinogenic benzo(a)pyrene.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

HPLC grade acetonitrile, benzo(a)pyrene, 1-hydroxybenzo(a)pyrene, dimethyl sulfoxide, DL-sulforaphane, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), glycerol, resorufin sodium salt, resorufin ethyl ether, sodium phosphate monohydrate, sucrose, Trizma hydrochloride, trypsin inhibitor, type II-S from Soybean, reduced form of  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), superoxide dismutase (SOD), hydrogen peroxide, glutathione peroxidase (GPx), and glutathione-S-transferase (GST) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). DL-dithiothreitol solution (DTT) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Dibasic sodium phosphate was purchased from Spectrum Chemical Co. (Gardena, CA, USA) and methanol HPLC grade was purchased from EMD Chemicals (Darmstadt, Germany).

### 2.2. Fish culture system

Tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*) were obtained from a local fish farm (Acuacultura del Desierto; Ensenada B.C., Mexico). A total of 270 fish with an average size of 20.6 ( $\pm 0.98$ ) cm of total length and 141 ( $\pm 9.48$ ) g of weight were utilized. Thirty organisms were randomly assigned to nine 200 L tanks individually connected to a biofilter recirculation system. Each tank was then considered as an experimental unit for three different treatments with three replicates each. The temperature was controlled ( $26 \pm 1$  °C) with continuous aeration and a water exchange rate of 20% every 24 h. The fish were acclimated for at least one week prior to the initiation of the experiment, time they were fed with a commercial diet (purchased from Purina S.A. de C.V., Cd. Obregón, Mexico).

### 2.3. Diet preparation

Three diets were formulated according to Table 1. For the broccoli diet (T1) alfalfa meal was substituted by broccoli sprouts meal, whereas in the sulforaphane diet (T2) the pure compound was added to a similar diet than the control diet. The broccoli sprouts were dried at 60 °C for 24 h, then, were grinded and sieved prior used as reported in Table 1. The ingredients from all experimental diets were blended with 50% of water (weight/volume) until a complete homogeneous dough-like mixture was achieved. The diets were cold-extruded through a pasta machine (Pasta Maker; Rosito Bisani, Los Angeles Ca, USA) into 3 mm pellets, dried at 60 °C for 24 h and stored in sealed plastic containers at 4 °C until required.

### 2.4. Fish treatment

The fish were fed once a day with prepared diets at 3% body weight per day, over 30 d. The diets consisted of: treatment 1 (T1) diet containing 30% dry broccoli; treatment 2 (T2) diet

**Table 1**  
Control and treatments diets for Tilapia experiments <sup>a</sup>.

Ingredients (% dw)	Control	T1, Broccoli	T2, Sulforaphane
Alfalfa	30.0	–	30.0
Broccoli	–	30.0	–
Fish meal	25.0	25.0	25.0
Corn meal (Maseca)	15.0	15.0	15.0
Soybean	10.0	10.0	10.0
Corn starch	8.8	8.8	8.8
Gelatin	5.0	5.0	5.0
Corn oil	2.5	2.5	2.5
Fish oil	2.0	2.0	2.0
Vitamins and minerals <sup>b</sup>	1.5	1.5	1.5
Stay C	0.2	0.2	0.2
Sulforaphane	–	–	0.55 mg kg <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> Test diets were formulated to satisfy the nutritional requirements of Tilapia. Both diets = contained the same level of protein and lipids but with different vegetable source.

<sup>b</sup> Vitamins and minerals supplement Rovimix from DSM.

enriched with 0.55 mg kg<sup>-1</sup> of sulforaphane; and controls fed with control diet (Table 1). After 30 d feeding with the experimental diets, benzo(a)pyrene (diluted in DMSO) at 100 µg g<sup>-1</sup> fish weight, were intraperitoneally injected to all Tilapia. After BaP treatment the fish were not feed to avoid affect the metabolite production. Then, groups of five fish were sacrificed at different times (0, 12, 24, 36, 48 and 72 h) after injection. Liver and bile samples from each group of five fish per experimental unit were immediately removed, homogenized, fast frozen in dry ice, and stored –70 °C until analysis. Three independent replicates of each treatment and each sampling time were carried out.

### 2.5. Microsomal fraction

Microsomal fractions from liver samples were obtained as follows: 0.5 g of hepatic tissue were homogenized in 1 mL of extraction buffer (0.125 M sucrose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris–HCl, 1 mg mL<sup>-1</sup> of trypsin inhibitor type II and 1 mM dithiothreitol). Samples were centrifuged to 15,000g during 20 min at 4 °C to separate fats and cellular debris. Then, the supernatant was centrifuged (Sorval ultracentrifuge and AH-629 rotor) to 105,000g for 90 min at 4 °C. The supernatant was decanted and the pellet was resuspended in 100 mM phosphate buffer, pH 7.6 containing 20% of glycerol according to Cavanagh et al. (2000). Protein content was determined spectrophotometrically at 595 nm by using Bio-Rad protein assay dye reagent, and using bovine serum albumin as protein standard.

### 2.6. EROD activity

Cytochrome P450 activity (CYP1A1) was estimated as ethoxy-resorufin-o-deethylase (EROD) activity, using a modified method of Burke and Mayer (1974). The modification consisted of the measurement of resorufin by high performance liquid chromatography (HPLC). Briefly, the 500 µL reaction medium contained 150 µg of microsomes, and 50 µM resorufin ethyl ether in 500 mM Tris buffer, pH 7.2. The reaction was started with the addition of 2.8 mM NADH. After 30 min incubation at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 500 µL of chilled methanol. Blank reactions were performed without microsomes. The samples were then centrifuged at 6000g for 20 min at 4 °C. The resorufin content in the supernatant was followed by fluorescence measurements on a HPLC (Agilent serie 1100, equipped with a Zorbax 300SB-C<sub>18</sub> reverse phase column and a multi-wavelength detector Agilent G1365B). Resorufin fluorescence was measured with an excitation wavelength of 560 nm and an emission wavelength of 585 nm. The samples were eluted isocratically with 52% phosphate buffer

(20 mM pH 6.8), 45% methanol–distilled water (70% v/v) and 3% acetonitrile at a flow of 0.8 mL min<sup>-1</sup>. The standard curve was obtained with resorufin sodium salt, and the activity units are defined as µmol of substrate transformed per min.

### 2.7. Superoxide dismutase activity (SOD)

Liver extracts were obtained by homogenization in cold 50 mM KCl buffer and then centrifuged at 15,000g for 30 min. SOD activity was estimated in the supernatant by measuring the inhibition of pyrogallol auto-oxidation, according the method of Marklund and Marklund (1974) modified by Zhang et al. (2005). SOD activity in liver extracts was assayed in a solution of 50 mM phosphate buffer pH 8.24 containing 3 mM pyrogallol (dissolved in 10 mM HCl). The rate of pyrogallol auto-oxidation was measured with a spectrophotometer (HACH DR 4000) at 325 nm. One unit of SOD activity is defined as the amount of the enzyme which gave 50% inhibition of the oxidation rate and the results are expressed as Units/mg of protein at 25 °C.

### 2.8. Catalase activity (CAT)

Catalase activity was assayed by the method of Aebi (1984). The reaction mixture consisted of 50 mM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) in a final volume of 1 mL. The reaction was started by adding the liver extract. The decrease in absorbance of hydrogen peroxide was monitored at 240 nm and CAT activity was calculated using  $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . The activity units (U) are defined as µmoles of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposed per minute.

### 2.9. Glutathione-S-transferase (GST)

Glutathione-S-transferase activity was estimated according the method of Habig et al. (1974). This method consisted in the conjugation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) with reduced glutathione (GSH) catalyzed by GST. The formation of the GSH-CDNB conjugate was monitored by the absorbance at 340 nm and quantified using a molar extinction coefficient of  $9.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . The reaction mixture contained 1 mM GSH and 1 mM CDNB in a 100 mM phosphate buffer, pH 6.5.

### 2.10. Lipid peroxidation activity (LPO)

LPO was determined by using method of Utley et al. (1967) modified by Fatima et al. (2000). The peroxidative damage on lipids occurring in the presence of free radicals, which result in the production of malondialdehyde (MDA) was determined by the thiobarbituric acid method. The tissue (0.1 g) was then homogenized in chilled 0.15 M potassium chloride solution and centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4 °C. Then, 1.0 mL of supernatant was incubated at 37 °C in a metabolic shaker for 60 min. A 1.0 mL aliquot of the same supernatant was incubated at 0 °C, which served as a control reaction. After 1 h incubation, 1 mL of 10% chilled trichloroacetic acid and 1 mL of 0.67% of thiobarbituric acid were added, mixed and then centrifuged. Thereafter, the tubes containing the supernatant were placed 10 min in a boiling water bath and then cooled to room temperature. The absorbance was measured at 535 nm and the LPO activity is expressed as MDA equivalents per g of tissue. The LPO activity units are µmoles of MDA per min.

### 2.11. PAH metabolites in bile

The content of benzo(a)pyrene metabolites in bile samples were estimated by HPLC. The samples were diluted (1:100) with 50% methanol in distilled water and analyzed according the method

of Ahmad et al. (2004). The samples were chromatographed through a 5  $\mu\text{m}$  ZorbaxSB-C<sub>18</sub> reverse phase column (4.6  $\times$  150 mm) and eluted with 1 mL min<sup>-1</sup> of a linear gradient (0–100%) of acidified methanol. The metabolites were detected by fluorescence at 380 nm excitation and 430 nm emission wavelengths. The amount of total PAH metabolites was estimated by total peaks area integration and reported as 1-hydroxypyrene equivalents (as reference standard) (Gagnon and Holdway, 2002).

### 2.12. Statistical analysis

Data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA). If the results of the ANOVA indicated significant differences among the mean values, then multiple comparisons of mean values were performed using Tukey's test. Differences were reported as statistically significant at  $P < 0.05$ . All the statistical analyzes were performed using the statistical program SIGMA STAT, 3.1 (Arlington, VA, USA).

## 3. Results and discussion

The effect of diets containing broccoli or sulforaphane on the basal levels of CYP450 and enzymatic activities related to oxidative stress were determined (Table 2). Fish were fed over 30 d with three different diets, one containing broccoli (T1), other containing sulforaphane (T2) and controls containing alfalfa instead (see Section 2).

The diet containing broccoli induced a two-fold increase in the CYP450 activity (CYP1A1-linked EROD monooxygenase) and the addition of sulforaphane in the diet significantly increased the CYP450 activity by 5-times. It is well known that all dietary and environmental carcinogens are metabolized once they enter the organism. The metabolic phase I, consisting in a first enzymatic transformation (mainly an oxidation), is catalyzed by the CYP450 enzymes, and in some cases hydrolysis or reduction could occur (Juge et al., 2007). In this transformation, the procarcinogens are converted into highly reactive intermediates that can bind DNA, RNA or protein. The CYP450 enzymes comprise a large gene superfamily that encodes over 500 distinct heme-thiolate proteins that act as terminal oxidases and are ubiquitous in living organisms. The CYP450 enzymes catalyze the metabolism of a wide variety

**Table 2**  
Basal levels of different enzymatic activities in liver extracts of Tilapia fed during 30 d with different diet compositions<sup>a</sup>.

Enzymatic activities	Control	Broccoli (T1)	Sulforaphane (T2)
CYP450 (EROD) (pmol/min/mg prot.)	6.7 $\pm$ 2.2 (100%) <sup>b</sup>	13.5 $\pm$ 1.2 (200%) <sup>c</sup>	35.4 $\pm$ 1.4 (526%) <sup>c</sup>
Catalase (CAT) (U/mg prot.)	17.9 $\pm$ 3.1 (100%)	28.4 $\pm$ 3.6 (159%)	19.3 $\pm$ 3.8 (108%)
Lipid peroxidation (LPO) (U/mg prot.)	18 $\pm$ 2 (100%)	20 $\pm$ 5 (111%)	22 $\pm$ 3 (122%)
Superoxide dismutase (SOD) (U/mg prot.)	154 $\pm$ 5 (100%)	113 $\pm$ 11 (73%)	98 $\pm$ 11 (64%)
Glutathione-S-transferase (GST) (U/mg prot.)	18.4 $\pm$ 2.7 (100%)	11.4 $\pm$ 0.6 (62%) <sup>c</sup>	16.7 $\pm$ 1.3 (91%)

<sup>a</sup> Fish fed during 30 d with balanced diet with 30% broccoli (T1) or 0.55 mg kg<sup>-1</sup> of sulphoraphan (T2) before of the BaP injection.

<sup>b</sup> Values in percentage of those found in control.

<sup>c</sup> Values significantly different at  $P < 0.05$  with respect to the control.

of xenobiotics and are responsible for the bioactivation of numerous endogenous compounds including steroids, bile acids, and fatty acids.

Abundant data is available in literature reporting that sulforaphane may inhibit the DNA-adduct formation and chemical carcinogenesis through the level reduction of certain CYP450 isoforms (Juge et al., 2007). Nevertheless, several studies shown that sulforaphane or broccoli may cause enzyme inhibition of some but not all CYP450's. High increases in CYP450 activities have been reported when broccoli phytochemicals (glucosinolates and sulforaphane) are included in the diet (Kumar et al., 2004; Paolini et al., 2004; Perocco et al., 2006). Lampe et al. (2000) reported a significant induction of CYP1A2 activity in humans (18–37% higher) after a treatment of brassica rich diet (16 g of radish sprouts, 150 g of frozen cauliflower, 200 g of frozen broccoli and 70 g of fresh shredded cabbage). Paolini et al. (2004) reported a significant induction of Phase-I microsomal mixed function monooxygenases, measured by seven specific cytochrome activities (including CYP1A1 EROD activity) in rats. Treatments consisted of unique and repeated doses of glucoraphanine (glucosinolate precursor of sulforaphane). They showed a significant induction of EROD activity (CYP1A1) with levels up to 14-fold in a higher unique dose or repeated doses. In addition, Perocco et al. (2006) found that 120 and 240  $\mu\text{g}$  of glucoraphanine per g rat body weight increased CYP1A1 activity (EROD activity), between 3.4 and 4.6-fold for females and males respectively, when compared with the control. Also, they found a significant correlation between CYP450 induction and over generation of free radicals measured by EPR techniques. Finally, Vang et al. (2001) reported the increase of CYP1A1, CYP2B1/2 and CYP1A2 levels (monitored by EROD, PROD and methoxyresorufino-demethylase MROD activities respectively) in rats feed with diets enriched with broccoli extract.

Even if the phase-I enzymes are involved in PAH conversion to highly reactive intermediates that can bind DNA, their induction could be considered beneficial for the detoxification because this transformation is the first step for PAH elimination by the phase II system.

The level of phase-II enzyme, glutathione-S-transferase was significantly reduced by broccoli in the fish diet (Table 2). This reduction was not statistically significant in the sulforaphane enriched diet. GST is not the only enzyme involved in phase II mechanism, other enzymes catalyzing the conjugation of endogenous ligands (glutathione and glucuronic acid) to xenobiotics substrates, such as UDP-glucotransferases, are also involved. Broccoli and sulforaphane have received much attention over the past decade as a potent naturally occurring inducer of phase-II enzymes in both animals and humans (Juge et al., 2007). Nevertheless, contradictory reports are available on GST induction, or not, by sulforaphane. This discrepancy could be due to the fact that several subclasses of GST's exist, and when total GST activity is measured changes in a particular subunit may be partially masked by a background activity of other subunits.

Levels of antioxidative enzymes catalase and superoxide dismutase, and lipid peroxidation were estimated in liver extract from tilapia fed with diets containing broccoli or sulforaphane (Table 2). No significant changes in catalase, superoxide dismutase and lipid peroxidation activity levels were found in the fish fed with broccoli and sulforaphane enriched diets. Bioactive components from cruciferous vegetables with anticancer activity are generally considered to be antioxidants due to their ability to modulate expression/activity of antioxidative and phase II drug-metabolizing enzymes and scavenging free radicals. Sulforaphane is not a direct antioxidant, but there is substantial evidence that it acts indirectly to increase antioxidant capacity of animal cells. Interestingly, more recent studies have provided convincing evidence to indicate that phytochemicals from broccoli cause generation of reactive oxygen

species (ROS) (Paolini et al., 2004; Perocco et al., 2006), potential trigger signals transduction inducing cell cycle arrest and/or programmed cell death (apoptosis).

Many broccoli components may act as direct-acting antioxidants, and the sulforaphane indirect antioxidant role can be attributed to several mechanisms including increased levels of reduced glutathione, regulation of phase-II enzymes, and effects on redox enzymes (Zhang et al., 2005).

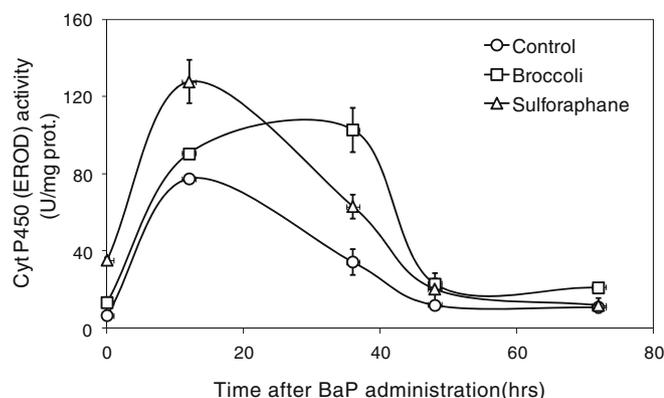
In order to evaluate the short-term evolution of the activities of CYP450 and antioxidant enzymes after a xenobiotic [benzo(a)pyrene (BaP)] shock. Tilapia fed with broccoli or sulforaphane enriched diets during 30 d, were intraperitoneally treated with BaP ( $100 \mu\text{g g}^{-1}$  fish weight) and the enzymatic activities were monitored at different times (0, 12, 24, 36, 48 and 72 h) after injection. CYP450 levels measured as EROD activity (CYP1A1) showed a significant increase 12 h after BaP injection (Fig. 1). At this time, the CYP450 level was higher for the fish fed with sulforaphane enriched diet (T2) than those fed with a broccoli enriched diet (T1), and both treatments showed higher values than those observed in the control group. Then, the CYP450 activity values slowly diminished to reach the starting values after 48 h (Fig. 1). The fish fed with broccoli maintained higher levels for longer period than sulforaphane treated and control fish.

CYP450 levels of different organisms have been worldwide used to monitor the presence of pollutants in the aquatic environment (Siroka and Drastichova, 2004). The CYP 1 family members have been so far proved to be the most sensitive indicators because they respond to water contamination at very low levels or at the time when the contaminant is no longer dissolved in water but persists in the living matter. The induction of CYP 1A1 is mediated by the Ah receptor (AhR), a xenobiotic-binding protein present in the cytosol. Generally, the toxicity of a pollutant is related to the degree of its affinity to AhR. Pollutants with a high binding ability for AhR also have a high capacity to induce CYP 1A1. An increase of the CYP1A1 activity has been reported in the fish *Oreochromis mossambicus* as consequence of the PAH exposure (Shailaja and D'Silva, 2003).

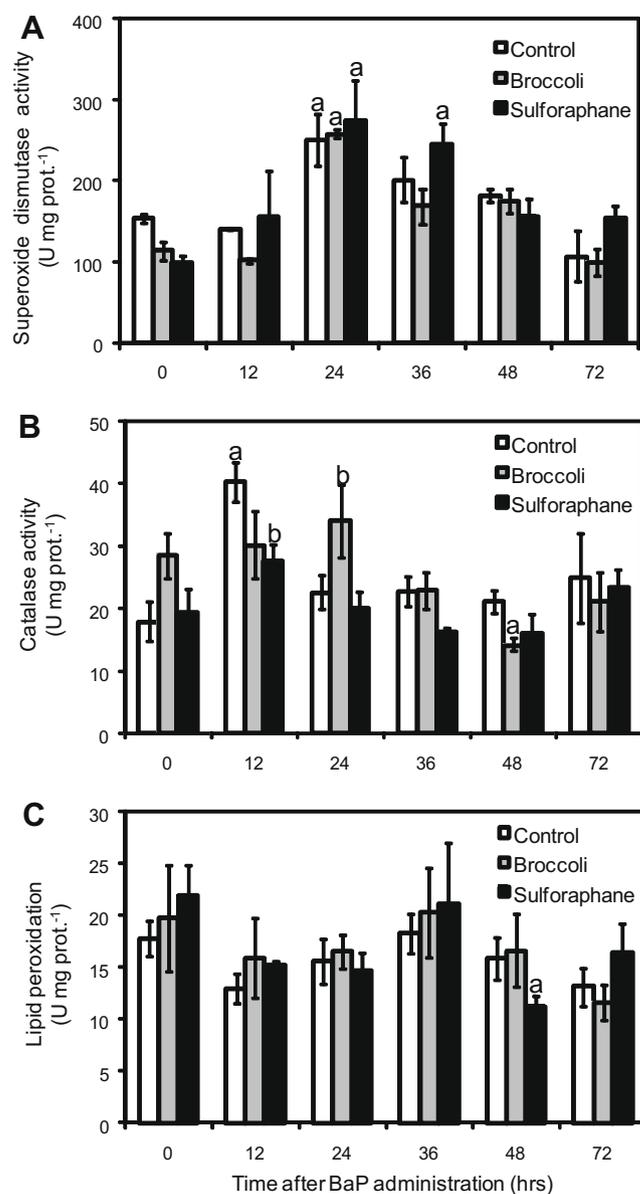
Superoxide dismutase activity showed no significant differences between the treatments (Table 1), however after the PAH administration an increase of SOD activity was detected in all treatments, reaching a maximal value after 24 h and getting back to the starting values after 72 h (Fig. 2A). Similarly, catalase activity showed a slight increase in all the treatments, including control fish, showing maximal values between 24 and 36 h after BaP administration (Fig. 2B). These results are consistent with those reported by Sun et al. (2006) with fish *Carassius auratus* under phen-

anthrene exposure. No significant differences for lipid peroxidation, measured as malondialdehyde (MDA), were found among the diet treatments and after BaP administration (Fig. 2C). Catalase and SOD responses to the PAH administration could be induced by a possible increase of reactive oxygen species (ROS) as consequence of the increase of CYP450 activity (Fig. 1) as previously demonstrated by Paolini et al. (Paolini et al., 2004; Perocco et al., 2006).

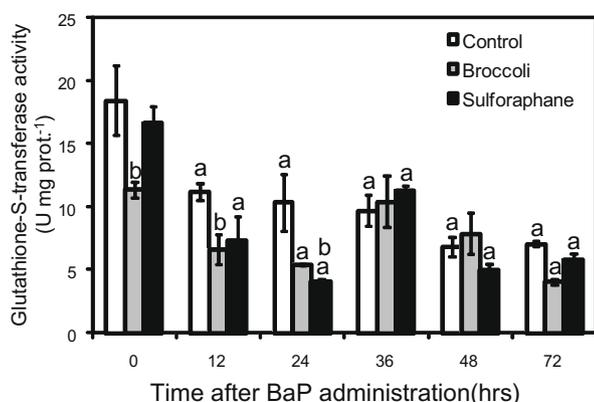
The phase II enzyme, glutathione-S-transferase (GST) was determined at different times after BaP administration (Fig. 3). In all diet treatments, including the control, there is a rapid decrease in the GST activity during the first 12 h after BaP administration. Inconsistently, the principal protective mechanism of living organisms against PAH is a metabolic transformation converting them to inactive, readily excretable metabolites. One of the most important enzyme systems catalyzing the detoxication of epoxides are the



**Fig. 1.** CYP450 activity evolution of Tilapia fish, fed with different diets, after benzo(a)pyrene administration. Activity was evaluated as EROD activity corresponding to the CYP1A1 activity. Samples from the 24 hours sampling showed aberrant values and were not considered.



**Fig. 2.** Superoxide dismutase (A), catalase (B), and lipid peroxidation (C) activities evolution of Tilapia fish, fed with different diets, after benzo(a)pyrene administration. For a particular enzymatic activity: (a) Values significantly different at  $P < 0.05$  with respect to the respective time zero. (b) Values significantly different at  $P < 0.05$  with respect to the control at the corresponding time.



**Fig. 3.** Glutathione-S-transferase activity evolution of Tilapia fish, fed with different diets, after benzo(a)pyrene administration. (a) Values significantly different at  $P < 0.05$  with respect to the respective time zero. (b) Values significantly different at  $P < 0.05$  with respect to the control at the corresponding time.

cytosolic glutathione-S-transferases (GSTs), a superfamily that exists as a number of isoenzymes, and is widely distributed into various tissues but predominates in the liver (Sherratt and Hayes, 2002). Levels of GSTs can be modified by a large range of xenobiotics and also by abiotic factors. Due to their involvement in the detoxification processes of xenobiotics, the GST activity was proposed as a biomarker for several aquatic species such as fish, crustaceans or mollusks.

PAHs are rapidly transformed into more hydrophilic metabolites that are excreted; thus fish exposed to these compounds show only trace amounts of PAH accumulated in their tissues (Tuvikene, 1995). PAH metabolites are usually determined in fish bile, where they are concentrated and stored prior to excretion. Bile PAH metabolite analysis provides information about the actual exposure of fish to PAH's and may reveals the pollution state of the fish environment (Vuorinen et al., 2006). The concentration of BaP metabolites in bile was determined and reported as 1-hydroxypyrene equivalents (Fig. 4). After 12 h of BaP administration, the concentration of bile aromatic metabolites was twice in the control fish than in the broccoli and sulforaphane treatments. These lower concentrations of BaP metabolites could indicate a better xenobiotic elimination in the fish fed with broccoli or with sulforaphane enriched diets.

Finally, the relationship between phase I and phase II metabolism could be evaluated by calculating the ratio of CYP450 activity/GST activity (Table 3). As mentioned above, a diet containing broccoli or sulforaphane strongly induced the CYP450 activity

**Table 3**

Relationship between phase I metabolism (CYP450 activity) and phase II metabolism (GST activity) after administration of benzo(a)pyrene to Tilapia fish fed with broccoli and sulforaphane enriched diets.

Time after BaP administration (h)	CYP450/GST		
	Control	Broccoli (T1)	Sulforaphane (T2)
0	0.036 (100%) <sup>a</sup>	0.119 (330%)	0.174 (483%)
12	0.69 (100%)	1.233 (178%)	1.282 (185%)

<sup>a</sup> Values in percentage of those found in control.

and thus the ratio CYP450/GST increased 3-times and almost 5-times, respectively. After 12 h BaP administration this ratio decreased to around 180% of the control value, due to both CYP450 activity induction in the control fish (Fig. 1) and a decrease of GST activity in the T1 and T2 treated fish (Fig. 3).

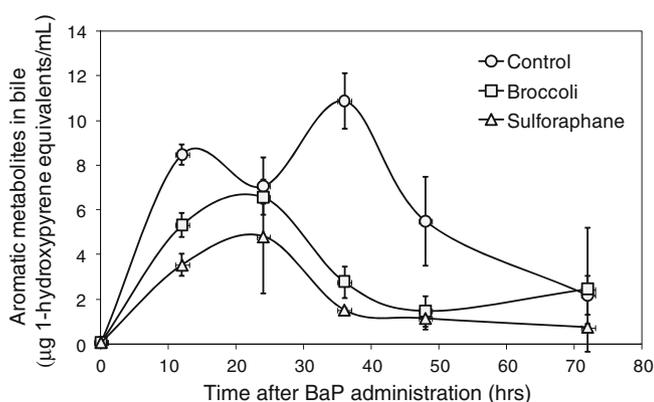
We can conclude so far that the presence of broccoli or its phytochemical sulforaphane increases significantly the basal levels of CYP450 activity. This increase in CYP450 activity could improve the detoxification capacity because this enzymatic transformation is the first step before phase II conjugation and elimination. Our results showed a lower concentration of aromatic metabolites in bile in the fish fed with diets enriched with broccoli or sulforaphane when compared with control fish. Thus, diets containing broccoli or sulforaphane induce changes in the enzymatic systems involved in the detoxification metabolism of fish. The protection of aquaculture organism against pollution effects by designing special diets that improve their detoxification capacity seems to be an interesting technological alternative to be explored.

#### Acknowledgements

This research has been supported by the National Council of Science and Technology of Mexico (SEMARNAT-CONACYT 2004-C01-42). We thank Eduardo Roberto Morales Guerrero for his technical assistance.

#### References

- Achuba, F.I., Osakwe, S.A., 2003. Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol. Biochem.* 29, 97–103.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 57, 290–302.
- Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.-F., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicol* 49, 269–287.
- Ariñç, E.A., Şen, A., Bozcaarmutlu, A., 2000. Cytochrome P4501A and associated mixed-function oxidases induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment. *Pure Appl. Chem.* 72, 985–994.
- Arukwe, A., Celius, T., Walther, B.T., Goksøy, A., 1998. Plasma levels of vitellogenin and eggshell Zona radiata proteins in 4-nonylphenol and o,p'-DDT treated juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Mar. Environ. Res.* 46, 133–136.
- Arzuaga, X., Elskus, A., 2002. Evidence for resistance to benzo[a]pyrene and 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in a chronically polluted *Fundulus heteroclitus* population. *Mar. Environ. Res.* 54, 247–251.
- Burke, D.M., Mayer, R.T., 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylchloranthrene. *Drug Metab. Dispos.* 2, 583–588.
- Cavanagh, J.E., Burns, K.A., Brunskill, G.J., Ryan, D.A.J., Ahokas, J.T., 2000. Induction of hepatic cytochrome P-450 1A pike bream (*Acanthopagrus berda*) collected from agricultural and urban catchments in Far North Queensland. *Mar. Pollut. Bull.* 41, 377–384.
- Fahey, J.W., Zhang, Y., Talay, P., 1997. Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 10367–10372.
- Fahey, J.W., Haristoy, X., Dolan, P.M., Kensler, T.W., Scholtus, I., Stephenson, K.K., Talalay, P., Lozniewski, A., 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7610–7615.



**Fig. 4.** Evolution of the concentration of aromatic metabolites in fish bile of Tilapia fish, fed with different diets, after benzo(a)pyrene administration.

- FAO, 2007. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department, Rome, ISBN 978-92-5-105568-7.
- Fatima, M., Ahmad, I.I., Sayeed, I.I., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquat. Toxicol.* 49, 243–250.
- Fimognari, C., Hrelia, P., 2007. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutat. Res.* 635, 90–104.
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P., Garric, J., 2002. Multibiomarker responses in fish from Moselle river (France). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 51, 145–153.
- Gagnon, M.M., Holdway, D.A., 2002. EROD activity, serum SDH and PAH biliary metabolites in sand flathead (*Platycephalus bassensis*) collected in Port Phillip Bay, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 230–237.
- Gorbi, S., Regoli, F., 2004. Induction of cytochrome P4501A and biliary PAH metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: Seasonal, dose- and time-response variability in field and laboratory conditions. *Mar. Environ. Res.* 58, 511–515.
- Habig, W., Babst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hellou, J., Leonard, J., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation products in trout exposed through food pellets. *Polycyclic Aromatic Comp.* 24, 697–712.
- Hu, R., Hebbar, V., Kim, B.R., Chen, C., Bozena, W., Buckley, B., Soteropoulos, P., Tolias, P., Hart, R.P., Kong, A.N.T., 2004. *In vivo* pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate Sulforaphane in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 263–271.
- James, M.O., Kleinow, K.M., Zhang, Y., Zheng, R., Wang, L., Faux, L.R., 2004. Increased toxicity of benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol in the presence of polychlorobiphenyls. *Mar. Environ. Res.* 58, 343–346.
- Juge, N., Mithen, R.F., Traka, M., 2007. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1105–1127.
- Kennedy, C.J., Farrell, A.P., 2005. Ion homeostasis and interrenal stress responses in juvenile Pacific herring *Clupea pallasii*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 323, 43–56.
- Kirby, M.F., Lyons, B.P., Waldock, M.J., Woodhead, R.J., Goodsir, F., Law, R.J., Matthiessen, P., Neall, P., Stewart, C., Thain, J.T., Tylor, T., Feist, S.W., 2000. Biomarkers of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure in fish and their application in marine monitoring. Science Series Technical Report. Number 110. Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science, 30 p.
- Kumar, A., Qiblawi, S., Khan, A.K., Rao, A.R., 2004. Chemomodulatory action of *Brassica campestris* (var Sarason) and the hepatic carcinogen metabolizing enzymes, antioxidant profiles and lipid peroxidation. *Asian Pacific J. Cancer Prevention* 5, 190–195.
- Lampe, J.W., King, I.B., Li, S., Grate, M.T., Barale, K.V., Chen, C., Feng, Z., Potter, J.D., 2000. Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. *Carcinogenesis* 21, 1157–1162.
- Luke, R.A., Steinert, S., Bay, S.M., Greenstein, D., Sapozhnikova, Y., Bawardi, O., Leifer, I., Schlenk, D., 2003. Biochemical effects of petroleum exposure in hornhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA. *Aquat. Toxicol.* 65, 159–169.
- Mahéo, K., Morel, F., Langouët, S., Kramer, H., Ferrec, E.L., Ketterer, B., Guillouzo, A., 1997. Inhibition of glutathione inhibition of cytochrome P-450 and induction of glutathione S-transferases by sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer Res.* 57, 3649–3652.
- Maradonna, F., Polzonetti, V., Bandiera, S.M., Migilarini, B., Carnevali, O., 2004. Modulation of the hepatic CYP1A1 system in the marine fish *Gobius niger*, exposed to xenobiotic compounds. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6277–6282.
- Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469–474.
- Miller, H.C., Mills, G.N., Bembo, D.G., MacDonald, J.A., Evans, C.W., 1999. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in *Trematomus bernacchi* as an indicator of environmental pollution in Antarctica: assessment by quantitative RT-PCR. *Aquat. Toxicol.* 44, 183–193.
- Mougin, C., 2002. Bioremediation and phytoremediation of industrial PAH-polluted soils. *Polycyclic Aromatic Comp.* 22, 1011–1043.
- Nacci, D.E., Kohan, M., Pelletier, M., George, E., 2002. Effects of benzo[a]pyrene exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like compounds. *Aquat. Toxicol.* 57, 203–215.
- Nogueira, P.R., Lourenço, J., Mendo, S., Rotchell, J.M., 2006. Mutation analysis of ras gene in the liver of European eel (*Anguilla anguilla* L) exposed to benzo [a] pyrene. *Mar. Pollut. Bull.* 52, 1611–1616.
- Paolini, M., Legator, M.S., 1992. Healthy broccoli? *Nature* 357, 448.
- Paolini, M., Perocco, P., Canistro, D., Valgimigli, L., Pedulli, G.F., Iori, R., Croce, C.D., Cantelli-Forte, G., Legator, M.S., Abel-Rahman, S.Z., 2004. Induction of cytochrome P450, generation of oxidative stress and *in vitro* cell-transforming and DNA-damaging activities by glucoraphanin, the bioprecursor of the chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli. *Carcinogenesis* 25, 61–67.
- Pavek, P., Dvorak, Z., 2008. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr. Drug. Metab.* 9, 129–143.
- Perocco, P., Bronzetti, G., Canistro, D., Valgimigli, L., Sapone, A., Affatato, A., Pedulli, G.F., Pozzetti, L., Broccoli, M., Iori, R., Barillari, J., Sblendorio, V., Legator, M.S., Paolini, M., Abdel-Rahman, S.Z., 2006. Glucoraphanin, the bioprecursor of the widely extolled chemoprotective agent sulforaphane found in broccoli, induces phase-I xenobiotic metabolizing enzymes and increases free radical generation in rat liver. *Mutat. Res.* 595, 125–136.
- Rice, C.A., Myers, M.S., Willis, M.L., Flench, B.L., Casillas, E., 2000. From sediment bioassay to fish biomarker connecting the dots using simple trophic relationship. *Mar. Environ. Res.* 50, 527–533.
- Shailaja, M.S., D'Silva, C., 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53, 835–841.
- Sherratt, P.J., Hayes, J.D., 2002. Glutathione S-transferases. In: Ioannides, C. (Ed.), *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 319–352.
- Siroka, Z., Drastichova, J., 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination – cytochrome P450 in fish. A review. *Acta Vet. BRNO* 73, 123–132.
- Steinkellner, H., Rabot, S., Freywald, C., Nobis, E., Scharf, G., Chabicovsky, M., Knasmüller, S., Kassie, F., 2001. Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mut. Res.* 285–297.
- Stephen, G.G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C., Ostrander, G. (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, pp. 37–85.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.* 48, 431–442.
- Stoewsand, G.S., 1995. Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassica oleracea* vegetables: a review. *Food Chem. Toxicol.* 33, 537–543.
- Sun, Y., Yu, H., Zhang, J., Yin, Y., Shi, H., Wang, X., 2006. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carrasius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere* 63, 1319–1327.
- Tuvikene, A., 1995. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ann. Zool. Fenn.* 32, 295–309.
- Utley, H.G., Bernheim, F., Hockstein, P., 1967. Effect of sulfhydryl reagents on peroxidation in microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 118, 29–32.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 64, 178–189.
- Vang, O., Frandsen, H., Hansen, K.T., Sørensen, J.N., Sørensen, H., Andersen, O., 2001. Biochemical effects of dietary intakes of different broccoli samples I. Differential modulation of cytochrome P-450 activities in rat liver, kidney and colon. *Metabolism* 50, 1123–1129.
- Vuorinen, P.J., Keinänen, M., Vuontisjärvi, H., Baršienė, J., Broeg, K., Förflin, L., Gercken, J., Kopecka, J., Köhler, A., Parkkonen, J., Pempkowiak, J., Schiedek, D., 2006. Use of biliary PAH metabolites as a biomarker of pollution in fish from the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 53, 479–487.
- Zhang, Y., Talalay, P., 1994. Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms. *Cancer Res.* 54, 1976s–1981s.
- Zhang, Y., Talalay, P., Cho, Ch.-G., Posner, G.H., 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2399–2403.
- Zhang, Y., Li, J., Tang, L., 2005. Cancer-preventive isothiocyanates: dichotomous modulators of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 70–77.