

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



---

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

---

**EFFECTO DEL BRÓCOLI EN EL METABOLISMO DEL CITOCROMO P450 EN PECES  
TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) EXPUESTOS A LOS CONTAMINANTES  
BENZO(a)PIRENO Y FENOL**

TESIS

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

Presenta:

JORGE DÁVILA ORTIZ

Ensenada, Baja California, México, Junio de 2010

TESIS DEFENDIDA POR  
**Jorge Dávila Ortiz**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dr. Rafael Vázquez Duhalt  
*Director del Comité*

---

Dra. Meritxell Riquelme Pérez  
*Miembro del Comité*

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
*Miembro del Comité*

---

Dra. María Lucila del Carmen Lares  
Reyes  
*Miembro del Comité*

---

Dra. Rufina Hernández Martínez  
*Coordinador del programa de posgrado en  
Ciencias de la vida*

---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales  
*Director de Estudios de Posgrado*

4 de junio de 2010

**RESUMEN** de la tesis de **Jorge Dávila Ortiz**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS en el programa de posgrado en ciencias con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Julio 2009

## **EFECTO DEL BRÓCOLI EN EL METABOLISMO DEL CITOCROMO P450 EN LA TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) EXPUESTA A BENZO(A)PIRENO Y FENOL**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Rafael Vázquez Duhalt  
Director de Tesis

Compuestos contaminantes como el benzo(a)pireno (B(a)P) son considerados como altamente peligrosos para la salud de los organismos expuestos. Diversos estudios, relacionan la ingestión de dietas ricas en vegetales crucíferos (e.g. brócoli), con la quimiprotección contra compuestos promotores de cáncer (como el B(a)P). En este trabajo, se expusieron peces tilapia (*Oreochromis niloticus*) a los contaminantes B(a)P y fenol. Los efectos de ambos contaminantes, fueron analizados por medio de las actividades enzimáticas de diferentes familias de citocromo P450 (CYP1A1, 1A2, 2D6, 2E1, 2C19, 2C9 y 3A4), además de la cuantificación de metabolitos aromáticos en bilis. Las tilapias fueron expuestas a diferentes concentraciones de B(a)P: 0.1, 1, 10, 50 y 100 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal (PC) y sacrificadas 12, 24, 72, 168 y 336 h después la inyección. Tanto el metabolismo del CYP450 (CYP1A1) como los metabolitos aromáticos en bilis, mostraron una relación directa respecto a las concentraciones de B(a)P y tiempos de sacrificio después de la inyección. En otro experimento, peces tilapias fueron aclimados a 20, 25 y 30 °C durante 14 d y expuestas a 100 mg kg<sup>-1</sup> PC de B(a)P, sacrificando a los organismos 72 h después de la inyección. El efecto de las temperaturas mostró una inducción lineal en las actividades CYP450 (1A1 y 1A2), mientras que los metabolitos aromáticos en bilis presentaron su máximo a 30 °C. Dietas ricas en brócoli y su fitoquímico sulforafano, fueron administradas a peces tilapia 30 d antes de una inyección con 100 mg kg<sup>-1</sup> PC de B(a)P, siendo sacrificados 12, 24, 36, 48 y 72 h después de la inyección. Los peces alimentados con brócoli y sulforafano, mostraron una inducción significativa de la actividad CYP1A1 producido sólo por las dietas con brócoli y sulforafano, manteniendo los niveles altos, incluso después de la inyección. En cuanto a los metabolitos aromáticos en bilis, las dietas de brócoli y sulforafano presentaron niveles significativamente menores respecto a la dieta control (alfalfa). En otro experimento, peces tilapias fueron alimentadas con una dieta rica en brócoli (30 %) durante 30 d antes de la disolución de dos dosis de fenol (2 y 20 mg l<sup>-1</sup>) en el medio. Los peces fueron sacrificados 12 y 24 h después de la exposición. Al igual que en el experimento anterior, la administración de la dieta con brócoli, indujo significativamente las actividades CYP1A2 y 2A1 antes de la exposición con el contaminante. Después de la exposición al fenol, la dieta con brócoli moduló significativamente los efectos del contaminante en todas las familias CYP analizadas. Por otro lado, la dieta con brócoli, fue rociada con una concentración baja de fenol y administrada durante 60 d en las tilapias, encontrando la modulación diferencial de las familias CYP450.

**Palabras Clave:** Tilapia, Citocromo, Brócoli, Benzo(a)Pireno, Fenol.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Jorge Dávila Ortiz** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México. June 2010.

**BROCCOLI EFFECT ON CYP450 METABOLISM OF TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)  
EXPOSED TO BENZO(a)PYRENE AND PHENOL CONTAMINANTS**

Xenobiotic compounds as benzo(a)pyrene (B(a)P), and phenol, have a worldwide distribution and were considered as highly dangerous to human health. Cruciferous vegetables as broccoli, have been related to have chemoprotection against contaminant compounds. In this work, the effect of broccoli rich diet was evaluated before to B(a)P and phenol compounds. First, different B(a)P doses were intraperitoneally injected to tilapia fish (0.1, 1, 10, 50 and 100 mg Kg<sup>-1</sup> of body weight), and excretion was measured by aromatic metabolites in bile (1OH-pyrene equivalents) after 12, 24, 72, 168 and 336 h. Linear increase was obtained on aromatic metabolites presented in bile respect to B(a)P concentration. Tilapia fish were acclimated to 20, 25 and 30°C during 14 days and exposed to 100 mg B(a)P kg<sup>-1</sup> (fish weight). CYP1A1 and 1A2 activities increased according temperature. Highest aromatic metabolites in bile were founded to 30°C. Broccoli rich diet and its phytochemical sulforaphane were administrated to tilapia fish during 30 days before to 100 mg kg<sup>-1</sup> B(a)P. (CYP1A1) activity increased by broccoli and sulforaphane effects, and presented the highest levels after B(a)P exposition. Also, lower concentrations of aromatic metabolites in bile was founded in fish fed with broccoli or sulforaphane enriched diets. Broccoli rich diet was administrated to tilapia fish 30 days before exposition to 2 and 20 mg l<sup>-1</sup> of phenol. Cytochrome P450 activities (CYP1A1, 1A2, 2D6, 2E1, 2C9, 2C19 and 3A4) was used to monitored the phenol effect on fish fed with broccoli diet. After 30 days of broccoli administration, significant changes were detected on CYP1A1, 1A2 activities. After phenol exposition (12 or 24 hours), CYP450 activities was induced or inhibited significantly. Also, broccoli diet was sprayed with phenol (30 mg kg<sup>-1</sup> of diet) and was administrated to tilapia fish during 60 days. CYP450 activities, showed the inhibition of CYP2D6, 2C19 and 3A4, whereas 2C9 increased their levels.

**Keywords:** Tilapia, Cytochrome P450, Broccoli, Benzo(a)Pyrene, Phenol.

## Dedicatorias

Al que es digno de recibir toda la gloria y honra de este trabajo. Al único que merece toda la alabanza de los triunfos que se lograron. Al que fue mi apoyo, mi confianza y mi fortaleza. Al que es mi luz en medio de la obscuridad. Al que compró mi vida con la suya. Al que creyó en mí desde el principio. Al que es el Rey de Reyes y Señor de Señores pero más que nada mi gran amigo “Jesucristo”.

A mis padres Jorge Dávila Ortiz y Ma. del Carmen Ortiz Juárez, que son los mejores padres del mundo, poniendo no sólo las condiciones necesarias para lograr todos mis grados académicos, sino además, quedándose hasta sin comer para que saliéramos adelante, y estando allí en los momentos más importantes de mi vida. Los quiero mucho.

A mis hermanas Diana Laura y Brenda Sue Dávila Ortiz, y ahora a sus hermosas familias, mi cuñado Eduardo y a todos mis hermosos sobrinos Melissa, Emmanuel y Joseline que son mi nuevo orgullo.

A mi gran amor Dámariz Rodríguez Melendrez, que estuvo conmigo a cada instante de este largo proceso. Que siempre me dio todo su amor, cariño y comprensión a pesar de las circunstancias tan adversas, sin importar que tan obscuro se viera el camino. Pero, esto apenas comienza.

A toda mi familia en Ensenada que la integran: la familia de Elia Melendres, de Rossana Iñiguez, de Eduardo Morales que dieron más de lo que podían para poder terminar: casa, comida, dinero, oraciones, apoyo pero sobre todo sus corazones.

A los pastores y amigos Samuel y Tabita Acosta, Julián Pérez y familia y pastores Samarin, gracias por sus oraciones, pero sobre todo su amor.

## Agradecimientos

Mi más grande agradecimiento al CONACyT por las facilidades económicas que me dio para realizar todos mis estudios de doctorado

Agradezco infinitamente a mi jefe y director de tesis Dr. Rafael Vázquez-Duhalt por haber aceptado la dirección de mi tesis a pesar del reto tan grande que representaba y ser parte fundamental del rescate de mi grado y enseñarme a publicar. A todos en el instituto de biotecnología en Cuernavaca “Mil gracias”.

A mi comité de tesis integrado por mis amigos Dr. Alexei F. Licea Navarro, Dra. Meritxell Riquelme Pérez y Dra. M. Lucila del Carmen Lares Reyes por haber hecho hasta lo imposible para solucionar los problemas del proceso. A la memoria del Dr. Jorge de la Rosa Vélez, quien fue un miembro valioso en este trabajo, pero sobre todo un amigo.

A la Dra. M. Teresa Viana y a su equipo de trabajo y alumnos, encabezados por el Dr. Gabriel Correa, quienes abrieron desinteresadamente su laboratorio, equipo, reactivos, pero sobre todo su corazón y amistad en la última parte de mi trabajo.

A todo el personal del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, y en especial, al Dr. David H. Covarrubias Rosales por su total confianza y apoyo que fue pieza clave para obtener mi grado.

A Dolores Sarracino y todos los integrantes del departamento de servicios escolares que llevaron mi caso con profesionalismo. A Ivonne Best por ser una gran amiga y una pieza clave para todos los trámites de becas.

A Eduardo Morales y familia quien fue pieza clave para la generación de todos los resultados de este trabajo, además de un “Jefe” en los momentos más oscuros y hasta mi familia, ayudándome cuando más lo necesitaba. ¡Gracias amigo!

A mi compañera y amiga: Dra. Virginia Villa Cruz quien me acompañó en el mismo barco durante toda la tormenta. Gracias por pelear hombro a hombro conmigo. A Enrique Strassburger y Nayeli Estavillo de “Acuacultura del Desierto” por su amistad y apoyo.

A la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra y al Dr. Marcel Martínez por todo su apoyo, atenciones, enseñanzas, amistad y cariño. A mis maestros tanto en CICESE como en la Universidad Autónoma de Baja California. A todos mis amigos y compañeros que, por ser muchos, necesitaría hacer otro libro para mencionarlos cada una de las hermosas cosas que me hicieron sentir durante los ocho años que pasé en CICESE y UABC. ¡Gracias a todos chicos, si se pudo!

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>Resumen español.....</b>	<b>i</b>
<b>Resumen inglés.....</b>	<b>ii</b>
<b>Dedicatorias.....</b>	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>iv</b>
<b>Contenido.....</b>	<b>v</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Tablas.....</b>	<b>ix</b>
<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo II. Antecedentes.....</b>	<b>9</b>
<b>II.1 Género <i>Oreochromis</i> (tilapia) y la exposición a xenobióticos.....</b>	<b>9</b>
<b>II.2 Exposición de peces a B(a)P.....</b>	<b>10</b>
<b>II.3 Citocromo P450 como biomarcador de xenobióticos.....</b>	<b>12</b>
<b>II.4 Exposición de peces a fenol.....</b>	<b>13</b>
<b>II.5 Efectos del brócoli en el metabolismo del CYP450.....</b>	<b>14</b>
<b>Capítulo III. Justificación.....</b>	<b>17</b>
<b>Capítulo IV. Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>IV.1 Objetivo general.....</b>	<b>18</b>
<b>IV.2 Objetivos particulares.....</b>	<b>18</b>
<b>Capítulo V. Materiales y métodos.....</b>	<b>19</b>
<b>V.1 Organismos y reactivos.....</b>	<b>19</b>
<b>V.2 Exposición a B(a)P en dosis y tiempo.....</b>	<b>19</b>

## CONTENIDO (continuación)

	<b>Página</b>
<b>V.3 Efecto de la temperatura de aclimatación en la respuesta al B(a)P.....</b>	<b>20</b>
<b>V.4 Efecto del brócoli y su fitoquímico sulforafano en la respuesta al B(a)P</b>	<b>21</b>
<b>V.5 Efecto del brócoli en la respuesta a dosis sub-letales de fenol.....</b>	<b>23</b>
<b>V.6 Análisis de metabolitos aromáticos en bilis.....</b>	<b>24</b>
<b>V.7 Fracción microsomal.....</b>	<b>25</b>
<b>V.8 Reacciones enzimáticas CYP450.....</b>	<b>25</b>
<b>V.9 Determinación de las diferentes actividades CYP450 por HPLC.....</b>	<b>27</b>
<b>V.10 Análisis estadísticos.....</b>	<b>28</b>
 <b>Capítulo VI. Resultados.....</b>	 <b>29</b>
<b>VI.1 Efecto de la dosis y el tiempo de exposición a B(a)P en la concentración de metabolitos aromáticos en bilis.....</b>	 <b>29</b>
<b>VI.2 Efecto de la temperatura de aclimatación sobre concentración de metabolitos aromáticos en bilis y actividades CYP450.....</b>	 <b>32</b>
<b>VI.3 Efecto de las dietas ricas en brócoli y sulforafano sobre la concentración de metabolitos aromáticos en bilis y actividades CYP1A1 después de la exposición a B(a)P.....</b>	 <b>35</b>
<b>VI.4 Efecto de las dietas ricas en brócoli sobre las actividades CYP450 después de la exposición a fenol.....</b>	 <b>39</b>
 <b>Capítulo VII. Discusión.....</b>	 <b>45</b>
<b>VII.1 Exposición de tilapias a B(a)P en dosis y tiempo.....</b>	<b>46</b>
<b>VII.2 Temperatura de aclimatación en la respuesta al B(a)P.....</b>	<b>48</b>
<b>VII.3 Dietas de brócoli, sulforafano en la respuesta a la exposición de B(a)P.....</b>	 <b>51</b>
<b>VII.4 Dieta de brócoli en la respuesta a la exposición de fenol .....</b>	<b>54</b>
 <b>Capítulo VIII. Conclusiones.....</b>	 <b>61</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
1	Equivalentes 1-hidroxipireno calculados a partir de los metabolitos aromáticos presentes en la bilis de tilapias inyectadas intraperitonealmente con benzo(a)pireno (0.1, 1, 10, 50 y 100 mg Kg-1 peso del pez) disuelto en DMSO (control) y sacrificados 12, 24, 72, 168 y 336 horas después de la inyección.....	30
2	Equivalentes 1-hidroxipireno calculados a partir de los metabolitos aromáticos presentes en la bilis de tilapias aclimatadas durante 14 días a 20, 25 y 30°C e inyectadas intraperitonealmente con 100 mg Kg-1 (peso del pez) de B(a)P. Los peces fueron sacrificados 0 (control) y 72 horas después de la inyección.....	32
3	Actividad enzimática de la familia CYP1A1 (EROD nmol min-1 mg-1 proteína) de muestras hepáticas de tilapias aclimatadas durante 14 días a 20, 25 y 30°C e inyectadas intraperitonealmente con 100 mg Kg-1 (peso del pez) de B(a)P. Los peces fueron sacrificados 0 (control) y 72 horas después de la inyección.....	33
4	Actividad enzimática de la familia CYP1A2 (MROD nmol min-1 mg-1 proteína) de muestras hepáticas de tilapias aclimatadas durante 14 días a 20, 25 y 30°C e inyectadas intraperitonealmente con 100 mg Kg-1 (peso del pez) de B(a)P. Los peces fueron sacrificados 0 (control) y 72 horas después de la inyección.....	34
5	Actividad enzimática CYP1A1 (EROD) obtenida de muestras hepáticas de tilapias alimentadas durante 30 días con las dietas brócoli, sulforafano y control e inyectadas intraperitonealmente con benzo(a)pireno (100 mg Kg-1 peso del pez). Los peces fueron sacrificados 0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas después de la inyección...	36
6	Equivalentes 1-OH pireno calculados a partir de los metabolitos aromáticos presentes en la bilis de tilapias alimentadas durante 30 días con brócoli, sulforafano y control e inyectadas intraperitonealmente con benzo(a)pireno (100 mg Kg-1 peso del pez). Los peces fueron sacrificados 0, 12, 24, 36, 48 y 72 horas después de la inyección.....	38

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
7	Actividad enzimática hepática (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína) de las familias CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4 de tilapias alimentadas durante 30 días con las dietas: brócoli (30%) y control, y expuestas a una concentración baja de fenol (2 mg L <sup>-1</sup> ). Los peces fueron sacrificados 0, 12 y 24 horas después de la exposición a fenol.....	41
8	Actividad enzimática hepática (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína) de las familias CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4 de tilapias alimentadas durante 30 días con las dietas: brócoli (30%) y control, y expuestas a una concentración alta de fenol (20 mg L <sup>-1</sup> ). Los peces fueron sacrificados 0, 12 y 24 horas después de la exposición a fenol.....	43

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Ingredientes y su porcentaje usado para la elaboración de las dietas brócoli, sulforafano y control administradas a la tilapia <i>O. niloticus</i> durante 30 días.....	22
II	Sustratos, reacciones y productos específicos para cada familia de CYP450 utilizadas en los diferentes experimentos con tilapias ( <i>O. niloticus</i> ). Tabla modificada de Zhang <i>et al.</i> (2005).....	26
III	Promedio ( $\pm$ desviación estándar) de los equivalentes 1-hidroxipireno calculados a partir de los metabolitos aromáticos encontrados en la bilis de la tilapia <i>O. niloticus</i> inyectada intraperitonealmente con benzo(a)pireno (0.1, 1, 10, 50 y 100 mg Kg-1 peso del pez) disuelto en DMSO (control) y sacrificada 12, 24, 72, 168 y 336 horas después de la inyección.....	31
IV	Actividad enzimática (nmol min-1 mg-1 proteína) de las familias CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4 en muestras hepáticas de tilapias ( <i>O. niloticus</i> ) alimentadas durante 60 días con las dietas preparadas brócoli y control rociadas con 30 mg de fenol por kilogramo de dieta.....	44

## Capítulo I. Introducción

---

La acuicultura ha sido considerada por la organización de las naciones unidas para la alimentación y agricultura (FAO) como el sector de producción animal con más rápido crecimiento en el mundo, con niveles cercanos al 7% anuales (FAO, 2009). Los volúmenes de producción anual de peces, crustáceos y moluscos han crecido anualmente, reportando para el año 2006: 51.7 millones de toneladas. Cabe señalar que este crecimiento se presenta en medio de un déficit de las pesquerías mundiales y donde los niveles actuales de captura ya no son suficientes para suplir las necesidades alimenticias de la población mundial. Estimaciones de las pesquerías realizadas por la FAO (2009), reportan que aproximadamente el 50% de las especies capturadas se encuentran completamente explotadas, mientras que el 30% están sobre explotadas, quedando tan solo un margen del 20% donde las pesquerías pueden crecer (FAO, 2009). A pesar del crecimiento sostenido en la acuicultura, otro tipo de problemas se han convertido en todo un reto para el sector. El incremento en el precio mundial de los energéticos y de los alimentos, sumado a los problemas del cambio climático mundial, han hecho que tanto las pesquerías como la acuicultura tengan que realizar diferentes ajustes políticos y de manejo, que repercuten directamente en los sectores naturales, sociales y económicos (FAO, 2009).

A pesar de que los estándares de certificación en la producción acuícola mundial no incluyen actualmente normas para la prevención contra los efectos contaminantes, la presencia de estos compuestos en los cuerpos de agua (ríos, mares y lagos) no sólo representa un problema social, sino un potencial riesgo para la producción acuícola y para sus consumidores. Estimaciones anuales en Europa, reportan que cerca de 300 millones de toneladas de compuestos contaminantes son vertidos a los cuerpos de agua (Schwarzenbach *et al.*, 2006). El efecto de xenobióticos en los organismos acuáticos incluyen: daños a tejidos (Ahmad *et al.*, 2004), retraso en el crecimiento (Gad y Saad, 2008), disturbios reproductivos (Maradonna *et al.*, 2004), bioacumulación en tejidos y paso a través de

cadena trófica (Rice *et al.*, 2000; Hellou y Leonard, 2004) y mortalidad si la toxicidad o la concentración son muy altas (Almeida *et al.*, 2002). A pesar de los efectos adversos y el riesgo para los consumidores, la regulación en el uso y desecho de estos compuestos contaminantes ha sido deficiente.

Uno de los sistemas ampliamente usados como bio-indicador de la presencia de xenobióticos, es la familia multi-enzimática del citocromo P450 (CYP450). En este sentido, el grupo de citocromos P450 tipo 1A (CYP1A) ha sido relacionado con el metabolismo de diferentes xenobióticos dentro de los que se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), hidrocarburos nitrados poliaromáticos (NPAH), bifenilos policlorados (PCB), dioxinas (TCDD), y algunos tipos de pesticidas (Široká y Drastichová, 2004). En cuanto a su estructura, el CYP450 presenta un sitio activo del tipo “hemo” constituido por grupos que contienen hierro (Fe) que le permite cambiar reversiblemente entre los estados oxidado y reducido (Schlezingner *et al.*, 2006). Se pueden encontrar más abundantemente en la membrana interna de la mitocondria, y en menor cantidad en la membrana del retículo endoplásmico liso (Arinç *et al.*, 2000; Orellana y Guajardo, 2004). Dentro del organismo, los CYP450 metabolizan compuestos endógenos como el colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroidales, ácidos grasos, vitaminas, neurohormonas y prostaglandinas, y exógenos como drogas y medicinas (Cajaraville *et al.*, 2000; Orellana y Guajardo, 2004). En presencia de xenobióticos, la actividad CYP450 constituye el primer paso para su excreción con reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis que tienen como objetivo cambiar la polaridad e incrementar su hidrólisis y excreción (Široká y Drastichová, 2004). A este primer paso metabólico se le conoce comúnmente como fase I.

La fase I del CYP450 comienza cuando compuestos endógenos y exógenos como los hidrocarburos aromáticos, entran a la célula y se unen al receptor de hidrocarburos arilo (AhR) presente en el citosol. Este complejo es posteriormente transportado al núcleo por medio del translocador nuclear de hidrocarburos arilo (ARNT) donde se unen a sitios promotores de ADN llamados elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) y/o elemento de respuesta a dioxinas (DRE), promoviendo y regulando la transcripción de varias familias

de genes, incluyendo los CYP450 (Dertinger *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2004; Anwar-Mohamed y El-Kadi 2009). Pocas veces los metabolitos intermediarios producidos en la fase I son excretados, necesitando la conjugación con otras moléculas en la fase II, como el glutatión catalizada por la glutatión-S-transferasa, entre otros (Bebianno *et al.*, 2007).

Un tipo de xenobióticos de distribución mundial e inductores del metabolismo CYP450 (CYP1A1 y CYP1A2 principalmente) son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH). Los PAH son producidos y liberados al ambiente por formas naturales y antropogénicas. Las formas naturales incluyen la quema de materia orgánica (e.g., incendios forestales), erupciones volcánicas y procesos de formación de petróleo (descomposición de material orgánico en el subsuelo), mientras que las antropogénicas están relacionadas con la extracción, refinamiento y distribución de petroquímicos, siendo los derrames petroleros las principales formas de liberación (Flowers *et al.*, 2002). Otros procesos humanos incluyen la producción de carbón y asfalto, y los residuos generados durante la combustión interna en motores, humo de cigarro y alimentos ahumados, entre otros (Nemeth y Weyand, 2002). La agencia de protección al ambiente de los Estados Unidos (con sus siglas en inglés “U. S. EPA”), considera 16 compuestos PAH como de “alto riesgo para la salud” por ser procarcinogénicos. Uno de estos compuestos es el benzo(a)pireno (B(a)P). El B(a)P tiene una estructura formada por cinco anillos bencénicos (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>), y características fisicoquímicas que incluyen una alta hidrofobicidad (solubilidad al agua menor a 0.0016 mg L<sup>-1</sup>), baja fotólisis y baja volatilidad, además de una alta tasa de sedimentación, alta afinidad por partículas en el ambiente (e.g., polvo) y alta acumulación (Mougin, 2002). Además, el B(a)P puede entrar en los organismos por medio de la dieta, vías respiratorias y a través de la piel. Nemeth y Weyand (2002) mencionan que las características mutagénicas y carcinogénicas del B(a)P están relacionadas con el metabolismo del CYP450, formando metabolitos intermediarios más reactivos que el compuesto parental (bioactivación). En este sentido, las fases I y II del B(a)P, produce un metabolito más reactivos que el parental, denominado: B(a)P-7,8-dihidrodiol-9,10-óxido. Este metabolito reacciona con el ADN

causando aductos que inciden en la formación de tumores (Dreij *et al.*, 2004; Harvey *et al.*, 2004).

Los niveles de B(a)P en el ambiente han sido reportados en la literatura. Aas *et al.*, (2000) encontraron que un kilogramo de petróleo crudo muestreado en el Mar del Norte puede contener hasta 1.3 mg de B(a)P. Rice *et al.*, (2000) encontraron una concentración aproximada de  $4.3 \mu\text{g g}^{-1}$  (peso seco) en sedimentos de Puget Sound, en el estado de Washington (E UA). Pikkarainen (2004) reporta que los sedimentos de 11 sitios del Mar Báltico presentan concentraciones de B(a)P entre 3.7 y  $385 \text{ ng g}^{-1}$ . Anyakora *et al.*, (2005) determinaron las concentraciones de B(a)P en el delta del Níger (Nigeria), encontrando niveles de  $1.72 \mu\text{g ml}^{-1}$  en agua,  $5.91 \mu\text{g g}^{-1}$  en sedimentos, y  $6.78 \mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco en tejido muscular de peces. Da Silva *et al.*, (2006) determinaron la concentración de B(a)P en el puerto petrolero de San Sebastián (Brasil) y reportan concentraciones entre 1.7 y  $11.2 \text{ ng g}^{-1}$  de sedimentos. La cuantificación de B(a)P en los gases de combustión de automóviles impulsados por gasolina fueron determinados por Okuda *et al.*, (2003), reportando niveles entre 1.1 y  $153 \mu\text{g g}^{-1}$ . Seidel *et al.*, (2004) también reportaron concentraciones de  $11.59 \text{ ng mg}^{-1}$  de B(a)P producidos en el escape de un tipo de automóvil compacto (VW lupo). Por otro lado, concentraciones de B(a)P en aire de diferentes ciudades de Inglaterra fueron determinadas por Lewis *et al.*, (2002), encontrando concentraciones promedio de  $5.58 \text{ ng por m}^{-3}$  de aire entre octubre y noviembre de 1994.

Una de las formas de exposición al B(a)P es a través de la dieta de los organismos. Rice *et al.*, (2000) mencionan que las características lipofílicas del B(a)P pueden causar su bioacumulación en el tejido de los organismos que lo consumen, con efectos en los niveles superiores de la cadena trófica. Para probar su hipótesis, alimentaron peces (*Pleuronectes vetulus*) con gusanos poliquetos (*Armandia brevis*) cultivados durante 28 días en sedimentos contaminados con B(a)P ( $7.1 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Encontraron una inducción de la actividad CYP1A1 y un incremento en la cantidad de aductos en los peces alimentados con los poliquetos contaminados. En cuanto al B(a)P en dietas de humanos, Pandey *et al.*, (2006) reportan altas concentraciones de B(a)P formadas después de utilizar repetidamente el

aceite de pescado en la fritura de alimentos ( $497\mu\text{g kg}^{-1}$  de aceite). Stolyhwo y Sikorski (2005) reportan que el ahumado de alimentos utilizando madera (forma tradicional en Europa para obtener el humo), transfiere por lo menos 100 PAH diferentes, incluyendo aproximadamente  $50\mu\text{g}$  de B(a)P por kilogramo de peso seco del alimento ahumado. Loutfy *et al.*, (2007) cuantificaron niveles de xenobióticos en alimentos comprados en mercados de la ciudad de Ismailia (Egipto). Ellos encontraron concentraciones de B(a)P ( $\text{ng g}^{-1}$ ) de 0.3 en carne de res, de 0.4 en pollo, de 6.2 en mantequilla, de 0.34 en peces, de 0.05 en crustáceos, y de 0.6 en bivalvos. Como se mencionó anteriormente, el B(a)P también es producido por la quema de materia orgánica, por lo que el humo de cigarro puede contener entre 6.3 y 8.26  $\text{ng}$  de B(a)P por cigarro (Seidel *et al.*, 2004).

Otro tipo de contaminante ampliamente distribuido en el ambiente es el fenol. Este compuesto está formado por un anillo bencénico y un grupo hidroxilo ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ ), pudiéndose encontrar tanto en forma sólida (cristal color blanco), como líquida (forma comercial). Presenta una evaporación más lenta que el agua (considerado por la U. S. EPA como “no” muy volátil) y una solubilidad de  $82.8\text{ g l}^{-1}$  de agua. No se asocia fuertemente a partículas, por lo que puede ser filtrado fácilmente a través del suelo hasta los mantos acuíferos.

La EPA reporta que el fenol se produce de forma natural en plantas, y en el intestino y desechos de animales. Además la descomposición y quema de material orgánico también produce este compuesto, por lo que es encontrado en el humo del cigarro. Otras detecciones se han realizado en alimentos ahumados, pollo y tocino fritos, té negro fermentado y como parte natural de la orina humana.

La producción antropogénica del fenol, está relacionada principalmente con la elaboración de resinas epóxicas y fenólicas, además de pinturas, plásticos, nylon, policarbonatos, herbicidas, fluidos hidráulicos, surfactantes industriales, carbón, fibras, adhesivos, acero, metal, aluminio y piel. Se obtiene como residuo en las industrias petroquímicas, de madera, y productoras de papel. Por sus características antisépticas (bactericidas y fungicidas), es usado comúnmente en productos de limpieza caseros y en hospitales como desinfectante.

Además, forma parte de enjuagues bucales, medicamentos para la garganta y lociones desinfectantes.

El fenol puede ser absorbido por inhalación, contacto con la piel y a través del alimento, siendo excretado principalmente por la orina. Además, puede ser bioacumulado en el tejido de los organismos y entrar en las cadenas tróficas. Gad y Saad (2008) encontraron una relación directa entre la acumulación de fenol en tejidos (hígado, músculo y branquias) de tilapias (*Oreochromis niloticus*) y las concentraciones aplicadas a los peces. El fenol, al igual que el B(a)P, es metabolizado por el sistema enzimático CYP450. Powley y Carlson (2001) reportan que el metabolismo del fenol es realizado principalmente por la familia CYP2E1, aunque no descartan que otras familias como la CYP2F2 puedan estar involucradas. Tanto la Agencia Internacional para el Estudio Contra el Cáncer como la U. S. EPA, reportan que no existen evidencias de que el fenol promueva mutaciones o cáncer en humanos, aunque mencionan que son necesarios otros estudios. La U. S. EPA reporta que dosis continuas de  $2 \text{ mg l}^{-1}$  de fenol en agua, no causaron efectos adversos en humanos. Sin embargo, la Agencia de Alimentación y Fármacos de los Estados Unidos (U. S. FDA por sus siglas en inglés) recomienda niveles menores a  $0.001 \text{ mg l}^{-1}$  para aguas embotelladas. Efectos de intoxicación de fenol en humanos, incluyen daños en la mucosa nasal, tracto gastrointestinal, hígado, sistema cardiovascular, hematológico, neurológico e inmunológico.

Según la Agencia de Sustancias Tóxicas y Enfermedades Registradas de los Estados Unidos (U. S. ATSDR por sus siglas en inglés), el tiempo de permanencia del fenol en el aire es entre 1 y 2 días, mientras que en el suelo puede ser de hasta 5 días. En medios acuáticos, este compuesto puede permanecer por más de una semana, con 9 días en agua salada. Debido a que la mayor degradación del fenol es por microorganismos (principalmente bacterias), el tiempo de permanencia del fenol puede verse afectado sobre todo cuando las condiciones ambientales no son favorables, y/o, la concentración de fenol es muy alta.

Concentraciones aproximadas de fenol en los Estados Unidos, fueron determinadas por la U. S. EPA (2005) para aguas superficiales, suelos y aire (45, 472 y 3480 toneladas métricas respectivamente). Detecciones de fenol en aguas residuales de la ciudad de Nueva York (EUA) realizadas entre 1989 y 1993 mostraron concentraciones entre 6 y 490 g l<sup>-1</sup> (mediciones realizadas antes de cualquier tratamiento). Además, la U. S. ATSDR reporta que los altos niveles de tráfico en las ciudades, pueden liberar a la atmósfera concentraciones entre 0.5 y 44 ppb de fenol. También la quema de árboles de pino y eucalipto, pueden liberar entre 300 y 524 mg kg<sup>-1</sup> de fenol en el humo de la madera quemada. Finalmente, estimaciones de fenol producido en el humo del cigarro varía desde los 19 a los 107 µg por cigarro.

Como se mencionó anteriormente, la fase I catalizada por el CYP450 es el primer paso en la excreción de xenobióticos, por consecuencia, su modulación (inducción y/o inhibición) está relacionada con la producción de metabolitos intermediarios y su excreción. Un tipo de moduladores naturales de la actividad metabólica CYP450 son los compuestos glucosinolados abundantes en vegetales crucíferos tales como el brócoli, coles de Bruselas, lechuga morada, rábanos y coliflor (Fimognari y Hrelia, 2007; Clarke *et al.*, 2008). Los compuestos glucosinolados (como la glucorafanina), son transformados a compuestos isotiocianatos por medio de una enzima llamada mirosinasa cuando la planta sufre daños en su tejido (e.g., proceso de cosecha, masticación o digestión) (Fimognari y Hrelia, 2007). El sulforafano (1-isotiocianato-4-(metinilsulfinil)butano) es uno de los principales compuestos isotiocianatos producidos a partir de la acción de la mirosinasa sobre la glucorafanina (su glucosinolado parental) (Clarke *et al.*, 2008). Según Paolini *et al.*, (2004), los niveles de glucorafanina en una planta de brócoli pueden llegar a ser hasta del 55% del total de los glucosinolados en la planta, aunque este porcentaje puede variar dependiendo de la parte (e.g. hojas, tallos, brotes), edad de la planta (joven o madura), especie estudiada, condiciones de cultivo (niveles de nitrógeno, pesticidas, etc), y almacenamiento (fresco o congelado) (Fahey *et al.*, 1997; Vang *et al.*, 2001). Como se muestra a detalle en la parte de antecedentes, la administración de glucorafanina y sulforafano en mamíferos, ha tenido un efecto quimioprotector contra el desarrollo de varios tipos de cáncer, incluso en presencia

de carcinógenos como el benzo(a)pireno (Fahey *et al.*, 2002). Zhang (2001) reporta que la actividad quimioprotectora del sulforafano, está en relación con la rápida entrada y acumulación en el citoplasma celular. Además, Clarke *et al.*, (2008) describen que dentro de la célula, los compuestos isotiocianatos (e.g. el sulforafano) realizan diferentes actividades anticancerígenas. Estas actividades incluyen la modulación (inhibición/inducción) de la actividad de diferentes tipos de CYP450 (fase I) y la inducción de diferentes enzimas de la fase II (e.g. glutatión-S-transferasa). Por otro lado, el sulforafano ha sido relacionado con procesos de arresto celular y apoptosis de células cancerígenas. Estos procesos dependen directamente de la dosis y tiempo de tratamiento.

## Capítulo II. Antecedentes

---

Como se mencionó anteriormente, una consecuencia del desarrollo urbano, industrial y agrícola, es la liberación de compuestos contaminantes al medio acuático (ríos, mares y lagos). La presencia de estos contaminantes en el medio ha ocasionado que diferentes organismos acuáticos (incluyendo peces), sean empleados como centinelas para evaluar el efecto de los xenobióticos en su fisiología, y estimar de forma indirecta la concentración aproximada de los compuestos. En este sentido, las evaluaciones se han realizado utilizando diferentes marcadores moleculares dentro de los que se encuentran la actividad metabólica del citocromo P450.

### II.1 Género *Oreochromis* y la exposición a xenobióticos

La importancia económica del género *Oreochromis* (tilapia) se ha incrementado en los últimos años, debido principalmente a su facilidad de cultivo, sus bajos precios, y su filete color blanco, alcanzando tasas de exportación mayores al 50 % anual y llegando a mercados donde hasta hace unos años era desconocida (FAO, 2009). Además de su importancia económica, la tilapia ha sido utilizada por diferentes autores como modelo para monitorear el efecto de diferentes contaminantes. Bainy *et al.*, (1999) utilizaron la especie para monitorear diferentes zonas de la Reserva Billings en São Paulo (Brasil). Ellos reportan la inducción de diferentes familias de CYP450. Zapata-Pérez *et al.*, (2000 y 2002) expusieron la especie tanto a sedimentos de la bahía de Chetumal (México), como a concentraciones de pireno, encontrando para ambos casos la inducción de la actividad CYP450 y metabolitos aromáticos biliares.

Además, otras especies del género *Oreochromis* han sido utilizadas para el monitoreo de diferentes contaminantes. Wong *et al.*, (2001) emplearon la especie *O. mossambicus* para evaluar sedimentos de cuatro lugares de Hong Kong. Ellos encontraron una inducción de la actividad CYP1A con diferencias significativas por lugar y tejido analizados (hígado, intestino y branquias). Shailaja y D'Silva (2003), también expusieron la especie *O. mossambicus* a fenantreno y a aguas residuales, encontrando una relación lineal entre la inducción de la familia CYP1A y las concentraciones de los contaminantes.

## II.2 Exposición de peces a B(a)P

Diferentes trabajos han monitoreado los efectos de los PAH en peces, y más específicamente al B(a)P debido a sus características mutagénicas y carcinogénicas. Diferentes especies de peces han sido utilizadas para evaluar el efecto del B(a)P. Courtenay *et al.*, (1999) expusieron peces de la especie *Microgadus tomcod* a concentraciones de 0.05, 0.1, 1 y 10 mg kg<sup>-1</sup> de peso del pez, encontrando una inducción significativa de la actividad CYP1A con un máximo a 24 h después de la exposición. Jorgensen y Wolkers (1999) encontraron una inducción de la actividad CYP1A debido a la exposición a B(a)P y la temperatura ambiental (1 y 10°C). Ellos además reportan que la temperatura afecta el tiempo de inducción, presentando los máximos 12 días después a 1°C y 2 días después a 10°C. Kirby *et al.*, (2000) también encontraron un incremento de la actividad CYP1A y metabolitos aromáticos en la bilis de la especie *Platichthys flesus* expuesta a B(a)P en concentraciones de 1 y 20 mg kg<sup>-1</sup> de peso del pez. Sin embargo, las máximas inducciones de ambos marcadores fueron registradas 8 días después de la exposición. Por su parte, Au *et al.*, (1999) reportan que las máximas actividades CYP1A se obtuvieron entre el primer y tercer día después de la exposición a 0.1, 1, 5 y 10 mg kg<sup>-1</sup> de peso del pez en la especie *Solea ovata*. Ellos además encontraron daños en las células hepáticas, producto de la exposición a B(a)P. Araujo *et al.*, (2000) reportan un incremento en la actividad CYP1A de las líneas celulares de *Ictalurus sp.* y *Oncorhynchus mykiss* (RTG-2) expuestas a B(a)P (0 a

20  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de medio) y fotoactivado con rayos ultravioleta (UV). Ellos encontraron que la fotoactivación del compuesto con el UV disminuye significativamente la viabilidad celular, incrementando la toxicidad del contaminante. Rice *et al.*, (2000) encontraron que el B(a)P puede ser bio-acumulado en el organismo, y transmitido a través de las cadenas tróficas. Ellos cultivaron gusanos poliquetos (*Armandia brevis*) en sedimentos que contenían este compuesto y alimentaron peces de la especie *Pleuronectes vetulus* con estos poliquetos. Ellos observaron un incremento tanto de la actividad CYP1A, como de la cantidad de aductos ADN-PAH de los peces alimentados con los poliquetos, por lo que concluyen que el contaminante se puede transmitir a través de las cadenas tróficas. Willett *et al.*, (2000) compararon la actividad CYP1A y metabolitos aromáticos biliares de dos especies (*Ameriurus nebulosus* e *Ictalurus punctatus*) expuestas a 10  $\text{mg kg}^{-1}$  (peso del pez). Aunque la especie *I. punctatus* presentó una inducción de CYP1A cinco veces mayor respecto a *A. nebulosus*, la concentración de metabolitos biliares no presentó diferencias estadísticas. Arzuaga y Elskus (2002), encontraron que los peces expuestos continuamente a xenobióticos, presentan una aparente resistencia respecto a los nunca expuestos. Ellos compararon peces *Fundulus heteroclitus* capturados en una zona contaminada y limpia de Nueva York y los expusieron a 50  $\text{mg kg}^{-1}$  (peso del pez) de B(a)P. Sus resultados mostraron una mayor inducción de la actividad CYP1A para los peces de la zona limpia respecto a la contaminada. Barnhill *et al.*, (2003) expusieron durante 9 semanas la especie *O. mykiss* a 10  $\mu\text{M}$  B(a)P en presencia de un pesticida llamado dieldrina. Ellos reportan que el pesticida causa cambios en la excreción del B(a)P, encontrando un incremento en la concentración de metabolitos aromáticos en la bilis de los peces. En un experimento similar, Padrós *et al.*, (2003) expusieron peces *Salvelinus alpinus* a B(a)P y una pintura llamada tributiltina durante 56 días. Ellos reportan que la pintura modula la actividad CYP1A y disminuye la cantidad de aductos (B(a)P-ADN) en los peces. Gorbi y Regoli (2004) reportan un incremento de la actividad CYP1A y metabolitos biliares en la especie *Anguilla anguilla* expuesta a 0.1, 1, 10 y 50  $\text{mg kg}^{-1}$  (peso del pez). Ellos mencionan que los máximos incrementos se dan tres días después de la exposición. Malmström *et al.*, (2004) expusieron las especies *Platichthys flesus* y *O. mykiss* a dos concentraciones de B(a)P (10 y 50  $\text{mg kg}^{-1}$  peso del pez). Los resultados mostraron diferencias significativas en la actividad

CYP1A a partir del día 2, siendo un orden de magnitud mayor para *O. mykiss* respecto a *P. flesus*.

Además del B(a)P, el efecto de otros PAH ha sido evaluado utilizando el metabolismo del CYP450. Carlsson y Pärt, (2001), cultivaron células de *O. mykiss* con benzo[k]fluoranteno, reportando una inducción de la actividad CYP1A producida por el contaminante. Luthe *et al.*, (2002) expusieron la especie *P. flesus* a pireno y 1-fluoropireno. Ellos reportan metabolitos tipo pireno-1-glucuronido y pireno-1-sulfato en la bilis de los peces después de la exposición a los PAH. Hellou y Leonard (2004) midieron la bio-acumulación del fenantreno, pireno y fluoranteno en la especie *Salvelinus fontinalis* expuesta a estos contaminantes. Sus reportes mostraron una mayor acumulación para el pireno, aunque obtuvieron diferencias significativas por tejido analizado. Kennedy y Farrell (2005) y Aas *et al.*, (2000) encontraron una inducción de la actividad CYP1A y metabolitos aromáticos en bilis de las especies *Clupea pallasii* y *Gadus morhua* (respectivamente) después de la exposición a petróleo crudo.

### **II.3 Citocromo P450 como biomarcador de xenobióticos**

El sistema CYP450 ha sido ampliamente utilizado como herramienta biológica para monitorear y evaluar el efecto de diferentes xenobióticos en el ambiente. Arinç *et al.*, (1999) encontraron la inducción del CYP1A en las especies *Liza saliens* (pelágica) y *Solea vulgaris* en la bahía Izmir, Turquía. Miller *et al.*, (1999) utilizaron la especie *Trematomus bernacchii* para evaluar zonas adyacentes a la estación científica McMurdo (Antártica). Sus resultados mostraron una inducción de la familia CYP1A y metabolitos aromáticos en bilis de los peces. Cavanagh *et al.*, (2000) también encontraron la inducción de la actividad CYP1A de la especie *Acanthopagrus berda* capturada en tres zonas de Australia reportadas con la presencia de xenobióticos. Barra *et al.*, (2001), utilizaron la especie *Oncorhynchus mykiss* para evaluar zonas del río Biobio en Chile, reportando concentraciones de

metabolitos aromáticos en bilis. Moore *et al.*, (2003) evaluaron la actividad metabólica del CYP1A de 11 especies de peces capturadas en diferentes lugares del mar Caspio, lago Djangari, lago Balkhash y río Ily en Kasakhstan. Ellos capturaron ejemplares de las especies: *Rutilus rutilus*, *Acipenser stellatus*, *A. guldenstaedti*, *Huso huso*, *Neogobius kessleri*, *N. fluviatilis*, *N. melanostomus*, *Benthophilus macrocephalus*, *B. kessleri*, *B. magistri* y *B. stellatus*, encontrando diferencias tanto por zona de muestreo como por especie. Roy *et al.*, (2003) utilizaron la especie *Pleuronichthys verticalis* para evaluar sedimentos de la isla Vista Seep (California) contaminados con PAH. Ellos encontraron un incremento de las actividades CYP1A y los metabolitos biliares del tipo naftaleno, fenantreno y B(a)P en la bilis. Williams *et al.*, (2003) evaluaron las zonas Alde y Tyne en Inglaterra por medio de la inducción de la familia CYP1A en la especie *Platichthys flesus*. Vuontisjärvi *et al.*, (2004) compararon los metabolitos aromáticos biliares de cinco especies (*Perca fluviatilis*, *Platichthys flesus*, *Zoarces viviparus*, *Salmo solar*, *Gadus mohua*) capturadas en el Mar Báltico. Estos autores reportan diferencias estadísticas entre zonas y especies, además de metabolitos biliares del tipo 1-OH pireno y 1-OH fenantreno. Webb *et al.*, (2005) utilizaron la especie *Acanthopagrus butcheri* para evaluar zonas del río Swan-Canning, (Australia), encontrando diferencias estadísticas en la actividad CYP1A y metabolitos aromáticos en bilis para las diferentes zonas analizadas.

## II.4 Exposición de peces a fenol

Roche y Bogé (2000) encontraron que el fenol y otros compuestos hidroxifenoles (resorcinol, hidroquinona y pirocatecol) afectan los niveles de hemoglobina, urea en plasma y fosfatasa alcalina de la especie *Dicentrarchus labrax* expuesta a estos contaminantes. Ellos además mencionan que los compuestos fenólicos hidroxilados presentaron una mayor toxicidad, pudiendo ser producidos a partir del metabolismo del fenol por el CYP450. Hori *et al.*, (2006) reportan que el fenol ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) produjo daños en las proteínas de tejidos de la especie *Brycon cephalus*, modulando las actividades alanina y aspartato aminotransferasas y las concentraciones de amonio y aminoácidos en sangre. Además, disminuyó los niveles

de glucosa, glucógeno y piruvato en el hígado. Abdel-Hameid (2007) también reporta una disminución de glucosa y glucógeno en el hígado de *Oreochromis aureus*, una modulación de las actividades alanina y aspartato amino transferasas en sangre, y daños celulares en hígado, intestino y gónadas. Gad y Saad (2008) encontraron una acumulación del fenol en tejidos de tilapia *Oreochromis niloticus* expuesta a concentraciones de 0.7, 1.4 y 2.8 mg l<sup>-1</sup>, encontrando los mayores niveles en el hígado. Además, el contaminante causó un incremento en lípidos y colesterol en sangre, mostrando daños en membranas y un incremento en la cantidad de micronúcleos celulares, siendo un indicador de daños a ADN. Hori *et al.*, (2008) no encontraron diferencias significativas en los indicadores de estrés: glucosa, cortisol, sodio y potasio en plasma de peces *Brycon amazonicus* expuestos a fenol. Sin embargo, reportan una inducción de las proteínas de shock térmico (hsp 70) de branquias e hígado, afectando las respuestas a estrés de los peces. Además mencionan que el fenol afecta la generación de hormonas esteroidales, y la capacidad osmoreguladora de los peces. Avilez *et al.*, (2008) encontraron cambios en el metabolismo antioxidante de peces *Brycon amazonicus* expuestos a 2 mg l<sup>-1</sup> de fenol en la actividad catalasa y glutatión peroxidasa.

## **II.5 Efectos del brócoli en el metabolismo del CYP450**

Diferentes autores reportan el efecto del brócoli y sus fitoquímicos en la fisiología de los organismos. En este trabajo, dietas conteniendo brócoli o sulforafano fueron administradas a tilapias antes de la exposición a xenobióticos o en combinación con éstos. A pesar de que la información de peces alimentados con brócoli (o la administración de sus fitoquímicos) es muy limitada, una gran cantidad de trabajos han sido realizados en mamíferos (incluyendo al hombre). Mahéo *et al.*, (1997) cultivaron hepatocitos de humano y ratón en diferentes soluciones de sulforafano. Ellos utilizaron las actividades CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2 y CYP3A4 para evaluar el efecto, encontrando que tan sólo CYP1A2 no presentó cambios, mientras que el resto (CYP1A1, 2B1/2 y 3A4) fueron inhibidas

directamente respecto a la dosis. Estos autores concluyen que la quimioprotección contra el cáncer que ha sido relacionada con el sulforafano, puede estar asociada con la inhibición de las actividades CYP450. Lampe *et al.*, (2000) midieron la expresión de CYP1A2 en hombres y mujeres alimentados durante 6 días con una dieta de crucíferos elaborada con rábano, coliflor, brócoli y lechuga morada. Ellos encontraron una inducción significativa de la actividad CYP1A2 después del consumo de estos vegetales. Vang *et al.*, (2001) evaluaron el efecto que tienen las condiciones de cultivo de las plantas sobre la concentración final de compuestos glucosinolados presentes. Ellos expusieron ratones a cuatro tipos de glucosinolados (glucorafanina, glucoiberina, glucosicina y neoglucobrasicina) extraídos de las plantas, y midieron la actividad enzimática CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2, CYP2A1, 2C11 y CYP3A1. De esta manera encontraron que la forma de cultivo de las plantas, influye directamente en la concentración final de los compuestos glucosinolados. Además, los fitoquímicos del brócoli indujeron significativamente la actividad CYP450 mostrando diferencias tanto por familia como por tejido analizado (hígado, riñón y colon). Fahey *et al.*, (2002) reportan que el sulforafano tiene propiedades bactericidas, por lo que realizaron pruebas con la bacteria *Helicobacter pylori*, presente en pacientes con gastritis, úlceras y cáncer del tracto digestivo. Ellos cultivaron colonias de bacterias *H. pylori* con sulforafano, encontrando mortalidades significativas en las colonias. Simultáneamente, alimentaron ratones con dosis de sulforafano, y los expusieron a una concentración del carcinogénico B(a)P (120 mg kg<sup>-1</sup> de peso del ratón). Sus resultados mostraron una disminución significativa de la cantidad de tumores presentes en los ratones alimentados con sulforafano, respecto a los que sólo recibieron el B(a)P. Paolini *et al.*, (2004) alimentaron ratones con glucorafanina, compuesto precursor del sulforafano en el brócoli. Los efectos del fitoquímico fueron medidos con la actividad enzimática CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2, CYP2C11 y CYP3A1/2. Sus resultados mostraron una inducción lineal de todas las actividades CYP respecto a la concentración aplicada. Además, cultivaron células cancerígenas BALB/c 3T3 con glucorafanina (1.0 mg ml<sup>-1</sup>) y B(a)P (2.5 mg ml<sup>-1</sup>) simultáneamente. Sus resultados mostraron que el fitoquímico incrementó seis veces la transformación celular a su forma cancerígena en presencia del B(a)P, por lo que sugieren que más que un quimioprotector, la

glucorafanina puede ser un promotor. Perocco *et al.*, (2006) también administraron glucorafanina en ratas, encontrando una inducción de las familias CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2, CYP2C11 y CYP3A1/2 por efecto de las dosis. Ellos concluyen que la administración de glucorafanina puede incrementar potencialmente el riesgo de cáncer, debido a la inducción de las enzimas que bio-activan contaminantes carcinogénicos. Anwar-Mohamed *et al.*, (2009) cuantificaron el ARNm del CYP1A1 producido en dos líneas celulares hepáticas (humano y ratón) cultivadas con 1 y 40  $\mu\text{M}$  de sulforafano. Además, los autores bloquearon diferentes partes de la ruta de inducción del ARNm de CYP1A1 y que están relacionados con el receptor de hidrocarburos arilo (AhR). Sus resultados mostraron un incremento lineal significativo entre la dosis de sulforafano y la cantidad de ARNm de CYP1A1. Estas inducciones se presentaron entre 1 y 24 h después de la exposición. Además, los bloqueos a la ruta de inducción del ARNm vía AhR, mostraron que el sulforafano es el causante único del incremento en la cantidad de ARNm.

Skupinska *et al.*, (2009) cultivaron células tumorales humanas con sulforafano y dos análogos estructurales de éste: el isotiocianato 2-oxohexil y la alisina. Simultáneamente, las células fueron expuestas a tres concentraciones de B(a)P (0.5, 1 y 2.5  $\mu\text{M}$ ). El efecto fue medido utilizando la actividad metabólica de CYP1A1 y CYP1A2. Ellos encontraron que tanto el sulforafano como sus análogos, inhibieron significativamente las actividades CYP450 inducidas por el contaminante, siendo la alisina la que mayor inhibición presentó.

### **Capítulo III. Justificación**

---

Casi la totalidad de las actividades en acuicultura se desarrollan en zonas costeras o en cuerpos de agua próximos a actividades industriales, agrícolas o urbanas. Desafortunadamente la presencia de contaminantes en estos cuerpos de agua, originados por las actividades humanas, ha ido en aumento en los últimos años. La presencia de contaminantes representa, sin duda, una amenaza para la producción y calidad de organismos. Además, debido a las características fisicoquímicas de algunos contaminantes (como el B(a)P y fenol), los contaminantes pueden ser bio-acumulados en los tejidos de los organismos cultivados y afectar la salud de los consumidores. El uso de compuestos quimioprotectores en la acuicultura (como la inclusión del brócoli en la dieta de los organismos de cultivo), podría disminuir el riesgo de afectación. En este sentido, las dietas ricas en brócoli administradas a los organismos podrían modular la capacidad metabólica del CYP450 (fase I), incrementando la velocidad de excreción de los contaminantes.

## Capítulo IV. Objetivos

---

### IV.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de una dieta rica en brócoli en la modulación de las actividades citocromo P450 dentro de la fase I del metabolismo de xenobióticos de peces tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuestos a benzo(a)pireno y fenol.

### IV.2 Objetivos particulares

- Estudiar el efecto de la dosis de B(a)P en la concentración de metabolitos aromáticos en bilis de tilapias.
- Estudiar el efecto de la temperatura en la concentración de metabolitos aromáticos en bilis, así como el metabolismo hepático de la familia CYP1A2 de tilapias expuestas a una dosis de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (peso del pez) de B(a)P.
- Estudiar el efecto de la alimentación con dietas ricas en brócoli y sulforafano en tilapias expuestas a una dosis de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (peso del pez) de B(a)P por medio del metabolismo hepático de la familia CYP1A1 y la concentración de metabolitos aromáticos en bilis.
- Estudiar el efecto de la alimentación con una dieta rica en brócoli en tilapias expuestas a las concentraciones subletales de 2 y  $20 \text{ mg l}^{-1}$  de fenol, utilizando el perfil de actividades hepáticas de seis familias de citocromo (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4).
- Estudiar el perfil de actividades hepáticas de seis familias de citocromo (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) de tilapias alimentadas durante 60 días con una dieta rica en brócoli contaminada con fenol.

## Capítulo V. Materiales y métodos

---

### V.1. Organismos y reactivos

Tilapias juveniles (*O. niloticus*) entre 5 y 20 cm de longitud total (LT) fueron obtenidas de dos granjas: Acuicultura del Desierto y Sistemas Acuícolas Integrales (Ensenada, Baja California, México).

Los reactivos: acetonitrilo grado HPLC, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido trifluoroacético,  $\beta$ -nicotina-adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH), benzo(a)pireno, 1-hidroxibenzo(a)pireno, cloruro de magnesio, clorzoxazona, hidrobromuro de dextrometorfano, dimetil sulfóxido, DL-sulforaphano, fenacetina, fenol, fosfato de sodio monohidratado, glicerol, inhibidor de tripsina tipo II-S extraído de soya, éter etílico de resorufina, sal sódica de resorufina, sacarosa, trizma HCl, tolbutamida, (S)-(+)-mefenitoina, fueron adquiridos de la compañía Sigma–Aldrich Chemical (San Louis, MO, USA). DL-ditiotreitól (DTT) en solución fue comprada en la compañía Fluka (Buchs, Suiza). El fosfato de sodio dibásico fue adquirido de la compañía Spectrum Chemical (Gardena, CA, USA). El metanol grado HPLC fue adquirido de EMD Chemicals (Darmstadt, Alemania).

### V.2. Exposición a B(a)P en dosis y tiempo

Tilapias juveniles (*O. niloticus*) de  $13 \pm 2$  cm (LT promedio  $\pm 1$  desviación estándar) y  $40 \pm 15$  g (peso promedio) fueron colocadas en seis acuarios de 200 l ( $n=25$  para cada estanque). Los peces fueron acondicionados a una temperatura de 30 °C, recirculación del 20 % diario y alimentados *ad libitum* utilizando alimento comercial (Purina S.A. de C.V., Cd. Obregón, Sonora, México). Después del periodo de acondicionamiento, los peces fueron inyectados intraperitonealmente con 0.1, 1, 10, 50 y 100 mg kg<sup>-1</sup> (peso corporal) de B(a)P disueltos en

DMSO. El volumen de inyección para cada concentración fue 100  $\mu$ l y los controles consistieron en la inyección de 100  $\mu$ l de DMSO solo. Los peces permanecieron en ayuno por lo menos 24 h antes de la inyección y durante todo el experimento. La extracción de la vesícula biliar se realizó en diferentes tiempos después de la exposición: 12, 24, 72, 168 y 336 h, sacrificando cinco peces por cada tiempo en cada concentración. Las vesículas biliares fueron congeladas inmediatamente por medio de hielo seco y almacenadas a -20 °C hasta su análisis. La bilis fue analizada como se describe posteriormente.

### **V.3 Efecto de la temperatura de aclimatación en la respuesta al B(a)P**

Con la finalidad de evaluar el efecto de la temperatura en el metabolismo del B(a)P, tilapias juveniles (*O. niloticus*) de 20 $\pm$ 2 cm (LT promedio) y 160 $\pm$ 35 g (peso promedio) fueron colocadas en nueve acuarios de 200 l (n=7 para cada estanque) y acondicionados por lo menos una semana antes del experimento (temperatura de 25 °C, recirculación diaria del 20 % y alimentación *ad libitum* con alimento comercial Purina S.A. de C.V., Cd. Obregón, Sonora, México). Una vez cumplido el tiempo de acondicionamiento, se varió la temperatura de los estanques a razón de 1 °C al día para obtener las temperaturas finales de 20, 25 y 30°C (cada tratamiento fue realizado por triplicado). Los peces permanecieron en las temperaturas finales durante 14 d. Durante este periodo, a los peces se le administró alimento comercial en razón de 3% del peso corporal diario. Después de 14 d con las temperaturas finales, los peces fueron inyectados intraperitonealmente con 100 mg kg<sup>-1</sup> de B(a)P disuelto en DMSO y sacrificados 72 h después de la inyección. El control del experimento fueron peces sacrificados antes de la exposición a B(a)P (n=3 por estanque). Los peces permanecieron en ayuno 24 h antes de la exposición al B(a)P. Inmediatamente después del sacrificio tanto el hígado como la bilis fueron extraídas, congeladas por medio de hielo seco, y almacenadas a -20 °C hasta su análisis. Reacciones enzimáticas relacionadas con el CYP1A (actividad EROD y MROD) fueron realizadas con las muestras de hígado mientras que se detectó las concentraciones de metabolitos aromáticos en la bilis de los peces. Ambos métodos son descritos a detalle más adelante.

#### **V.4 Efecto del brócoli y su fitoquímico sulforafano en la respuesta al B(a)P**

El efecto quimioprotector del brócoli y su fitoquímico sulforafano fueron evaluados a través de la dieta en un total de 270 tilapias juveniles (*O. niloticus*). Los peces de  $20.6 \pm 0.98$  cm (LT promedio) y  $141 \pm 9.48$  g (peso promedio) fueron colocados en nueve acuarios de 200 l ( $n=30$  para cada acuario) y acondicionados por lo menos una semana antes del experimento. El periodo de acondicionamiento se realizó utilizando una temperatura constante de  $26 \pm 1$  °C, una tasa de recirculación del 20 % diario y una alimentación *ad libitum* utilizando alimento comercial (Purina S.A. de C.V., Cd. Obregón, México). Después del periodo de acondicionamiento, los peces fueron expuestos a tres tratamientos: 1) 30 días de alimentación con una dieta rica en brócoli, 2) 30 días de alimentación con una dieta rica en sulforafano, y 3) 30 días de alimentación con una dieta control. Todos antes de ser sometidos a una inyección intraperitoneal de B(a)P.

Las tres dietas utilizadas: brócoli, sulforafano y control, fueron formuladas para satisfacer los requisitos nutricionales de las tilapias, y contenían la misma cantidad de proteínas, lípidos y vegetales. Tanto los ingredientes, como el porcentaje de ellos para las tres dietas, se describen en la Tabla I. La dieta brócoli fue elaborada con brotes de brócoli comercial cortados en pequeños trozos y puestos a secar a 60 °C durante 24 h. Una vez seco el brócoli, éste fue molido hasta formar una harina. Para el caso de las dietas sulforafano y control el brócoli fue substituido por alfalfa seca, la cual fue molida para formar una harina. A la dieta sulforafano se le adicionó  $0.55 \text{ mg kg}^{-1}$  (dieta) de DL-sulforafano. Una vez obtenidas las harinas de brócoli y alfalfa, éstas se mezclaron con el resto de los ingredientes (Tabla 1) y 50 % agua (volumen/peso) hasta formar una pasta homogénea. Pellets de 3mm fueron hechos con una máquina extrusora (Pasta Maker, Rosito Bisani, Los Angeles Ca, USA), y puestos a secar a 60 °C durante 24 h. Las tres dietas fueron almacenadas a -4 °C hasta su uso.

**Tabla I. Ingredientes y su porcentaje usado para la elaboración de las dietas brócoli, sulforafano y control administradas a la tilapia *O. niloticus* durante 30 días.**

<b>Ingredientes (% peso seco)</b>	<b>Brócoli</b>	<b>Sulforafano</b>	<b>Control</b>
Alfalfa	----	30.0	30.0
Brócoli	30.0	----	----
Harina de pescado	25.0	25.0	25.0
Harina de maíz (Maseca)	15.0	15.0	15.0
Harina de soya	10.0	10.0	10.0
Fécula de maíz (Maizena)	8.8	8.8	8.8
Gelatina	5.0	5.0	5.0
Aceite de maíz	2.5	2.5	2.5
Aceite de pescado	2.0	2.0	2.0
Vitaminas y minerales <sup>a</sup>	1.5	1.5	1.5
Vitamina C (Stay-C <sup>®</sup> )	0.2	0.2	0.2
<b>DL-sulforafano</b>	----	0.55 mg kg <sup>-1</sup> dieta	

<sup>a</sup>Vitaminas y minerales marca Rovimix de DSM productos nutricionales (Suiza)

La alimentación de las tilapias con las tres dietas (brócoli, sulforafano y control) fue durante 30 d, en un porcentaje de 3 % de peso corporal al día. En el día 31, cinco peces de cada dieta fueron sacrificados por medio de un corte cefálico para evaluar el efecto de la dieta (tiempo 0). La vesícula biliar fue extraída y congelada por medio de hielo seco. El resto de los peces recibieron una inyección intraperitoneal de B(a)P (100 mg kg<sup>-1</sup> peso del pez) y fueron sacrificados 12, 24, 36, 48 y 72 h después de la exposición (cinco peces para cada tiempo). Inmediatamente después de cada sacrificio, la vesícula biliar y el hígado fueron extraídos, congelados con hielo seco, y almacenados a -20 °C hasta su análisis. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. A las muestras de hígado se les evaluó la actividad enzimática CYP1A1 (actividad etoxiresorufin O-detilasa, EROD), mientras que en la bilis se cuantificó la concentración de compuestos del tipo aromático. Ambas metodologías son descritas posteriormente.

## **V.5 Efecto del brócoli en la respuesta a dosis sub-letales de fenol**

Un total de 270 tilapias juveniles (*O. niloticus*) de 5.92±0.15 cm (LT promedio) y 3.5±0.35g (peso promedio) fueron colocadas en 18 acuarios de 15 l (n=15 para cada acuario) conectados a un sistema de re-circulación. Los organismos fueron acondicionados

por lo menos una semana antes del experimento, con una temperatura de  $28 \pm 1$  °C, oxigenación constante, fotoperiodo 12:12 h y una alimentación *ad libitum* (alimento comercial Purina S.A. de C.V., Cd. Obregón, México). El experimento consistió en exponer a las tilapias a concentraciones sub-letales de fenol en una forma aguda (disuelta en el medio) y otra crónica (dispersa en la dieta) como se describe a continuación.

La forma aguda de exposición consistió en agregar una dosis sub-letal baja y otra alta de fenol en el acuario de tilapias previamente alimentadas con las dietas brócoli y control. La elaboración de las dietas, con sus ingredientes y concentraciones se describió a detalle en la sección previa V.4 y Tabla I. Las dosis sub-letales alta y baja de fenol fueron determinadas por el método de concentración letal 50 en 48 horas (48h-LC<sub>50</sub>), colocando 6 peces en un acuario de 15 l sin recambio (sistema estático), a una temperatura de  $28 \pm 1$  °C, y oxigenación constantes. Una única dosis de fenol por vez (dosis entre 5 y 30 mg L<sup>-1</sup>) fue agregada al acuario, y la muerte de los organismos fue monitoreada dentro de un periodo de 48 h. Una vez obtenida la 48h-LC<sub>50</sub> (24.5 mg l<sup>-1</sup>), se designaron tanto la dosis baja (2 mg l<sup>-1</sup>) y como la alta (20 mg l<sup>-1</sup>) de fenol. Seis acuarios fueron designados para cada una de las dosis (tres para cada dieta). El experimento comenzó alimentando las tilapias durante 30 días con las dietas respectivas: brócoli y control en una relación del 3 % corporal diario. Las dosis baja y alta de fenol (2 y 20 mg l<sup>-1</sup> respectivamente) fueron agregadas a los acuarios inmediatamente después del periodo de alimentación (día 31) y los organismos fueron sacrificados 0, 12 y 24 h después de la exposición (5 peces para cada periodo de tiempo). El sacrificio se realizó por medio de un corte cefálico extrayendo y congelando inmediatamente el hígado con hielo seco y almacenando las muestras a -80 °C hasta su análisis.

Para la exposición crónica a fenol, las dietas balanceadas: brócoli y control descritas en la sección V.4 y Tabla I fueron rociadas con 30 mg kg<sup>-1</sup> (dieta) de fenol y almacenadas a -4°C hasta su uso (para disminuir la evaporación). Las tilapias de 6 acuarios (tres por dieta) fueron alimentadas durante 60 días con ambas dietas: brócoli y control guardando la relación de 3 % del peso corporal diario. Al término de los 60 días, los peces fueron

sacrificados por medio de corte cefálico y sus hígados extraídos. Los hígados fueron inmediatamente congelados con hielo seco, y almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Tanto las muestras de la exposición aguda como de la crónica fueron analizadas para evaluar el perfil de seis familias de citocromo P450 (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) como se describe posteriormente.

## **V.6 Análisis de metabolitos aromáticos en bilis**

Las muestras de bilis de tilapia obtenidas de cada uno de los tratamientos antes descritos, fueron analizadas por medio de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Las muestras de bilis fueron diluidas 1:100 en 50 % metanol-agua destilada (v/v) de acuerdo con el método propuesto por Ahmad *et al.*, (2004). Las diluciones fueron inyectadas (10  $\mu\text{l}$ ) en un HPLC Agilent 1100 series equipado con un detector de multi-onda Agilent G1365B. La columna utilizada fue ZorbaxSB-C<sub>18</sub> fase reversa (4.6 x 150 mm y tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ). La fase móvil consistió en un gradiente lineal de agua destilada desionizada acidificada y metanol (0-100 %) en un tiempo total de corrida de 15 min. Los metabolitos fueron detectados por fluorescencia utilizando las longitudes de onda 380 nm (excitación) y 430 nm (emisión) específicas para 1-hidroxi pireno. Las cuantificaciones de aromáticos en bilis fueron estimadas con la integración total de los picos obtenidos y reportados como equivalentes 1-hidroxi pireno ( $\mu\text{g}$  de equivalentes  $\text{ml}^{-1}$ ) que fue utilizado como referencia estándar (Gagnon y Holdway, 2002). Diluciones 1-hidroxi pireno entre 0.1 y 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  fueron realizadas con 50 % metanol-agua destilada (v/v) e inyectadas (10  $\mu\text{l}$ ) en el HPLC. Las condiciones de corrida fueron iguales a las utilizadas para la detección de metabolitos aromáticos en bilis.

## V.7 Fracción microsomal

Todas las actividades enzimáticas de las familias CYP450 fueron realizadas utilizando la fracción microsomal hepática. Ésta fracción fue obtenida con base en una modificación de los métodos reportados por Willet *et al.*, (2000) e Iwata *et al.*, (2002). Muestras de hígado (0.5 g) fueron homogeneizadas sobre hielo utilizando 1 ml de la misma solución amortiguadora de extracción fría (Sacarosa 0.125 M, EDTA 1 mM, Tris HCl 50 mM y Ditiotreititol 1mM, pH 7.4). Una vez homogéneas las muestras, éstas se centrifugaron a 12,000 g por 10 min (4 °C) para separar las grasas y los desechos celulares. El sobrenadante fue colectado, cuidando de no extraer la capa superior de grasa o la inferior de desechos, y pasado a tubos de ultracentrífuga que contenían 15 ml de solución amortiguadora de extracción. Las muestras fueron ultracentrifugadas a 105,000 g por 90 min a 4 °C (Beckman Coulter Optima L-90K Ultracentrifuge, rotor SW28). Posteriormente, el sobrenadante fue decantado y el pellet formado en el fondo (fracción microsomal) fue resuspendido con solución amortiguadora de fosfatos (100 mM pH 7.4) que contenía 20 % (v/v) de glicerol (Cavanagh *et al.*, 2000). Para cada muestra se determinó la concentración de proteína soluble total utilizando el kit de ensayos de proteína (Bio-Rad), basado en la determinación de Bradford (1976). Para la cuantificación, se realizó una curva estándar de proteína de albumina de bovino siguiendo las especificaciones del fabricante.

## V.8 Reacciones enzimáticas CYP450

Una vez obtenida la fracción microsomal, esta fue utilizada para evaluar las actividades enzimáticas de las distintas familias del CYP450. Las reacciones fueron realizadas utilizando sustratos específicos para cada familia. La Tabla II muestra los diferentes sustratos, así como la reacción y el producto específico de cada familia de CYP utilizada.

**Tabla II. Sustratos, reacciones y productos específicos para cada familia de CYP450 utilizadas en los diferentes experimentos con tilapias (*O. niloticus*). Tabla modificada de Zhang *et al.*, (2005).**

<b>Familia CYP</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Reacción</b>	<b>Producto</b>
<b>CYP1A1</b>	Resorufina, etil éter	<i>O</i> -deetilación (EROD)	Resorufina
<b>CYP1A2</b>	Resorufina, metil éter	<i>O</i> -deetilación (MROD)	Resorufina
<b>CYP1A2</b>	Fenacetin	<i>O</i> -deetilación	Acetaminofeno
<b>CYP2C9</b>	Tolbutamida	4-hidroxilación	4-Hidroxytolbutamida
<b>CYP2C19</b>	S-Mefenitoina	4'-hidroxilación	4'-Hidroximefenitoina
<b>CYP2D6</b>	Dextrometorfano	<i>O</i> -demetilación	Dextrofrano
<b>CYP2E1</b>	Clorzoxazona	6-hidroxilación	6-Hidroxiclorzoxazona
<b>CYP3A4</b>	Testosterona	6 $\beta$ -hidroxilación	6 $\beta$ -Hidroxitestosterona

La familia CYP1A1 fue evaluada por medio de la actividad etoxiresorufin *O*-detilasa (EROD) usando una modificación del método propuesto por Burke y Mayer (1974). Las reacciones fueron realizadas utilizando solución amortiguadora tris (50 mM pH 7.2), 50  $\mu$ M de etil éter de resorufina y 150  $\mu$ g de microsomas en 500  $\mu$ l totales ajustados con agua destilada. Las reacciones iniciaron cuando se adicionaron 2.8 mM de NADH, mezclándose durante 30 s e incubándose a 37 °C durante 30 min. El blanco de las reacciones fue realizado con todo excepto microsomas. Después del periodo de incubación, las reacciones fueron detenidas con 500  $\mu$ l de metanol frío, y centrifugadas a 6000 g por 20 min (4 °C). El sobrenadante fue recuperado e inyectado en el HPLC para su cuantificación tal y como se describe posteriormente.

La familia CYP1A2 fue evaluada por medio de dos sustratos: metil éter de resorufina (en la actividad metoxiresorufin *O*-detilasa MROD) y con el fenacetin. La reacción MROD fue realizada de manera similar a la descrita para la actividad EROD, substituyendo únicamente el sustrato (etil éter de resorufina) por 5  $\mu$ M de metil éter de resorufina.

La evaluación de la familia CYP1A2 con el sustrato fenacetín, se realizó de manera simultánea con otros cinco sustratos específicos para las familias: CYP2C9 (Tolbutamida),

CYP2C19 (S-mefenitoina), CYP2D6 (Dextrometorfano), CYP2E1 (Clorzoxazona) y CYP3A4 (Testosterona) (Tabla II). Las reacciones fueron realizadas con ligeras modificaciones de acuerdo a lo propuesto por Zhang *et al.*, (2005). Las reacciones contenían solución amortiguadora de fosfatos (50 mM pH 7.4), 200 µg de microsomas, y MgCl (10 mM). Además se adicionaron 50 nmol de fenacetín, clorzoxazona y tolbutamida, 450 nmol de S-mefenitoina, 300 nmol de dextrometorpano y 200 nmol de testosterona en 500 µl totales de reacción (ajustados con agua destilada). Las reacciones comenzaron cuando se adicionó 1.2 mM de NADPH, agitadas durante 30 s, e incubadas durante 30 min a 37°C. El blanco de reacción contenía todo excepto microsomas. Después del tiempo de incubación, 250 µl de acetonitrilo fue adicionado para detener la reacción y las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 min (4 °C). Los sobrenadantes fueron recuperados e inyectados al HPLC como se describe más adelante.

## **V.9 Determinación de las diferentes actividades CYP450 por HPLC**

Todas las reacciones enzimáticas CYP450 fueron evaluadas a través de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con las siguientes características.

Las actividades EROD y MROD de las familias CYP1A1 y CYP1A2 (respectivamente) fueron analizadas inyectando 50 µl en un HPLC 1100 series conectado a un detector de fluorescencia Agilent G1321A y usando una columna analítica fase reversa Zorbax SB-C8 (4.6 X 150 mm y 5 µM de tamaño de partícula). La fase móvil consistió en la mezcla de 52% de solución amortiguadora de fosfatos (200 mM pH 6.8), 45% de metanol-agua destilada (70% v/v) y 3% de acetonitrilo. El tiempo total de corrida fueron 14 min, con 3 min entre corridas para equilibrar la columna. El flujo fue de 0.8 ml por min. Las detecciones se realizaron con las longitudes de onda de 560 nm (excitación) y 585 nm (emisión). La actividad enzimática fue determinada usando una curva estándar de sal sódica de resorufin (µmol de sustrato transformado por minuto).

Las reacciones que contenían simultáneamente los sustratos de las familias CYP1A2 (fenacetin), 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4 fueron inyectadas (50  $\mu$ l) en un HPLC Perkin Elmer 2001c series equipado con un detector de arreglo de diodos Perkin Elmer 235c. Los análisis se realizaron a 225 nm de longitud de onda, y con una columna fase reversa Supelcosil<sup>TM</sup> LC-18 (5 cm x 4.6 mm y 5  $\mu$ M de tamaño de partícula). Para la fase móvil se utilizaron agua destilada con 0.1 % de ácido trifluoroacético (TFA) como solvente A y acetonitrilo con 0.1 % TFA como solvente B. El programa de elución consistió en 5 minutos de solvente A (100 %), seguido por un gradiente con 8 min de solvente B (25 %), 5 min de solvente B (60 %) y 5 min de solvente B (50 %). La actividad enzimática es reportada como nmol de sustrato consumido por minuto por miligramo de proteína microsomal.

## **V.10 Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Minitab<sup>®</sup> 15.1.0.0. Las comparaciones entre tratamientos se realizaron de forma paramétrica (cuando los supuestos de las pruebas fueron cumplidos) y no paramétricas. Los análisis paramétricos utilizados fueron: análisis de varianza, y prueba de Tukey para los análisis pareados. Las pruebas no paramétricas fueron Kruskal-Wallis utilizando una bondad de ajuste de  $\chi^2$  para las comparaciones pareadas. En todas las pruebas se consideró un valor de significancia  $\alpha=0.05$ .

## Capítulo VI. Resultados

---

### VI.1 Efecto de la dosis y el tiempo de exposición a B(a)P en la concentración de metabolitos aromáticos en bilis

Se evaluó la concentración de aromáticos presentes en la bilis de tilapias juveniles (medidos como equivalentes 1-OH pireno) inyectadas intraperitonealmente con 0.1, 1, 10, 50 y 100 mg kg<sup>-1</sup> de B(a)P (peso corporal) y se sacrificaron 12, 24, 72, 168 y 336 h después de la inyección. El control del experimento fueron peces inyectados con el vehículo acarreador (DMSO). Los resultados son presentados en la Figura 1 y Tabla III.

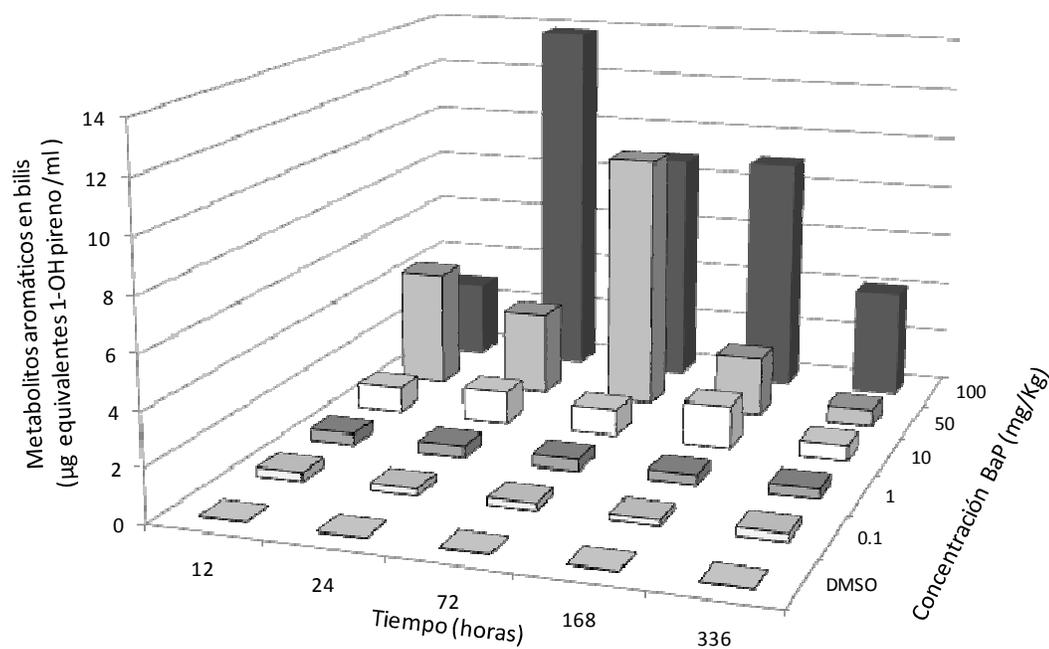
En los peces control (inyectados sólo con el vehículo DMSO) no se detectaron compuestos aromáticos en bilis.

El análisis por dosis mostró una relación directa entre el B(a)P inyectado y la concentración de aromáticos presentes en la bilis, encontrando los valores mínimos para las concentraciones de 0.1 y 1 mg kg<sup>-1</sup> e incrementándose linealmente hasta los máximos en las concentraciones 50 y 100 mg kg<sup>-1</sup>. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas para las dosis altas de 50 y 100 mg kg<sup>-1</sup>, respecto a las dosis 0.1, 1 y 10 mg.

En cuanto al tiempo después de la inyección, las concentraciones 0.1 y 1 mg kg<sup>-1</sup> B(a)P no presentaron diferencias significativas ni por tiempo ni por concentración. Los peces inyectados con 10 mg kg<sup>-1</sup> presentaron concentraciones más altas de aromáticos en bilis, con valores similares para todos los tiempos, y con un ligero incremento para las 168 h. Sin embargo, a pesar de esta tendencia, no se observaron diferencias significativas para esta dosis respecto a 0.1 y 1 mg kg<sup>-1</sup> B(a)P.

La inyección con  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  mostró un máximo de metabolitos biliares después de 72 h, mostrando diferencias significativas respecto a los otros tiempos. Cabe señalar que la concentración de aromáticos comenzó su disminución después de este tiempo (72 h).

Los peces inyectados con  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  presentaron un incremento significativo a partir de las 12 h después de la exposición, mostrando su valor máximo 24 h después, y disminuyendo linealmente después de éste tiempo. A pesar de esta disminución a las 336 h, el valor de metabolitos biliares permaneció significativamente alto respecto a las otras concentraciones.



**Figura 1.** Equivalentes 1-hidroxipireno calculados a partir de los metabolitos aromáticos presentes en la bilis de tilapias inyectadas intraperitonealmente con B(a)P ( $0.1, 1, 10, 50$  y  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  peso del pez) disuelto en DMSO (control) y sacrificados 12, 24, 72, 168 y 336 h después de la inyección.

**Tabla III. Promedio ( $\pm$ desviación estándar) de los equivalentes 1-hidroxipireno calculados a partir de los metabolitos aromáticos encontrados en la bilis de la tilapia *O. niloticus* inyectada intraperitonealmente con B(a)P (0.1, 1, 10, 50 y 100 mg kg<sup>-1</sup> peso del pez) disuelto en DMSO (control) y sacrificada 12, 24, 72, 168 y 336 h después de la inyección.**

Concentración (mg kg <sup>-1</sup> peso pez)	Tiempo (horas) después de la inyección con B(a)P				
	12	24	72	168	336
<b>0.1</b>	0.33( $\pm$ 0.016)	0.25( $\pm$ 0.032)	0.25( $\pm$ 0.024)	0.21( $\pm$ 0.028)	0.29( $\pm$ 0.017)
<b>1</b>	0.43( $\pm$ 0.027)	0.45( $\pm$ 0.013)	0.44( $\pm$ 0.047)	0.37( $\pm$ 0.017)	0.38( $\pm$ 0.031)
<b>10</b>	0.97( $\pm$ 0.056)	1.24( $\pm$ 0.050)	1.01( $\pm$ 0.074)	1.60( $\pm$ 0.065)	0.59( $\pm$ 0.031)
<b>50</b>	4.45( $\pm$ 0.241)	3.19( $\pm$ 0.235)	9.74( $\pm$ 1.159)	2.24( $\pm$ 0.456)	0.64( $\pm$ 0.131)
<b>100</b>	2.94( $\pm$ 0.344)	13.84( $\pm$ 0.291)	8.90( $\pm$ 0.197)	9.02( $\pm$ 0.031)	4.11( $\pm$ 0.099)

## VI.2 Efecto de la temperatura de aclimatación sobre la concentración de metabolitos aromáticos en bilis y actividades CYP450

El efecto de la temperatura en el metabolismo del B(a)P fue evaluado en tilapias juveniles aclimatadas durante 14 d a 20, 25 y 30°C e inyectados con 100 mg kg<sup>-1</sup> de B(a)P (peso del pez). La Figura 2 muestra los equivalentes 1-hidroxi pireno calculados a partir de los metabolitos aromáticos encontrados en la bilis de los peces. Los peces control (peces sacrificados antes de la inyección con B(a)P) no presentaron concentraciones de compuestos aromáticos detectables. En cuanto a los peces inyectados con B(a)P, fueron encontradas diferencias significativas entre temperaturas, mostrando los valores mínimos de 1-hidroxi pireno, para los 25 °C y máximos para los 30 °C. La temperatura de 20 °C no mostró diferencias estadísticas respecto al tratamiento a 30 °C (con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ ).

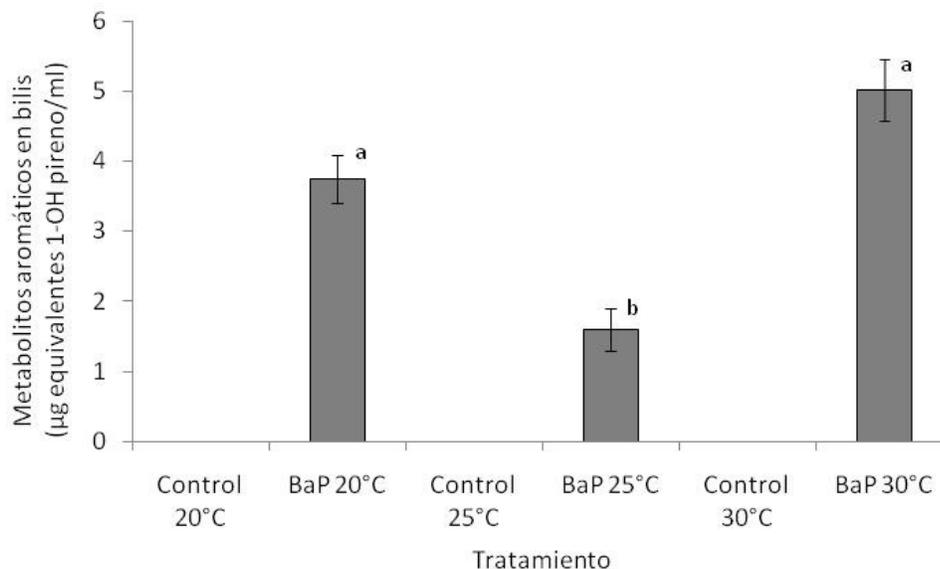
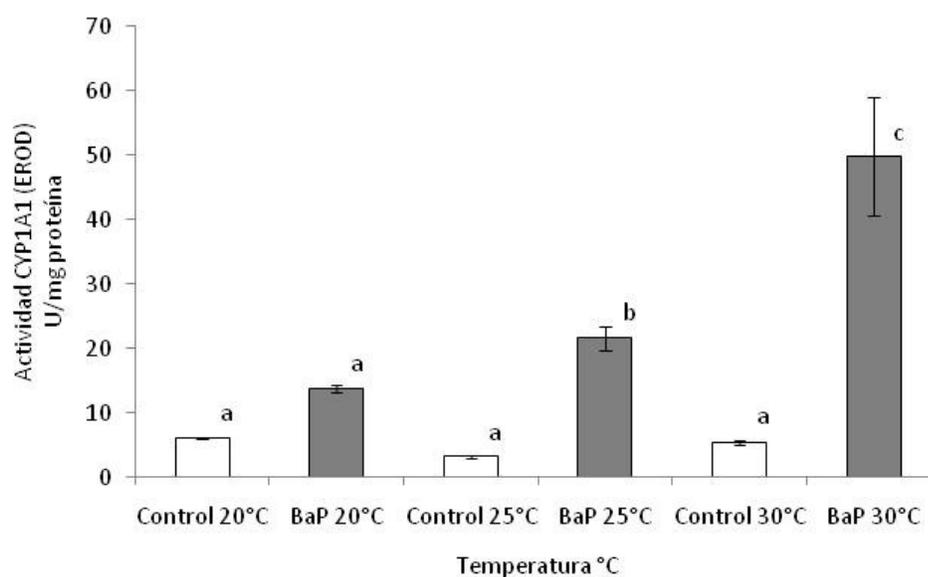


Figura 2. Equivalentes 1-hidroxi pireno (promedio  $\pm$  1 desviación estándar) calculados a partir de los metabolitos aromáticos presentes en la bilis de tilapias aclimatadas durante 14 d a 20, 25 y 30 °C e inyectadas intraperitonealmente con 100 mg kg<sup>-1</sup> (peso del pez) de B(a)P. Los peces fueron sacrificados 0 (control) y 72 h después de la inyección. Las letras denotan diferencias estadísticas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

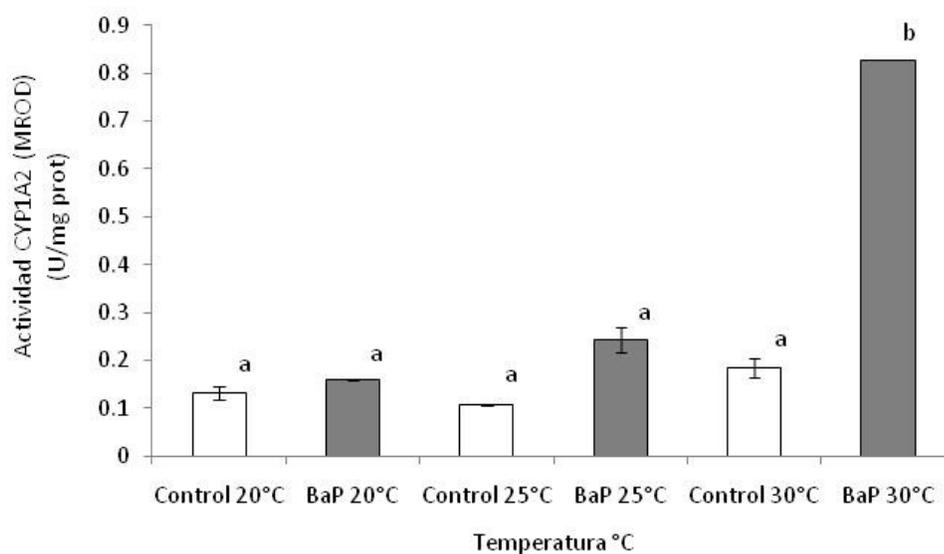
Los efectos de las temperaturas y del B(a)P fueron monitoreados por medio de las actividades enzimáticas EROD y MROD, relacionadas con los CYP450 de la familia 1A en muestras de hígado.

En cuanto a la actividad EROD (CYP1A1), la Figura 3 muestra que las temperaturas de aclimatación (20, 25 y 30 °C) no tuvieron efectos significativos en la actividad EROD de los peces control (sacrificados antes de la inyección con B(a)P), sin embargo, el tratamiento con el xenobiótico presentó un incremento significativo de la actividad para las temperaturas de 25 y 30 °C. Cabe señalar que este incremento en la actividad fue lineal respecto a la temperatura de aclimatación, presentando la máxima actividad los peces de 30°C.



**Figura 3.** Actividad enzimática (promedio  $\pm$  1 desviación estándar) de la familia CYP1A1 (EROD  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ ) de muestras hepáticas de tilapias aclimatadas durante 14 días a 20, 25 y 30°C e inyectadas intraperitonealmente con  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (peso del pez) de B(a)P. Los peces fueron sacrificados 0 (control) y 72 horas después de la inyección. Las letras denotan diferencias estadísticas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

La Figura 4 muestra la actividad enzimática MROD relacionada con el CYP1A2. Esta actividad no mostró diferencias estadísticas entre los tratamientos (temperaturas y B(a)P), con la excepción de los peces aclimatados a 30 °C e inyectados con B(a)P que mostraron un incremento significativo de la actividad respecto al control (peces sacrificados antes de la inyección) y las otras temperaturas (20 y 25 °C).



**Figura 4.** Actividad enzimática (promedio  $\pm$  1 desviación estándar) de la familia CYP1A2 (MROD  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) de muestras hepáticas de tilapias aclimatadas durante 14 d a 20, 25 y 30 °C e inyectadas intraperitonealmente con  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (peso del pez) de B(a)P. Los peces fueron sacrificados 0 (control) y 72 h después de la inyección. Las letras denotan diferencias estadísticas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ )

### **VI.3 Efecto de las dietas ricas en brócoli y sulforafano sobre la concentración de metabolitos aromáticos en bilis y actividades CYP1A1 después de la exposición a B(a)P**

Como se menciona a detalle en la sección V.4, peces tilapias fueron alimentados durante 30 días con dietas que incluían 30% brócoli y sulforafano y expuestos a una dosis de 100 mg kg<sup>-1</sup> de B(a)P. Los efectos tanto de las dietas, como del B(a)P, fueron evaluadas por medio de la actividad EROD (relacionada con la CYP1A1) y la concentración de aromáticos en bilis (Figs. 5 y 6, respectivamente).

Los efectos de las dietas brócoli y sulforafano, fueron evaluados antes de la exposición al B(a)P, (Fig. 5, tiempo 0). La incorporación del brócoli y sulforafano en las dietas, produjo una inducción de la actividad CYP1A1 en los organismos, sin embargo, sólo la dieta sulforafano presentó diferencias significativas respecto a la dieta brócoli y control (Fig. 5).

Doce horas después de la inyección con B(a)P, la actividad CYP1A1 fue inducida significativamente en las tres dietas (respecto al tiempo 0), con la máxima actividad para la dieta sulforafano y diferencias significativas respecto a las otras dietas (que no presentaron diferencias estadísticas entre ellas) (Fig. 5).

Cabe señalar que el tiempo de muestreo 24 h, presentó actividades CYP1A1 similares a las observadas para el tiempo 0 h (sin diferencias estadísticas) para los tres tratamientos: brócoli, sulforafano y control. Cabe señalar que esta disminución no se observó en los metabolitos aromáticos de bilis, por lo que fue considerado un error en el método, y omitido de la Figura 5. El tiempo 36 h, mostró una disminución significativa en las dietas sulforafano y control (respecto al tiempo 12 h), mientras que la dieta brócoli mostró un ligero incremento en la actividad CYP1A1, pero sin diferencias estadísticas respecto al tiempo 12 h (Fig. 5).

Los tiempos 48 y 72 h, mostraron una disminución significativa de la actividad CYP1A1 para las tres dietas (respecto al tiempo 36 h), mostrando valores similares a los encontrados para el tiempo 0 (niveles basales) (Fig. 5).

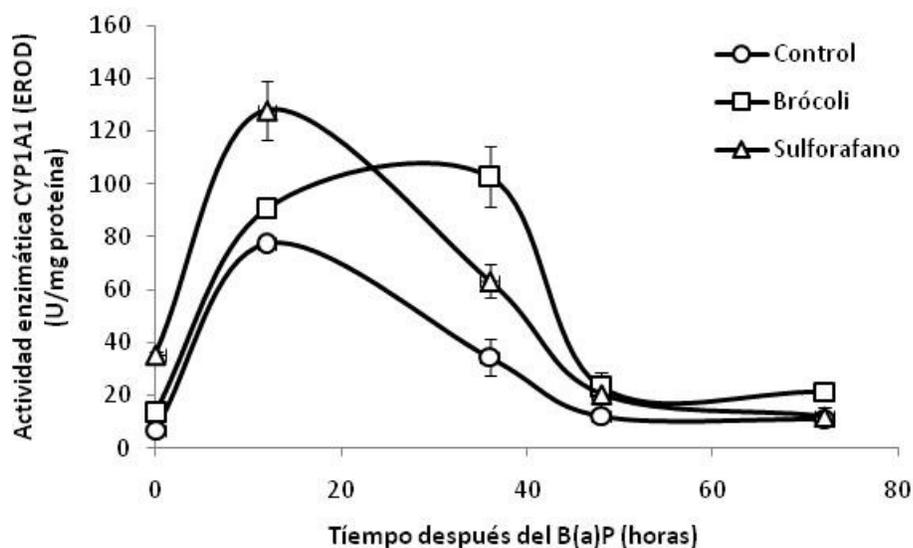


Figura 5. Actividad enzimática CYP1A1 (promedio  $\pm$  1 desviación estándar) obtenida de muestras hepáticas de tilapias alimentadas durante 30 d con las dietas brócoli, sulforafano y control e inyectadas intraperitonealmente con B(a)P ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  peso del pez). Los peces fueron sacrificados 0, 12, 24, 36, 48 y 72 h después de la inyección. Figura publicada en Villa-Cruz *et al.*, (2009). Las letras denotan diferencias estadísticas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

La Figura 6 muestra los equivalentes 1-hidroxipireno calculados a partir de los compuestos aromáticos presentes en la bilis de las tilapias expuestas a B(a)P después de la alimentación con brócoli, sulforafano y control.

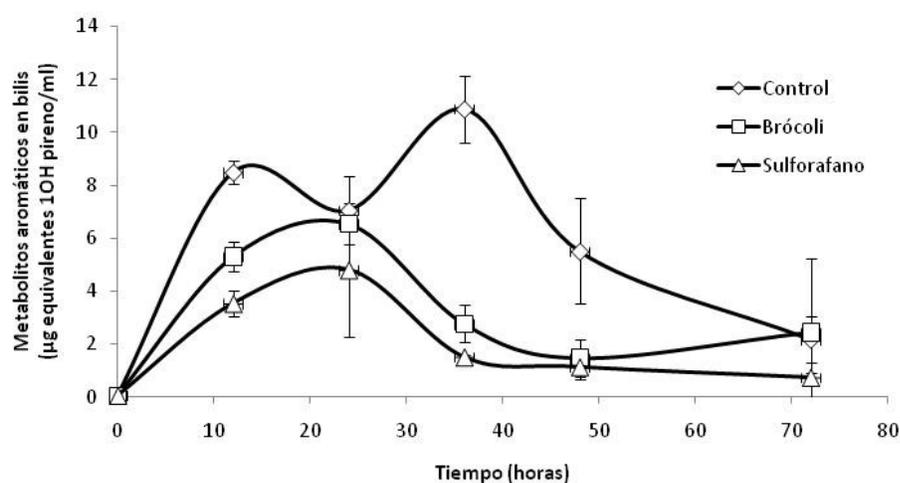
El tiempo 0 (antes de la inyección con B(a)P) no mostró concentraciones de aromáticos detectables. Doce horas después de la inyección con B(a)P, la cantidad de compuestos aromáticos encontrados en bilis se incrementó significativamente para las tres dietas, mostrando la máxima concentración para la dieta control con diferencias estadísticas respecto a las otras dietas (brócoli y sulforafano) que no mostraron diferencias entre ellas (Fig. 6).

Después de 24 h, las concentraciones de aromáticos encontradas en bilis, no fueron estadísticamente diferentes a las cuantificadas para 12 h, además de no presentar diferencias significativas entre dietas (Fig.6.).

El muestreo de las 36 h posteriores a la inyección de B(a)P mostró diferencias entre dietas, con una disminución significativa en las dietas brócoli y sulforafano, respecto a la dieta control que presentó un incremento significativo de su nivel respecto al tiempo 24 h. Cabe señalar que las dietas brócoli y sulforafano no presentaron diferencias estadísticas entre ellas (Fig. 6.).

Una disminución significativa de la dieta control, fue obtenida después de 48 h. A pesar de que esta dieta presentó una menor cantidad de aromáticos, su concentración permaneció significativamente mayor respecto a la dieta brócoli y sulforafano, mismas que presentaron valores similares (sin diferencias estadísticas) a los encontrados para las 36 h.

A las 72 h de muestreo, las tilapias de la dieta control presentaron una disminución significativa (respecto a las 48 h) en concentración de aromáticos, presentando valores estadísticamente similares a los peces de las dietas brócoli y sulforafano. Cabe señalar que no se tuvieron diferencias estadísticas en estos tratamientos respecto al anterior tiempo de muestreo (48 h) (Fig. 6).



**Figura 6:** Equivalentes 1-OH pireno (promedio  $\pm$  1 desviación estándar), calculados a partir de los metabolitos aromáticos presentes en la bilis de tilapias alimentadas durante 30 días con brócoli, sulforafano y control e inyectadas intraperitonealmente con B(a)P ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  peso del pez). Los peces fueron sacrificados 0, 12, 24, 36, 48 y 72 h después de la inyección. Figura publicada en Villacruz *et al.*, (2009). Las letras denotan diferencias estadísticas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

## **VI.4 Efecto de las dietas ricas en brócoli sobre las actividades CYP450 después de la exposición a fenol**

Para evaluar el efecto quimioprotector del brócoli en presencia del xenobiótico fenol, tilapias juveniles fueron alimentadas con una dieta rica en brócoli y una dieta control elaborada con alfalfa (Tabla I), y expuestas a una concentración de 2 y 20 mg l<sup>-1</sup> de fenol (Figs 7 y 8, respectivamente). Los efectos tanto de la dieta con brócoli como del xenobiótico fueron evaluados por medio de la actividad enzimática de seis familias de citocromo P450 (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, y 3A4) (Tabla I).

El efecto de la dieta enriquecida con brócoli sobre el perfil de CYP450 antes de la exposición al fenol (tiempo 0), indujo significativamente la actividad enzimática en las familias CYP1A2, 2E1 e inhibió la actividad CYP3A4 respecto a la dieta control. El perfil de CYP450 presentó diferencias significativas de su actividad (inducción/inhibición) respecto a la administración y dosis de fenol (Figs. 7 y 8).

La dosis baja de fenol tuvo efectos en las actividades CYP450, de cada dieta (brócoli y control). La actividad CYP1A2 presentó una inhibición significativa con ambas dietas después de la exposición. Esta inhibición estuvo presente a las 12 h después de la exposición, con una recuperación de la actividad para las 24 h sólo en el caso de la dieta con brócoli. La dieta control permaneció inhibida hasta las 24 h (Fig. 7).

Al igual que para CYP1A2, la dosis baja de fenol inhibió significativamente la actividad CYP2E1. Esta inhibición se observó para ambas dietas en los dos tiempos de muestreo (12 y 24 h), sin diferencias estadísticas entre dietas y tiempo (Fig. 7).

La actividad CYP2C9 presentó cambios significativos en el tiempo. Para el muestreo de las 12 h, sólo la dieta control presentó una inducción significativa respecto al T0. En el tiempo

24 h, la actividad mostró un incremento para la dieta brócoli, con diferencias significativas respecto a la dieta control y los otros tiempos (Fig. 7).

Una inducción significativa en la actividad CYP2D6 fue observada para la dieta brócoli doce horas después de la exposición a fenol (diferencias estadísticas respecto al T0). Sin embargo, cambios en la actividad enzimática de esta familia fueron observados 24 h después de la exposición, mostrando la inducción significativa de la dieta control (diferencias estadísticas respecto a los otros tratamientos), y el regreso a los niveles basales para la dieta brócoli (Fig. 7).

La exposición a la dosis baja de fenol presentó un incremento lineal de la actividad CYP2C19 a través del tiempo. Un incremento significativo (respecto al T0) fue observado 12 h después, para las dietas control y brócoli sin diferencias estadísticas entre ellas. De forma similar, las 24 h se evidenció un incremento de la actividad de las enzimas para ambas dietas, siendo estadísticamente mayor para la dieta control, respecto a la de brócoli (Fig. 7).

La dosis de 2 mg L<sup>-1</sup> de fenol no presentó diferencias estadísticamente significativas en la actividad CYP3A4, presentando desviaciones estándar muy amplias en cada tratamiento (Fig. 7).

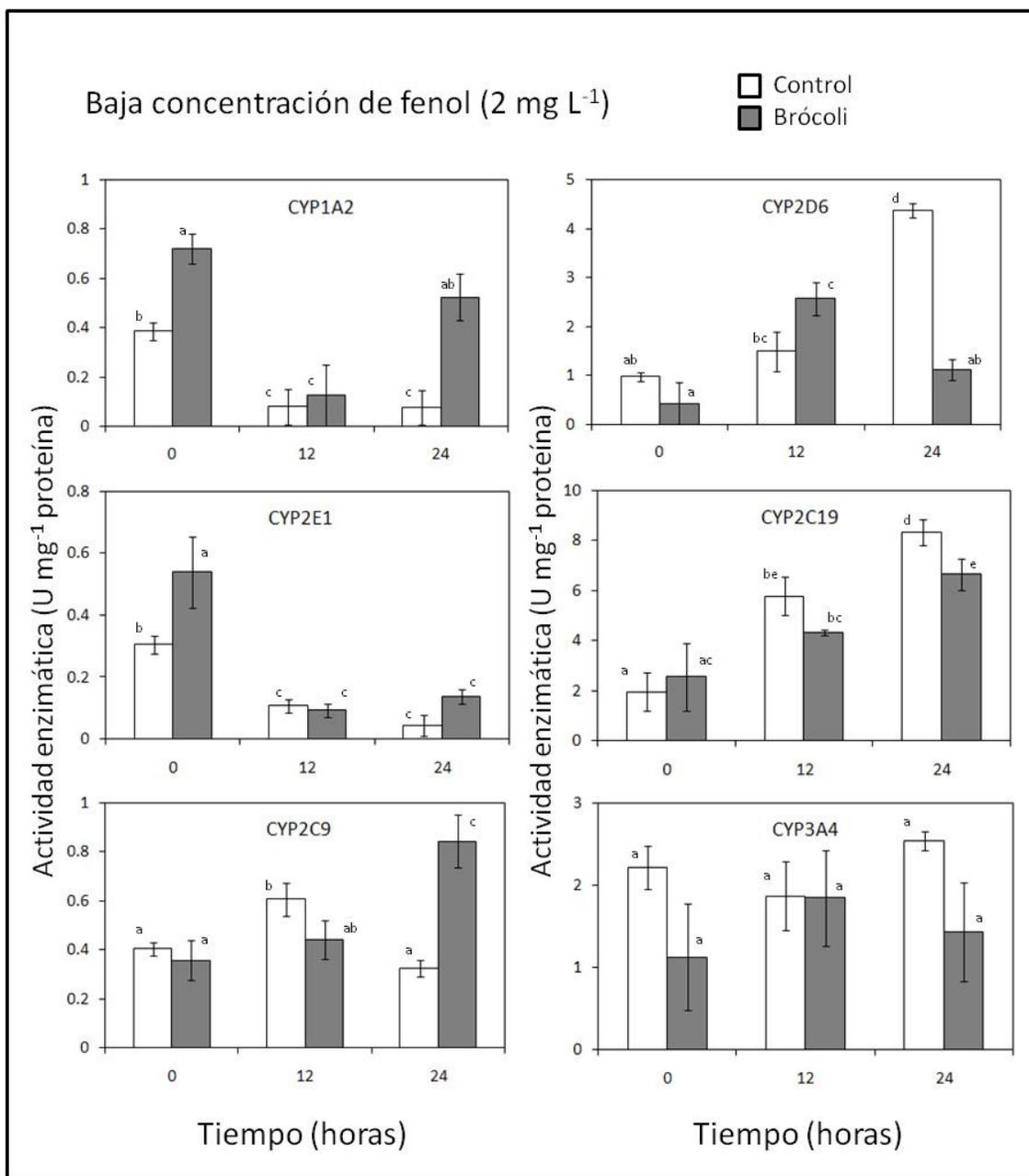
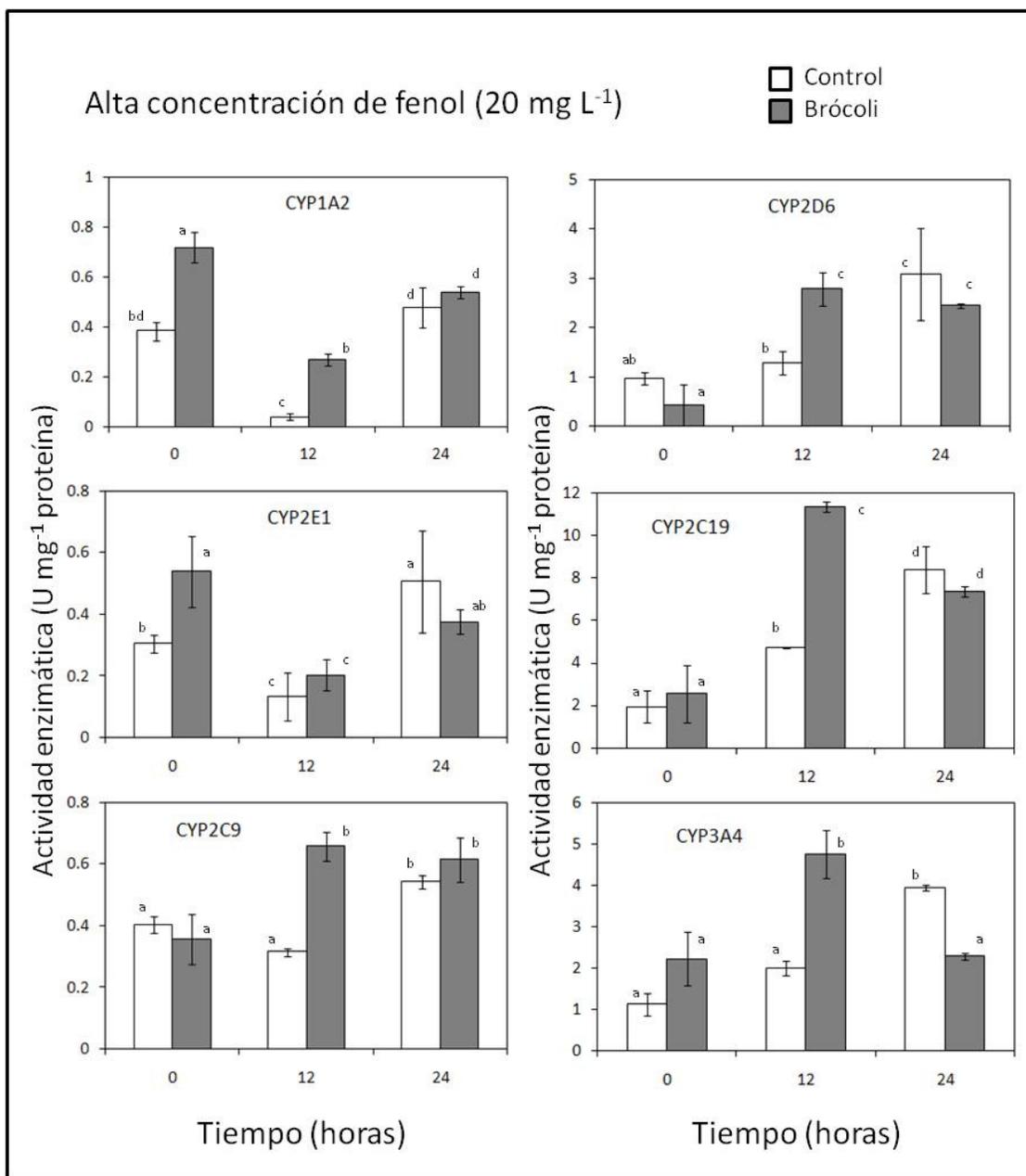


Figura 7. Actividad enzimática hepática promedio ( $\pm 1$  desviación estándar) de las familias CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4 ( $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  proteína) de tilapias alimentadas durante 30 d con las dietas: brócoli (30 %) y control, y expuestas a una concentración baja de fenol ( $2 \text{ mg l}^{-1}$ ). Los peces fueron sacrificados 0, 12 y 24 h después de la exposición a fenol. Las letras denotan diferencias estadísticas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

Los efectos de la dosis alta de fenol ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ), son mostrados para cada una de las actividades en la Figura 8. En cuanto al CYP1A2, el fenol produjo una inhibición de la actividad para ambas dietas para el tiempo 12 h (siendo mayor para la dieta control), y presentando diferencias estadísticas entre dietas y tiempos. Para el tiempo 24 h, se observó un incremento de la actividad para ambas dietas (sin diferencias significativas entre ellas), mostrando valores similares a los basales (Fig. 8). La actividad CYP2E1 también presentó una inhibición significativa para las dos dietas (control y brócoli) 12 h después de la exposición. Después de 24 h, la actividad tuvo un incremento significativo (respecto al tiempo 12 h) regresando a los valores basales (Fig. 8).

La dosis alta de fenol indujo la actividad CYP2C9 de la dieta brócoli, con diferencias significativas respecto a la dieta control y el T0 (antes del fenol). Para el tiempo 24 h, la dieta control presentó una inducción en la actividad enzimática, presentando valores similares (sin diferencias estadísticas) a los presentados por la dieta brócoli tanto en 12 como en 24 h (Fig. 8). La actividad CYP2D6 presentó un incremento estadístico (respecto al T0), sólo para la dieta brócoli después de 12 h. La dieta control mostró un incremento significativo a las 24 h, presentando valores similares (sin diferencias estadísticas) respecto a la dieta brócoli del tiempo 12 y 24 h (Fig. 8).

Un incremento significativo de la actividad CYP2C19 fue obtenido para las dietas brócoli y control en el tiempo 12 h, con los mayores valores para la dieta brócoli. Para las 24 h, la dieta control mostró un incremento significativo de su actividad enzimática (respecto a las otras horas), mientras que la dieta brócoli disminuyó sus niveles, presentando diferencias significativas respecto al tiempo 12 h, y valores similares a los de la dieta control 24 horas (sin diferencias estadísticas entre ellas) (Fig. 8). La actividad CYP3A4 mostró un incremento significativo de la dieta brócoli después de la exposición a la dosis alta de fenol (después de 12 h). Para las 24 h, la dieta control mostró un incremento, mientras que la dieta brócoli mostró una disminución de la actividad, regresando a los niveles basales (antes de la exposición al fenol T0) (Fig. 8).



**Figura 8.** Actividad enzimática hepática promedio ( $\pm 1$  desviación estándar) de las familias CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4 ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) de tilapias alimentadas durante 30 d con las dietas: brócoli (30%) y control, y expuestas a una concentración alta de fenol (20 mg l<sup>-1</sup>). Los peces fueron sacrificados 0, 12 y 24 h después de la exposición a fenol. Las letras denotan diferencias estadísticas entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ).

La Tabla IV muestra la actividad enzimática de las diferentes familias CYP450 alimentadas durante 60 d con las dietas brócoli y control (alfalfa), rociadas con una concentración de fenol ( $30 \text{ mg kg}^{-1}$  de dieta). El efecto del fenol y brócoli fue monitoreada con la actividad enzimática de seis familias de citocromo.

Los peces alimentados con brócoli rociado con fenol, presentaron la inhibición significativa de la actividad CYP2C19, 2D6 y 3A4, y el incremento significativo de la familia CYP2C9. A pesar de que las actividades CYP1A2 y 2E1 fueron ligeramente más altas para la dieta brócoli-fenol, ésta no presentó diferencias significativas respecto al control (alfalfa-control).

**Tabla IV. Actividad enzimática ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína) de las familias CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4 en muestras hepáticas de tilapias (*O. niloticus*) alimentadas durante 60 días con las dietas preparadas brócoli y control rociadas con 30 mg de fenol por kilogramo de dieta.**

Citocromo P450	Actividad Enzimática ( $\text{U mg}^{-1}$ proteína)	
	Control	Brócoli
<b>CYP1A2</b>	0.51 ( $\pm 0.15$ )	0.85 ( $\pm 0.01$ )
<b>CYP2D6</b>	6.05 ( $\pm 0.18$ )*	0.72 ( $\pm 0.32$ )
<b>CYP2E1</b>	0.59 ( $\pm 0.15$ )	0.78 ( $\pm 0.21$ )
<b>CYP2C19</b>	12.44 ( $\pm 2.77$ )*	1.54 ( $\pm 1.68$ )
<b>CYP2C9</b>	0.01 ( $\pm 0.01$ )	0.44 ( $\pm 0.15$ )*
<b>CYP3A4</b>	7.90 ( $\pm 1.32$ )*	1.74 ( $\pm 0.57$ )

## Capítulo VII. Discusión

---

El principal problema de las pesquerías mundiales es la sobreexplotación. Para el 2007, la Organización Mundial de Agricultura y Pesquerías (FAO) reportaron que el 80 % de las poblaciones se encontraron en el límite máximo permisible y/o sobre explotados (FAO, 2009). Al mismo tiempo que las capturas pesqueras declinan, la acuicultura se ha consolidado como el sector de producción animal con mayor crecimiento en la última década, colocándose como una solución real a las demandas alimenticias mundiales. Datos calculados por la FAO para 2006, reportan una producción aproximada de 51.7 millones de toneladas de peces, crustáceos y bivalvos siendo 3.2 millones de toneladas mayor que en 2005. Aunque los volúmenes de producción en la acuicultura se incrementan anualmente, este sector está enfrentando diferentes problemas que pueden limitar su crecimiento. Dentro de éstos se destacan principalmente: el incremento mundial del precio de alimentos y energéticos, además de los relacionados con el cambio climático y su efecto en la biología de las especies. A pesar de que la FAO no considera que la contaminación de cuerpos acuáticos (lagos, ríos y mares) sea un problema que afecte la producción de la acuicultura en un corto plazo, sí lo considera dentro de las perspectivas a mediano plazo, sobre todo, porque los niveles de contaminación acuática se han incrementado en los últimos años, por lo que nuevas estrategias de prevención deben ser creadas para evitar daños posteriores.

El uso de peces como organismos centinela ante la exposición de diversos xenobióticos, ha sido reportado por numerosos autores, tanto en laboratorio como en zonas contaminadas (ver antecedentes). En este trabajo, peces juveniles de la especie *O. niloticus* (conocidas comúnmente como tilapias) fueron expuestos a dos contaminantes ampliamente encontrados en el ambiente: benzo(a)pireno y fenol. Tanto por sus características fisicoquímicas como por sus efectos tóxicos en los organismos, la agencia de protección al ambiente de los Estados Unidos (U. S. EPA) ha clasificado ambos xenobióticos como de

alto riesgo, y en el caso del B(a)P como mutagénico y carcinogénico. Una vez obtenido el efecto de los contaminantes en las tilapias, una dieta rica en brócoli fue probada en los peces para evaluar sus efectos quimioprotectores.

## VII.1 Exposición de tilapias a B(a)P en distintas dosis

El xenobiótico B(a)P, ha sido estudiado en diversos trabajos (incluyendo peces), sobre todo por sus características carcinogénicas y mutagénicas. En este trabajo, juveniles de tilapia fueron inyectados intraperitonealmente con 0.1, 1, 10, 50 y 100 mg de B(a)P  $\text{kg}^{-1}$  de peso corporal, y sacrificados 12, 24, 72, 168 y 336 h después de la inyección. Como se reporta en la Figura 1 y Tabla III, la inyección con B(a)P incrementó los niveles de compuestos aromáticos en bilis de forma directamente proporcional a la dosis de B(a)P inyectada, aunque, sólo las concentraciones de 50 y 100 mg  $\text{kg}^{-1}$  mostraron diferencias significativas respecto al control. Estas inducciones se observaron a partir de las primeras 12 h, alcanzando los máximos para las 24 h (100 mg) y 72 h (50 mg) después de la exposición. Esta inducción lineal entre los compuestos aromáticos en bilis y las dosis de B(a)P inyectadas, coincidieron con lo reportado por Kirby *et al.*, (2000). Ellos inyectaron la especie *Platichthys flesus* con 1 y 20 mg de B(a)P  $\text{kg}^{-1}$  (peso del pez), encontrando que sólo la dosis de 20 mg  $\text{kg}^{-1}$  incrementa significativamente la cantidad de metabolitos aromáticos en bilis. Esta inducción se observó dos días después de la inyección y alcanzó el máximo 8 días después. Willett *et al.*, (2000), encontraron que 10 mg  $\text{kg}^{-1}$  de B(a)P inducía significativamente la concentración de metabolitos aromáticos en bilis en las especies *Ameiurus nebulosus* e *Ictalurus punctatus* a partir de las primeras 24 h, con máximos 168 h después de la inyección. Gorbi y Regoli (2004) inyectaron la especie *Anguilla anguilla* con 0.1, 1, 10 y 50 mg  $\text{kg}^{-1}$  de B(a)P, encontrando una relación lineal entre las dosis inyectadas y los niveles de compuestos aromáticos en bilis. Además, mencionan que una inyección con 5 mg  $\text{kg}^{-1}$  de B(a)P incrementa los niveles de aromáticos en bilis a partir de la exposición y alcanzando los máximos después de tres días. Ellos reportan que los niveles regresan a los del control después del día 21, coincidiendo con lo que se muestra en los

resultados de este trabajo donde los niveles de aromáticos disminuyeron después de 336 h (14 d). Courtenay *et al.*, (1999) mencionan que la permanencia del B(a)P en los peces es la más corta (hasta por 14 días) comparada con otros xenobióticos tales como el  $\beta$ -naftoflavona ( $\beta$ -NF), 3,3',4,4'-Tetraclorobifenil (PCB-77) y el 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) donde reportan una permanencias hasta por 72 días.

Otros trabajos también utilizan el B(a)P para inducir la actividad metabólica del citocromo P450 (específicamente la familia 1A1). Debido a que una de las funciones del CYP450 es el metabolismo de compuestos xenobióticos como un primer paso para su excreción (Široká y Drastichová, 2004), esta enzima ha sido utilizada como marcador de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos. En este sentido, Zapata-Pérez *et al.*, (2002) reportan que la producción de metabolitos aromáticos en bilis es proporcional a la inducción del metabolismo de CYP450. La familia CYP1A1 ha sido utilizada por otros autores como marcador después de la exposición a B(a)P. Au *et al.*, (1999) reportaron en *Solea ovata* una relación lineal entre la concentración de B(a)P y la respuesta de la actividad metabólica CYP1A1. Además, mencionan que la inyección con 5 mg kg<sup>-1</sup> de B(a)P incrementa significativamente la actividad CYP1A1 a partir del día, con máximos tres días después y regresando a los niveles basales después de siete días. Courtenay *et al.*, (1999) también encontraron para *Microgadus tomcod* una relación lineal entre las concentraciones de B(a)P inyectada y la inducción de ARN mensajero de la familia CYP1A1. Además, mencionan que 10 mg kg<sup>-1</sup> de B(a)P inducen el ARNm CYP1A1 a partir de las primeras 8 h, con un máximo entre las 24 y 48 h después de la inyección. Estos autores además mencionan que la inducción de CYP450 por el B(a)P, es la más rápida (máximo en los tres primeros días), comparado con los xenobióticos PCB-77 y 2,3,7,8-TCDD que alcanzan sus máximos después de siete días. Malmström *et al.*, (2004) inyectaron las especies *Platichthys flesus* y *Oncorhynchus mykiss* con 10 y 50 mg kg<sup>-1</sup> de B(a)P, mostrando una relación lineal entre las dosis y la inducción de la actividad enzimática CYP1A1. Ellos reportan que las inducciones de la actividad CYP1A1 iniciaron dos días después de la inyección, con máximos en el día cinco y regresando a los niveles basales después de 20 días.

## VII.2 Temperatura de aclimatación en la respuesta al B(a)P

El cultivo de tilapia y específicamente de la especie *O. niloticus* está en relación directa con la temperatura del agua. Según el centro de acuicultura de la región sur de los Estados Unidos (U. S. SRAC por sus siglas en inglés), la temperatura óptima para el cultivo de la tilapia se encuentra entre los 27 y 30 °C (82 a 86 °F), mientras que el cultivo por debajo de los 20°C (68 °F) ocasiona un menor crecimiento, causando la muerte si está cercana a los 10°C (50 °F). Como se menciona posteriormente, la temperatura ambiental ha sido reportada como causal de variaciones en el metabolismo de xenobióticos. En este trabajo, se evaluó el efecto de la temperatura en el metabolismo del xenobiótico B(a)P (100 mg kg<sup>-1</sup>) en tilapias aclimatadas durante 14 días a tres temperaturas (20, 25 y 30 °C), y sacrificadas tres días después de la inyección. El metabolismo del xenobiótico en las tres temperaturas fue evaluado por medio de la concentración de metabolitos aromáticos en bilis y actividades metabólicas CYP1A1 y CYP1A2 (por EROD y MROD respectivamente). Las Figuras 2, 3 y 4, muestran que la temperatura (por sí sola) no tuvo ningún efecto en los metabolitos y actividades monitoreadas. Sin embargo, las tres temperaturas afectaron el metabolismo del B(a)P, mostrando diferencias para los tres marcadores (aromáticos en bilis, EROD y MROD). En el caso de la concentración de compuestos aromáticos en bilis (Fig. 2), fueron encontradas diferencias significativas entre los inducidos a la temperatura de 25 °C (valores mínimos) y las de 20 y 30 °C (valores máximos). Para el caso de las actividades CYP1A1 y CYP1A2, se obtuvo una relación directa entre la inducción de ambas enzimas y la temperatura, mostrando las menores actividades a los 20 °C y las máximas a los 30 °C. Como se menciona anteriormente, la actividad CYP450 es el primer paso para el metabolismo y eliminación de compuestos xenobióticos. Un incremento en las actividades EROD y MROD debido a la temperatura ambiental, puede inducir una mayor concentración de metabolitos de xenobióticos en bilis, tal y como se encontró en este trabajo. Esta correlación entre la actividad CYP1A y la concentración de metabolitos aromáticos en bilis es concorde con lo reportado para otras especies de peces (Shailaja y D'Silva, 2003; Zapata-Pérez *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 1999).

Diferencias marcadas entre los metabolitos biliares y las actividades CYP1A1 y 1A2 fueron observadas, mostrando que la temperatura más baja (20 °C) presentó una alta concentración de metabolitos aromáticos en bilis pero una baja actividad CYP1A1. Resultados similares a los obtenidos en este trabajo fueron obtenidos por Gorbi y Regoli (2004). Ellos evaluaron la actividad CYP1A1 y concentración de metabolitos aromáticos en bilis de la especie *Anguilla anguilla* durante los meses de enero, abril, agosto y octubre. Ellos encontraron diferencias entre ambos marcadores, mostrando que el mes de enero (temperaturas frías) presentaba altas concentraciones de metabolitos en bilis, pero bajas actividades CYP1A1, mientras que los meses de agosto y octubre (temperaturas altas) mostraban altas actividades CYP1A1 pero bajos metabolitos aromáticos en bilis. Ellos mencionan que estas diferencias pueden deberse a la alimentación, puesto que en bajas temperaturas los peces se alimentan poco acumulándose más metabolitos aromáticos en la bilis. Otra explicación a estas diferencias puede ser el tiempo de metabolismo y excreción de los compuestos aromáticos. En este trabajo, los peces de las diferentes temperaturas fueron sacrificados 72 h después de la exposición, por lo que los máximos pudieron ocurrir antes o después de este tiempo. En este sentido, Jorgensen y Wolkers (1999) encontraron un retraso en el metabolismo del CYP1A1 debido a la temperatura. Ellos aclimataron la especie *Salvelinus alpinus* a las temperaturas encontradas en otoño (10 °C) e invierno (1 °C) en la estación McMurdo (Antártica) y las expusieron a B(a)P a través del alimento (35 mg kg<sup>-1</sup> alimento). Ellos reportan que los peces aclimatados a 1 °C presentaron el máximo de actividad CYP1A1 diez días después la exposición, mientras que los peces aclimatados a 10 °C la presentaron un día después de la exposición. Ellos mencionan que las actividades CYP1A1 fueron mayores en los peces aclimatados a 1 °C que en los peces aclimatados a 10°C (efecto inverso a lo encontrado en los resultados de este trabajo). Además de la alimentación y/o el tiempo de excreción, la temperatura pudo inducir rutas metabólicas alternas (e.g. otras familias de CYP) que explican las diferencias entre marcadores. Stegeman *et al.*, (1997) reportan que familias como las CYP2B y CYP3A son inducidas por compuestos contaminantes como los barbitúricos.

Cabe señalar que otros factores (además de la temperatura) han sido reportados como posibles causas de variación en el metabolismo de xenobióticos por el CYP450. Diferencias por especie han sido reportadas por Barra *et al.*, (2001), Vuontisjärvi *et al.*, (2004) y Shaw *et al.*, (2004). Además, Willett *et al.*, (2000) encontraron diferencias en la actividad CYP1A1 (por EROD) entre las especies *Ameriurus nebulosus* e *Ictalurus punctatus* inyectadas intraperitonealmente con la una dosis de B(a)P (10 mg kg<sup>-1</sup>). Moore *et al.*, (2003) encontraron diferencias significativas en 11 especies capturadas en Turquía, con diferencias por tejido (e.g. hígado, estómago, branquias). Ellos concluyen que estas diferencias pueden ser debidas a la alimentación, migración y hábitat (pelágico, bentónico). Wong *et al.*, (2001) encontraron diferencias en la inducción de ARNm CYP1A1 en los tejidos branquias, hígado e intestino de tilapias expuestas a sedimentos contaminados con PAH. Ellos reportan que las diferencias pueden deberse a la vía de entrada del xenobiótico: agua (branquias) o alimento (intestinos). Otra causa de variación es el estatus reproductivo (Cavanagh *et al.*, 2000; Malmström *et al.*, 2004). Courtenay *et al.*, (1999) mencionan que la expresión genética del CYP1A1 en peces sexualmente maduros no refleja adecuadamente la exposición a xenobióticos y que puede producir estimaciones erróneas. Williams *et al.*, (2003) y Webb *et al.*, (2005) relacionaron las diferencias en la actividad CYP1A1 con el género de los organismos analizados, encontrando que esta actividad es mayor para los machos respecto a hembras. Además, Flammarion *et al.*, (2002) mencionan que el periodo de desove en las hembras afecta las actividades CYP450, esto basados en niveles gonadosomáticos altos. Aas *et al.*, (2000) mencionan que en peces maduros puede ser más precisa la cuantificación de metabolitos aromáticos en bilis que las actividades CYP450. Otro factor que inhibe el metabolismo de xenobióticos por el CYP450 son las altas concentraciones de exposición al contaminante. Roy *et al.*, (2003) reportan una menor cantidad de metabolitos aromáticos en la bilis de la especie *Pleuronichthys verticalis* expuestos a altas concentración de PAH de sedimentos de Vista Seep California. Además, Carlsson y Pärt, (2001), reportaron una inhibición de la actividad CYP1A1 en la línea celular de *Oncorhynchus mykiss* en las dosis más altas del PAH benzo[k]fluoranteno (B[k]F). En este presente trabajo, las altas concentraciones de B(a)P utilizadas sólo modificaron el tiempo de excreción (entre 24 y 72 h dependiendo de la dosis) pero no

inhibieron la actividad. Otros reportes mencionan que la combinación de contaminantes en el ambiente, puede modificar las respuestas. En este sentido, Barnhill *et al.*, (2003) encontraron que la combinación entre un pesticida y el B(a)P en la dieta del *O. mykiss* (durante 9 semanas) incrementó 142 % la excreción del B(a)P. Como se encontró en este trabajo y se discute posteriormente, la alimentación con dietas ricas en brócoli también modifican las tasas de excreción del B(a)P.

La naturaleza química de estos metabolitos aromáticos ha sido estudiada por Luthe *et al.*, (2002) en la bilis de la especie *Platichthys flesus* después de la inyección intraperitoneal con diferentes PAH. Ellos determinaron que el pireno-1-glucuronido y pireno-1-sulfato fueron los metabolitos aromáticos presentes después de la inyección con pireno. Por otra parte, Vuorinen *et al.*, (2006) detectaron concentraciones de 1-hidroxipireno en la bilis de tres especies (*P. flesus*, *Zoarces viviparus* y *Perca fluviatilis*) capturadas en el mar Báltico. Otros análisis realizados por Vuontisjärvi *et al.*, (2004) en la misma zona y con las mismas especies, reportan bajas concentraciones de 1-hidroxifenantreno como metabolito formado en la bilis.

### **VII.3 Dietas ricas en brócoli y, sulforafano en la respuesta a la exposición a B(a)P**

El B(a)P es un compuesto xenobiótico considerado como peligroso por sus características mutagénicas y carcinogénicas. Diferentes trabajos han relacionado al B(a)P con la inducción de mutaciones y cáncer (Flowers *et al.*, 2002; Dreij *et al.*, 2004). Por otro lado, diferentes trabajos (ver antecedentes) relacionan dietas ricas en vegetales crucíferos (brócoli, coliflor, coles de Bruselas, rábano), con una disminución en el riesgos de adquirir cáncer. Fimognari y Hrelia (2007) y Clarke *et al.*, (2008) mencionan que estas propiedades anti-cancerígenas de los vegetales crucíferos, está relacionada con la presencia de un tipo de compuestos denominados glucosinolados. Paolini *et al.*, (2004) reportan que la

glucorafanina, que es el precursor directo del sulforafano, pueden llegar a constituir hasta el 55 % del total de los glucosinolados en la planta del brócoli. Fimognari y Hrelia (2007) reportan que la mayor actividad anti-cancerígena de los glucosinolados se presenta cuando son transformados enzimáticamente a otros compuestos llamados isotiocianatos. Este metabolismo es realizado por una enzima llamada mirosinasa cuando la planta sufre un daño en su tejido como el que ocurre durante la cosecha, masticación, y/o procesos digestivos. Dentro de estos compuestos isotiocianatos, el más reportado ha sido el sulforafano (Clarke *et al.*, 2008). Diferentes autores mencionan que las principales características anti-cancerígenas del brócoli y sus fitoquímicos están relacionadas directamente con la modulación de las familias CYP450 en presencia de xenobióticos.

Siendo el objetivo de este trabajo la evaluación de la capacidad quimioprotectora del brócoli, incluido en dietas de peces, con el fin de contender con los efectos de la contaminación de los cuerpos de agua usados en la acuicultura, se monitoreó la actividad de diferentes CYP 450 en tilapia.

Como se muestra en la Figura 5 (tiempo 0), el efecto de los 30 días de alimentación con brócoli y sulforafano mostró una inducción significativa del metabolismo CYP1A1 en ambas dietas respecto a la dieta control. Esta inducción estuvo en concordancia con otros trabajos realizados principalmente en mamíferos, donde se reporta el incremento de la actividad CYP450 como resultado del tratamiento con brócoli y sus fitoquímicos (e.g. sulforafano, glucorafanina). Lampe *et al.*, (2000) encontraron un incremento en la actividad CYP1A2 en humanos alimentados durante 6 días con una dieta rica en vegetales crucíferos (rábano, coliflor, brócoli y lechuga morada). Vang *et al.*, (2001) reportaron un incremento de las actividades CYP2B1/2, CYP1A1 y CYP1A2 en ratones alimentados durante 10 días con cuatro tipos de glucosinolados extraídos del brócoli (glucorafanina, glucoiberina, glucosicina y neoglucobrassicina). Paolini *et al.*, (2004) y Perocco *et al.*, (2006) expusieron oralmente ratones con 120 o 240 mg kg<sup>-1</sup> de glucorafanina (precursor directo del sulforafano) encontrando una inducción de las actividades CYP2B1/2, CYP1A1 y CYP1A2 en ambas concentraciones. Anwar-Mohamed y El-Kadi (2009) también reportan

una inducción de la cantidad de ARN mensajero en células hepáticas de ratón y humanas cultivadas con 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$  de sulforafano. Ellos además reportan que las inducciones se realizaron desde la primera hora, con máximos seis horas después de la exposición.

Por otro lado, y contradictoriamente, otros trabajos han reportado inhibiciones del sistema CYP450 después del tratamiento con sulforafano. Mahéo *et al.*, (1997) cultivaron hepatocitos de ratón en soluciones de sulforafano con las concentraciones finales de 5, 10 y 25  $\mu\text{M}$  durante 48 h. Ellos reportan una inhibición de las actividades CYP1A1 y 1A2 (por EROD y PROD), en relación directa con la dosis. Skupinska *et al.*, (2009) reportan una inhibición de la actividad CYP1A1 y 1A2 (por EROD y MROD) en células hepáticas y mamarias de humano incubadas durante 24 y 48 h con sulforafano y otros compuestos isotiocianatos.

En el presente trabajo se observó que el metabolismo del CYP1A1 fue significativamente mayor en las tilapias alimentadas con brócoli y sulforafano (respecto a la dieta control) (Fig. 5), presentando los valores máximos de inducción entre las 12 y 24 h después de la inyección. Esta inducción mayor en las dietas con brócoli y sulforafano después de la exposición a B(a)P, puede ser considerada benéfica desde el punto de vista de la excreción de los xenobióticos. Šíroková y Drastichová (2004) consideran que la inducción en el metabolismo del CYP450 después de la exposición a xenobióticos, está directamente relacionada con su excreción (como primer paso). En este sentido, si el brócoli y sus fitoquímicos inducen el metabolismo del CYP1A1 antes de la exposición al xenobiótico (en este caso B(a)P) entonces puede permitir que el metabolismo del xenobiótico sea mayor y por consecuencia su excreción se realice en un menor tiempo. Esta hipótesis fue corroborada con la presencia de compuestos aromáticos en bilis, puesto que una función de la vesícula biliar en los organismos está relacionada con la excreción de compuestos metabolizados en el hígado. Como se observa en los resultados (Fig. 6), la concentración de compuestos aromáticos en la bilis de las tilapias alimentadas con brócoli y sulforafano, presentaron niveles significativamente menores a los encontrados para la dieta control. Esta menor concentración de metabolitos aromáticos permite suponer que el xenobiótico fue

metabolizado y excretado durante las primeras 12 h (dato no tomado en este estudio), sobre todo porque los niveles de CYP1A1 ya eran altos antes de la inyección con B(a)P, además de que tanto los niveles de aromáticos en bilis, como el metabolismo CYP1A1 permanecieron bajos hasta las 72 h. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Courtenay *et al.*, (1999), Barra *et al.*, (2001) y Vuorinen *et al.*, (2006), quienes mencionan que los PAH son metabolizados y excretados más rápidamente respecto a otros contaminantes. Este incremento en la velocidad de excreción del B(a)P, además tiene un efecto directo en la toxicidad del xenobiótico en el organismo. En este sentido, Fahey *et al.*, (2002) encontraron que ratones alimentados con sulforafano ( $442.5 \text{ mg kg}^{-1}$  peso corporal) y expuestos a B(a)P ( $120 \text{ mg kg}^{-1}$  peso corporal) presentaron una disminución de 39% en los tumores producidos por el B(a)P comparado con ratones sólo expuestos al contaminante.

#### **VII.4 Dieta de brócoli en la respuesta a la exposición de fenol**

En el presente trabajo, juveniles de tilapia fueron expuestas a concentraciones sub-letales de fenol de dos formas 1) disuelto en los acuarios de 15 L (después de una alimentación con brócoli) y 2) en combinación con el alimento. Como se describe a detalle en la metodología, las concentraciones sub-letales alta y baja de fenol, fueron determinadas con base en la concentración letal de fenol que mató el 50% de una muestra de tilapias en 48 horas (48h-LC50). El valor 48h-LC50 determinado en este estudio fue de  $24.5 \text{ mg L}^{-1}$  (para peces de 5.9 cm LT y 3.5 gramos), por lo que las dosis sub-letales baja y alta utilizadas fueron: 2 y 20  $\text{mg L}^{-1}$  respectivamente. Cabe señalar que el valor de LC<sub>50</sub> de fenol obtenido para los juveniles de tilapia, fue similar a lo reportado por otros autores. Gad y Saad, (2008) reportan para la misma especie (*O. niloticus* de 12.6 cm y 20 gr) un valor de 96h-LC50 de fenol de  $28 \text{ mg L}^{-1}$ . Además, Abdel-Hameid, (2007) encontró para la especie *Oreochromis aureus* (8.59 cm y 10.11 gr) un valor de 96h-LC50 de  $29 \text{ mg L}^{-1}$  de fenol. Avilez *et al.*, (2008) reportan un 96h-LC50 de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  para la especie *Brycon*

*amazonicus* de 22.5 cm, mientras que Hori *et al.*, (2006 y 2008) reportaron un 96h-LC50 de 20 mg L<sup>-1</sup> para la especie *B. cephalus* (19.9 cm) y 96h-LC50 de 17.4 mg L<sup>-1</sup> para *B. amazonicus* (14.06 cm). Además de las dosis baja y alta de fenol disueltas en el medio (acuarios de 15 L), este contaminante se roció en el alimento, en una concentración de 30 mg kg<sup>-1</sup> de dieta y fue administrada durante 60 días en porciones de 3 % (peso corporal) diaria.

Los dos tratamientos con fenol (disuelto en el medio y por alimento) fueron realizados después y/o en combinación con una dieta preparada con 30 % brócoli. Como se mencionó anteriormente, la inclusión de brócoli y otros vegetales crucíferos en la dieta de mamíferos ha sido relacionada con una quimioprotección contra el efecto carcinogénico de xenobióticos por la modulación de las familias CYP450. Fahey *et al.*, (1997) compararon diferentes formas de extracción de glucosinolados a partir de brócoli y otros vegetales crucíferos. Sus resultados mostraron que las diferentes formas de extracción indujeron de forma similar (sin diferencias significativas) el metabolismo del CYP450. En este sentido, el proceso de elaboración de la dieta 30 % brócoli utilizado en este trabajo moduló las actividad CYP450 de forma similar a la dieta preparada con 0.55 mg kg<sup>-1</sup> de sulforafano comercial (Figs. 5, 7, 8 y Tabla IV). Sin embargo, Fahey *et al.*, (1997) reportan que la potencia de inducción del CYP450 puede ser afectada por otros factores como la edad de la planta, el tiempo después de la cosecha y la congelación. Ellos reportan que las plantas jóvenes, recién cosechadas y no congeladas presentan una mayor potencia de inducción de CYP450.

La evaluación tanto del tratamiento con brócoli como del fenol, se realizó cuantificando el metabolismo de seis familias de CYP450 (1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) con una modificación del método propuesto por Zhang *et al.*, (2005). Las Figuras 7 y 8 muestran el efecto de la alimentación con la dieta 30 % brócoli durante 30 d (tiempo 0) y la exposición a las dosis baja y alta de fenol para cada una de las seis familias monitoreadas. Además, la Tabla IV muestra el efecto combinado del brócoli y fenol a través de la alimentación durante 60 d. Monitorear simultáneamente las familias de CYP450 después de los

tratamientos con fenol y brócoli es de gran utilidad debido a que por un lado el brócoli es considerado como un quimioprotector sobre todo contra carcinogénicos, mientras que el metabolismo del fenol por las familias CYP puede producir metabolitos más reactivos (e.g. benceno, catecol, hidroquinona y pirocatecol) como es el caso del pirocatecol que tiene una toxicidad cien veces mayor que el fenol (Roche y Bogé, 2000; Powley y Carlson, 2001).

La alimentación con 30 % brócoli durante 30 días (antes del fenol), mostró un efecto en tres de las seis familias de CYP monitoreadas. Por un lado, se obtuvo un incremento significativo de las actividades enzimáticas CYP1A2 y 2E1, mientras que la familia CYP3A4 fue inhibida significativamente. En el caso de las familias CYP1A2 y 2E1 la inducción significativa fue similar a lo encontrado para la familia CYP1A1 previamente (Fig. 5). Además, la inducción de las actividades enzimáticas CYP450 por el efecto del brócoli, ha sido reportada por otros autores. Lampe *et al.*, (2000) reportan la inducción de la actividad CYP1A2 en humanos alimentados durante 6 días con vegetales crucíferos (rábano, coliflor, brócoli y lechuga morada). Vang *et al.*, (2001) alimentaron ratones con una dieta de brócoli al 10 % y encontraron la inducción de CYP1A2 en hígado y colon. Paolini *et al.*, (2004), Perocco *et al.*, (2006) y Hanlon *et al.*, (2008) reportan la inducción del metabolismo CYP1A2 por efecto de exposición con sulforafano y glucorafanina. Por otro lado, la inhibición de la familia CYP3A4 fue reportada por Mahéo *et al.*, (1997). Ellos cultivaron hepatocitos humanos con diferentes concentraciones de sulforafano (5, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) y encontraron una inhibición dependiente de la dosis.

El efecto conjunto del fenol y el brócoli, también fue monitoreado en las seis familias de citocromo. El tratamiento con fenol inhibió significativamente la actividad enzimática CYP1A2 tanto en la dosis baja (Fig. 7) como en la dosis alta (Fig. 8) durante las primeras 12 h después de la exposición y regresando a los niveles basales después de 24 h. Cabe señalar que para ambas dosis de fenol, la dieta con brócoli presentó una menor inhibición en la dosis baja (24 h después; Fig. 7) y alta (12 h después Fig. 8). Por otro lado, la alimentación con brócoli-fenol durante 60 días no presentó diferencias significativas en la actividad CYP1A2 respecto al control (alfalfa y fenol; Tabla IV). A pesar de que la

información del efecto del fenol sobre esta familia es limitado, Baer-Dubowska *et al.*, (1998) reportan que los compuestos fenólicos encontrados en plantas (específicamente el ácido protocatecuico), inhiben la actividad CYP1A2 hepática de ratones. Por otro lado, la familia CYP1A2 ha sido ampliamente utilizada para evaluar la exposición en peces de xenobióticos como: hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), hidrocarburos aromáticos halogenados (HAH), bifenilos policlorados (PCB), dibenzodioxinas policloradas (PCDD), dibenzofuranos policlorados (PCDF) entre otros. En este trabajo, la familia CYP1A2 fue utilizada para monitorear el efecto de la temperatura en el metabolismo del B(a)P en tilapias (Fig. 4).

Para el caso de la familia CYP2E1, el tratamiento con las dosis baja y alta de fenol inhibieron significativamente la actividad enzimática, regresando a los niveles del control después de las 24 h (dosis baja Fig. 7) y 12 h (dosis alta Fig. 8). En el caso de la alimentación durante 60 d con fenol-brócoli, la actividad CYP2E1 no presentó diferencias significativas respecto al control (alfalfa con fenol; Tabla IV). Según Powley y Carlson (2001), la familia CYP2E1 está relacionada directamente con el metabolismo del fenol. Ellos cultivaron microsomas humanos hepáticos y de pulmón con 20  $\mu$ M de fenol, reportando que más del 50 % fue metabolizado por esta familia. Ellos además mencionan que otras familias como CYP2F2 también están relacionadas con el metabolismo del fenol. Además, Mikstacka *et al.*, (2002) reportan que compuestos fenólicos encontrados en frutas y verduras (e.g. manzana, té negro) inhiben la actividad CYP2E1 en microsomas de ratón. A pesar de que la información del efecto del fenol en peces es limitada, la familia CYP2E1 ha sido utilizada para evaluar el efecto de diferentes químicos. Wall y Crivello (1998), evaluaron el metabolismo CYP2E1 de la especie *Pleuronectes americanus* con diferentes concentraciones de clorzoxazona, sustrato específico de esta familia en mamíferos. Este compuesto también fue utilizado en este trabajo como sustrato (ver materiales y métodos). Geter *et al.*, (2003) reportan que el xenobiótico 3-cloro-4-(diclorometil)-5-hidroxi-2[5H]-furano que se forma cuando se agrega cloro en agua potable, indujo significativamente el metabolismo del CYP2E1 en el pez *Oryzias latipes*. Por otro lado, El metabolismo de esta familia en presencia de xenobióticos como nitrosaminas, alcanos, hidrocarburos

halogenados además de otros producidos por el humo de cigarro, están relacionados con la inducción de diferentes tipos de cáncer como el estomacal, y pancreatitis (Mikstacka *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2002; Burim *et al.*, 2004; Boccia *et al.*, 2007). Además, Lu y Cederbaum (2008) reportan que la familia CYP2E1 metaboliza el etanol, siendo un primer paso para el desarrollo de cirrosis hepática.

El efecto del fenol y brócoli en la familia CYP2C9 mostró una inducción significativa de la actividad 24 h después (dosis baja) y 12 h después en la dosis alta (Figs. 7 y 8 respectivamente). Esta inducción también fue observada en la alimentación crónica con brócoli rociado con fenol durante 60 d con diferencias estadísticas respecto al control (alfalfa y fenol; Tabla IV). Aunque el efecto del fenol no ha sido monitoreado con esta familia en peces, el metabolismo de CYP2C9 ha sido utilizado para medir el efecto de xenobióticos como el nonilfenol en humanos (Niwa *et al.*, 2002), además de otros medicamentos como: anti-inflamatorios no esteroideos, agentes alquilantes usados en quimioterapias y medicamentos anti-epilépticos en mamíferos (Pavanello, 2003; Rosemary *et al.*, 2006). Por otro lado, Khedhaier *et al.*, (2008) reportan que las diferencias polimórficas de CYP2C9, 2C19 y 2D6 pueden ser utilizados para predecir cáncer de seno.

En el caso de la familia CYP2C19, la concentración del fenol (alto o bajo) tuvo un efecto directo en la actividad metabólica del CYP450, tanto para en la exposición aguda como para la crónica (Fig. 7 y 8; Tabla IV). Al igual que en la familia CYP2C9, no hay reportes del metabolismo de esta familia en concentraciones de fenol en peces. Sin embargo, esta familia también fue usada por Niwa *et al.*, (2002) para monitorear el efecto del xenobiótico nonilfenol en humanos. Además, esta familia también es utilizada para monitorear el efecto de medicamentos anti-inflamatorios no esteroideos, agentes alquilantes usados en quimioterapias y medicamentos anti-epilépticos en mamíferos (Pavanello, 2003; Rosemary *et al.*, 2006).

El metabolismo de la familia CYP2D6 después de la exposición a las dosis baja y alta de fenol, mostró una inducción significativa las 12 h para ambas dosis (Figs. 7 y 8

respectivamente). En ambas dosis, se observó para la dieta con brócoli una disminución de la actividad después de 24 h y con diferencias significativas para la dosis baja (Fig. 7). En el tratamiento con la dieta brócoli rociado con fenol, se observó una inhibición significativa respecto al control (alfalfa y fenol; Tabla IV). Esta familia también ha sido utilizada para monitorear el efecto de nonilfenol en humanos (Niwa *et al.*, 2002), encontrando que 1 mM del xenobiótico inhibe significativamente la actividad CYP2D6 en hepatocitos humanos. Además, CYP2D6 está relacionada con el metabolismo de compuestos producidos en el humo de cigarro y con la susceptibilidad de cáncer de pulmón y laringe en personas expuestas (Benhamou *et al.*, 1996). Además, Pavanello, (2003) reporta que la familia CYP2D6 metaboliza fármacos que actúan en el sistema cardiovascular y nervioso central.

En la familia CYP3A4, la dosis baja de fenol después del tratamiento con brócoli no mostró diferencias significativas en ningún tiempo (12 o 24 h; Fig. 7), mientras que, la dosis alta presentó una inducción significativa después de 12 h (Fig. 8), regresando a los valores basales después de 24 h. La alimentación crónica de brócoli rociado con fenol durante 60 d, inhibió significativamente los niveles CYP3A4 respecto al control (alfalfa con fenol; Tabla IV). Las familias CYP3A representan más del 30 % de los tipos CYP450 encontrados en el hígado humano y 70 % del intestino (Perocco *et al.*, 2006). Además, James *et al.*, (2005) mencionan que la familia CYP3A es común a lo largo del intestino del pez *Ictalurus punctatus*, por lo que el metabolismo de xenobióticos presentes en la alimentación, comienza desde la digestión. A pesar de que no hay reportes del efecto del fenol en la familia CYP3A4 de peces, esta familia ha sido utilizada para monitorear fármacos como la rifampicina (medicamento utilizado para la tuberculosis) en peces *Ctenopharyngodon idellus* (Li *et al.*, 2008), y xenobióticos como el nonilfenol. Hasselberg *et al.*, (2005) reportan que el nonilfenol inhiben la actividad CYP3A hasta un 35 % en el pez *Gadus morhua*. Niwa *et al.*, (2002) también reportan una la inhibición de la actividad de esta familia en hepatocitos humanos expuestos al nonilfenol. En este trabajo, las tilapias alimentadas con brócoli rociado con fenol mostraron una inhibición significativa de la actividad CYP3A4 similar a lo reportado en la literatura, sin embargo, la dosis alta de fenol indujo significativamente la actividad enzimática de la familia para la dieta con brócoli.

Como se reportó para la familia CYP1A1, la inducción de las actividades enzimáticas CYP por el brócoli en presencia de xenobióticos como el B(a)P y fenol, puede considerarse benéfica para el metabolismo del pez puesto que la velocidad de excreción del xenobiótico puede incrementar (e.g. concentraciones de aromáticos biliares; Fig. 6).

## Capítulo VIII. Conclusiones

---

En el presente trabajo se demostró que el B(a)P induce el sistema CYP1A1 de las tilapias, de forma similar que en otras especies de peces. Esta inducción fue lineal con respecto a la dosis, y mostró las mayores actividades dentro de las primeras 24 h después de la exposición. Además, la presencia de compuestos aromáticos en la bilis de los organismos mostró que el contaminante es rápidamente excretado.

En este estudio se comprobó además que la temperatura de aclimatación a la que estuvieron sometidos los peces fue un factor que influyó en el metabolismo del B(a)P. El incremento en la temperatura incrementó tanto el metabolismo CYP como su excreción sobre todo porque existe un incremento en el metabolismo del pez a mayores temperaturas. Estas variaciones de temperatura son comunes en el ambiente y están relacionadas con las estaciones del año. Puesto que los peces están sometidos a estos cambios estacionales, el efecto que pueden tener los xenobióticos en la fisiología del organismo variará en relación a la temperatura. Este trabajo mostró además que el uso del sistema CYP450 para monitorear el efecto de xenobióticos en el ambiente, debe considerar un factor de error en la temperatura estacional, para evitar una sub o sobre estimación.

La alimentación de las tilapias con una dieta rica en brócoli y su fitoquímico sulforafano, mostró la inducción de la actividad CYP1A1. Este resultado fue parcialmente similar a lo reportado para mamíferos, puesto que se reporta que la alimentación con brócoli puede inhibir las actividades del CYP1A1. La exposición al contaminante B(a)P después de la alimentación con brócoli, mostró una co-inducción de la actividad CYP1A1 para ambas dietas brócoli y sulforafano. Pero además, un efecto directo fue observado en las concentraciones de metabolitos aromáticos en bilis donde se observó una mayor excreción del contaminante durante las primeras horas después de la exposición. Con base en estos

resultados, se puede concluir que la acción quimioprotectora del brócoli en los peces, está relacionada con la inducción de la actividad CYP1A1 previa a la exposición del contaminante, y que además, esta inducción está relacionada con un incremento en la capacidad excretora del contaminante.

La alimentación de tilapias con una dieta rica en brócoli, fue evaluada además, con seis familias de CYP450. Al igual que en el experimento con BaP, la actividad enzimática de dos familias fueron significativamente inducidas (CYP1A2 y 2E1). Esto demuestra que los fitoquímicos del brócoli son metabolizados por diferentes familias de citocromo. Además, el brócoli moduló significativamente las seis familias de CYP450 en presencia de fenol. Los efectos del brócoli fueron observados tanto por la forma de exposición del fenol (disuelto en el agua o a través del alimento) y a través del tiempo (en horas o en días). Tomando en cuenta la basta información de quimioprotección del brócoli y los resultados encontrados en el trabajo con BaP, la alimentación con brócoli antes de la exposición al fenol, ofrece una quimioprotección contra sus efectos.

Finalmente, se concluye que la incorporación del brócoli en el alimento de los peces en la acuicultura, puede ser una alternativa viable para prevenir los efectos de compuestos contaminantes en los organismos cultivados.

## Referencias

- Aas E., Baussant T., Balk L., Liewenborg B., Andersen O.K. 2000. PAH metabolites as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology*. 51: 241-258.
- Abdel-Hameid N.A.H. 2007. Physiological and histopathological alterations induced by phenol in *Oreochromis aureus* juveniles. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 7: 131-138.
- 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57: 290-302.
- Almeida J.A., Diniz Y.S., Marques S.F.G., Faine L.A., Ribas B.O., Burneiko R.C., Novelli E.L.B. 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*. 27: 673-679.
- Anwar-Mohamed A., El-Kadi A.O.S. 2009. Sulforaphane induces CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity levels via an AhR-dependent pathway hepatoma Hepa 1c1c7 and human HepG2 cells. *Cancer Letters*. 275: 93-101.
- Anyakora C., Ogbeche A., Palmer P., Coker H. 2005. Determination of polynuclear hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. *Journal of Chromatography A*. 1073: 323-330.
- Araújo C.S.A., Marques S.A.F., Carrondo M.J.T., Gonçalves L.M.D. 2000. In vitro response of the brown bullhead catfish (BB) and rainbow trout (RTG-2) cell lines to benzo a pyrene. *The Science of the Total Environment*. 247: 127-135.
- Arinç E.A., y Şen A. 1999. Hepatic cytochrome P4501A and 7-ethoxyresorufin O-deethylase in mullet and common sole as an indicator of toxic organic pollution in Izmir Bay, Turkey. *Marine Environmental Research*. 48: 147-160.
- Arinç E., Sen A., Bozcaarmutlu A. 2000. Cytochrome P4501A and associated mixed-function oxidase induction in fish as a biomarker for toxic carcinogenic pollutants in the aquatic environment. *Pure and Applied Chemistry*. 72: 985-994.
- Arzuaga X., Elskus A. 2002. Evidence for resistance to benzo[a]pyrene and 3,4,3',4'-tetrachlorobifenyl in a chronically polluted *Fundulus heteroclitus* population. *Marine Environmental Research*. 54: 247-251.

- ATSDR, 2008. Toxicological profile for phenol. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U. S. Department of Health and Human Services. <http://www.atsdr.cdc.gov>. Octubre 2008.
- Au D.W.T., Wu R.S.S., Zhou B.S., Lam P.K.S. 1999. Relationship between ultrastructural changes and EROD activities in liver of fish exposed to Benzo[a]pyrene. *Environmental Pollution*. 104: 235-247.
- Avilez I.M., Hori T.S.F., de Almeida L.C., Hackbarth A., Neto J.C.B., Bastos V.L.F.C., Moraes G. 2008. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 148: 136-142.
- Baer-Dubowska W., Szaefer H., Krajka-Kuzniak V. 1998. Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica*. 28: 735-743.
- Bainy C.D.A., Woodin B.R., Stegeman J.J. 1999. Elevated levels of multiple cytochrome P450 forms in tilapia from Billings Reservoir-São Paulo, Brazil. *Aquatic Toxicology*. 44: 289-305.
- Barra, R., Sanchez-Hernandez J.C., Orrego R., Parra O., Gavilan J.F. 2001. Bioavailability of PAHs in the Biobio River (Chile): MFO activity and biliary fluorescence in juvenile *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere*. 45: 439-444.
- Barnhill M.L., Rosemond M.V.M., Curtis L.R. 2003. Dieldrin stimulates biliary excretion of 14C-Benzo[a]pyrene polar metabolites but does not change the biliary metabolite profile in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicological Sciences*. 75: 249-259.
- Bebianno M.J., Lopes B., Guerra L., Hoarau P., Ferreira A.M. 2007. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. *Environment International*. 33: 550-558.
- Benhamou S., Bouchardy C., Paoletti C., Dayer P. 1996. Effects of CYP2D6 activity and tobacco on larynx cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 5: 683-686.
- Boccia S., Lauretis A.D., Gianfagna F., van Duijn C.M., Riccardi G. 2007. CYP2E1 PstI/RsaI polymorphism and interactions with tobacco, alcohol and GSTs in gastric cancer susceptibility: a meta-analysis of the literature. *Carcinogenesis*. 28: 101-106.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyses of Biochemical*. 72: 248-254.

- Burim R.V., Canalle R., Martinelli A.L.C., Takahashi C.S. 2004. Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTP1 and cytochrome P450 CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. *Mutagenesis*. 19: 291-298.
- Burke D.M., Mayer R.T. 1974. Etoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially induced by 3-methylchloranthrene. *Drug Metabolism and Disposition*. 2: 583-588.
- Cajaraville M.P., Bebianno M.J., Blasco J., Porte C., Sarasquete C., Viarengo A. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula a practical approach. *The Science of the Total Environment*. 247: 295-311.
- Cavanagh J.E., Burns K.A., Brunskill G.J., Ryan D.A.J., Ahoka J.T. 2000. Induction of hepatic cytochrome P-450 1A in Pikey Bream (*Acanthopagrus berda*) collected from agricultural and urban catchments in Far North Queensland. *Marine Pollution Bulletin*. 41: 377-384.
- Carlsson C., Pärt P. 2001. 7-Ethoxyresorufin O-deethylase induction in rainbow trout gill epithelium cultured on permeable supports: asymmetrical distribution of substrate metabolites. *Aquatic Toxicology*. 54: 29-38.
- Clarke J.D., Dashwood R.H., Ho E. 2008. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Letters*. 269: 291-304.
- Courtenay S.C., Grunwald C.M., Kreamer G.L., Fairchild W.L., Arsenault J.T., Ikononou M., Wirgin I.I. 1999. A comparison of the dose and time response of CYP1A1 mRNA induction in chemically treated Atlantic tomcod from two populations. *Aquatic Toxicology*. 47: 43-69.
- Da Silva D.A.M., Buzitis J., Krahn M.M., Bicego M.C., Pires-Vanin A.M.S. 2006. Metabolites in bile of fish from São Sebastião Channel, São Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. *Marine Pollution Bulletin*. 52: 175-183.
- Dertinger A.D., Silvertone A.E., Gasiewicz T.A. 1998. Influence of aromatic hydrocarbon receptor-mediated events on the genotoxicity of cigarette smoke condensate. *Carcinogenesis*. 19: 2037-2042.
- Dreij K., Bajak E., Sundberg K., Cotgreave I., Jernström B., Seidel A., Gusnanto A. 2004. DNA adducts of benzo[a]pyrene and benzo[a,l]pyrene-diol epoxides in human lung epithelial cells: kinetics of adduct removal, effects on cell cycle checkpoints, and gene expression. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 24: 549-566.

- Fahey J.W., Zhang Y., Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 7610-7615.
- FAO, 2009. The State of World Fisheries and Aquaculture 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. Rome ISBN 978-92-5-106029-2.
- Fimognari C., Hrelia P. 2007. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutation Research*. 635: 90-104.
- Flammarion P., Devaux A., Nehls S., Migeon B., Noury P., Garric J. 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 51: 145-153.
- Flowers L., Rieth S.H., Cogliano V.J., Fuoreman G.L., Hertzberg R., Hofmann E.L., Murphy D.L., Nesnow S., Schoeny R.S. 2002. Health assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures: current practices and future directions. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 22: 811-821.
- Gad N.S., Saad A.S. 2008. Effect of environmental pollution by phenol on some physiological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Global Veterinaria*. 2: 312-319.
- 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. *Marine Pollution Bulletin*. 44: 230-237.
- Gao C., Takezaki T., Wu J., Li Z., Wang J., Ding J., Liu Y., Hu X., Xu T., Tajima K., Sugimura H. 2002. Interaction between Cytochrome P-450 2E1 polymorphisms and environmental factors with risk of esophageal and stomach cancers in Chinese. *Cancer Epidemiology, Biomarker and Prevention*. 11: 29-34.
- Geter D.R., Fournie J.W., Brouwer M.H., DeAngelo A.B., Hawkins W.E. 2003. p-Nitrophenol and glutathione response in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to MX, a drinking water carcinogen. *Comparative biochemistry and physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 134: 353-364.

- 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. *Marine Environmental Research*. 58: 511-515.
- Hanlon N., Coldham N., Sauer M.J. 2008. Ioannides C. Up-regulation of the CYP1 family in rat and human liver by the aliphatic isothiocyanates euricin and sulforaphane. *Toxicology*. 252: 92-98.
- Harvey R.G., Dai Q., Ran C. 2004. Efficient new syntheses of polycyclic aromatic hydrocarbon *ortho*-quinones and their 2'-deoxyribonucleoside adducts. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 24: 257-269.
- Hasselberg L., Grøsvik B.E., Goksøyr A., Celander M.C. 2005. Interactions between xenoestrogens and ketoconazole on hepatic CYP1A and CYP3A, in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Hepatology*. 4: 1-15.
- Hellou J., Leonard J., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation products in trout exposed through food pellets. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 24: 697-712.
- Hori T.S.F., Avilez I.M., Inoue L.K., Moraes G. 2006. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei: characidae) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 143: 67-72.
- Hori T.S.F., Avilez I.M., Iwama G.K., Johnson S.C., Moraes G., Afonso L.B.O. 2008. Impairment of the stress response in matrinxã *Brycon amazonicus* exposed to low concentrations of phenol. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 147: 416-423.
- Iwata H., Yoshinari K., Negishi M., Stegeman J.J. 2002. Species-specific responses of constitutively active receptor CYP2B coupling: lack of CYP2B inducer-responsive nuclear translocation of CAR in marine teleost, scup (*Stenotomus chrysops*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 131: 501-510.
- James M.O., Lou Z., Rowland-Fawx L., Celander M.C. 2005. Properties and regional expression of a CYP3A-like protein in channel catfish intestine. *Aquatic Toxicology*. 72: 361-371.
- Jørgensen E.H., Wolkers J. 1999. Effect of temperature on the P4501A response in winter- and summer-acclimated Arctic char (*Salvelinus alpinus*) after oral benzo[a]pyrene exposure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 56: 1370-1375.

- 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. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 323: 43-56.
- Khedhaier A., Hassen E., Bousouina N., Gabboui S., Ahmed S.B., Chouchane L. 2008. Implication of xenobiotic metabolizing enzyme gene (CYP2E1, CYP2C19, CYP2D6, mEH and NAT2) polymorphisms in breast carcinoma. *Biomed Central Cancer*. 8: 1-12.
- Kirby M.F., Lyons B.P., Waldock M.J., Woodhead R.J., Goodsir F., Law R.J., Matthiesen 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 pp.
- 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.
- Lewis A.C., Bartle K.D., Pilling M.J. 2002. Formation and lifetime of polycyclic aromatic compounds during national-scale transient pollution episode. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 22: 175-196.
- Lewis N., Williams T.D., Chipman K. 2004. Functional analysis of xenobiotic response elements (XREs) in CYP1A of the European flounder (*Platichthys flesus*). *Marine Environmental Research*. 58: 101-105.
- Li D., Yang X.L., Zhang S.J., Lin M., Yu W.J., Hu K. 2008. Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): possible implications for the establishment of a fish CYP3A model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*. 147: 17-29.
- Loutfy N., Fuerhacker M., Tundo P., Raccanelli S., Ahmed M.T. 2007. Monitoring of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans, dioxin-like PCB and polycyclic aromatic hydrocarbons in food and feed samples from Ismailia city, Egypt. *Chemosphere* 66: 1962-1970.
- Lu Y., Cederbaum A. 2008. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free radical biology and medicine*. 44: 723-738.

- Luthe G., Stroomberg G.J., Ariese F., Brinkman U.A.T., van Straalen N.M. 2002. Metabolism of 1-fluoropyrene and pyrene in marine flatfish and terrestrial isopods. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 12: 221-229.
- Mahéo K., Morel F., Langouët S., Kramer H., Ferrec E.L., Ketterer B., Guillouzo A. 1997. Inhibition of Cytochrome P-450 and induction of Glutathione S-Transferases by Sulforaphane in primary human and rat hepatocytes. *Cancer Research*. 57:3649-3652.
- Malmström C.M., Koponen K., Lindström-Seppä P., Bylund G. 2004. Induction and localization of hepatic CYP4501A in flounder and rainbow trout exposed to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 58: 365-372.
- Maradonna F., Polzonetti V., Bandiera S.M., Migliarini B., Carnevali O. 2004. Modulation of the hepatic CYP1A1 system in the marine fish *Gobius niger*, exposed to xenobiotic compounds. *Environmental Sciences and Technology*. 38: 6277-6282.
- Meyer J.N., Nacci D.E., Di-Giulio R.T. 2002. Cytochrome P4501A (CYP1A) in killifish (*Fundulus heteroclitus*); heritability of altered expression and relationships to survival in contaminated sediments. *Toxicological Sciences*. 68: 69-81.
- 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. *Aquatic Toxicology*. 44: 183-193.
- Mikstacka R., Gnojowski J., Baer-Dubowska W. 2002. Effect of natural phenols on the catalytic activity of cytochrome P450 2E1. *Acta Biochimica Polonica*. 49: 917-925.
- Moore M.J., Mitrofanov I.V., Valentini S.S., Volkov V.V., Kurbskiy A.V., Zhimbey E.N., Eglinton L.B., Stegeman J.J. 2003. Cytochrome P4501A expression, chemical contaminants and histopathology in roach, goby and sturgeon and chemical contaminants in sediments from the Caspian Sea, Lake Balkhash and the Ily River Delta, Kazakhstan. *Marine Pollution Bulletin*. 46: 107-119.
- Mougin C. 2002. Bioremediation and phytoremediation of industrial PAH-polluted soils. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 22: 1011-1043.
- Nemeth K.R., Weyand E.H. 2002. Evaluation of Ah genotype on PAH:DNA binding and metabolite excretion in mice fed coal tar. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 22: 899-910.
- Niwa T., Maekawa Y., Fujimoto M., Kishimoto K., Yabusaki Y., Ishibashi F., Katagiri M. 2002. Inhibition of human hepatic cytochrome P450s and steroidogenic CYP17 by nonylphenol. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 25: 235-238.

- Okuda T., Takada H., Naraoka H. 2003. Thermodynamic behavior of stable carbon isotopic compositions of individual polycyclic aromatic hydrocarbons derived from automobiles. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 23: 219-236.
- Orellana B.M., Guajardo V.T. 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista Médica de Chile*. 132; 85-94.
- Padrós J., Pelletier E., Oliveira-Ribeiro C. 2003. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic char (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 192: 45-55.
- Pandey M.K., Yadav S., Parmar D., Das M. 2006. Induction of hepatic cytochrome P450 isozymes, benzo(a)pyrene metabolism and DNA binding following exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon residues generated during repeated fish fried oil in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 231: 126-134.
- Paolini M., Perocco P., Canistro D., Valgimigli L., Pedulli G.F., Lori 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.
- Pavanello S. 2003. Metabolic and DNA repair variations in susceptibility to genotoxins. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 23: 49-107.
- 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 chemopreventive agent sulforaphane found in broccoli, induces phase-I xenobiotic metabolizing enzymes and increases free radical generation in rat liver. *Mutation Research*. 595: 125-136.
- Pikkarainen A.L. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Baltic Sea sediments. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 24: 667-679.
- Powley M.W., Carlson G.P. 2001. Cytochrome P450 isozymes involved in the metabolism of phenol, a benzene metabolite. *Toxicology Letters*. 125: 117-123.
- Rice C.A., Myers M.S., Willis M.L., French B.L., Casillas E. 2000. From sediment bioassay to fish biomarker connecting the dots using simple trophic relationships. *Marine Environmental Research*. 50: 527-533.

- Roche H., Bogé G. 2000. In vivo effects of phenolic compounds on blood parameters of a marine fish (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 125: 345-353.
- Rosemary, J. Surendiran A., Rajan S. Shashindran C.H. Adithan C. 2006. Influence of the CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on phenytoin hydroxylation in healthy individuals from south India. *Indian Journal Medical Research*. 123: 665-670.
- Roy L.A., Steinert S., Bay S.M., Greenstein D., Sapozhnikova Y., Bawardi O., Leifer I., Schlenk D. 2003. Biochemical effects of petroleum exposure in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) exposed to a gradient of sediments collected from a natural petroleum seep in CA, USA. *Aquatic Toxicology*. 65: 159-169.
- Schlezinger J.J., Struntz W.D.J., Goldstone J.V., Stegeman J.J. 2006. Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by coplanar polychlorinated biphenyl congeners. *Aquatic Toxicology*. 77: 422-432.
- Schwarzenbach R.P., Escher B.I., Fenner K., Hofstetter T.B., Johnson C.A., von Guten U. y Wehrli B. 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*. 313: 1072-1077.
- Seidel A., Frank H., Behnke A., Schneider D., Jacob J., 2004. Determination of dibenzo[*a,l*]pyrene and other fjord-region PAH isomers with mw 302 in environmental samples. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 24: 759-771.
- 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.
- Shaw M., Tibbetts I.R., Müller J.F. 2004. Monitoring PAHs in the Brisbane River and Moreton Bay, Australia, using semipermeable membrane devices and EROD activity in yellowfin bream, *Acanthopagrus australis*. *Chemosphere*. 56: 237-246.
- Šíroká Z., Drastichová J. 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination-Cytochrome P450 in fish. A review. *Acta Veterinaria Brno*. 73: 123-132.
- Skupinska K., Misiewicz-Krzeminska I., Stypulkowski R., Lubelska K., Kasprzycka-Guttman T. 2009. Sulforaphane and its analogues inhibit CYP1A1 and CYP1A2 activity induced by Benzo[*a*]pyrene. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 23: 18-28.
- Stegeman J.J. Woodin B.R., Singh H., Marjorie F., Celander O., Celander M. 1997. Cytochrome P450 (CYP) in tropical fishes: catalytic activities, expression of multiple

CYP proteins and high levels of microsomal P450 in liver of fish from Bermuda. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 116: 61-75.

- Stolyhwo A., Sikorski Z.E. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish –a critical review. *Food Chemistry*. 91: 303-311.
- 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.
- Villa-Cruz V., Davila J., Viana M.T., Vazquez-Duhalt R. 2009. 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. *Chemosphere*. 74: 1145-1151.
- Vuontisjärvi H., Keinänen M., Vuorinen P.J., Peltonen K. 2004. A comparison of HPLC with fluorescence detection and fixed wavelength fluorescence methods for the determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon metabolites in fish bile. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 24: 333-342.
- Vuorinen P.J., Keinänen M., Vuontisjärvi H., Baršienė J., Broeg K., Förlin 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 Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 53: 479-487.
- Wall K.L., Crivello J. 1998. Chlorzoxazone metabolism by winter flounder microsomes: evidence for existence of a CYP2E1-like isoform in teleost. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 151: 98-104.
- Webb D., Gagnon M.M., Rose T.H. 2005. Interannual variability in fish biomarkers in a contaminated temperate urban estuary. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 62: 53-65.
- Willet K.L., Gardinali P.R., Lienesch L.A., Di Giulio R.T. 2000. Comparative Metabolism and Excretion of Benzo(a)pyrene in 2 Species of Ictalurid Catfish. *Toxicological Sciences*. 58: 68-78.
- Williams T.D., Gensberg K., Minchin S.D., Chipman J.K. 2003. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). *Aquatic Toxicology*. 65: 141-157.

- Wong C.K.C., Yeung H.Y., Woo P.S., Wong M.H. 2001. Specific expression of cytochrome P4501A1 gene in gill, intestine and liver of tilapia exposed to coastal sediments. *Aquatic Toxicology*. 54: 69-80.
- Zapata-Pérez O., Simá-Alvarez R., Noreña-Barroso E., Güemes J., Gold-Bouchot G., Ortega A., Albores-Medina A. 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.
- Zapata-Pérez O., Gold-Bouchot G., Ortega A., López T., Albores A. 2002. Effect of pyrene on hepatic cytochrome P4501A (CYP1A) expression in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 42: 477-485.
- Zhang T., Zhu Y., Gunaratna C. 2005. Simultaneous determination of metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates by gradient liquid chromatography with UV detection. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 5(3):189-196.
- Zhang Y. 2001. Molecular mechanism of rapid cellular accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates. *Carcinogenesis*. 22: 425-431.