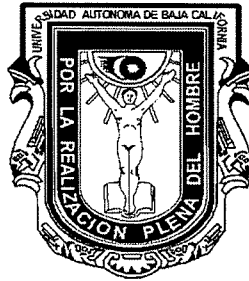


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



EFFECTO QUIMIOPROTECTOR DE LA INCLUSIÓN A CUATRO NIVELES DE
BRÓCOLI EN LA DIETA BALANCEADA DE TRUCHA ARCOIRIS
(*Onchorhynchus mykiss*) CONTRA LOS EFECTOS SUBLETALES DEL FENOL

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS DE ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA


LEHABIM MOISÉS MARCIAL MARTÍNEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. AGOSTO DE 2011

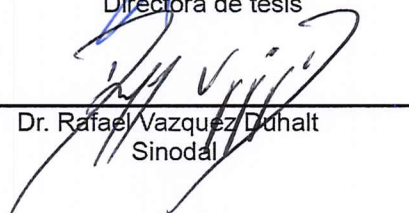
EFFECTO QUIMIOPROTECTOR DE LA INCLUSIÓN A CUATRO NIVELES DE BRÓCOLI EN LA
DIETA BALANCEADA DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) CONTRA LOS
EFFECTOS SUBLETALES DEL FENOL

Los compuestos fenólicos en el medio acuático tienen diversas fuentes de origen tanto naturales como antropogénicas, una amplia distribución y son considerablemente tóxicos para los organismos clave como los peces. La acuicultura es una actividad importante a nivel mundial y tiene que enfrentar el peligro potencial de la presencia de estos compuestos en los medios de cultivo, representando con ello un factor de pérdidas además de los riesgos sanitarios para el consumo humano. Los peces de agua dulce son un grupo muy susceptible a éste peligro por el uso de aguas provenientes de fuentes bajo la influencia de contaminación urbana, industrial y agrícola, principalmente. Entre las especies de agua dulce de mayor importancia en México se encuentra la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). La trucha arcoíris, como los demás organismos, posee un sistema de metabolismo de xenobióticos, éste mismo sistema puede bioactivar los compuestos fenólicos a formas más tóxicas. La biotecnología en acuicultura nos permite buscar soluciones para atender a éste problema por medio de diversas estrategias como el uso de quimioprotectores que al ser integrados a la dieta formulada del pez le confieran una protección contra los efectos adversos de los contaminantes. Un grupo de fitoquímicos presentes en los vegetales crucíferos como el brócoli (*Brassica oleracea*) han mostrado proveer quimioprotección contra los efectos dañinos de compuestos tóxicos en diversos estudios. Por ello, el presente trabajo evaluó el efecto quimioprotector de dietas formulada enriquecidas con brócoli a cuatro niveles (0, 5, 10 y 20%) contra los efectos tóxicos de una concentración subletal de fenol. La dieta fue suministrada a los peces por un periodo de 30 días tras los cuales se evaluaron parámetros biométricos, además del contenido de compuestos fenólicos en bilis y la actividad de enzimas del metabolismo de xenobióticos (EROD y GST) y estrés oxidativo (SOD). Los compuestos fenólicos y actividad de enzimas fueron nuevamente medidos a las 24 y 48 horas después de una inducción con una concentración de 6.72 mg L^{-1} de fenol, determinada como el límite inferior del intervalo de confianza de la LC_{50} de 48 horas para éste estudio. El contenido de compuestos fenólicos en bilis, EROD y GST no proporcionaron los datos esperados para establecer un efecto quimioprotector de la dieta. La GST por su parte mostró mantener los niveles de actividad a través de los tiempos muestreados que fue diferente al descenso observado en los peces sin inclusión de brócoli a las 24 horas. No se concluye que la dieta formulada tenga un efecto quimioprotector, sin embargo, en base a la experiencia adquirida en el trabajo se hace mención de algunas recomendaciones para trabajos posteriores.


Aprobada por:



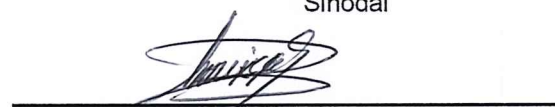
Dra. María Teresa Viana Castrillón
Directora de tesis



Dr. Rafael Vazquez Dahalt
Sinodal



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes
Sinodal



Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Sinodal

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

EFFECTO QUIMIOPROTECTOR DE LA INCLUSIÓN A CUATRO NIVELES DE
BRÓCOLI EN LA DIETA BALANCEADA DE TRUCHA ARCOIRIS
(*Oncorhynchus mykiss*) CONTRA LOS EFECTOS SUBLETALES DEL FENOL

TESIS

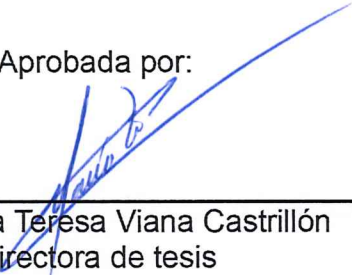
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

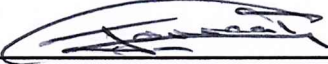
PRESENTA

LEHABIM MOISÉS MARCIAL MARTÍNEZ

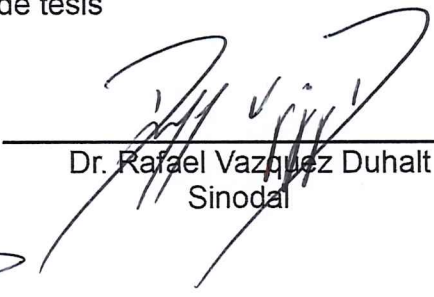
Aprobada por:



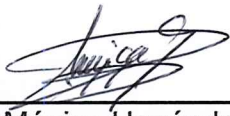
Dra. María Teresa Viana Castrillón
Directora de tesis



Dr. Juan Gabriel Correa Reyes
Sinodal



Dr. Rafael Vazquez Duhalt
Sinodal



Dra. Mónica Henández Rodríguez
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca en el periodo de agosto de 2008 a julio de 2010 con el número de Becario 267211.

A la Facultad de Ciencias Marinas (FCM), mi *alma mater*, en donde viví bellos momentos y ocasiones de madurar.

A los maestros que son parte de ésta gran institución, personal administrativo y a todos los que trabajan por la *realización plena del hombre*.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) por ser un instituto de gran solidez y vanguardia de la cual también he obtenido grandes cosas, así como a la ayuda de mucho de su personal administrativo, de investigación, docente y técnico a quienes ya he agradecido personalmente.

A la Doctora María Teresa Viana, mi directora de tesis, por sus grandes enseñanzas en el vasto y maravilloso mundo de la investigación, por sus consejos, ayuda y apoyo en verdad grande para poder llevar a cabo éste proyecto tan maravilloso de mi vida. También por la oportunidad de poder ser parte de un grandioso equipo de trabajo. Honor a quien honor merece.

Al Dr. Juan Gabriel Correa Reyes por las lecciones y ayuda tan grandes en las cuestiones de cultivo de peces, me he llevado grandes cosas de ello.

Al Dr. Rafael Vazquez Duhalt quien con su ayuda me ha dado la oportunidad de aprender la lógica y rigor del trabajo de investigación y que con sus conocimientos me ayudo a cimentar importantes cosas de éste trabajo.

A la Dr. Mónica Hernández Rodríguez quien con sus observaciones me ayudó a pisar en suelo seguro en una rama de la ciencia nueva y desconocido para mí.

Al laboratorio de Ecología Molecular “Dr. Jorge de la Rosa Vélez” por su apoyo en el uso de equipo esencial para gran parte de éste trabajo.

Al equipo integrante del laboratorio de Nutrición y Fisiología como el MC Marco A. González y la MC Griselda M. Parés.

A Mis compañeros dentro del mismo laboratorio, pasados y presentes, por ser parte de éste trabajo en poco o mucho y a quienes ya he agradecido personalmente: Emmanuel, Emyr, Marco, Daniel, Josué, Jaime, Ariana, Servando, Fernando, Augusto, Edith y muchos otros que sin afán de descortesía por no mencionar sus nombres ofrezco mis agradecimientos sinceros. Al Dr. Jorge Dávila por su ayuda e instrucción y enseñarme las primeras cosas que me ayudaron a diseñar el presente trabajo.

DEDICATORIA

La Primera Dedicatoria y Agradecimiento Infinito será algo que seguiré haciendo toda mi vida, a Él. Gracias.

A mi esposa Pamela por ser mi compañera en éste viaje y por su apoyo incondicional para poder lograr éste proyecto de mi vida. Continuemos de viaje los dos.

A mis Padres, mis grandes amigos, por todo lo que han dado de sus vidas para mi superación y las oportunidades que me han dado de conocer, viajar, estudiar, gozar, sentir. Por todo lo que han dedicado y que espero ésta satisfacción pueda en cierto grado compensar todo ello. Los amo.

A mi familia en Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, mis abuelos, mis tías y tíos, primos, sobrinos. Todos caben en éste momento de gozo.

A mi familia extendida, mi suegra Paulina, mi cuñada Luci, mi sobrino Eduardo, los parientes de Mochis. Son importantes en éste suceso tan especial.

INDICE GENERAL

CARÁTULA	I
RESUMEN	II
PAGINA DE APROBACIÓN	III
AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. Compuestos fenólicos en el medio acuático	1
1. 1. 1. Riesgos en cultivos de organismos acuáticos	2
1. 1. 2. Riesgos en salud pública	3
1. 2. Aspectos del metabolismo de xenobióticos en peces	4
1. 2. 1. Metabolismo de fase I	5
1. 2. 2. Metabolismo de fase II	6
1. 3. Enzimas de estrés oxidativo	7
1. 4. Quimioprotectores en biotecnología	7
2. ANTECEDENTES	10
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVO	15

4.1. Objetivo General	15
4.2. Objetivos Particulares	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5. 1. Manejo de los organismos	16
5. 2. Formulación de la dieta de trucha arcoíris	18
5.3. Determinación de la CL ₅₀ de 48 horas de fenol	19
5.4. Diseño experimental	20
5.4.1. Ensayo de quimioprotección	20
5.4.2. Toma de muestras	22
5.5. Análisis de compuestos fenólicos en la bilis de trucha arcoíris	23
5.6. Obtención de fracciones enzimáticas de hígado de trucha	26
5.7. Ensayos enzimáticos	28
5.7.1. Metabolismo de fase I (EROD)	28
5.7.2. Metabolismo de fase II GST)	28
5.7.3. Estrés oxidativo (SOD)	29
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Determinación de la CL ₅₀ de 48 horas de fenol	31
7.2. Índices biológicos	31
7.3. Compuestos fenólicos en bilis de trucha arcoíris	34

7.4. Actividad enzimática del metabolismo de fase I	34
7.5. Actividad enzimática del metabolismo de fase II	35
7.6. Estrés oxidativo	37
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIONES	48
10. RECOMENDACIONES	49
11. LITERATURA CITADA	50
12. GLOSARIO DE ÍNDICES BIOLÓGICOS	60

INDICE DE CUADROS

Cuadro I. Ingredientes contenidos en las dietas experimentales de trucha arcoíris (<i>O. mykiss</i>) con distintos niveles de brócoli (0, 5, 10 y 20%) y su composición proximal de acuerdo a la AOAC (1990).	18
Cuadro II. Distribución del 2% de biomasa de alimentación diaria de trucha.	22
Cuadro III. Mortalidades acumulativas de la determinación de la CL ₅₀ en trucha arcoíris (<i>O. mykiss</i>).	32
Cuadro IV. Comparación de peso de trucha arcoíris alimentadas por 30 días con dietas a diferentes niveles de brócoli. Biomasa por estanque, 12 organismos por estanque.	33
Cuadro V. Análisis estadístico del Crecimiento Absoluto (CA) de trucha arcoíris al final de la alimentación de 30 días con diferentes niveles de brócoli en la dieta.	35
Cuadro VI. Las medias de las actividades enzimáticas de GST ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$) de la fracción citosólica de los hepatocitos de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).	36

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de caja de las actividades de GST	38
---	----

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Compuestos fenólicos en el medio acuático

El fenol y sus compuestos simples halogenados son importantes productos industriales y naturales que se encuentran presentes en medios acuáticos, por su naturaleza pueden ser tóxicos aunque su dinámica y efectos están aún en estudio (Sierra *et al.*, 2009). El fenol está presente en forma molecular en las descargas de refinerías de petróleo, coquerías (carbonización de carbón), manufactura de resinas industriales, plantas de procesamientos de productos químicos derivados del petróleo e industrias como la farmacéutica, plástica y de barnices; además de las industrias de madera, tintes, acero, hierro, fibras sintéticas, detergentes, pesticidas, explosivos y plantas de celulosa (Ng *et al.*, 1997; Vorob'eva *et al.*, 2007; Baryamoglu *et al.*, 2009). Las fuentes naturales del fenol se encuentra en plantas y frutas, desechos animales y humanos como producto del metabolismo de los aminoácidos aromáticos en el tracto digestivo, en la biotransformación del benceno, biotransformación y degradación de materia orgánica por destrucción microbiana e hidrolítica de ácidos fúlvicos y húmicos de alto peso molecular, entre otros (Lob y Tar, 2000; Vorob'eva *et al.*, 2007; Marchioni Avilez *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009).

1. 1. 1. Riesgos en cultivos de organismos acuáticos

El cultivo de organismos acuáticos en agua dulce es una actividad practicada en México y existe la necesidad de impulsarla de acuerdo a las estrategias de desarrollo del país (SAGARPA, 2011). De acuerdo a la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) a través de la CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca) se cuenta con una producción pesquera de 1, 573 millones de toneladas métricas, de las cuales el 18% corresponde a la acuicultura con 283 625 toneladas (SAGARPA, 2010). En México la producción promedio anual de organismos de agua dulce (Carpa, mojarra o tilapia, trucha arcoíris y anfibios) es de 71 000 toneladas, de las cuales 3 400 ton corresponden a trucha arcoíris que se cultivan en 10 estados del país (SAGARPA, 2006; SAGARPA, 2011). El cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) se ha extendido y es una de las especies principales en distintas regiones del mundo. La producción mundial de éste organismo para el año 2008 representaba 17.4 % (0.58 millones ton) de los peces diadromos, en tercer lugar detrás del salmón del atlántico (1.5 millones ton, 44%) y del chano (0.68 millones ton, 20.4%) (FAO, 2010).

El agua de uso de los sistemas de acuicultura se encuentra bajo la influencia de descargas urbanas, industriales y agrícolas que tienen presentes sustancias contaminantes que ponen en peligro la viabilidad de los cultivos, entre ellos, los de trucha arcoíris. Uno de los compuestos clave es el fenol por

su amplia distribución, toxicidad, biodegradabilidad pobre y peligro ecológico a largo plazo (Hallenbeck y Cunningham, 1986).

Los efectos tóxicos del fenol son conocidos en peces, la concentración letal de éste compuesto esta en el intervalo de 5 a 25 mg L⁻¹ para la tilapia mosambica, *Oreochromis mossambicus* (Saha *et al.*, 1999). En la tilapia nilótica (*O. niloticus*) disminuyó los niveles de las hormonas tiroides T₃ y T₄ que controlan el crecimiento y el desarrollo, provocando una relación inversa en éstas en éstas respuestas, así como la presencia de micronúcleos en los eritrocitos que son prueba de exposición a sustancias genotóxicas (Gad y Saad, 2008). En el pez marino *Dicentrarchus labrax* una inyección intra-abdominal de 50 mg por cada 100 g de pez mató a todos los peces en 2 horas y redujo significativamente algunos parámetros sanguíneos como los niveles de nitrógeno de urea en sangre (BUN), la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) y el cortisol, indicando con ello alteraciones en el metabolismo de proteínas, intoxicación a nivel de neuronas y posible daño hepático. En la trucha arcoíris la concentración letal CL₅₀ de fenol a las 48 horas se determinó en 9.3 mg mL⁻¹, incrementando la sensibilidad a este compuesto con el aumento en salinidad a 5.2 mg mL⁻¹ en 60 % agua de mar (Brown *et al.*, 1967).

1. 1. 2. Riesgos en salud pública

La toxicidad del fenol en humanos se debe a su rápida absorción por inhalación oral y vía dérmica. Una vez absorbido el fenol se distribuye

rápidamente en el cuerpo, y los niveles en pulmones, hígado y riñones se reportan como los más altos (EPA, 2002).

1. 2. Aspectos del metabolismo de xenobióticos en peces

La exposición de los organismos a compuestos sintetizados por el hombre o xenobióticos induce respuestas bioquímicas, fisiológicas e histológicas denominadas biomarcadores. Estas respuestas se pueden evaluar mediante técnicas de laboratorio (Siroka y Drastichova, 2004). El fin de estas respuestas es el metabolismo del contaminante o xenobiótico para su eliminación y así evitar daño a las células del organismo.

El metabolismo de los xenobióticos es un proceso que comprende dos fases: Las reacciones de la fase I que involucra la generación de compuestos más polares por las reacciones de oxidación, reducción y/o hidrólisis del sustrato, lo cual puede resultar en la reducción de la efectividad del xenobiótico metabolizado, denominado bioeliminación. Si esto no sucede, se puede producir una forma activa del compuesto ó bioactivación. Las reacciones de la fase II comprenden la formación de conjugados con los metabolitos producidos de la fase I, y ocasionalmente los compuestos originales interactúan con productos del metabolismo endógeno como el glucoronato, glutatona, 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato y otros para producir compuestos polares que son eliminados del organismo (Siroka y Drastichova, 2004).

1. 2. 1. Metabolismo de fase I

Las enzimas más importantes del metabolismo de fase I son la superfamilia del citocromo P450 o CYP. El CYP es una de las más grandes y versátiles familias de proteínas. El CYP se clasifica como una hemoproteína de tipo b debido a la estructura básica de grupo hemo que se encuentra en otras enzimas como la citocromo c oxidasa en la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, la hemoglobina de la sangre y mioglobina de los músculos. Su nombre, citocromo, se deriva por su descubrimiento como un pigmento que en acoplamiento con el monóxido de carbono (CO) absorbe luz a 450 nm. La forma inactiva del CYP absorbe luz a 420 nm (Šíroká y Drastichová, 2004). La clasificación del CYP es muy amplia, la designación se realiza con base en las familias y subfamilias de acuerdo a la similitud en la secuencia de aminoácidos. El símbolo de CYP se deriva de citocromo P450 seguido de un número arábigo que indica la familia, luego una letra que indica la subfamilia y finalmente otro número arábigo para indicar miembros individuales de las subfamilias; por ejemplo, el CYP2E1. Desde el año 1998 se ha adoptado una clasificación más sofisticada debido al incremento en el número de proteínas identificadas junto con su secuencia en el genoma de diversos organismos. En esta clasificación las familias se agrupan dentro de órdenes superiores denominados clanes (Nelson 1996, 1998, 1999).

El CYP se asocia con las membranas del retículo endoplasmático, aunque también se encuentra en las membranas mitocondriales; mientras que en bacterias, se localiza en el citosol en forma soluble. El CYP se encuentra presente en grandes cantidades en el hígado llegando a constituir el 1-2% de la masa total de los hepatocitos (Šíroká y Drastichová, 2004). Las enzimas del CYP se conocen por su particular función en el metabolismo fase I de una gran variedad de xenobióticos lipófilos como fármacos, pesticidas, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH, por sus siglas en inglés) y aloquímicos de plantas. Muchos otros, sin embargo, tienen funciones endógenas especializándose en el metabolismo de moléculas de señalización como hormonas esteroides, eicosanoides y feromonas (Rewitz *et al.*, 2006).

1. 2. 2. Metabolismo de fase II

La Glutathione-S-transferasa (GST) es una enzima representativa del metabolismo de xenobióticos de fase II. La GST es una proteína citosólica responsable de la conjugación del tripéptido glutathione con los electrófilos producidos en los organismos tras un estrés oxidativo por compuestos (Lauren *et al.*, 1989; Pérez-López *et al.*, 2002; Stephensen *et al.*, 2002). La actividad GST denota la existencia de las enzimas que metabolizan las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) derivadas de la presencia de compuestos generadores de estos radicales libres o de otras fuentes diversas como la radiación UV (Monserrat *et al.*, 2008).

1. 3. Enzimas de estrés oxidativo

Los organismos aeróbicos, como los peces, son susceptibles al ataque de especies reactivas de oxígeno (ERO). El metabolismo de las células es una fuente continua de ERO que resultan de la reducción univalente del oxígeno (O_2) que tienen el potencial de dañar los componentes celulares y llevar a la muerte de la célula (Morales *et al.*, 2004; Trenzado *et al.*, 2006). El organismo tiene un sistema de defensa enzimático para prevenir el daño por estos radicales libres. La Superoxido Dismutasa (SOD) convierte el anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Existen dos variedades, una en la fracción citosólica, que contiene Cu y Zn; y la mitocondrial que contiene una isoenzima, la Mn-superoxido dismutasa. Ambas se han utilizado como marcadores en el diagnóstico de enfermedades clínicas hematológicas (Aksnes y Njaa, 1981).

1. 4. Quimioprotectores en biotecnología

La búsqueda de quimioprotectores que prevengan en los organismos los daños por compuestos tóxicos presentes en el medio acuático sería un gran campo de aplicación dentro de la biotecnología en acuicultura para prevenir las pérdidas en cultivos y posibles riesgos para los consumidores. Tal búsqueda debe centrarse en los compuestos del medio natural.

El consumo de vegetales amarillos y verdes se ha relacionado con la baja incidencia de cáncer en ciertos grupos de población, lo cual llevó a estudiar

algunos de ellos, entre los que destacaron los de la familia *Cruciferae* (Brócoli, coliflor, mostaza, berro, coles de Bruselas, entre otros), en los cuales se encontró una rica fuente de inductores de enzimas de la fase II y que previenen el desarrollo de cáncer en líneas celulares de ratones Hepa 1c1c7 (Zhang *et al.*, 1992). Dentro de estos sistemas vegetales existe la interacción de enzima-sustrato que implica a la mirosinasa-glucosinolato, descrita por primera vez en 1840 por Bussy, y que comprende la coexistencia de la enzima mirosinasa en las inmediaciones de la pared celular y membrana de vacuola. Los glucosinolatos a su vez se albergan dentro de las paredes celulares vegetales y principalmente dentro de la vacuola donde se almacenan junto con ácido ascórbico. No es muy clara la función de los glucosinolatos pero se les vincula con el sistema de defensa para protección contra microbios y pestes, y como reguladores de crecimiento mediante el ácido indolacético (IAA) (Bones y Rossiter, 1996). A nivel celular los glucosinolatos son un grupo de metabolitos secundarios y una vez que la célula vegetal sufre daño mecánico, ataque, infección o pestes y/o rompimiento, se exponen a la acción hidrolítica de la mirosinasa con la cual hasta ese momento no habían tenido contacto. La hidrólisis de los glucosinolatos por la mirosinasa produce un compuesto inestable denominado tihidroximado-O-sulfonato, que de acuerdo a las condiciones de pH y otros factores deriva en la producción de isotiocianatos, tiocianatos, nitrilos y sulfuro elemental (Bones y Rossiter, 1996). Los isotiocianatos llamaron la atención al ser uno de tantos grupos de agentes químicos que en estudios con ratones inhibieron los efectos tóxicos y

neoplásico de compuestos carcinogénicos (Talalay *et al.*, 1988). Los germinados de brócoli son una fuente rica de isotiocianatos que inducen la actividad de las enzimas de la fase II (Fahey *et al.*, 1997). Entre los isotiocianatos que exhibieron mayor quimioprotección contra los compuestos carcinogénicos se encuentra el sulforafano (Zhang *et al.*, 1992).

El sulforafano (isotiocianato-4-metilsulfonibutil) es un compuesto quimioprotector que regula la actividad del citocromo P450 (CYP) generalmente evitando la bioactivación de compuestos xenobióticos por las enzimas de la fase I de detoxificación e induce las enzimas de la fase II, evaluándose su actividad en células experimentales humanas y de ratones (Fimognari, 2007). El sulforafano (SF) se encuentra presente en el brócoli y cuyo precursor es un glucosinolato llamado glucorafanin que es hidrolizado por la mirosinasa cuando hay ruptura o daño en el tejido vegetal (Hanlon *et al.*, 2008).

La presencia de compuestos quimioprotectores en el brócoli podría integrarse a dietas formuladas de peces para así evitar los efectos adversos de xenobióticos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto quimioprotector de la inclusión de brócoli a tres niveles en la dieta formulada de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) contra los efectos subletales del fenol.

2. ANTECEDENTES

El uso de biomarcadores para evaluar los efectos de la presencia de compuestos tóxicos sobre los organismos en el ambiente acuático se han utilizado desde décadas atrás. Los diversos estudios pretenden evaluar principalmente la actividad de las enzimas del metabolismo de xenobióticos de fase I y II en células del tejido hepático diversas especies de peces y otros.

Es así como el CYP1A1 fue estudiado mediante la actividad enzimática de la 7-etoxycoumarin-O-deetilasa (ECOD), además de la actividad de la anilina hidroxilasa, aldrin epoxidasa y contenido de CYP en hígado de la trucha de río o trucha café (*Salvelinus fontinalis*) al ser inducidas mediante administración de ingesta con una mezcla comercial de bifeniles policlorados (PCB's) denominada Aroclor 1254 (Monsanto Co.) y 3-metilcolantreno (Addison *et al.*, 1978). Mediante la actividad enzimática de la etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD), aldrin epoxidasa y GST en el bacalao (*Gadus morhua*) y la trucha arcoíris (*O. mykiss*), inducidos por administración oral de PCB-105 (Bernhoff *et al.*, 1994). También a través de EROD, por el contenido de CYP por ELISA y GST en tres substratos en la trucha común (*Salmo trutta*) inducidas con propiconazol por exposición en el agua (Egaas *et al.*, 1999). Mediante actividad EROD en dos especies de ciprínidos, *Leuciscus cephalus* y *Gobio gobio*, ambos muestreados en ríos sujetos o no a contaminación, donde aún se propone un método estadístico para la clasificación de aguas limpias y sucias (Flammarion y Garric, 1999).

Mediante EROD y GST se estudió en *Leuciscus cephalus* L. para evaluar los niveles de contaminación en varios ríos importantes de la República Checa (Havelkova *et al.*, 2008). A través del EROD en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) para evaluar sus niveles en aguas bajo influencia urbana de la región de Uppsala, Estocolmo con respecto a las no urbanizadas (Abrahamson *et al.*, 2007) y mediante EROD en el Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) para evaluar la calidad de aguas contaminadas de laboratorio y plataformas de petróleo en el Mar del Norte (Abrahamson, 2008).

Los estudios que existen sobre el uso de compuestos quimioprotectores como posibles remediadores de los efectos adversos de xenobióticos en peces se enfocan en probar compuestos de origen natural o sintético para evitar efectos tóxicos, mutagénicos o teratogénicos. Takahashi *et al.* (1995) estudiaron la capacidad del indol-3-carbinol (I3C), compuesto derivado del glucosinolato glucobrasicina en los vegetales crucíferos, en su acción de regular la inducción del CYP1A en el hígado de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) para proteger contra la hepatocarcinogénesis inducida por la Aflotoxina B₁ (AFB₁). Los resultados mostraron una correlación inversa dosis-dependiente con respecto a los resultados de EROD y encontraron que 1000 ppm de Indol-3-carbinol inhibieron la producción de abductos de AFB₁-DNA sin inducción detectable de actividad contra EROD. Farah *et al.* (2006) evaluaron el efecto antimutagénico del extracto etanólico de las hojas de Neem (*Azadirachta indica*) en el pez de agua dulce *Channa punctatus* inducidos con pentaclorofenol (PCP) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). A través de dos pruebas citogénicas,

observaron las aberraciones cromosómicas (CA, por sus siglas en inglés) y prueba de micronúcleos (MN) mediante una reducción en frecuencia de CA en 40 – 75 % y 45.4 – 83.3 %, en MN 40.2 – 75.3 % y 44.1 – 65.8 % para ambos xenobióticos probados, respectivamente.

Montserrat *et al.* (2008) probaron el ácido lipoico (LA, por sus siglas en inglés) como agente antioxidante en diferentes órganos (agallas, cerebro, músculo e hígado) del pez *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). En este estudio, el LA redujo significativamente las especies reactivas de oxígeno en cerebro e incrementó significativamente la actividad de la ligasa de glutamato-cisteína, además de incrementar significativamente la GST cerebral, indicando con esto que el LA mejora la capacidad detoxificante y antioxidante de compuestos que gastan la glutatona en las reacciones de la fase II. Villa-Cruz *et al.* (2009) y Dávila *et al.* (2010) evaluaron los efectos de la inclusión de brócoli en un porcentaje del 30 % y sulforafano a 0.55 mg kg^{-1} en dietas balanceadas de tilapia (*Oreochromis niloticus*) sobre las enzimas del metabolismo de xenobióticos y, también, el carácter quimioprotector de estas dietas contra los efectos mutagénicos y carcinogénicos de inyecciones intraperitoneales de Benzo(a)pireno. Tras una alimentación de 30 días, la inducción de los niveles de CYP aumentó, no así en SOD y GST donde hubo una disminución de las actividades tras el mismo periodo de alimentación. En el mismo estudio, la inducción a través de una inyección intraperitoneal de Benzo(a)pireno ($100 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ peso de pez), el remanente de éste en la bilis disminuyó tras 36 horas en los organismo alimentados con dietas enriquecidas de brócoli y sulforafano con

respecto al control correlacionándose con la disminución de la actividad EROD. Dávila *et al.* (2010) evaluaron el perfil de las actividades de varias familias del CYP en juveniles de tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuestas a dos concentraciones de fenol (2 y 20 mg L⁻¹) en tres tiempos de muestreo (0, 12 y 24 horas). Los resultados del estudio muestran que los peces que fueron alimentados con dieta enriquecida con brócoli por un periodo de 30 días antes de la inducción con el xenobiótico, mostraron incremento en los niveles de las actividades del CYP.

El presente trabajo se propone evaluar el efecto quimioprotector del brócoli en dietas formuladas para trucha arcoíris (*O. mykiss*) contra los efectos subletales del fenol mediante el monitoreo de biomarcadores celulares del metabolismo hepático de xenobióticos I (EROD) y II (GST), actividad de enzimas de estrés oxidativo (SOD), así como contenido de fenol en bilis.

3. HIPÓTESIS

Debido a la presencia del sulforafano, un compuesto quimioprotector en el brócoli, dietas preparadas con brócoli tendrán un efecto protector contra las concentraciones subletales de fenol en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto quimioprotector de la inclusión de brócoli en dietas isoproteicas e isoenergéticas formuladas para la trucha arcoíris (*O. mykiss*) contra los efectos subletales del fenol mediante el monitoreo de biomarcadores celulares del metabolismo de xenobióticos y estrés oxidativo.

4.2 Objetivos Particulares

Determinar los efectos de una concentración subletal de fenol sobre los parámetros del metabolismo de fase I, II y estrés oxidativo.

Evaluar el efecto de la alimentación con dietas enriquecidas con brócoli sobre los índices biológicos de crecimiento y desarrollo en la truchas arcoíris.

Evaluar los efectos de la alimentación con dietas enriquecidas con brócoli sobre la actividad de la enzimas de fase I, II y de estrés oxidativo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Manejo de los organismos

Truchas de 171 ± 10.7 g peso promedio y 23.35 ± 0.41 cm de longitud fueron mantenidas en dos estanques de 400 L cada uno en un sistema cerrado de recirculación conectado a un biofiltro tipo polygeyser de dos pies cúbicos de capacidad de “beads” para mantener las concentraciones de amonio, nitrito y nitrato óptimos para una buena calidad de agua. Aireación constante fue suplementada a fin de poder mantener el nivel de aire en óptimas condiciones para los peces. Durante el mantenimiento se les proveyó de alimento *ad libitum* tres veces al día con alimento comercial de trucha (Silvercup, Murray, Utah 84157, Engorda, 3.5 mm, extruido flotante, 40 % proteína, 10 % grasa) sin inclusión de brócoli por un periodo de 3 semanas previo al inicio de los experimentos y monitoreando los parámetros de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, amonio, nitrito, nitrato, fosfatos y pH cada 72 horas. La temperatura de trabajo para todos los experimentos fue de 15 ± 3 °C.

Para la determinación de la concentración letal media de 48 horas de fenol (CL_{50} de 48 horas) organismos del lote previamente descrito fueron tomados y puestos en estanques cilíndricos de 200 L los cuales contenían agua dulce previamente desinfectada y aireada. La distribución y sorteo de las truchas se describe en la sección correspondiente. El sistema era estático y se realizaban recambios de agua las 9, 14 y 19 horas del día a fin de mantener los

parámetros óptimos de calidad de agua. El monitoreo de los parámetros se llevaba a cabo cada 12 horas durante el tiempo del bioensayo de 48 horas. Las truchas se mantuvieron en éste sistema por tres días alimentándose en el régimen ya explicada anteriormente, luego se les dejó de alimentar por un día previo al ensayo de intoxicación para la determinación de la CL_{50} de 48 horas.

Para el caso del ensayo de quimioprotección el sistema consistió de un grupo de 12 estanques circulares de plástico de 550 litros de capacidad, dispuestos en dos hileras de seis. El agua circula de los estanques a un sistema de drenaje común por medio de un tubo de PVC de 4" que hacía llegar el agua de desecho a un estanque de compensación de 1 100 litros que por medio de una motobomba impulsaba el agua a través del biofiltro y entonces, regresaba nuevamente al sistema por medio de tubos de alimentación de PVC de 1". El biofiltro tiene dos funciones principales, la primera de ellas es filtrar los sólidos en suspensión que luego con removidos por medio de retrolavados y, la segunda función es permitir que las bacterias nitrificantes transformen los compuestos orgánicos como el amonio a formas menos tóxicos como el nitrato. Se mantuvo una aireación constante a fin de mantener una concentración de oxígeno óptima para los organismos residentes en los estaques. La temperatura se registró diariamente para asegurar que el sistema se mantuviera en 15 ± 3 °C, conforme a las condiciones térmicas óptimas de la especie.

Cuadro I. Ingredientes contenidos en las dietas experimentales de trucha arcoíris

(*O. mykiss*) con distintos niveles de brócoli (0, 5, 10 y 20%) y su

composición proximal de acuerdo a la AOAC (1990).

INGREDIENTES (g 100 g ⁻¹)	DIETA			
	<i>Broc-0</i>	<i>Broc-5</i>	<i>Broc-10</i>	<i>Broc-20</i>
Harina de Brócoli	0	5	10	20
Harina de Pescado	67	64.07	61.138	55.276
Harina de Maíz	5.5	5.5	5.5	5.5
Aceite de Pescado	10.62	10.85	11.09	11.56
Fécula de Maíz	12.5	10.2	7.9	3.3
Grenetina	6	6	6	6
Vitaminas	1.5	1.5	1.5	1.5
Stay C*	0.4	0.4	0.4	0.4
Minerales	1.2	1.2	1.2	1.2
Benzoato de sodio	0.23	0.23	0.23	0.23
Cloruro de Colina	0.09	0.09	0.09	0.09
Tocoferol	0.01	0.01	0.01	0.01
TOTAL	105.05	105.05	105.058	105.066

COMPOSICIÓN PROXIMAL (g 100 g ⁻¹ peso seco)				
Proteína cruda	45.29	45.29	45.29	45.29
Grasa cruda	16.01	16.00	16.00	16.00
Cenizas	9.18	8.83	8.48	7.78

* **Stay C:** Mezcla comercial deshidratada de L-ascorbil-2-polifosfato (AsPP), vitamina C

estabilizada con 35% de actividad de ácido ascórbico

5.2. Formulación de la dieta de trucha arcoíris

Las dietas balanceadas para trucha arcoíris se formularon de acuerdo a los tratamientos del Cuadro 1. Con el fin de proporcionar una entrada isoproteica e isocalórica se balancearon las cantidades de cada componente ya que la inclusión de brócoli seco aporta un 30% de proteína cruda en masa seca, por ello a mayor inclusión de brócoli se redujo la inclusión de harina de pescado.

La harina de brócoli que se incluyeron en las dietas se obtuvo al moler brócoli comercial (Pure Nature™ Brócoli Orgánico Congelado / La Huerta® Brócoli Congelado) adquirido en tiendas de autoservicio locales con ayuda de una licuadora convencional. La masa molida resultante se secó en una estufa de aire forzado a 60°C durante 24 horas. El brócoli seco se molió en un molino de granos hasta obtener una harina fina que posteriormente fue cernida para poder remoler las fracciones gruesas retenidas.

5.3. Determinación de la concentración letal de fenol de 48 horas (CL₅₀ de 48 horas)

La concentración letal media de fenol (CL₅₀) se determinó a partir de un grupo de 48 truchas y de manera previa al ensayo de quimioprotección usando las recomendaciones de la US EPA (2002) para un sistema estático sin renovación de agua. Se utilizaron cuatro organismos por unidad experimental de 171 ±10.7 g peso promedio y 23.35 ±0.41 cm de longitud. Tres unidades experimentales se escogieron al azar para ser las réplicas de cada tratamiento de fenol. Las concentraciones utilizadas para determinar la CL₅₀ de 48 horas fueron de 0, 6, 9 y 12 mg L⁻¹ las cuales se establecieron de acuerdo al criterio de Brown *et al.* (1967) y Mitrovic *et al.* (1998). El fenol fue pesado en una balanza analítica bajo normas de seguridad con el uso de máscara de gases y guantes. La cantidad pesada para cada tratamiento se calculó al multiplicar la concentración final requerida en cada tratamiento por el volumen final de agua de 120 L. El fenol se colocó dentro de un tubo falcón de 50 mL con tapa y antes

de agregarlo al estanque se agregó una cantidad aproximada de 40 mL de agua destilada para disolver. Las observaciones de mortalidad se realizaron cada media hora durante las primeras 6 horas, luego hasta las 12 horas y adelante en intervalos de 12 horas hasta las 48 horas. La mortalidad se determinó al observar falta de movilidad, nulo movimiento opercular y la falta de respuesta al estímulo cuando fueron tocados con una varilla de vidrio. Los datos de mortalidad se analizaron con el modelo de Trimmed Spearman-Kärber para la CL_{50} (US-EPA, 2002; Hamilton *et al.*, 1977) para determinar media y los límites superior e inferior del intervalo de confianza de la CL_{50} de 48 horas en este experimental. El límite inferior del intervalo de confianza de la CL_{50} de 48 horas del fenol se utilizó como la concentración subletal para el ensayo de quimioprotección.

5.4 Diseño experimental

5.4.1. Ensayo de quimioprotección

El ensayo de quimioprotección se desarrolló con 144 organismos de trucha arcoíris (*O. mykiss*) del mismo lote usado para la determinación de la CL_{50} de 48 horas con un peso promedio de 198.1 ± 11.7 g. Cuatro tratamientos fueron probados en este experimento; 0, 5, 10 y 20% de brócoli, cada uno por triplicado y asignados al azar en cada uno de los 12 estanques del experimento. Una vez transferidas las truchas al sistema se alimentaron *ad libitum* tres veces al día por una semana con alimento formulado sin inclusión de brócoli.

Entonces, los organismos fueron alimentados durante 30 días con su dieta respectiva al 2% de su peso por día ofrecida en cuatro raciones en intervalos de 4 horas a partir de las 8 am, dando un 40 por ciento al inicio del día y un 20 por ciento de la ración diaria en cada una de las tres entregas restantes (Cuadro II). La ingesta diaria correspondió a un 50% más de lo indicado en las tablas de alimentación comercial (El Pedregal, Silvercup®) para la especie a fin de no subalimentar a los organismos. Al final del periodo de alimentación de 30 días se midió la biomasa total de cada estanque para determinar el crecimiento absoluto (CA), crecimiento relativo (CR), tasa de conversión alimenticia (TCA) y tasa de crecimiento específica (TCE). Posteriormente, se sacrificaron cuatro organismos de cada estanque para determinar el índice hepatosomático (IHS), contenido de compuestos fenólicos en bilis y los niveles basales de los parámetros enzimáticos del metabolismo de xenobióticos de fase I (EROD) en la fracción microsomal, fase II (GST) y estrés oxidativo (SOD) en la fracción citosólica de hepatocitos. Los organismos restantes se mantuvieron en el sistema de recirculación. Los estanques fueron privados de flujo de agua a fin de poder realizar la intoxicación con fenol en medio estático y a un volumen de 120 L.

Las indicaciones de la EPA (2002) comentan en relación a los problemas de alimentar a los peces durante los bioensayos de carácter estático, ya que podría ocasionar modificaciones de la concentración del tóxico al adsorberse en el alimento, acumulación de residuos de alimentos y residuos metabólicos con la resultante demanda de oxígeno y cambio en los parámetros de calidad de

agua. Por lo anterior, se optó por dejar sin alimentación a las truchas ya dispuestas en el sistema estático antes de ser intoxicadas con el fenol. Una vez agregado el fenol para llevar a cabo la intoxicación de los peces se realizó un muestreo a las 24 horas y finalmente otros a las 48 horas.

Cuadro II. Distribución del 2% de biomasa de alimentación diaria de trucha.

Hora del día	Porción
8:00	2/5 partes
12:00	1/5 parte
16:00	1/5 parte
20:00	1/5 parte

5.4.2. Toma de muestras

Se colectaron 4 organismos de cada unidad experimental a las 24 y 48 horas después de iniciada la intoxicación con fenol en los estanques. Se determinaron sus parámetros biométricos y posteriormente fueron sacrificados y disectados. El hígado y bilis fueron extraídos de la cavidad visceral. Las muestras fueron empacadas y rotuladas de acuerdo al tratamiento de brócoli y hora del muestreo. Una cama de hielo seco se dispuso dentro de una hielera

para criogenizar las muestras para posteriormente almacenarlas en un ultracongelador (Revco) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis correspondiente. El hielo seco tiene un punto de ebullición de $-78.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.5. Análisis de compuestos fenólicos en la bilis de trucha arcoíris

La bilis obtenida de cada organismo fue analizada mediante cromatografía de gases con un detector de ionización de flama (CG-IF) y cromatografía líquida de alto desempeño con un detector de UV (HPLC-UV) para encontrar metabolitos fenólicos en los tiempos muestreados.

La extracción de compuestos fenólicos para su análisis por CG-IF se llevó a cabo mediante dos metodologías y solamente una para el caso del HPLC-UV que se describen a continuación:

1) Extracción de compuestos fenólicos por acetilación de compuestos liberados por acidificación de bilis para su análisis en CG-IF.

Se utilizó la metodología de acuerdo a Balíková y Kohlíček (1989), con modificaciones, los pasos en resumen son los siguientes: En frasco de cristal delgado color ámbar de 4.5 cm de altura y 1.5 cm de diámetro con tapa de rosca se colocaron 500 μL de bilis y 500 μL de ácido fosfórico (H_3PO_4). La mezcla se agitó suavemente y se colocó en un baño María por 1 hora a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación ligera para permitir la hidrólisis de la bilis con el ácido. Al término de éste tiempo la mezcla se dejó enfriar por 10 min. Posteriormente, 1.5 mL de *n*-hexano se agregaron a la mezcla ya hidrolizada y se agitó ligeramente por 10

min a temperatura ambiente. Se tomaron 1.5 mL de la capa superior que es la fase de hexano y se transfirió a un nuevo frasco. Todos los pasos anteriores se manejaron en obscuridad con el propósito de evitar la acción fotolítica de la luz sobre los compuestos. El hexano transferido anteriormente a un frasco nuevo se le agregó 0.5 mL de bicarbonato de potasio (K_2CO_3) acuoso al 0.1 M agitando suavemente. Luego, 250 μ L de la capa alcalina se transfirió a otro frasco nuevo y se acetiló agregando 2.5 μ L de anhídrido acético $(CH_3CO)_2O$ e inmediatamente mezclado con 125 μ L de *n*-hexano. Ésta mezcla se agitó por 20 min a temperatura ambiente y 1 μ L de la capa superior se inyectó en el CG. El fenol puro se utilizó como estándar (Aldrich Chemical Company, Inc., No. Catálogo 18, 545-0, 99+ %, No. CAS: 108-95-2, Lote No. 03322LO) junto con fenildecano como estándar externo que fue agregado en concentración conocida en el hexano de la extracción.

2) Extracción de compuestos fenólicos libres y conjugados hidrolizados por acidificación de bilis para su análisis en CG-IF.

Mediante la metodología de Oikari y Kunnamo-Ojala (1987), con modificaciones, los pasos en resumen son los siguientes: a 0.3-0.5 mL de bilis se acidificaron con 2 gotas de HCl 6 N para alcanzar un pH aproximado de entre 2 y 3. Luego se procedió a una extracción con 3 lotes de *n*-hexano:acetona (3:1) para extraer los compuestos libres, se agitó de 5 a 10 min, después de un reposo de 5 min se extrajo la capa superior, la cual fue lavada

dos veces. La fracción no extraída con la solución de solventes se sujeta a hidrólisis alcalina con 0.5 N de KOH en 90% de etanol a 70°C por 2 horas. En este paso se extraen los xenobióticos liberados mediante 3 lavados con la mezcla *n*-hexano:acetona (3:1) como se menciona anteriormente. Las dos extracciones, los compuestos libres y los xenobióticos conjugados de fenol se leen en el cromatógrafo de gases y se relacionan a la cantidad de bilis tratada. El fenol puro se usa como estándar y el fenildecano como estándar externo, según se mencionó anteriormente.

El cromatógrafo de gases utilizado es de Agilent Technologies Serie 6850 Network GC System con las columnas HP-1 (30 m x 0.320 mm i.d., 0.25 µm film) y DB-23 (60 m x 0.250 mm i.d., 0.25 µm film) de Agilent J&W Columns.

3) Extracción simple de compuestos fenólicos con tetrahidrofurano (THF) para su análisis en HPLC-UV

El THF se ha utilizado para la extracción de compuestos fenólicos (Leccese *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2008). La extracción se lleva a cabo de la siguiente manera: En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se colocaron 100 µL de muestra y se le adicionaron 100 µL de tetrahidrofurano. La mezcla se agitó vigorosamente durante 5 min con ayuda de un mezclador de vórtice. Después, se centrifugó a 10,000 rpm para precipitar los insolubles. Se tomaron 100 µL del sobrenadante y se inyectaron por medio de un automuestreador estándar G1329A en un HPLC-UV Agilent serie 1200. Las condiciones de cromatografía fueron:

Columna C₁₈ HP AminoQuant, 200 x 2.1 mm (5 µm)

Eluente A: Agua destilada desionizada

Eluente B: Acetonitrilo al 70 % en agua destilada desionizada

Programa de elución:

100 % eluente A por 3 min

100 % eluente B en rampa de 35 min

Se mantiene el 100 % de B por 3 min

100 % eluente A en 4 min para regresar a condiciones iniciales

Se mantiene 100 % de A por 4 min

Detector a 265 y 280 nm.

5.6. Obtención de fracciones enzimáticas de hígado de trucha

Los procedimientos para la extracción de las fracciones microsomal y citosólica de hígado de trucha arcoíris se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Sturve *et al.* (2008) y Hektoen *et al.* (1994) en donde una cantidad de hígado (0.5 – 1.0 g) se colocó dentro de un vaso de precipitado sobre una cama de hielo agregando una cantidad de amortiguador de homogeneización (NaH₂PO₄ 0.1 M, KH₂PO₄ 0.1 M, KCl 0.15 M a un pH de 7.4) equivalente a 5:1 (g/V). La homogeneización del tejido hepático se realizó con ayuda de un disruptor tisular tipo rotoestacionario (roto/stator) consistente en un embolo giratorio que ajusta perfecto dentro de una camisa metálica y que está sujeto al motor manual que al revolucionar a 35,000 rpm. El embolo protegido

se sumerge y al activarse succiona el material al interior de la camisa y entonces entra en un ciclo continuo a través de estrechas rendijas que rápidamente cortan y desintegran.

El tejido homogenizado se sometió a un procedimiento conocido como centrifugación diferenciada, en la cual el sobrenadante de una centrifugación anterior se centrifuga nuevamente pero a mayores gravedades, con el propósito de ir separando los elementos celulares por peso. La primera centrifugación se realizó a 800 gravedades (RCF) por 15 min y 4°C, la segunda fue a 12,000 RCF por 15 min a 4 °C y finalmente, a 105 000 RCF por 90 min a 4°C. En la última centrifugación se toma el sobrenadante que corresponde a la fracción citosólica que se utiliza para los ensayos la glutathiona-S-transferasa (GST) y superóxido dismutasa (SOD). Al tomar el sobrenadante se aprecia en el fondo del tubo un sedimento bien compacto el cual se suspende en 1 mL de amortiguador de resuspensión de microsomas (amortiguador de homogeneización + 20 % de glicerol), ésta es la fracción microsomal que se utiliza para el ensayo enzimático de la etoxiresorufin-O-deetilasa (EROD). Éstas dos fracciones obtenidas se guardaron en un criogenizador Revco a -80°C hasta su uso en los ensayos correspondientes. La estabilidad de las enzimas se mantiene hasta por un año después de su extracción (Forlin y Anderson, 1985). El contenido de proteína de las fracciones microsomal y citosólica se determinó espectrofotométricamente por el método Bradford con albúmina de suero bovino como estándar.

5.7. Ensayos enzimáticos

5.7.1. Metabolismo de fase I (EROD)

La primera prueba enzimática se trató de la determinación de la actividad del CYP1A1 mediante la deetilación del substrato resorufin etil éter (REE). Se utilizó la metodología de Burke y Mayer (1974) con modificaciones para la reacción de la actividad con la siguiente secuencia: Una mezcla de reacción de Tris-amortiguador 0.5 M (pH 7.2), proteína microsomal a una concentración final de 150 μg y resorufin etil éter (REE) a 50 μM , iniciando luego la reacción con 2.8 mM de β -NADH, todo en un volumen final de 500 μL , se incubó a 37°C por 30 min para posteriormente detener la reacción con 500 μL de metanol frío. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente a 6000 g por 20 min. El sobrenadante fue inyectado al HPLC con un detector de fluorescencia ajustado a $\lambda_{\text{exc}} = 560 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 585 \text{ nm}$. La muestra fue eluída con una solución isocrática de 65.5 % de agua destilada desionizada, 31.5 % metanol y 3% de acetonitrilo a un flujo de 0.8 mL min^{-1} . El compuesto sal de resorufin sódico (Sigma-Aldrich) se utilizó como estándar.

5.7.2. Metabolismo de fase II (GST)

La prueba de la Glutación-S-transferasa (GST) se llevó a cabo mediante la metodología de Sturve *et al.* (2008) y Hektoen *et al.* (1994) que brevemente describimos: La mezcla de reacción consistió en 0.1 M de NaH_2PO_4 (pH 7.4), 1 mM de EDTA, 1 mM de GSH y proteína citosólica de 0.015 a 0.15 mg mL^{-1} en el

volumen final de reacción. La mezcla se incubó por 2 min a 25°C, posteriormente para iniciar la reacción se agregó 1 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB). La absorbencia del complejo GST-CDNB generado se monitoreó a 340 nm durante un periodo de 3 min y su concentración en el medio se evaluó con el coeficiente de extinción $\epsilon = 9,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5.7.3. Estrés oxidativo (SOD)

La prueba de Superóxido Dismutasa (SOD) se llevó a cabo mediante un kit de determinación de SOD 19160 (Sigma-Aldrich) con modificaciones de acuerdo a la lectura de las absorbencias. Las lecturas de absorbencia se realizaron de forma cinética usando un espectrofotómetro de UV-Visible (spectrophotometer Shimadzu UV-1700 de PharmaSpec; Shimadzu Corporation, Analytical & Measuring Instruments Division, Kyoto Japan) que cuenta con un controlador de temperatura Peltier CPS-240A Cell positioner (Shimadzu, Kyoto, Japan) con espacio para 6 celdas de 1 cm con una séptima posición para la cubeta de referencia. La formación del conjugado WST-1 formazán se monitoreo por 5 min, el compuesto tiene un coeficiente de extinción (ϵ) de $37 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos provenientes de cada variable analizada en los tiempo de muestreo se obtuvieron por triplicado y en cada una de éstas réplicas se muestrearon cuatro organismos a fin de estimar la variabilidad. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con respecto al tiempo de muestreo y nivel de brócoli. Si el análisis indicaba diferencias entre las medias con respecto al control, entonces se realizaron comparaciones usando la prueba de Tukey y Holm-Sidak con ayuda del programa estadístico Minitab, versión 15.1.0.0 (State College, Pennsylvania, USA). Las diferencias se reportaron como estadísticamente diferente a una $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de la CL₅₀ de 48 horas de fenol en trucha arcoíris

La concentración letal media de fenol en 48 horas (CL₅₀ de 48 hrs) fue determinada con un total de 48 organismos, distribuidos en 12 unidades experimentales con cuatro organismos cada una. Tres unidades experimentales se escogieron al azar para ser las réplicas para cada tratamiento de fenol (Cuadro III). Las dos concentraciones mayores de 9 y 12 mg L⁻¹ resultaron en 100% de mortalidad en menos de 6.5 horas en todas sus réplicas. Las concentraciones menores de 0 (control) y 6 mg L⁻¹ no tuvieron mortalidad. Los datos de concentración y mortalidad sirvieron para calcular el límite inferior de la CL₅₀ de 48 horas de fenol que fue de 6.72 mg L⁻¹ y el límite superior de 8.76 mg L⁻¹, con una media de 7.68 mg L⁻¹. Éste intervalo es similar al determinado en un trabajo previo de Mitrovic *et al.* (1998) de 6.6 a 8.5 mg mL⁻¹ y es inferior a la CL₅₀ observada por Brown *et al.* (1967) de 9.3 mg mL⁻¹.

7.2. Índices biológicos

Durante el periodo de alimentación de 30 días con dietas formuladas enriquecidas con brócoli para la trucha arcoíris se registró el deceso de un organismo en el tratamiento 0% brócoli, repetición 1. En el final del periodo de alimentación se tomaron los datos biométricos de 4 organismos de cada

unidad experimental en el ensayo de quimioprotección para el cálculo de índices biológicos de crecimiento y desarrollo (Cuadro IV), además de obtener las muestras para las pruebas enzimáticas del metabolismo de xenobióticos fase I, II y estrés oxidativo que se explican más adelante.

Cuadro III. Mortalidades acumulativas de la determinación de la CL₅₀ en trucha arcoíris (*O. mykiss*).

<i>t</i> (horas)	Concentración de fenol (mg L ⁻¹)											
	0			6			9			12		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1
2.5	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	2
3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	4	3
6.5	0	0	0	0	0	0	4	3		4		4
8.5	0	0	0	0	0	0						
11.5	0	0	0	0	0	0						
22	0	0	0	0	0	0						
26.5	0	0	0	0	0	0						
30	0	0	0	0	0	0						
34.5	0	0	0	0	0	0						
46.5	0	0	0	0	0	0						
48.5	0	0	0	0	0	0						
Sobrevivientes	4	4	4	4	4	4	0	0	0	0	0	0

El crecimiento absoluto (CA) medido en biomasa total cada estanque estuvo en el intervalo de 1.05 kg a 1.38 kg al final de la alimentación, dando un crecimiento promedio por pez de 87.5 g a 115 g (Cuadro V).

El crecimiento relativo (CR) por cada estanque estuvo en el intervalo de 45.74 y 55.00% con respecto al peso inicial (Cuadro V). No se encontraron diferencias significativas en el CA y CR con respecto al contenido de brócoli (Cuadro V).

El índice hepatosomático (IHS) estuvo en el intervalo de 0.010 y 0.012 y no se encontraron diferencias significativas con respecto a los tratamientos de contenido de brócoli en la dieta (Cuadro V). El valor de TCA se halló en el intervalo de 1.110 a 1.246 y el de TCE 1.310 a 1.441 % día⁻¹ y no se encontraron diferencias significativas (Cuadro V).

Cuadro IV. Comparación de peso de trucha arcoíris alimentadas por 30 días con dietas a diferentes niveles de brócoli. Biomasa por estanque, 12 organismos por estanque.

Tratamiento	Repetición	Peso biomasa inicial (kg)	Peso biomasa final (kg)
0	1	2.03	3.14
	2	2.17	3.26
	3	2.45	3.73
5	1	2.05	3.14
	2	2.46	3.8
	3	2.31	3.57
10	1	2.37	3.52
	2	2.59	3.97
	3	2.51	3.78
20	1	2.82	4.11
	2	2.11	3.16
	3	2.48	3.7

7.3. Compuestos fenólicos en bilis de trucha arcoíris

Los resultados de búsqueda de compuestos fenólicos mediante CG y HPLC-UV no dieron los resultados esperados. Los cromatogramas no mostraron la presencia de compuestos fenólicos en la bilis de los peces muestreados a las 24 y 48 horas posteriores a la inducción con fenol.

7.4. Actividad enzimática del metabolismo de fase I

La actividad enzimática del CYP medido por el ensayo EROD tampoco dio los resultados esperados. En éste caso, no fue posible detectar los picos que identifican al producto de la actividad enzimática del CYP1A1. Entonces, procedimos a tratar diferentes variantes sobre la extracción de los microsomas en base a otros autores (Celandier et al., 1993; Bernhoft et al., 1994; Cravedi et al., 1996; Otto et al., 1996; Pastershank et al., 1998; Stephensen et al., 2005; Sturve et al., 2008) con el fin de establecer alguna relación con la calidad de la extracción y la falta de actividad enzimática. Sin embargo, al probar las extracciones de estos microsomas en el ensayo EROD, no se mostraron resultados en los cromatogramas.

Cuadro V. Análisis estadístico del Crecimiento Absoluto (CA) de trucha arcoiris al final de la alimentación de 30 días con diferentes niveles de brócoli en la dieta.

Tratamiento	Intervalo de confianza (95%)				
	CA (kg)	CR (%)	IHS	TCA	TCE (% día ⁻¹)
0	1.160±0.259	52.490±5.949	0.012±0.001	1.178±0.063	1.310±0.304
5	1.230±0.317	54.063±1.924	0.011±0.002	1.110±0.040	1.441±0.044
10	1.230±0.317	54.063±1.924	0.011±0.001	1.110±0.040	1.441±0.042
20	1.187±0.307	48.230±5.403	0.010±0.001	1.246±0.143	1.312±0.122

7.5. Actividad enzimática del metabolismo de fase II

La actividad enzimática de la GST fue analizada preliminarmente mediante un análisis de las medianas en un diagrama de caja para poder observar la tendencia de la mediana y su distribución (Figura 1). En éste diagrama se representa la distribución de los valores en rectángulos. El rectángulo interior inserto en otro rectángulo representa el intervalo de confianza al 95% de la mediana. La base del rectángulo exterior representa el nivel donde se halla el primer cuartil de los datos, mientras que la base superior es el tercer cuartil. Los datos atípicos se marcan con asteriscos y se hallan fuera de la cobertura de los rectángulo mencionados y son todos aquellos datos que se hallan a una distancia mayor equivalente a la distancia entre el primer y tercer cuartil de su grupo de datos. En éste análisis muestra se observa un descenso de la mediana en los tratamientos con respecto a los valores iniciales.

El análisis estadístico de las medias de las actividades de la GST se realizaron por medio de la prueba de Holm-Sidak a una $P < 0.05$ (Cuadro VI).

Los resultados muestran durante el tiempo de exposición al fenol en el tratamientos de 0% brócoli hay una tendencia descendente de la media a partir del segundo muestreo a las 24 horas y que se conserva a las 48 horas. Otro tratamiento que muestra una tendencia similar es el de 20% de brócoli, pero en éste caso el descenso ocurre al final del experimento a las 48 horas. En los tratamientos de 5% y 10% brócoli no se observa descenso significativo del valor de la media.

Cuadro VI. Las medias de las actividades enzimáticas de GST ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$)

de la fracción citosólica de los hepatocitos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Brócoli	Fenol	Media ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$)	Intervalo de Confianza (95%)	Error Estándar
0	0	1.487	1.013 , 1.96	0.215
	24	0.742	0.629 , 0.855 ^A	0.049
	48	0.903	0.744 , 1.063 ^A	0.072
5	0	1.297	0.852 , 1.742	0.202
	24	0.948	0.756 , 1.140	0.085
	48	1.027	0.795 , 1.260	0.106
10	0	1.268	0.969 , 1.568	0.134
	24	1.099	0.611 , 1.588	0.219
	48	0.998	0.860 , 1.135	0.062
20	0	1.452	0.858 , 2.046	0.267
	24	0.963	0.782 , 1.144	0.081
	48	0.840	0.657 , 1.023 ^A	0.082

7.6. Estrés oxidativo

El uso del kit comercial simplificó la determinación de la actividad SOD. El kit contiene una solución enzimática de xantina oxidasa que genera los iones superóxido en el ensayo. La ausencia de SOD en las muestras permite la formación del complejo WST-1 formazán por los iones y la absorbencia a 450 nm aumenta en el tiempo. La presencia de SOD en las muestras debe entonces inhibir la formación del complejo WST-1 formazán y, por ende, disminuir la absorbencia de la muestra.

En el caso de las extracciones de hepatocitos de trucha arcoíris expuestos al fenol donde se obtuvo la enzima SOD en la fracción citosólica por centrifugación diferencial, al agregarlos a las reacciones del kit comercial no mostraron inhibición alguna de la formación del compuesto WST-1 formazán. Esto nos requirió revisar el protocolo de extracción de las fracciones enzimáticas de hígado de trucha, además de utilizar variantes de amortiguadores de extracción descritos por otros autores. Sin embargo, el resultado fue el mismo. La ausencia de actividad SOD inclusive en los peces control sin exposición al fenol fue un resultado no esperado del presente trabajo.

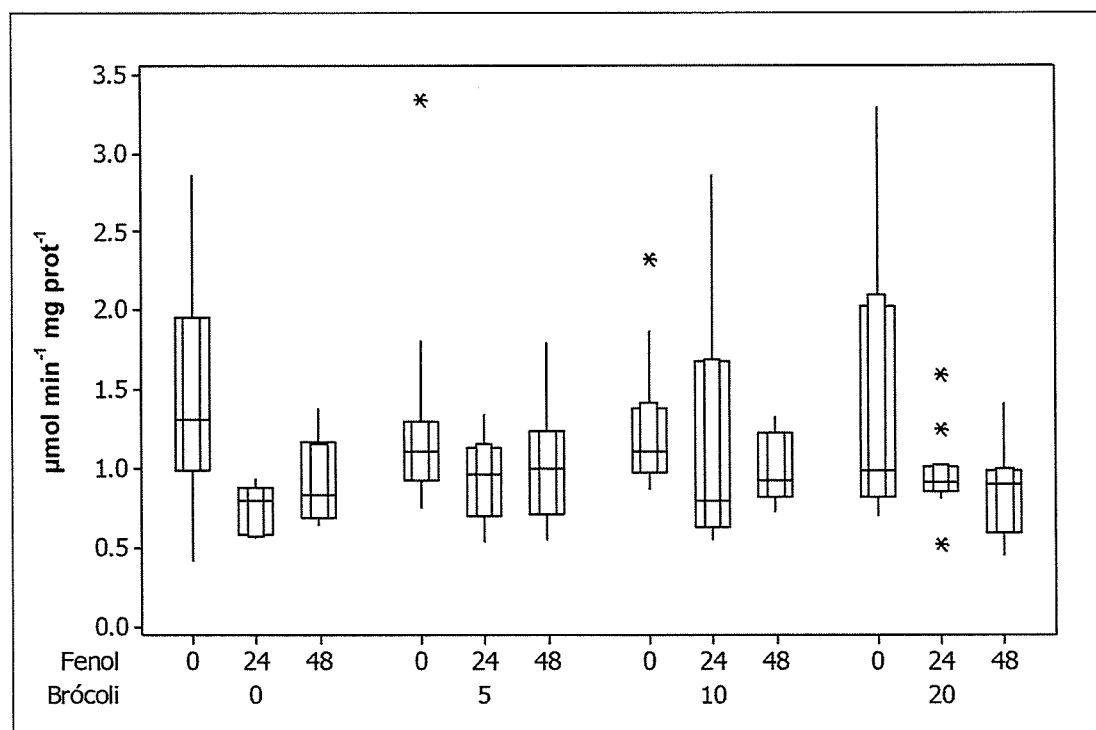


Figura 1. Diagrama de caja de las actividades GST ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$).

8. DISCUSIÓN

El efecto de la inclusión a cuatro niveles (0, 5, 10 y 20%) de brócoli en dietas experimentales de trucha arcoíris sobre las respuestas de los parámetros biológicos (CA, CR, IHS, TCA y TCE) tras un periodo de 30 días de alimentación no mostró diferencias significativas con respecto a cada nivel probado. Los valores hallados de estos parámetros, exceptuando el IHS, fueron diferentes a los descritos en estudios de crecimiento de trucha alimentados por 39 días con alimento comercial donde el valor del CA fue mayor (140 g), CR mayor (140%) y TCE mayor (11.675%); sin embargo, el TCA fue similar (1.4) (Arredondo *et al.*, 1996). Así, los peces tuvieron un menor crecimiento comparado con el estudio de Arredondo y colaboradores.

El brócoli tiene un aporte de proteína que fue considerado para la formulación de las dietas; al aumentar el porcentaje de brócoli había que ir descendiendo la cantidad de harina de pescado. El efecto en el crecimiento de dietas formuladas enriquecidas con brócoli para trucha arcoíris no tiene un referente hasta donde tenemos de conocimiento. Pereira *et al.*, (2002) hace un formulación de dieta para trucha con los subproductos de un vegetal crucífero de la misma familia del brócoli, la col. En el estudio de Pereira y colaboradores se observa un descenso del crecimiento al ir aumentando la cantidad de harina de col (0, 160, 250 y 320 g kg⁻¹) como ingrediente de dietas balanceadas de trucha en su búsqueda de poder buscar fuentes alternas de proteína y fibra. Lo

observado con respecto a las truchas de Pereira y colaboradores coincide con el presente estudio. Pereira *et al.*, (2002) concluye que la inclusión de la harina de col es aceptable a ciertos niveles pero que deben de analizarse más a fondo el consumo y digestibilidad de proteína y fibra provenientes del vegetal.

Los resultados del contenido de compuestos fenólicos en la bilis de la trucha arcoíris expuestos a contaminante por 48 horas no fueron los esperados, a pesar de que este tipo de contaminantes polares han mostrado ser bioacumulables (Lech *et al.*, 1973). Lech y colaboradores utilizan compuestos tóxicos marcados isotópicamente observaron que una exposición estática de 0.5 mg L^{-1} en 24 horas para el caso de TMF (3-trifluorometil-4-nitrofenol) resultó en una bioacumulación del orden de 1061 veces con respecto a los valores encontrados en el agua. Si bien, el marcaje isotópico no estuvo al alcance del presente trabajo, se realizaron dos métodos por medio de cromatografía de gases (CG) y uno por medio de HPLC con detector de UV (HPLC-UV) para analizar el contenido de compuestos fenólicos en la bilis de acuerdo a diversos autores (Balíková y Kohlíček, 1989; Oikari y Kunnamo-Ojala, 1987). La importancia del uso de éstas técnicas radica en la posibilidad de haber abordado la búsqueda de los compuestos conjugados resultantes de la actividad de las enzimas de fase I y II bajo dos diferentes perspectivas: 1) Al considerar la presencia de compuestos fenólicos totales presentes en la bilis y que mediante las técnicas abordadas fueran extraídos de los compuestos conjugados que fueron hidrolizados y acetilados para su análisis de CG y, 2) al considerar los compuestos conjugados por separado y visualizarlos dentro de

un cromatograma como compuestos relacionados con el fenol a fin de poder observar cambios en el transcurso de la inducción y relacionarlos con la acción diferencial de las enzimas del metabolismo de fase I y II de acuerdo al tratamiento de brócoli. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante éstas técnicas no mostraron la presencia de compuestos relacionados con fenol o metabolitos de éste en los cromatogramas resultantes de cada tratamiento antes y después de la inducción con fenol. Las muestras presentaban los mismos perfiles de compuestos sin ninguna diferencia entre tratamiento con brócoli y exposición con fenol. La causa de estos resultados no esperados es difícil de explicar, ya que la concentración de fenol en el agua fue de 6.72 mg L^{-1} (0.07 mM), que es mayor que la utilizada por Mitrovic *et al.* (1968) para la misma especie donde reportaron un deceso de 20% de los organismos (mayores de 1 año, 12 a 15 cm de longitud total) a una concentración de 6.5 mg L^{-1} de fenol en 48 horas. Mientras que, en el presente estudio al exponer a los peces a una concentración de 6.72 mg L^{-1} no hubo deceso de peces en ninguno de los tratamientos durante el mismo intervalo de tiempo. Ésta diferencia debe de tomar en cuenta que ésta mencionada concentración es el límite inferior del intervalo de confianza de la CL_{50} de 48 horas determinada para éste grupo de organismos en éste caso en particular y de acuerdo a lo observado en el cuadro de mortalidades acumulativas en la concentración de 6 mg L^{-1} no hay deceso de organismos pero al utilizar el siguiente nivel escogido de 9 mg L^{-1} existe una mortalidad del 100 % en menos de 7 horas. Estos resultados muestran lo estrecho del umbral de la concentración tóxica para las truchas en el presente

trabajo. Por ello, el haber podido determinar la presencia de compuestos fenólicos en la bilis de trucha, que en éste caso no fue posible, hubiese dado información valiosa en cuanto al grado de intoxicación de los organismos.

El no haber hallado compuestos fenólicos en la bilis de los peces puede sugerir que la capacidad de los organismos para metabolizar y eliminar de sí mismos los compuestos metabolizados fue mayor que la concentración subletal utilizada para el experimento. A éste respecto podemos apuntar que durante el periodo de tratamiento con el contaminante se llevaron a cabo recambios de agua de una tercera parte del volumen del estanque donde se encontraban las truchas y que se reponía el fenol disuelto proporcional a ese volumen de agua para continuar con un efecto subletal y entonces no se puede considerar la pérdida de fenol por degradación fotoquímica o bacteriana. Además, los peces fueron puestos en los estanques en ayuno 48 horas antes del experimental para evitar que la presencia de alimento o desechos metabólicos que cambiasen las características del agua y que a su vez afectaran el efecto homogéneo de la inducción con fenol.

Las actividades enzimáticas de EROD, GST y SOD después de los 30 días de alimentación con alimento enriquecido con brócoli no mostraron resultados para el caso de EROD y SOD. Para el caso de la actividad GST si se obtuvieron resultados, pero estos muestran que no existen diferencias significativas comparando los 4 niveles de inclusión de brócoli en la dieta. Se pensaba que tras la alimentación habría una reacción diferencial de las actividades enzimáticas entre tratamientos como se ha encontrado en otros

estudios donde hay un aumento de los valores de actividad EROD y disminución en la actividad de GST y SOD (Villa-Cruz *et al.*, 2009, Dávila *et al.*, 2010).

El hecho de no haber obtenido datos por medio de los ensayos EROD y SOD aún a pesar de seguir los protocolos y metodologías de los diversos autores que realizaron estudios de inducción de éstas enzimas por xenobióticos (Bernhoft *et al.*, 1994; Hektoen *et al.*, 1994; 1996; Sturve *et al.*, 2008) podría sugerir falta de cuidado u omisión de pasos importantes en el diseño experimental y en el posterior tratamiento de las muestras. Sin embargo, el trabajo presente se baso en diversos estudios que difieren en el método de inducción y tipo de contaminante, como la administración oral de PCB-105 (Bernhoft *et al.*, 1994) y 2,3,7,8-TCDD (Hektoen *et al.*, 1994) y exposición a aguas de descargas de planta de tratamiento (Sturve *et al.*, 2008), pero todos están relacionados con la trucha arcoíris. Cabe aquí señalar que en ninguno de éstos trabajos previamente citados aparece la SOD como parte del diseño experimental. Así que, se buscaron estudios que nos pudiesen dar pautas de protocolo para el monitoreo de la actividad SOD en trucha arcoíris u otras especial (Aksnes y Njaa, 1981; Trenzado *et al.*, 2006)

Por otro lado, la medición de la actividad EROD se encuentra referido en un número elevado de publicaciones donde se aborda su uso como biomarcador para la evaluación de la presencia de contaminantes en el ambiente acuático (Van der Oost *et al.*, 2003; Široká y Drastichová, 2004; Au, 2004; Janosek *et al.*, 2006; Reynaud *et al.*, 2008). En el presente estudio

obtuvimos una actividad nula del CYP, tanto en las muestras control como en las inducidas por fenol en todos los tiempos de muestreo. Existe evidencia de la transformación del fenol a compuestos relacionados como la hidroquinona y el catecol mediante la acción de las enzimas microsomales de los hepatocitos de la trucha arcoíris en presencia de fenol a baja concentración (0.7 a 80 mM). Esto observado en cultivos de microsomas de dicha especie dando una actividad EROD de hasta $13.0 \pm 7.0 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$ (Kolanczyk *et al.*, 2002). El estudio de Kolanczyk *et al.* (2002) demostró que la actividad enzimática de los microsomas organismos tratados con fenol es mayor con respecto al control, también se apunta en el mismo estudio que se usó un técnica analítica sensible acoplando HPLC y detección electroquímica (ECD) para incrementar 1000 veces la sensibilidad de la medición de la actividad EROD sobre los métodos convencionales de HPLC fluorometría y espectrofotometría.

La actividad GST, por su parte, evaluada al final de los 30 días de alimentación con 4 diferentes niveles de brócoli (0, 5, 10 y 20%) y antes de la inducción con fenol no mostró diferencias significativas con respecto al control. Villa-Cruz y colaboradores (2009) observan en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) que el efecto de 30 días de alimentación con dieta formulada enriquecida con 30% brócoli disminuye significativamente la actividad GST en un 62% con respecto al control. La observación del presente estudio resulta contraria a la del estudio de Villa-Cruz y colaboradores (2009) pero debe tenerse en cuenta que la GST como biomarcador para la evaluación de la presencia de xenobióticos en el ambiente ha sido muy controversial debido

principalmente a que su acción deriva de varias isoenzimas asociadas que pueden tener entre ellas una acción inhibitoria o inductora (Petřivalský *et al.*, 1997; Villa-Cruz *et al.*, 2009). De forma general los valores estuvieron en un intervalo de 6 a 643.5% mayor que los comparados para diversos estudios con la misma especie donde determinan la actividad normal de GST si haber sido inducidos con algún contaminante (Nimmo *et al.*, 1979; Bauermeister *et al.*, 1983; Laurén *et al.*, 1989; Celander *et al.*, 1993; Cravedi *et al.*, 1996; Melgar-Riol *et al.*, 2001; Pérez-López *et al.*, 2002; Sturve *et al.*, 2005). Las mayores diferencias se dieron con truchas en proporción 4 veces más grandes que las del presente estudio y las menores diferencias se dieron con truchas de tamaño semejante aunque no igual que las del presente estudio. Por otro lado, con relación a otros estudios con la misma especie, la actividad de la GST fue entre 7.1 a 72.9% (Bernhoff *et al.*, 1994; Hektoen *et al.*, 1994; Stephensen *et al.*, 2002; Petřivalský *et al.*, 1997). Las diferencias menores se observan con peces en proporción iguales a los del presente estudio y la mayor diferencia en peces en proporción menores a los del presente estudio. Con esto se puede observar que los peces alimentados con dietas enriquecidas con brócoli no se afecta el valor de la actividad GST y se encuentra en un intervalo donde otros estudios han determinado esta actividad en truchas del medio natural y de laboratorio no inducidas bajo ningún contaminante. Esto es importante pues como también quedó registrado, el aporte de brócoli en la dieta no tiene efectos adversos en el parámetro biológico de crecimiento, IHS de las truchas.

El monitoreo de los efectos de la exposición de trucha arcoíris a una concentración subletal de fenol (6.72 mg L^{-1}) durante 48 horas fue posible solamente con el estudio de la actividad de GST. Aquellos peces alimentados con dieta control al ser expuestos al fenol mostraron una tendencia de descenso de los valores en las primeras 24 a 48 horas y repunte posterior como en otros estudios de intoxicación con xenobióticos como la naftoflavona (Celander *et al.*, 1993), en tilapia nilótica (*O. niloticus*) con benzo-a-pireno vía intraperitoneal (Villa Cruz *et al.*, 2009). En estudios de mayor tiempo con trucha arcoíris se observa la misma tendencia pentaclorobifenil (PCB-105) a los 9 días que luego asciende a los 17 días (Bernhoft *et al.*, 1994). Sin embargo, en otros estudios con la misma trucha arcoíris la tendencia es inversa, como con el 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (Hektoen *et al.*, 1994) y los compuestos *Paraquat*, *Menadione* y *Naphthazarin* que son generadores de especies reactivas de oxígeno (Stephensen *et al.*, 2002). Por otro lado, en algunos estudios no se observa una tendencia de las actividades de la GST durante el tiempo de exposición a contaminantes como con propiconazol y fenpropimorf (Almli *et al.*, 2002) y una mezcla comercial de bifenilos policlorados (PCB's, por sus siglas en inglés) denominada Arochlor-1254 (Pérez-López *et al.*, 2002).

El comportamiento de los valores de la actividad GST de los peces alimentados con dietas enriquecidas de brócoli no exhibe ninguna tendencia como en los peces control, con excepción del tratamiento de 20%, que muestra un descenso significativo a las 48 horas. De hecho, los valores iniciales de GST durante la exposición se mantienen sin cambio significativo durante las 48 horas

del experimento. Ésta diferencia en la tendencia de peces no alimentados y alimentados con dietas experimentales de brócoli da a entender un efecto diferencial debido a la presencia del vegetal en la dieta. Sin embargo, se ha analizado previamente que el uso de la GST como biomarcador para establecer el efecto sobre la GST es diferente con el tipo de contaminante. Villa-Cruz *et al.*, (2009) observaron un descenso de la actividad de GST en las primeras 24 horas con respecto al control en tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuestas a inyecciones intraperitoneales de benzo-a-pireno; estas tilapias fueron alimentadas por 30 días con dietas enriquecidas con brócoli (30%) previo a la exposición con el contaminante. Entonces bajo éste criterio, el presente estudio no permiten establecer una quimioprotección real por efecto de la alimentación con dietas formuladas con inclusión de brócoli en trucha arcoíris (*O. mykiss*), además de carecer de otros elementos que refuten o fundamenten ésta aseveración como el caso del estudio de contenido de metabolitos de fenol en bilis, la actividad EROD y GST, que en el presente estudio no arrojaron datos.

9. CONCLUSIONES

El presente estudio buscó determinar el efecto quimioprotector de dietas formuladas para trucha arcoíris enriquecidas con cuatro niveles de brócoli (0, 5, 10 y 20 %) contra los efectos tóxicos de una exposición subletal de fenol (6.72 mg L^{-1}) por medio del análisis de parámetros biológicos de crecimiento y las actividades de las enzimas del metabolismo de xenobióticos de fase I (EROD), fase II (GST) y estrés oxidativo (SOD). El conocimiento generado de éste y otros estudios relacionados podría ayudar a sentar las bases para dilucidar futuras estrategias de desarrollo de quimioprotectores en dietas formuladas de peces con el objeto de prevenir pérdidas y riesgos sanitarios por los efectos de aguas contaminadas en los cultivos. En estudio realizado bajo las condiciones usadas en éste trabajo nos permiten concluir que:

Las dietas enriquecidas con brócoli no tienen efecto significativo sobre los parámetros biológicos de crecimiento (CA, CR, IHS, TCA y TCE).

Las actividades de las enzimas EROD y SOD no pudieron ser determinadas.

La actividad GST no tuvo cambios significativos en los tratamientos de brócoli, excepto en la dieta de mayor inclusión (20%) al final del experimento.

El presente no permite concluir firmemente sobre la capacidad quimioprotectora de los fitoquímicos de brócoli en las dietas formuladas para trucha.

10. RECOMENDACIONES

La experiencia lograda con el presente trabajo de investigación no permite aportar conocimiento sobre el potencial uso de brócoli y sus fitoquímicos como compuestos quimioprotectores con aplicación en la industria de la acuicultura para evitar pérdidas y riesgos sanitarios por la presencia de compuestos tóxicos en los cultivos. Sin embargo, la experiencia derivada de éste trabajo permite dar las siguientes consideraciones que se deben de tomar para en futuras investigaciones sobre éste tema:

1. Que el uso de biomarcadores para el monitoreo de la capacidad quimioprotectora de compuestos naturales pueden arrojar resultados controversiales o diferentes a los esperados y que algunos de estos marcadores serán funcionales en algunas especies y en otras no.
2. Que de ser posible se tengan a disposición otras herramientas de observación como el uso de técnicas moleculares para ver el efecto quimioprotector de dietas enriquecidas con brócoli u otros compuestos a fin de poder esclarecer las diferencias en respuesta a los diversos factores y poder hallar una forma de estandarización para los efectos de los xenobióticos en las diferentes especies.

11. LITERATURA CITADA

- Abrahamson A, Andersson C, Jönsson ME, Fogelberg O, Örberg J, Brunström B, Brandt I. 2007. Gill EROD in monitoring of CYP1A inducers in fish--A study in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caged in Stockholm and Uppsala waters. *Aquatic Toxicology*. 85: 1-8.
- Abrahamson A, Brandt I, Brunström B, Sundt RC, Jørgensen EH. 2008. Monitoring contaminants from oil production at sea by measuring gill EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Environmental Pollution*. 153: 169-175.
- Addison RF, Zinck ME, Willis DE. 1978. Induction of hepatic mixed-function oxidase (MFO) enzymes in trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding Aroclor® 1254 or 3-methylcholanthrene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 61: 323-325.
- Aksnes A, Njaa LR. 1981. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 69: 893-896.
- Arredondo-Figueroa JL, Valdivia-Soto HR, Lastiri LH, Verdusco RC. 1996. Evaluación del crecimiento, factor de conversión de alimento y calidad del agua del cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en un sistema cerrado. *Hidrobiológica*. 6: 59-65.
- Au DWT. 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*. 48: 817-834.

- Bayramoglu G, Gursel I, Tunali Y, Arica MY. 2009. Biosorption of phenol and 2-chlorophenol by *Funalia trogii* pellets. *Bioresource Technology* 100, 2685-2691.
- Balíková M, Kohlíček J. 1989. Gas chromatography of simple phenols in biological fluids. *Journal of Chromatography*. 497: 159-167.
- Bernhoft A, Hektoen H, Utne Skaare J, Ingebrigtsen K. 1994. Tissue distribution and effects on hepatic xenobiotic metabolising enzymes of 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl (PCB-105) in COD (*Gadus morhua*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Pollution*. 85: 351-359.
- Bertelli D, Plessi M, Braghiroli D, Monzani A. 1998. Separation by solid phase extraction and quantification by reverse phase HPLC of sulforaphane in broccoli. *Food Chemistry*. 63: 417-421.
- Bones AM, Rossiter JT. 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiologia Plantarum*. 97: 194-208.
- Brown VM, Shurben DG, Fawell JK. 1967. The acute toxicity of phenol to rainbow trout in saline waters. *Water Research*. 1: 683-685.
- Bussy A. 1840. Sur la formation de l'huile essentielle de moutarde. *J. Pharm.* 27: 464-471.
- Celander M, Leaver MJ, George SG, Förlin L. 1993. Induction of cytochrome P450 1A1 and conjugating enzymes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver: A time course study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 106: 343-349.

- Chiang WCK, Pusateri DJ, Leitz REA. 2008. Gas Chromatography/Mass Spectrometry method for the determination of sulforaphane and sulforaphane nitrile in Broccoli. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1018-1021.
- Cravedi JP, Paris A, Monod G, Devaux A, Flouriot G, Valotaire Y. 1996 Maintenance of cytochrome P450 content and phase I and phase II enzyme activities in trout hepatocytes cultured as spheroidal aggregates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology.* 113: 241-246.
- Davila J, Marcial-Martinez LM, Viana MT, Vazquez-Duhalt R. 2010. The effect of broccoli in diet on the cytochrome P450 activities of tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) during phenol exposure. *Aquaculture.* 304: 58-65.
- Egaas E, Sandvik M, Fjeld E, Källqvist T, Goksøyr A, Svensen A. 1999. Some effects of the fungicide propiconazole on cytochrome P450 and glutathione S-transferase in brown trout (*Salmo trutta*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology.* 122: 337-344.
- EPA-US. Toxicological review of phenol. CAS No. 108-95-2. 2002. In support of summary Information on the integrated Risk Information System (IRIS).
- Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. 1997. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducer of enzymes that protect against carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 10367-10372.

- Farah MA, Ateeq B, Ahmad W. 2006. Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests. *Science of the Total Environment*. 364: 200-214.
- Fimognari C, Hrelia P. 2007. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutation Research – Reviews in Mutation Research*. 635: 90-104.
- Förlin L, Andersson T. 1985. Storage conditions of rainbow trout liver cytochrome P-450 and conjugating enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 80B: 569-572.
- Gad NS, Saad AS. 2008. Effect of environmental pollution by phenol on some physiological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Global Veterinaria*. 2: 312-319.
- Hallenbeck WH, Cunningham KM. 1986. *Quantitative Risk Assessment for Environmental and Occupational Health*. Burns Lewis Publishers, Chelsea, 199 pp.
- Hanlon N, Coldham N, Sauer MJ, Ioannides C. 2008. Up-regulation of the CYP1 family in rat and human liver by the aliphatic isothiocyanates erucin and sulforaphane. *Toxicology*. 252: 92-98.
- Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations. *Environ. Sci. Tech.* 11: 714-719.

- Janosek J, Hilscherová K, Bláha L, Holoubek I. 2006. Environmental xenobiotics and nuclear receptors--Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro*. 20: 18-37.
- Kolanczyk RC, Schmieder PK. 2002. Rate and capacity of hepatic microsomal ring-hydroxylation of phenol to hydroquinone and catechol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology*. 176: 77-90.
- Laurén DJ, Halarnkar PP, Hammock BD, Hinton DE. 1989. Microsomal and cytosolic epoxide hydrolase and glutathione S-transferase activities in the gill, liver, and kidney of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Baseline levels and optimization of assay conditions. *Biochemical Pharmacology*. 38: 881-887.
- Leccese A, Viti R, Bartolini S. 2011. The effect of solvent extraction on antioxidant properties of apricot fruit. *Cent. Eur. J. Biol.* 6: 199-204.
- Liang H, Yuan QP, Dong HR, Liu YM. 2006. Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19: 473-476.
- Liang H, Li CF, Yuan QP, Vriesekoop F. 2007. Separation and purification of sulforaphane from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 8047-8053.
- McKim JM, Kolanczyk RC, Lien GJ, Hoffman AD. 1999. Dynamics of renal excretion of phenol and major metabolites in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 45: 265-277.

- Mitrovic VV, Brown VM, Shurben DG, Berryman MH. 1968. Some pathological effects of sub-acute and acute poisoning of rainbow trout by phenol in hard water. *Water Research*. 2: 249-254.
- Monserat JM, Lima JV, Ferreira JLR, Acosta D, Garcia ML, Ramos PB, Morales TB, Santos LCD, Amado LL. 2008. Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 148: 287-292.
- Morales AE, Pérez-Jiménez A, Hidalgo MC, Abellán E, Cardenete G. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 139: 153-161.
- Morrow MD, Higgs D, Kennedy CJ. 2004. The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 137: 143-154.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6: 1-42.
- Nelson DR. 1998. Metazoan cytochrome P450 evolution. Review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 121: 15-22.

- Nelson DR. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. Minireview. Archives of Biochemistry and Biophysic. 369: 1-10.
- Oikari A, Kunnamo-Ojala T. 1987. Tracing of xenobiotic contamination in water with the aid of fish bile metabolites: A field study wiith caged rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquatic Toxicology. 9: 327-341.
- Otto DME, Buttner JK, Arquette DM, Moon TW. 1996. Impaired inducibility of xenobiotic and antioxidant responses in rainbow trout exposed to polychlorinated biphenyl contaminated sediments in the St. Lawrence River. Chemosphere. 33: 2021-2032.
- Pastershank GM, Kiparissis Y, Metcalfe CD. 1998. Induction of hepatic ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to 3,3',4,4'-tetrachlorodiphenyl ether by intraperitonealinjection or gavage intubation. Chemosphere. 38: 3051-3060.
- Pérez-López M, Nóvoa-Valiñas MC, Melgar-Riol MJ. 2002. Glutathione S-transferase cytosolic isoforms as biomarkers of polychlorinated biphenyl (Arochlor-1254) experimental contamination in rainbow trout. Toxicology Letters. 136: 97-106.
- Reynaud S, Raveton M, Ravanel P. 2008. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review. Aquatic Toxicology. 87:139-145.

- Ricker W. 1979. Growth rates and models. 677-743 pp En: W Hoar, D Randall, J Brett, editores. Fish Physiology. Volumen VIII. Bioenergetics and Growth. Academic Press, New York, USA.
- SAGARPA, 2006. Carta Nacional Pesquera. Diario Oficial de la Federación. Viernes 25 de agosto de 2006.
- SAGARPA, 2010. Carta Nacional Pesquera. Diario Oficial de la Federación. Jueves 2 de diciembre de 2010.
- SAGARPA. 2011. Carta Nacional Acuícola. Diario Oficial de la Federación. Lunes 31 de enero de 2011.
- Saha NC, Bhunia F, Kaviraj A. 1999. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 63: 195-202.
- Sierra R, Forest K, Friesen KJ. 2009. Mechanistic aspects regarding the direct aqueous environmental photochemistry of phenol and its simple halogenated derivatives. Review. Environment International. 35: 425-437.
- Siroká Z, Drastichová J. 2004. Biochemical markers of aquatic environment contamination – Cytochrome P450 in fish. A review. Acta Vet. Brno. 73: 123-132.
- Sivakumar G, Aliboni A, Bacchetta L. 2007. HPLC screening of anti-cancer sulforaphane from important European Brassica species. Food Chemistry. 104: 1761-1764.

- Soares MC, Ribeiro ET, Kuskoski EM, Gonzaga LV, Lima A, Filho JM, Fett R. 2008. Composition of phenolic acids content in apple (*Malus sp*) pomace. *Semina: Ciências Agrárias*. 29: 339-348.
- Stegeman JJ, Lech JJ. 1991. Cytochrome P450 monooxygenase systems in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. Review. *Environmental Health Perspectives*. 90:101-109.
- Stephensen E, Sturve J, Förlin L. 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 133: 435-442.
- Sturve J, Almroth BC, Förlin L. 2008. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 70: 446-452.
- Takahashi N, Stresser DM, Williams DE, Bailey GS. 1995. Induction of hepatic CYP1A by indole-3-carbinol in protection against aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout. *Food and Chemical Toxicology*. 33: 841-850.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13: 57-149.
- Villa-Cruz V, Davila J, Viana MT, 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.

Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. 1992. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 2399-2403.

12. GLOSARIO DE ÍNDICES BIOLÓGICOS

CA

Sinónimos. Crecimiento neto. Conocida como AG, por sus siglas en inglés.

Diferencia entre el peso final e inicial de un pez en crecimiento.

$$CA = Pf - Pi$$

CR

Sinónimos. Conocida como AG, por sus siglas en inglés.

Proporción porcentual del crecimiento de un pez con respecto al peso inicial.

$$R = \frac{Pf - Pi}{Pi} \times 100$$

IHS

Sinónimos. Índice hepatosomático (IH). Conocida como HSI, por sus siglas en inglés.

Proporción expresada en porcentaje del peso del hígado del pez con respecto al peso total del pez.

$$IHS = \frac{P_{\text{hígado}}}{P_{\text{pez}}} \times 100$$

TCE

Sinónimos. Tasa de crecimiento específica, tasa específica de crecimiento (TEC) o tasa de crecimiento específico. Conocida como SGR, por sus siglas en inglés. Tasa instantánea de crecimiento (TIC) (Ricker, 1979).

Definida como el aumento de masa por unidad de tiempo.

$$TCE(\%/día) = \frac{(\ln Pf - \ln Pi)}{t2 - t1} \times 100$$

TCA

Sinónimos. Factor de conversión alimenticia (FCA). Conocida como FCR, por sus siglas en inglés.

Cociente entre la cantidad de alimento entregado y la ganancia de peso vivo.

$$TCA = \frac{\text{Alimento entregado}}{\text{Ganancia peso vivo}}$$