

<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	10	69-78	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	-------	---	-------------------	----------------

Estudio de la bioactividad *in vitro* e *in vivo* de brotes de brócoli ricos en glucosinolatos/isotiocianatos

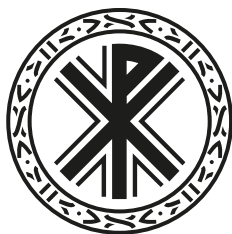
Study of the *in vitro* and *in vivo* bioactivity of glucosinolates/isothiocyanates-rich broccoli sprouts

Fecha de recepción y aceptación: 28 de agosto de 2017, 1 de diciembre de 2017

N. Baenas¹, D. A. Moreno¹ y C. García-Viguera^{1*}

¹ Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC.

* Correspondencia: Laboratorio de Fitoquímica y Alimentos Saludables. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CEBAS-CSIC. Campus Universitario de Espinardo. Edificio 25. 30100 (Espinardo) Murcia. España. *E-mail*: cgviguera@cebas.csic.es



RESUMEN

Los brotes de brócoli son alimentos de gran interés debido a su mayor contenido en nutrientes y compuestos bioactivos en comparación con el vegetal adulto. Poseen alto contenido en glucosinolatos, destacando la glucorafanina, que se encuentra en mayor concentración, cuyo producto de hidrólisis, el isotiocianato sulforafano, ha demostrado poseer distintas actividades biológicas, como son la antiinflamatoria, antioxidante y un efecto antiproliferativo. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto antiproliferativo de estos brotes como matriz vegetal, así como sus compuestos bioactivos puros, la glucorafanina y el sulforafano, demostrando una mayor bioactividad del vegetal como alimento completo. Por otro lado, se demostró el efecto antinociceptivo (analgésico) de estos brotes en modelos de roedores *in vivo*, abriendo una línea de investigación interesante para el estudio de los mecanismos de acción de estos compuestos naturales como fitoterapéuticos.

PALABRAS CLAVE: *crucíferas, glucorafanina, sulforafano, antiproliferativo, antinocicepción.*

ABSTRACT

Broccoli sprouts are very interesting plant foods due to their potential source of nutrients and bioactive compounds. These sprouts have a higher content in glucosinolates than adult plants, being glucoraphanin the one presented in higher amount. Its hydrolysis product, the isothiocyanate sulforaphane, has shown different biological activities in previous studies, such as anti-inflammatory, antioxidant and antiproliferative effect. The aim of this work was to explore the antiproliferative effect of pure glucoraphanin and pure sulforaphane against cell lines of human cancer *in vitro*, compared to the complete broccoli sprouts. Results showed that the whole plant is more active. On the other hand, also the antinociceptive effect of broccoli sprouts was studied in rodent models *in vivo*, providing an interesting research line for the study of the action pathways of these natural products as phytotherapeutics.

KEYWORDS: *crucifers, glucoraphanin, sulforaphane, antiproliferative, antinociceptive.*

INTRODUCCIÓN

Según distintos estudios realizados hasta la fecha, el consumo de vegetales de la familia de las crucíferas está relacionado con diferentes efectos beneficiosos para la salud, como una actividad anticancerígena o antiinflamatoria. Esto se debe a su alto contenido en compuestos bioactivos, como los glucosinolatos y sus derivados, los isotiocinatos, así como los compuestos fenólicos [1-3]. En este sentido, el consumo de brotes de brócoli proporciona una fuente muy interesante de nutrientes y fitoquímicos en nuestra dieta, ya que pueden presentar una concentración hasta veinte veces superior en bioactivos que el vegetal adulto [4, 5].

Muchas de las actividades biológicas de estos brotes están relacionadas con la presencia de sulforafano, el isotiocianato procedente de la hidrólisis del glucosinolato glucorafanina. Este compuesto se metaboliza a través de la ruta del ácido mercaptúrico en los enterocitos, uniéndose al glutatión y derivados de la cisteína, los cuales se han encontrado en plasma y orina en niveles cuantificables [6]. El sulforafano y sus metabolitos son capaces de inducir actividades enzimáticas como las de detoxificación (enzimas de tipo Fase II), así como otros efectos anticancerígenos como inhibición del ciclo celular y apoptosis [7, 8]. Además, estos compuestos se han relacionado con una acción antiinflamatoria y antioxidante en la célula, inhibiendo el factor NF- κ B responsable de la expresión de iNOS, COX-2 y del factor THF- α , mecanismos implicados en la inflamación celular y, por lo tanto, previniendo o reduciendo el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas [9].

No obstante, además de estos estudios, todavía se necesita investigar con detenimiento los mecanismos de acción del sulforafano. Es por ello por lo que en este trabajo se evalúa el efecto antiproliferativo de los brotes de brócoli como matriz vegetal completa, así como de los fitoquímicos puros: la glucorafanina (principal glucosinolato del brócoli) y el sulforafano (isotiocianato derivado del anterior), en líneas celulares de cáncer humano colorrectal (Caco-2 y HT-29) y hepático (HepG2), comparando los efectos de una matriz vegetal con sus compuestos bioactivos puros. Por otro lado, se investiga una acción antinociceptiva (analgésica) en modelos de roedores (*in vivo*), abriendo una línea de investigación con el objetivo de promover el uso de fitoquímicos como alternativa al uso de medicamentos analgésicos con efectos secundarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Germinación de brotes de brócoli

Las semillas de brotes de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) se adquirieron en la empresa Intersemillas, S. A. (Valencia, España). La producción de estos brotes se realizó en las cámaras de cultivo controladas del CEBAS-CSIC, con las siguientes condiciones: ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h, temperaturas de 25 y 20 °C y humedad relativa del 60 y 80 %, respectivamente, radiación PAR 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ mediante tubos fluorescentes (Philips TLD 36 W/83, Hamburgo, Alemania) y lámparas de haluro metálico (Osram HQI.T 400 W, Múnich, Alemania). La germinación de los brotes se realizó, en primer lugar, mediante hidratación y aireación de las semillas durante 24 h en agua con 5 g/L de hipoclorito sódico para su activación y desinfección. A continuación, se extendieron sobre celulosa (CN SEEDS Ltd, Inglaterra) 10 g de semillas hidratadas por bandeja de 12 x 7 cm y se trasladaron



a la cámara de cultivo controlada. Allí se mantuvieron en oscuridad durante los primeros tres días, y a partir del cuarto día de germinación se expusieron al ciclo de luz/oscuridad hasta el octavo día, cuando se recogieron, pesaron, congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Por último, los brotes se liofilizaron y molieron para realizar su extracción. Cada bandeja de brotes ($n = 3$) corresponde a un replicado de una muestra (tres bandejas son tres réplicas de una misma muestra).

Extracción y determinación de glucosinolatos en brotes de brócoli

Cada muestra liofilizada (50 mg), perteneciente a una bandeja de brotes, se extrajo con 1 ml de $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (70:30). Las muestras se incubaron a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, para desactivar la enzima mirosinasa. Tras centrifugar las muestras, el extractante se evaporó en un evaporador rotatorio y el residuo sólido se disolvió en H_2O para su posterior análisis cromatográfico. Las muestras se filtraron por una membrana de PVDF de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Millex) y se analizaron por HPLC-DAD-MS/MS en los laboratorios del CEBAS-CSIC, mediante el método descrito por Baenas *et al.* para la efectiva identificación y cuantificación de los glucosinolatos [10].

Extracción y determinación de isotiocianatos en brotes de brócoli

Cada muestra liofilizada (50 mg) se extrajo con 1,5 ml de H_2O . Las muestras se incubaron durante 24 h a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), en agitación para conseguir la hidrólisis de los glucosinolatos a isotiocianatos [11]. Tras centrifugar las muestras, estas se filtraron por una membrana de PVDF de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ (Millex) y se analizaron por UHPLC-MS/MS-QqQ, mediante el método descrito por Dominguez-Perles *et al.* para la identificación y cuantificación de los isotiocianatos [12].

Preparación de extractos acuosos para el análisis de bioactividad

La evaluación de la bioactividad se realizó empleando métodos *in vitro* e *in vivo*.

En primer lugar, los brotes de brócoli liofilizados y molidos se sometieron a una extracción acuosa siguiendo el método de Cramer y Jeffery (2011) a gran escala, consistiendo en la extracción de 25 g de material vegetal en 400 ml de agua, que se centrifugaron durante 10 min a 3.000 rpm. Posteriormente se filtraron por papel de filtro de tipo Albert 400. A continuación, este extracto acuoso se liofilizó y se almacenó en un desecador, libre de humedad y en oscuridad, hasta su uso.

Evaluación del efecto antiproliferativo *in vitro* en cultivos celulares

Se empleó el método colorimétrico MTT [13] y tres cultivos celulares: Caco-2 y HT-29 (líneas celulares de cáncer intestinal) y HepG2 (línea celular de cáncer hepático). Se expusieron a diferentes concentraciones de sulforafano puro ($100\text{-}10\text{ }\mu\text{mol/L}$), glucorafanina ($100\text{-}10\text{ }\mu\text{mol/L}$) y extracto acuoso de brotes de brócoli ($20\text{-}0,05\text{ }\mu\text{mol/L}$) durante 24 h, para determinar el efecto inhibidor de



dichas muestras en la proliferación de estas células, mediante el cálculo de la IC_{50} (concentración de la muestra que produce una inhibición del crecimiento celular del 50 %).

Evaluación del efecto analgésico *in vivo* en roedores

Mediante la realización de un extracto acuoso del material vegetal liofilizado, se evaluó el efecto antinociceptivo (analgésico) de los brotes de brócoli, por medio de dos tipos de test de nocicepción (proceso neuronal mediante el cual se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos contra los tejidos) en roedores [14]: test de la formalina en ratas Wistar [15] y test de estiramientos en ratones albinos Swiss [16]. Para ello se emplearon las dosis 500, 1000 y 2000 mg/kg del extracto acuoso liofilizado, diluido en agua, y se administraron con una sonda orogástrica o cánula directamente al estómago de los roedores, con el fin de controlar la dosis aplicada. Este tratamiento se administró 30 min antes del inicio de los tests de nocicepción.

Métodos estadísticos

Todos los análisis se realizaron por triplicado. El cálculo de la IC_{50} se llevó a cabo con el programa Graphpad Prism (IBM Corp, NY, USA); y las diferencias significativas entre valores correspondientes a más de dos muestras se calcularon mediante un ANOVA ($P < 0,05$) con el programa SPSS 15.0 (LEAD Technologies, Chicago, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido en compuestos bioactivos de los brotes de brócoli

La caracterización en compuestos bioactivos (glucosinolatos e isotiocianatos) del material vegetal se llevó a cabo con anterioridad al diseño de los experimentos de evaluación de la bioactividad, con el objetivo de escoger las dosis apropiadas del extracto acuoso de brotes de brócoli, con un contenido en compuestos conocido. Los brotes seleccionados se recogieron a los ocho días de germinación, habiéndose establecido dicho periodo de tiempo como óptimo para su consumo en trabajos previos, debido a un tamaño apropiado y a su alto contenido en compuestos bioactivos [10]. En el extracto hidrometanólico, preparado con el objetivo de desactivar la enzima mirosinasa responsable de la hidrólisis de los glucosinolatos a isotiocianatos, se encontró una elevada concentración de glucosinolatos (40,25 mg/g brotes de brócoli P.S.) (tabla 1), en comparación con el contenido de estos compuestos en vegetales maduros, como la pella de brócoli (~8 mg/g P.S.) [17]. Del total de glucosinolatos, se observó que el 40 % correspondía a la glucorafanina, cuyo producto de hidrólisis, el sulforafano, posee diferentes bioactividades *in vitro* e *in vivo*, como actividad antioxidante, antiproliferativa y antiinflamatoria, a través de la modulación de mecanismos y expresión de ciertas enzimas y genes relacionados con enfermedades crónicas y ciertos cánceres [9, 18].



Tabla 1. Compuestos bioactivos en brotes de brócoli (mg/g P.S.)

Glucosinolatos		
Glucoiberina	6,08	± 0,38
Glucorafanina	15,69	± 0,09
4-Hidroxiglucobrasicina	1,65	± 0,20
Glucoerucina	3,59	± 0,08
Glucobrasicina	3,02	± 0,29
4-Metoxiglucobrasicina	1,40	± 0,10
Neoglucobrasicina	8,81	± 0,20
GLS Alifáticos	25,36	± 0,50
GLS Indólicos	14,88	± 0,64
Total	40,25	± 0,79
Isotiocianatos		
Sulforafano	0,951	± 0,001
Iberina	0,026	± 0,001
Indole-3-carbinol	0,013	± 0,003
Total	0,990	± 0,005

Media (n = 3) ± SD. P.S. (peso seco)

Tras realizar la hidrólisis de la glucorafanina por la enzima mirosinasa mediante la extracción acuosa, el contenido en sulforafano en el extracto acuoso fue de 0,95 mg/g brotes de brócoli (tabla 1). En los brotes también se analizaron el isotiocianato iberina (0,026 mg/g), producto de hidrólisis de la glucoiberina, y el indol-3-carbinol (0,013 mg/g), producto de hidrólisis de glucosinolatos de tipo indólico, pues ambos isotiocianatos también contribuyen a la bioactividad de este alimento, debido a su actividad antioxidante y anticancerígena, según diversos estudios [8,19].

Efecto antiproliferativo en células cancerígenas intestinales (Caco-2 y HT-29) y hepáticas (HepG2) humanas

Los resultados indican que el efecto antiproliferativo del extracto de brotes de brócoli, como matriz alimentaria, y del sulforafano es dosis-dependiente. Sin embargo, no es así en el caso del tratamiento con glucorafanina, con el cual no se alcanza la inhibición del 50 % del crecimiento celular (IC50). En la figura 1 se puede observar la inhibición del crecimiento de las líneas celulares tras los tratamientos realizados con sulforafano como compuesto puro (100-10 µmol/L), glucorafanina como compuesto puro (100-10 µmol/L) y el extracto acuoso de brotes de brócoli (conteniendo 20-0,05 µmol/L de sulforafano).



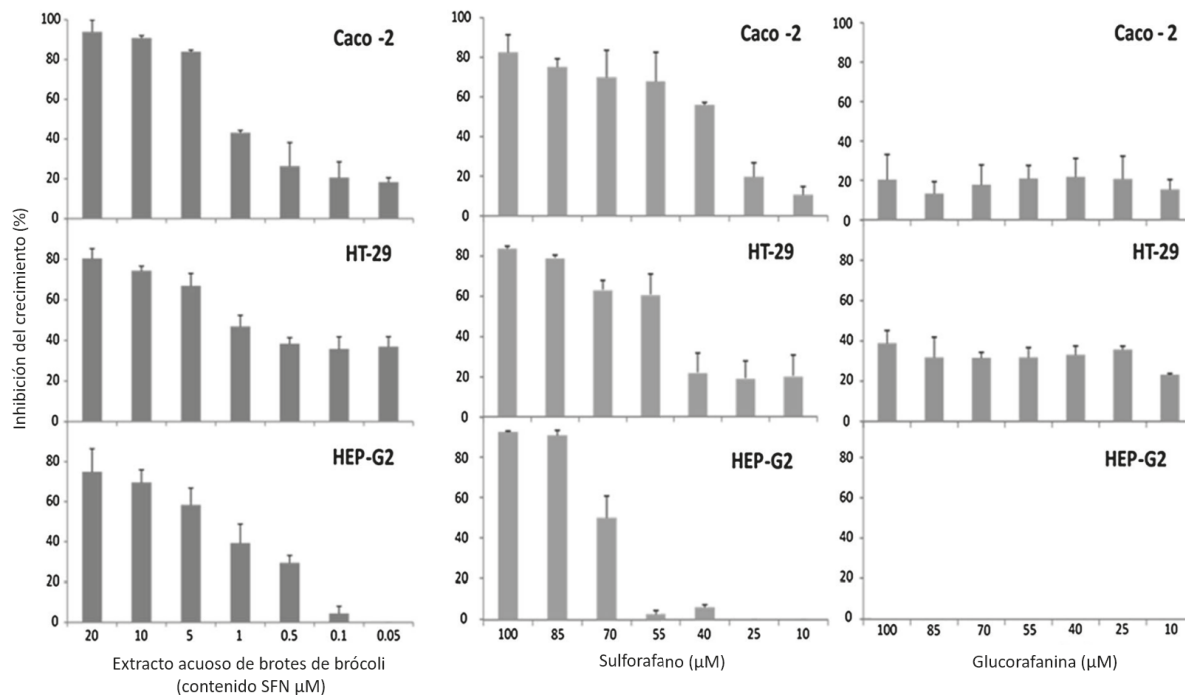


Figura 1. Efecto antiproliferativo (% inhibición del crecimiento) tras la aplicación de extracto de brotes de brócoli y sulforafano (SFN) y glucorafanina como compuestos puros.

Estos resultados indican que es necesaria la hidrólisis del glucosinolato glucorafanina al isotiocianato sulforafano para obtener el efecto bioactivo, en este caso la actividad antiproliferativa, de acuerdo con otros autores [20]. La IC_{50} más baja que hemos obtenido ha sido con el tratamiento de brotes de brócoli, siendo de 1,6 y 3,2 $\mu\text{mol/L}$ en ambas Caco-2 y HT-29, y en HepG2, respectivamente (figura 1). Estos resultados nos indican que, aunque los brotes de brócoli contienen menor cantidad de sulforafano en comparación con la aplicación del compuesto puro, el efecto del alimento completo, con la presencia de otros compuestos bioactivos como compuestos fenólicos o vitaminas, actúa biológicamente de forma sinérgica, incrementando la bioactividad de esta muestra y no interfiriendo con la actividad del sulforafano presente en los brotes [20].

Efecto analgésico de brotes de brócoli en modelos de roedores

Antes de la realización de los test de nocicepción se administró a los roedores el extracto acuoso de brotes de brócoli liofilizado y disuelto en agua, empleando una cánula para proporcionarles las dosis orales de 500, 1.000 y 2.000 mg/kg 30 min antes. Los resultados obtenidos, tras realizar el test, indican una disminución del dolor en las ratas con el tratamiento, tanto en la primera fase (fase neurogénica) durante los primeros 5 min (figura 2.A-B.), como en la segunda (fase inflamatoria), de 20 a 25 min (figura 2.C-D.).



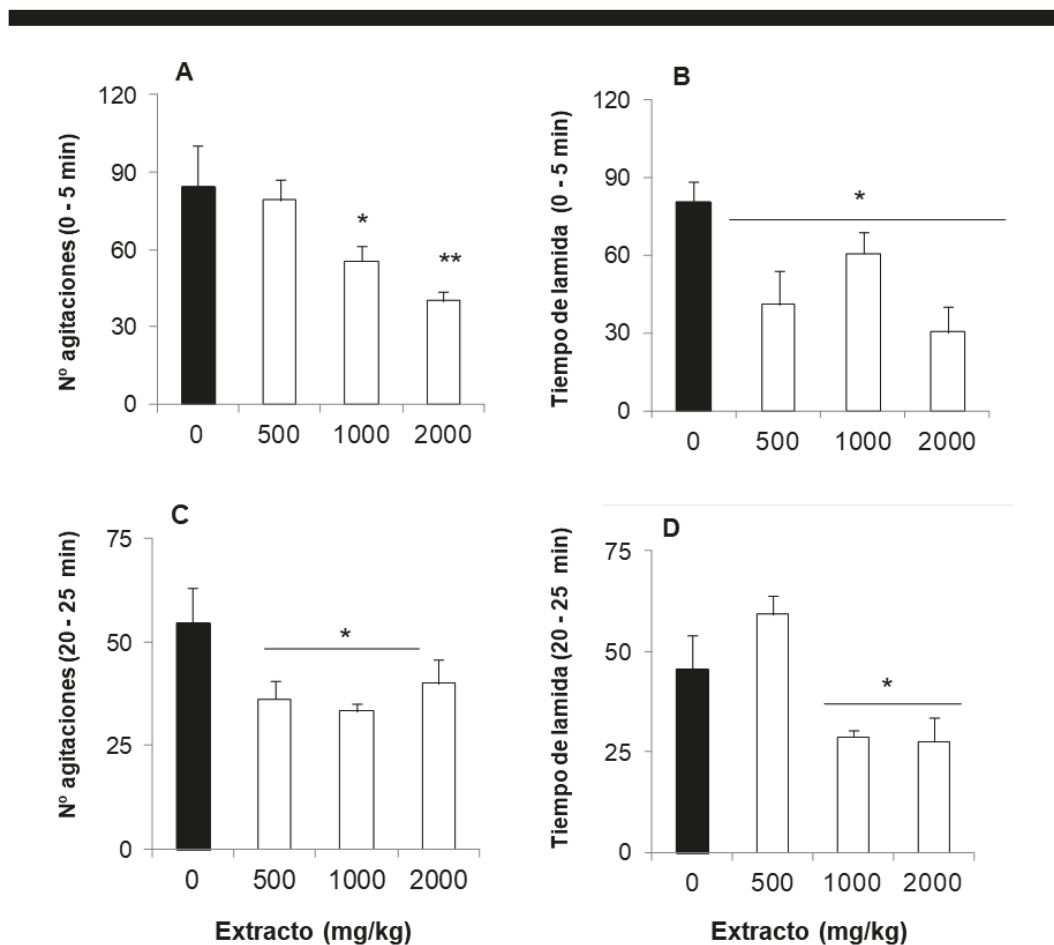


Figura 2. Efecto antinociceptivo evaluado con el test de la formalina tras el tratamiento vía oral del extracto de brotes de brócoli en ratas.

En cada una de las fases se evaluó la cantidad de veces que la rata agitaba la pata debido al dolor causado por un agente nocivo, inyectado en la zona subplantar, y el tiempo de lamidas que el animal realizaba en este lugar, siendo en general estos resultados significativos estadísticamente con las dosis de 1.000 y 2.000 mg/kg, donde encontramos una reducción de estos parámetros (figura 2).

En el caso del test de estiramientos en ratones, observamos que el efecto tanto en el tiempo de latencia hasta el primer estiramiento, como en el número total de estiramientos abdominales, fue dosis-dependiente, pues encontramos diferencias significativas en el aumento del tiempo de latencia para las dosis de 1.000 y 2.000 mg/kg en los ratones tratados (figura 3.A.), y tras proporcionar las tres dosis orales en el número total de estiramientos abdominales (figura 3.B.).



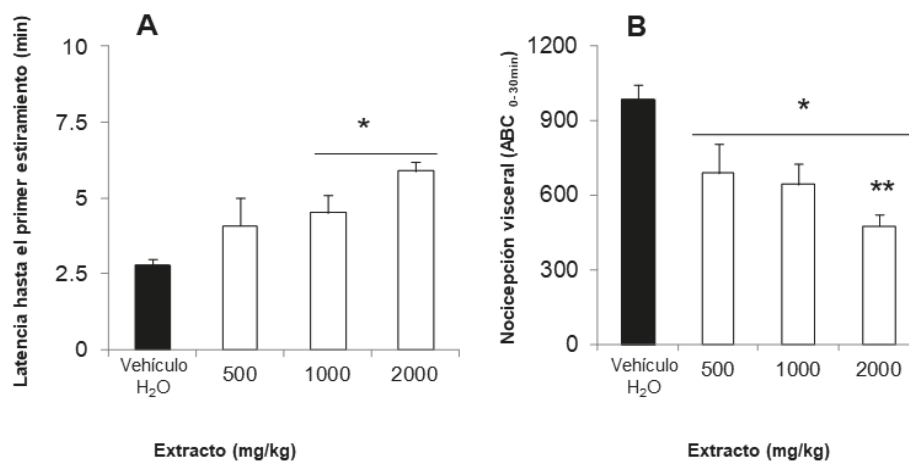


Figura 3. Efecto antinociceptivo dosis-respuesta evaluado por el test de estiramientos tras el tratamiento vía oral del extracto de brotes de brócoli en ratones.

Por lo tanto, el extracto de brotes de brócoli liofilizados modula tanto la fase neurogénica del dolor o dolor agudo, debido a la activación del sistema nervioso periférico, como la fase inflamatoria, responsable del dolor a nivel del sistema nervioso central. No obstante, la disminución del dolor es superior en la primera fase, posiblemente debido a una acción de tipo opiácea del tratamiento [20], así como una acción analgésica debido al bloqueo de mecanismos inflamatorios a nivel periférico [21,22].

CONCLUSIONES

Es importante, antes de realizar un estudio *in vitro* o *in vivo*, caracterizar el material vegetal que se va a utilizar para los tratamientos, con el objetivo de identificar y cuantificar los compuestos bioactivos, presentes en este, que puedan tener efecto beneficioso para la salud.

Con este trabajo se ha demostrado que se puede estudiar la biodisponibilidad y bioactividad del sulforafano en células cancerígenas humanas, uno de los responsables del efecto antiproliferativo de los brotes de brócoli en este modelo *in vitro*. Por otro lado, se ha demostrado el efecto analgésico de estos brotes en modelos de roedores, pudiendo utilizarse como tratamiento y evitar así los efectos secundarios de los medicamentos usados normalmente. Así mismo, se requiere el estudio de los mecanismos de acción de los compuestos bioactivos presentes en los brotes de brócoli, como antiinflamatorio, anticancerígeno y antioxidante, para determinar cómo afectan al metabolismo humano y a la prevención del desarrollo de enfermedades.



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha financiado mediante el proyecto AGL2013-46247-P, del Ministerio de Economía y Competitividad (España), y parcialmente a través de la Red Temática CORNUCOPIA (Ref. 112RT0460), dentro del programa CYTED (España). N. Baenas fue beneficiaria de una beca FPU del Ministerio de Educación (España).

REFERENCIAS

- [1] Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2012;18(6):337-47.
- [2] Jeffery EH, Keck AS. Translating knowledge generated by epidemiological and *in vitro* studies into dietary cancer prevention. *Molecular nutrition & food research*. 52 Suppl 1. 2008;S7-17.
- [3] Wagner AE, Terschluesen AM, Rimbach G. Health Promoting Effects of Brassica-Derived Phytochemicals: From Chemopreventive and Anti-Inflammatory Activities to Epigenetic Regulation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013;12.
- [4] Cevallos-Casals BA, Cisneros-Zevallos L. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species. *Food Chemistry*. 2010;119(4):1485-90.
- [5] Hanlon PR, Barnes DM. Phytochemical Composition and Biological Activity of 8 Varieties of Radish (*Raphanus sativus* L.) Sprouts and Mature Taproots. *Journal of Food Science*. 2011;76(1): C185-C92.
- [6] Angelino D, Jeffery E. Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Foods*. 2014;7:67-76.
- [7] Clarke JD, Ho E, Dashwood RH. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane, *Cancer letters*. 2008;269(2):291-304.
- [8] La Marca M, Beffy P, Della Croce C, Gervasi PG, Iori R, Puccinelli E *et al.* Structural influence of isothiocyanates on expression of cytochrome P450, phase II enzymes, and activation of Nrf2 in primary rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(8):2822-30.
- [9] Folkard DL, Marlow G, Mithen RF, Ferguson LR. Effect of Sulforaphane on NOD2 via NF- κ B: implications for Crohn's disease. *Journal of Inflammation*. 2015;12(1):1-6.
- [10] Baenas N, Moreno DA, García-Viguera C. Selecting sprouts of brassicaceae for optimum phytochemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(45):11409-20.
- [11] Cramer JM, Jeffery EH. Sulforaphane absorption and excretion following ingestion of a semi-purified broccoli powder rich in glucoraphanin and broccoli sprouts in healthy men. *Nutrition and cancer*. 2011;63(2):196-201.
- [12] Domínguez-Perles R, Medina S, Moreno DA, García-Viguera C, Ferreres F, Gil-Izquierdo A. A new ultra-rapid UHPLC/MS/MS method for assessing glucoraphanin and sulforaphane bioavailability in human urine. *Food Chemistry*. 2014;143:132-8.
- [13] Baenas N, Silván JM, Medina S, de Pascual-Teresa S, García-Viguera C, Moreno DA. Metabolism and antiproliferative effects of sulforaphane and broccoli sprouts in human intestinal (Caco-2) and hepatic (HepG2) cells. *Phytochemistry Reviews*. 2015;14(6):1035-44.



- [14] Baenas N, González-Trujano ME, Guadarrama-Enríquez O, Pellicer F, García-Viguera C, Moreno DA. Broccoli sprouts in analgesia-preclinical: In vivo studies. *Food and Function*. 2017;8(1):167-76.
- [15] Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain*. 1990;40(2):229-38.
- [16] Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British journal of pharmacology and chemotherapy*. 1968;32(2):295-310.
- [17] Aires A, Carvalho R, Rosa E. Glucosinolate composition of brassica is affected by postharvest, food processing and myrosinase activity. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2012;36(3):214-24.
- [18] Heiss E, Herhaus C, Klimo K, Bartsch H, Gerhauser C. Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(34):32008-15.
- [19] Munday R, Munday CM. Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(7):1867-71.
- [20] Zhao CS, Tao YX, Tall JM, Donovan DM, Meyer RA, Raja SN. Role of micro-opioid receptors in formalin-induced pain behavior in mice. *Experimental neurology*. 2003;184(2):839-45.
- [21] Bell RF, Borzan J, Kalso E, Simonnet G. Food, pain, and drugs: does it matter what pain patients eat? *Pain*. 2012;153(10):1993-6.
- [22] Medina S, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C, Ferreres F, Gil JJ. *et al.* The intake of broccoli sprouts modulates the inflammatory and vascular prostanoids but not the oxidative stress-related isoprostanes in healthy humans. *Food Chemistry*. 2015;173:1187-94.

