

Uso Potencial de Flavonoides y Antocianinas en el Cultivo de Peces: Producción de Organismos Monosexados y Nutraceuticos

Gustavo A. Rodríguez Montes de Oca

Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa. Paseo Claussen S/N, Col.

Los Pinos, Mazatlán Sinaloa CP 82000. Email: garm73@gmail.com

Resumen

La producción de peces monosexados es altamente deseable para el cultivo a nivel comercial, siendo el caso más relevante el de la tilapia (*Oreochromis* sp.) con la finalidad de controlar la reproducción en cultivo y seleccionar el género con mejor crecimiento. El procedimiento más común para la producción de peces monosexados es el uso de esteroides sintéticos, pero debido a las implicaciones de su uso con el ambiente y salud pública, hay una búsqueda de químicos alternativos. Varios fitoquímicos en particular flavonoides, presentan una serie de propiedades biológicas relevantes; en particular por su potencial uso como inhibidores de la aromatasas o antagonistas de los receptores de estrógenos dentro de las células. Este trabajo hace una breve descripción de trabajos recientes sobre el tema y hace mención de algunos experimentos que se han llevado a cabo, incluyendo datos obtenidos por el autor. Asimismo, se incluye información de su aplicación biológica como nutraceuticos o alimentos funcionales, en particular como antioxidantes. De igual forma se hace una mención especial de la posibilidad de utilizar fitoquímicos obtenidos de plantas, tal como el caso de las antocianinas presentes en la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), de amplio consumo y producción en México.

Palabras clave: fitoquímicos, flavonoides, aromatasas, antocianinas.

Flavonoides como posibles agentes masculinizadores en peces (caso tilapia)

El cultivo de peces para producción de alimentos es un tema altamente relevante. Entre las especies que más destacan en esta actividad es la tilapia, la cual definitivamente se ha acercado a la aseveración hecha por Fitzsimmons (2000) donde indica que las tilapias están próximas a ser el pez cultivado de mayor relevancia a nivel mundial. Sin embargo, existe la posibilidad que esto no sea al los niveles esperados, ya que al igual que con otras especies, uno de los problemas más significativos es la adquisición de crías de calidad y en particular que estas sean 100% machos. Lo anterior implica en su gran mayoría la administración de hormonas esteroides sintéticos, tal como la 17α -metiltestosterona (MT), que de alguna forma da un aspecto negativo, ya que se generan opiniones encontradas con respecto a su uso y liberación al medio ambiente y las posibles implicaciones de la exposición a este tipo de químicos.

De igual forma hay una serie de implicaciones a considerar, respecto a que la eficiencia de este método de masculinización es depende de una serie de factores tales como la dosis, inicio y tiempo del tratamiento además de la forma de administración (Mirza and Shelton, 1988.) Por otro lado existen problemas asociados al uso de MT, ya que puede inducir gonadas intersexuales y feminización paradójica (Goudie, Redner, Simco & Davis 1983; Solar, Donaldson & Hunter 1984; Van den Hurk, Lambert, Peute 1989; Blazquez, Piferrer, Zanuy, Carillo & Donaldson 1995; Rinchar, Dabrowski, García-Abiado & Otoobre 1999; Papoulias, Noltie, Tillit, 2000) debido a la aromatización de esta hormona (Piferrer y Donaldson, 1989; Hornung, Jensen, Korte, Kahl, Durhan, Denny, Henry y Ankley 2004) es decir una transformación de 17α -metiltestosterona a 17α -metilestradiol, por lo que es pertinente considerar métodos alternativos para masculinizar tilapias y otros peces.

La aromatasa es una enzima de interés muy particular en la diferenciación sexual en peces, dado que existe evidencia que la expresión del gen que la codifica puede ser inhibido a altas temperaturas (35°C) induciendo la masculinización de hembras de tilapia a diferentes proporciones (D’cotta, Fostier, Guiguen & Govoroun 2001), igualmente en otro

Rodríguez, G. 2011. Uso Potencial de Flavonoides y Antocianinas en el Cultivo de Peces: Producción de Organismos Monosexados y Nutracéuticos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 301-316.

experimento con hembras del lenguado japonés *Paralichthys olivaceus*) se observaron resultados similares a 27°C (Kitano, Takamune, Nagahama & Abe, 2000). Por lo que la inhibición de esta enzima por factores físicos emula el efecto de los tratamientos con andrógenos en ciertas especies (Kwon, McAndrew & Penman, 2001). Igualmente, dado que los estrógenos son productos de la metabolización de la testosterona a estas hormonas (Fig 1), es posible considerar que la inhibición de la misma por factores químicos es otra alternativa viable a la masculinización de peces. Siendo en primera instancia inhibidores sintéticos, con una estructura química similar a las hormonas endógenas (Gao, Wang, Wallat, Yao, Rapp, O'Bryant, MacDonald & Wang, 2010) u otros químicos tal como los derivados de plantas que pueden suprimir la síntesis de estrógenos (Geahlen, Koonchanok & McLaughlin, 1989; Pelissero, Lenczowski, Chinzi, Davail-Cuisset, Sumpter & Fostier, 1996; Eng, Williams, Mandava, Kirma, Tekmal & Chen 2001).

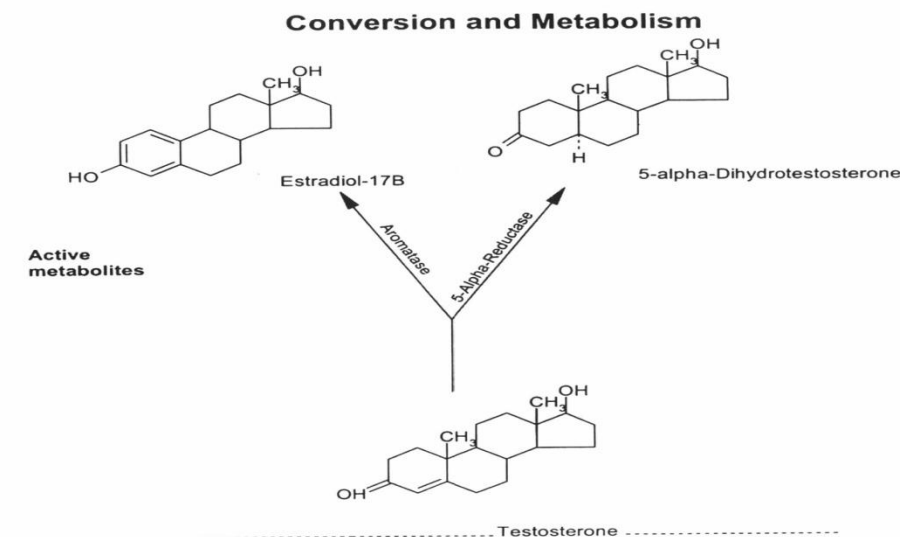


Figura 1. Conversión enzimática de la testosterona a estradiol mediada por la enzima aromatasa (Acology, 2004 www.rx2u.com)

Esta descrito que ciertos compuestos químicos tal como los flavonoides, isoflavonoides y antocianinas, los cuales poseen una estructura molecular muy similar a las hormonas esteroides (Fig 2); estos químicos son derivados de productos tales como soya, té, frutas y vegetales y presentan una actividad antiestrogénica inhibiendo a la aromatasa (Hodek,

Trefil & Stiborova, 2002). Esta enzima, una hemoproteína P-450, cataliza la conversión de andrógenos como la testosterona y la androstenediona vía una triple hidroxilación a estrógeno y otras hormonas femeninas, junto con otras enzimas tal como la 5 α -reductasa y la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Brodie, Lu & Long 1999; Strauss, Santii, Saarinen, Streng, Joshi & Makela 1998; Griffiths, Morton & Denis 1999; Eng *et al.*, 2001).

Actualmente existen una serie de estudios que proveen evidencia muy relevante en cuanto a la habilidad de estos fitoquímicos en la inhibición de la aromatasa, en particular flavonoides como el crisin con resultados interesantes en la elevación de los niveles naturales de testosterona en ratas adultas (Chen, Kao & Laughthon 1997), siendo un punto importante su estructura molecular estable y bajo peso molecular para poder pasar a través de las membranas celulares (Ososki y Kenelly, 2003) ya que esto determina en gran forma su capacidad de inhibición de la aromatasa (Le Bail, Latoche, Marre-Fournier & Habrioux 1998; Jeong, Shin, Kim & Pezzuto 1999; Saarinen, Joshi, Ahotupa, Li, Ammala, Makela & Santini 2001) aunque es importante considerar que la afinidad de estos flavonoides por la aromatasa es generalmente menor a la observada por hormonas esteroides y sus derivados (Seralini y Moslemi 2001).

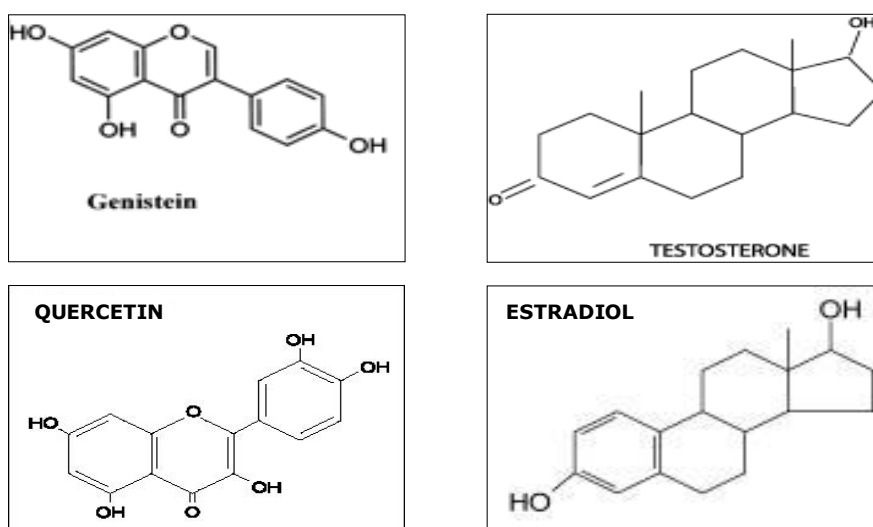


Figura 2. Similitud en la estructura molecular entre hormonas esteroides (testosterona y estradiol) con flavonoides (Genistein y quercetina)

Definitivamente la acción de flavonoides y otros fitoquímicos es un tema relativamente reciente en peces; un antecedente relevante es cuando se determinó el efecto de los flavonoides presentes en dietas con un alto contenido de soya en hembras de esturión dado que se observó una clara disminución en los niveles de estrógenos en plasma (Pelissero *et al.*, 1996). Aunque la gran mayoría de la información disponible en cuanto a la efectividad de estos flavonoides en la inhibición de síntesis de estrógenos en peces proviene de estudios *in vitro* utilizando preparaciones de células de ovarios de peces (Joshi, Ahotupa, Koshan, Mäkele & Santii 1999; Jeong *et al.*, 1999) existen un par de antecedentes relevantes sobre la administración en la dieta de genistein (un isoflavonoide) en bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) donde se observó un incremento dependiente del nivel de inclusión de este isoflavonoide (0 a 8 g/kg) en el número de peces con gónadas intersexuales y características fenotípicas propias de machos (Green y Kelly, 2009) y lo observado en anguila europea (*Anguilla anguilla*) donde a una dosis de 20 mg/kg genistein en la dieta presentó un nivel muy alto de machos fenotípicos (85%) (Tzchori, Degani, Elisha, Eliyahu, Hurvitz, Vaya y Moav 2004).

Flavonoides como nutraceuticos (antioxidante)

Otro aspecto relevante relacionado a los flavonoides y otros fitoquímicos en la dieta son sus asociaciones con factores nutricionales. Existe en la literatura una serie de revisiones (Knight & Eden, 1995; Pietta, 2000; Dixon, 2004) donde se sugiere que además de la ya probada capacidad de funcionar como antioxidantes, pueden interactuar en la fosforilación de proteínas, quelación de hierro e interferir con diversas reacciones enzimáticas (Boyle, Lu, Long, 2000), siendo la más relevante su función como antioxidantes, dicha capacidad es dada por la alta presencia de grupos funcionales hidroxilo con una alta capacidad de donaciones de hidrogeno (Pietta, 2000). Además, varios flavonoides tienen la capacidad de regenerar otros antioxidantes como el tocoferol (Boyle *et al.*, 2000) en el ámbito de salud pública, el consumo de fitoquímicos está asociado con una disminución considerable del

riesgo de enfermedades cardiovasculares (Reiterer, Toborek, Henning 2004), siendo una razón importante para determinar el espectro de la funcionalidad biológica de la administración de estos compuestos en dietas para peces.

Experiencias previas del posible uso de flavonoides como agentes masculinizadores en tilapia.

Se pueden dar algunos ejemplos de experimentos realizados por el autor, los cuales están encaminados a determinar la magnitud del efecto *in vivo* en tilapia sexualmente indiferenciadas, utilizando inhibidores de la aromatasas, tanto de origen natural como sintéticos. Para este fin, se llevaron a cabo una serie de experimentos utilizando dietas semi-purificadas a base de caseína y gelatina a las cuales se les adiciono genistein (500 mg/kg), quercetin (10 g/kg) o MT (60 mg/kg) o libre de flavonoides u hormonas (control). En un segundo experimento se prepararon dietas experimentales con los siguientes fitoquímicos: ácido cafeico (500 mg/kg), crisin (500 mg/kg), daidzein (500 mg/kg), MT (60 mg/kg) y además se incluyeron los compuestos espironolacton (500 mg/kg) y 1,4,6-androstatrien-3-17diona (ATD) (150 mg/kg) como inhibidores sintéticos de la aromatasas, en ambos casos se utilizaron crías de tilapia *Oreochromis niloticus* genéticamente 100% hembras (TilGen, Filipinas).

En ambos casos se evaluó el crecimiento, supervivencia, relación final del sexo fenotípico de los peces y además valores de la bioacumulación de algunos de estos flavonoides en tejido. Se encontró que a los niveles de inclusión de los flavonoides seleccionados (500 mg/kg) no fue posible observar un efecto significativo en incrementar el porcentaje de machos (Fig 3 y 4), en una proporción similar a lo observado con MT (85-100%) y el inhibidor de la aromatasas ATD (50%) (Fig 3 y 4). No se observó un efecto negativo en el crecimiento o supervivencia de los organismos experimentales. Sin embargo, lo observado con respecto a crisin (Fig. 4), donde se observó una diferencia de 10-15% con respecto al control, mantiene cierta expectativa con respecto a continuar este tipo de estudios. Además, fue posible validar la presencia de todos los flavonoides utilizados en las dietas

Rodríguez, G. 2011. Uso Potencial de Flavonoides y Antocianinas en el Cultivo de Peces: Producción de Organismos Monosexados y Nutracéuticos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuicola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuicola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 301-316.

experimentales en el tejido de los peces, por medio de análisis de cromatografía de líquidos (HPLC).

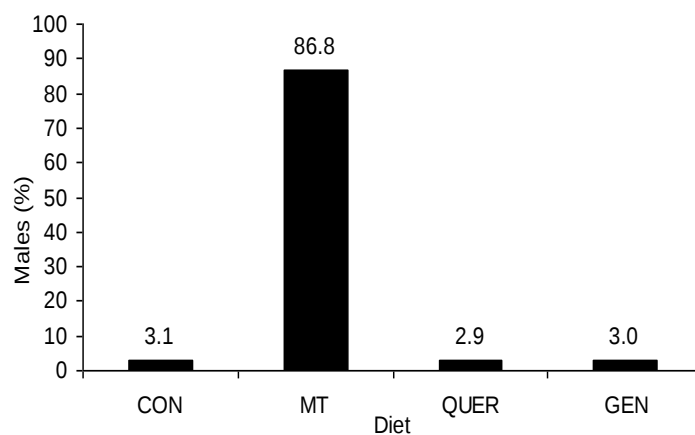


Figura 3. Valores observados de presencia de machos (%) en tilapias genéticamente hembras alimentadas con las dietas experimentales control (CON), 17α -metiltestosterona (MT), quercetin (QUER) y genistein (GEN). (Rodríguez-Montes de Oca, 2005)

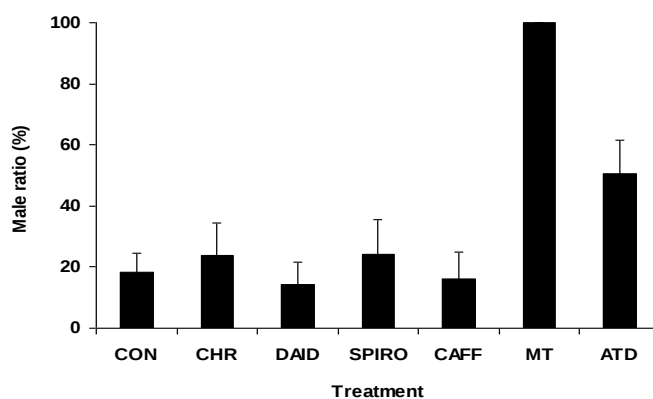


Figura 4. Valores observados de presencia de machos (%) en tilapias genéticamente hembras alimentadas con las dietas experimentales control (CON), crisis (CHR), daidzein (DAID), ácido cafeico (CAFF), espironolacton (SPIRO), 1,4,6-androstatrien-3-17diona (ATD) y 17α -metiltestosterona (MT). (Rodríguez-Montes de Oca, 2005)

Consideraciones particulares sobre la absorción y bio disponibilidad de los flavonoides

El grado de absorción y metabolización de los flavonoides después de la ingestión es un punto muy relevante para establecer su bioactividad. Un paso importante es validar su tasa de retención una vez consumidos, por ejemplo la evidencia de altas concentraciones en la orina en estudios en humanos y otros vertebrados indican una eliminación considerable después de su consumo (Pelissero *et al.* 1996). En general, la absorción de los flavonoides se lleva a cabo a través de una serie de conjugaciones y deconjugaciones facilitadas por la flora bacteriana y el hígado (Patisaul y Whitten 1999; Hollman y Arts 2000; Miyahara, Ishibashi, Inudo, Nishijima, Iguchi, Guillete & Arizono 2003). Existe la posibilidad de que no se den todos los pasos necesarios para facilitar dicha absorción debido al grado de desarrollo del tracto digestivo en peces sexualmente indiferenciados, tal como las tilapias de los experimentos mencionados anteriormente. Sin embargo, existe la posibilidad de que existan diferencias entre diferentes especies de peces y la contribución de enzimas hidrolíticas por parte de la flora bacteriana que están involucradas en el proceso de metabolización del alimento (Bairagi, Ghosh, Sen & Ray 2002) abriendo la posibilidad a combinar la suplementación de flavonoides en las dietas con probióticos y de esta forma no depender de otros factores para un pronto o adecuado desarrollo de la flora bacteriana tales como las condiciones del experimento en cuanto a la utilización de UV y otros que pueden alterar la especificidad de la flora bacteriana presente en los organismos (LeaMaster, Walsh, Brock & Fujika 1997).

Este establecido hasta cierto grado cuales son las vías de metabolización que intervienen en la absorción en vertebrados de varios flavonoides, por ejemplo daidzein es transformado a dihidrodaidzein, después en equol y finalmente en O-dimetilangolesin (Patisaul & Whitten 1999). Crisin posee una estructura molecular que facilita su transporte en membranas celulares; sin embargo, su absorción puede ser muy limitada dada una serie de eficientes conjugaciones (glucosilación y sulfatación) en el borde de las células epiteliales del intestino (Walle, Galijjatovic & Walle 1999). Por lo que también es necesario ampliar el

número de estudios de farmacocinética y establecer el grado y eficiencia de absorción de flavonoides y otros fitoquímicos, validando la dosis y duración del tratamiento mínimas requeridas para observar un efecto significativo, ya que en una conclusión preliminar establecer dichos valores permitirá hacer aseveraciones en relación a una causa efecto totalmente dependiente de la dosis considerada en las dietas experimentales. Un ejemplo interesante en cuanto a cómo diferentes especies de peces metabolizan de una forma muy diferente flavonoides administrados en la dieta es un estudio efectuado por Gontier-Latonnelle, Cravedi, Perdu, Lamothe, Le Menn & Bennetau-Pelissero (2007) donde se estableció que mientras la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss* produce principalmente genistein glucoronado mientras el esturión *Acipenser baeri* produce principalmente metabolitos sulfatados, pero los niveles de genistein en plasma son casi 20 veces más altos en esturión; por lo que es otro punto relevante a establecer en cuanto a las diferencias a nivel de fisiología digestiva de cada especie.

Antocianinas: aspectos relevantes

En relación a este apartado, cabe mencionar que hay una gran cantidad de información disponible que detalla la posibilidad del uso de extractos de plantas en aspectos reproductivos tanto de animales como de humanos. Esta reportado que la administración de extractos de las plantas *Hibiscus macranthus* y *Basella alba* pueden promover efectos viriles y anabólicos, además de producir incrementos de los niveles endógenos de testosterona en ratas adultas (Moundipa, Kamtchouning, Koueta, Tanchou, Foyang, Mbiapo, 1999). La harina de la maca peruana (*Lepidium meyenii*) ha sido utilizada por largo tiempo como un remedio natural para la infertilidad de varones en comunidades rurales (Quiros, Epperson, Hu, Holle, 1996; Cicero, Bandieri, Arletti 2001; Gonzales, Cordova, Vega, Chung, Villena, Gomez 2003) y recientemente se ha reportado como la administración oral de extractos de maca incrementa la conducta sexual en ratones y disminuye la disfunción eréctil en ratas (Zheng, He, Kim, Rogers, Shao, huang, Lu, Yan, Qien, Zheng, 2000). Cicero *et al.* (2001) reportaron que el uso de maca pulverizada

Rodríguez, G. 2011. Uso Potencial de Flavonoides y Antocianinas en el Cultivo de Peces: Producción de Organismos Monosexados y Nutracéuticos. En: Cruz-Suárez, L.E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D. A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 301-316.

aumento el desempeño sexual en ratas y que la administración de extractos acuosos de esta raíz por 14 días incremento el peso de los testículos y el epidídimo e incremento la espermatogénesis (Gonzales, Ruiz, Gonzales, Villegas, Cordova, 2001).

Con este antecedente, podemos entrar en detalle al porque se considera como una opinión personal, la potencialidad de los extractos de la flor de Jamaica como una fuente de fitoquímicos de actividad androgénica o antiestrogénica u de otra índole como nutraceuticos en particular como antioxidantes. En particular las antocianinas, estos flavonoides poseen en su estructura molecular un agregado de un azúcar o carbohidrato, lo cual de alguna forma sustituye la reacción que ocurre en el tracto digestivo como parte de la metabolización de este tipo de compuestos y que puede tener como consecuencia una mayor absorción y estabilidad (Leguizamón, González-León & Báez-Sañudo 2005). Una de las propiedades biológicas de las antocianinas mejor descritas corresponden a su capacidad de funcionar como antioxidantes (Chang, Huang, Huang, Ho & Wang 2006; Kou, Yen, Hong, Wang, Lin & Wu 2009; Fernández-Arroyo, Rodríguez-Medina, Beltrán-Debón, Pasini, Joven, Micol, Segura-Carretero & Fernández-Gutiérrez 2011).

Existen varias referencias que describen como las antocianinas presentes en diversas plantas tal como la jambal *Eugenia jambolana*, disminuyen la proliferación de células cancerosas dependientes de estrógenos en condiciones de laboratorio, inhibiendo principalmente la actividad de estas hormonas en estas preparaciones de células (Li, Adams, Chen, Killian, Ahmed & Seeram 2009), al igual que los trabajos descritos por Wang, Nair, Strasburg, Booren & Gray (1999) con extractos de cerezas y Zhang, Seeram, Lee, Feng & Heber (2008) con extractos de fresa, donde se describen resultados similares. En cuanto al alto contenido de antocianinas en la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) existe información disponible desde hace tiempo (Lowry, 1976) donde se describe la alta presencia de estos compuestos en varias plantas del mismo género y recientemente en trabajos tales como los descritos por Wong, Yusof, Ghazali & Che (2003), Man Ali, Al Wabel & Blunden (2005), Chang *et al*, (2006) y Fernandez-Arroyo *et al*, (2011) por mencionar algunos.

Conclusiones

El uso de fitoquímicos tales como flavonoides en cuanto a sus efectos antiestrogénicos o androgénicos es una posible respuesta a la sustitución del uso de hormonas esteroides en el control de la diferenciación de peces de relevancia para la acuicultura tal como la tilapia. Si consideramos que estos compuestos son parte inherente de muchos de los ingredientes vegetales que son componentes de la alimentación de peces, definitivamente es un área de oportunidad para combinar el valor nutricional de estos compuestos como posibles nutraceuticos al funcionar como antioxidantes y sus posibles implicaciones en procesos reproductivos de los organismos que los consumen. Por lo que continuar con este tipo de trabajos presenta un campo interesante dentro de los muchos aspectos inherentes a la nutrición acuícola.

Agradecimientos

El apoyo financiero para parte de esta investigación provino de USAID Grant No. LAG-G-00-96-90015-00 por medio de Aquaculture Collaborative Research Support Program (CRSP) y el Consejo Nacional en Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Referencias

- Bairagi A., Ghosh K.S., Sen S.K. & Ray A.K. (2002) Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International* **10**, 109-121.
- Blazquez M, Piferrer F, Zanuy S, Carillo M, Donadlson EM, (1995) Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture*. **135**, 329-342.
- Boyle, S.P., Dobson, V.L., Duthie, S.J., Hinselwood, D.C., Kyle, J.A.M., Collins, A.R., (2000) Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: A human supplementation study. *European Journal of Clinical Nutrition* **54**, 774-782.
- Brodie A, Lu Q, Long B, (1999) Aromatase and its inhibitors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **69**,205-210.
- Chang Y.-C., Huang K.-X., Huang A.-C., Ho Y.-C., Wang C.-J. (2006) Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL-mediated macrophages apoptosis *Food and Chemical Toxicology*, **44**,1015-1023.
- Chen S, Kao YC, Laughton CA, (1997) Binding characteristics of aromatase inhibitors and phytoestrogens to human aromatase. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **61**,107-115.
- Cicero, A.F.G., Bandieri, E., Arletti, R., (2001) *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *Journal of Ethnopharmacology* **75**, 225-229.
- D’cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun A. (2001) Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Rep and Development*. **276**, 265-276.
- Dixon, R.A., (2004). Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 225-261.
- Eng ET, Williams D, Mandava U, Kirma U, Tekmal RR, Chen S, (2001) Suppression of aromatase (estrogen synthetase) by red wine phytochemicals. *Breast Cancer Research and Treatment*. **67**,133-146.
- Fernández-Arroyo S, Rodríguez-Medina IC, Beltrán-Debón R, Pasini F, Joven J, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez (2011) A Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. *Food Research International*, **44**, 1490-1495.
- Fitzsimmons K, (2000). Tilapia: the most important aquaculture species of the 21st century. In Fitzsimmons K, Filho JC Eds. *Proceedings from the fifth international symposium on tilapia aquaculture*. Departamento de Pesca e Aquicultura DPA / MA. Rio de Janeiro Brazil.3-7 Sept. 3-8.
- Gao Z-X, Wang H-P, Wallat G, Yao H, Rapp D, O'Bryant P, MacDonald R, Wang W-M (2010) Effects of a nonsteroidal aromatase inhibitor on gonadal differentiation of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. *Aquaculture Research*, **41**, 1282-1289.

- Geahlen RL, Koonchanok NM, McLaughlin JL, (1989). Inhibition of protein tyrosine kinase by flavonoids and related compounds. *J. Nat. Prod.*, **52**, 982-986.
- Gontier-Latonnelle K, Cravedi JP, Laurentie M, Perdu E, Lamothe V, Le Menn F, Bennetau-Pelissero C (2007) Disposition of genistein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *General and Comparative Endocrinology*, **150**, 298-308.
- Gonzales, G.F., Ruiz, A., Gonzales, C., Villegas, L., Cordova, A., (2001). Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian Journal of Andrology* **3**, 231-233.
- Gonzales, G.F., Cordova, A., Vega, K., Chung, A., Villena, A., Gomez, C. (2003). Effects of *Lepidium meyenii* (Maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. *Journal of Endocrinology* **176**, 163-168.
- Goudie CA, Redner BD, Simco BA, Davis KB, (1983). Feminization of channel catfish by oral administration of steroid sex hormones. *Trans. Am. Fish. Soc.* **112**, 670-672.
- Green, C., Kelly, A. (2009). Effects of the estrogen mimic genistein as a dietary component on sex differentiation and ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) *Fish Physiology and Biochemistry*. **35**, 377-384
- Griffiths K, Morton MS, Denis L, (1999). Certain aspects of molecular endocrinology that relate to the influence of dietary factors on the pathogenesis of prostate cancer. *3 Eur Urol*. **35**, 443-455.
- Hodek P, Trefil P, Stiborová M (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, **139**, 1-21.
- Hollman P.C.H. & Arts L.C.W. (2000) Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1081-1093.
- Hornung MW, Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Durhan EJ, Denny JS, Henry TR, Ankley GT (2004) Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17[alpha]-methyltestosterone: conversion of 17[alpha]-methyltestosterone to 17[alpha]-methylestradiol. *Aquatic Toxicology*, **66**, 15-23.
- Jeong HJ, Shin YG, Kim IH, Pezzuto JM, 1999. Inhibition of aromatase activity by flavonoids. *Arch Pharm Res*. **22**, 309-312.
- Joshi SC, Ahotupa M, Koshan ML, Mäkele S and Santii R. (1999) Inhibition of aromatase by flavonoids in cultured jeg-3 cells. In *Kumpulainen JT and Salonen J.T. Natural antioxidants and anticarcinogens in nutrition, health and disease*. RS,C. UK 36-374.
- Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe S. (2000). Aromatase inhibitor and 17 alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) *Molecular Reproduction and Development*. **56**, 1-5
- Knight, D.C., Eden, J.A., (1995) Phytoestrogens: A short review. *Maturitas* **22**, 167-175.

- Kou M.-C., Yen J.-H., Hong J.-T., Wang C.-L., Lin C.-W., Wu M.-J. (2009) Cyphomandra betacea Sendt. phenolics protect LDL from oxidation and PC12 cells from oxidative stress, *Food Science and Technology*, **42**, 458-463.
- Kwon JY, Mcandrew BJ, Penman DJ, (20019. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development*. **59**, 359-370.
- Le Bail JC, Laroche T, Marre-Fournier F, Habrioux G. (1998). Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. *Cancer Letters*. **133**, 101-106.
- LeaMaster B.R., Walsh W.A., Brock J.A. & Fujika R.S. (1997) Cold Stress-induced changes in the aerobic heterotrophic gastrointestinal tract bacterial flora of red hybrid tilapia. *Journal of Fish Biology* **50**, 770-780.
- Li L, Adams LS, Chen S, Killian C, Ahmed A, Seeram NP (2009) Eugenia jambolana Lam. Berry Extract Inhibits Growth and Induces Apoptosis of Human Breast Cancer but Not Non-Tumorigenic Breast Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 826-831.
- Lowry JB (1976) Floral anthocyanins of some malesian Hibiscus species. *Phytochemistry*, **15**, 1395-1396.
- Ali BH, Wabel NA, Blunden G (2005) Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: a review. *Phytotherapy Research*, **19**, 369-375.
- Mirza, J.A., Shelton, W.L., 1988. Induction of gynogenesis and sex reversal in silver carp. *Aquaculture* **68**, 1-14.
- Miyahara M., Ishibashi H., Inudo M., Nishijima H., Iguchi T., Guillette L.J. & Arizono K. (2003) Estrogenic activity of a diet to estrogen receptors -alpha and -beta in an experimental animal. *Journal of Health Science* **49**, 481-491.
- Moundipa, F.P., Kamtchouing, P., Koueta, N., Tantchou, J., Foyang, N.P.R., Mbiapo, F.T., (1999) Effects of aqueous extracts of *Hibiscus macranthus* and *Basella alba* in mature rat testis function. *Journal of Ethnopharmacology* **65**, 133-139.
- Ososki, A.L., Kennelly, E.J., 2003. Phytoestrogens: A review of the present state of research. *Phytotherapy Research* **17**, 845-869.
- Papoulias D.M., Noltie DB, Tillitt DE, 2000. Effects of methyltestosterone exposure on sexual differentiation in medaka, *Oryzias latipes*. *Mar. Environ. Res.*, **50**, 181-184.
- Patisaul H.B. & Whitten P.L. (1999) Dietary phytoestrogen. In: *Endocrine disruptors, effects on male and female reproductive systems* (ed by R.K. Naz) pp. 89-123. CRC Press, USA,.
- Pelissero C, Lenczowski MJ, Chinzi D, Davail-Cuisset B., Sumpter JP, Fostier A, (1996). Effects of flavonoids on aromatase activity, an *in vitro* study. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **57**, 215-223.
- Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**,1035-1042.

- Piferrer F, Donaldson E.M, (1989). Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture* **77**, 251-262.
- Quiros, C.F., Epperson, A., Hu, J.H., Holle, M., (1996). Physiological studies and determination of chromosome number in Maca, *Lepidium meyenii* (Brassicaceae). *Economic Botany* **50**, 216-223.
- Reiterer, G., Toborek, M., Hennig, B., (2004) Quercetin protects against linoleic acid-induced procine endothelial cell dysfunction. *J. Nutr.* **134**, 771-775.
- Rinchard J, Dabrowski K, Garcia-Abiado MAR, Ottobre J, (1999) Uptake and depletion of 17 α -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: effect on plasma steroids and sex reversal. *Steroids*, **64**, 518-525.
- Rodriguez-Montes, G.A., (2005) Evaluation of phytochemicals on sex differentiation and growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PhD dissertation*, The Ohio State University, Columbus, Ohio.
- Saarinén N, Joshi SC, Ahotupa M, Li X, Ammala J, Makela S, Santini R. (2001) No evidence for the in vivo activity of aromatase-inhibiting flavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **78**, 231-239.
- Seralini GE, Moslemi S, (2001) Aromatase inhibitors: past, present and future. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **178**, 117-131.
- Solar II, Donaldson EM, Hunter GA, (1984). Optimization of treatment regimes for controlled sex differentiation and sterilization in wild rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) by oral administration of 17 α -methyltestosterone. *Aquaculture*. **42**, 129-139.
- Strauss L, Santti R, Saarinén N, Streng T, Joshi S, Makela S. (1998) Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicology Letters*. **102-103**, 349-354.
- Tzchori I., Degani G., Elisha R., Eliyahu R., Hurvitz A., Vaya J. & Moav B. (2004) The influence of phytoestrogens and oestradiol-17 β on growth and sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture Research* **35**, 1213-1219.
- van den Hurk, R., Lambert. J.G., Peute, D., 1982. Steroidogenesis in the gonads of rainbow trout fry (*Salmo gairdneri*) before and after the onset of gonadal sex differentiation. *J. Reprod. Nutr. Dev.* **22**, 413-425.
- Walle U.K., Galijjatovic A. & Walle T. (1999) Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 431-438.
- Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang Y-C, Booren AM, Gray JJ, DeWitt DL (1999) Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Anthocyanins and Their Aglycon, Cyanidin, from Tart Cherries. *Journal of Natural Products*, **62**, 294-296.
- Wong P-K, Yusof S, Ghazali HM, Che Man Yb (2003) Optimization of hot water extraction of roselle juice using response surface methodology: a comparative study with other extraction methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**, 1273-1278.

- Zhang Y, Seeram NP, Lee R, Feng L, Heber D (2008) Isolation and Identification of Strawberry Phenolics with Antioxidant and Human Cancer Cell Antiproliferative Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 670-675.
- Zheng, B.L., He, K., Kim, C.H., Rogers, L., Shao, Y., Huang, Z.Y., Lu, Y., Yan, S.J., Qien, L.C., Zheng, Q.Y., (2000). Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* **55**, 598-602