

2003-2007

300867632

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Evaluación de la actividad fagocítica en tilapia
(*Oreochromis niloticus*) expuesta a endosulfán**

Trabajo de Titulación en la Modalidad de:

Tesis para obtener el título de

Licenciado en Biología

PRESENTA:

Luz de María Bretón Deval

Directora de Tesis

Biol. Martha Cecilia Téllez Bañuelos

Asesora de Tesis

Dra. Galina Petrovna Zaitseva

TESIS/CUCBA

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
Presidente del Comité de Titulación.
Licenciatura en Biología.
CUCBA.
Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e Informes opción tesis con el título: "**Evaluación de la actividad fagocítica en tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a endosulfán**" que realizó la pasante **Luz de María Bretón Deval** con número de código **300867632** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Zapopan Jalisco, 3 de Marzo 2008

Biol. Martha Cecilia Téllez Bañuelos
Directora de Tesis

Dra. Galina Petrovna Zaitseva
Asesora de Tesis

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Josefina Casas Solís		05/Marzo/2008
C. Dr. Eduardo Juárez Carrillo		05/Marzo/2008
Dr. Edgardo Flores Torales		05/Marzo/2008
Supl. Dra. Galina Petrovna Zaitseva		05/03/2008

S
P
V

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología Celular y Molecular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Occidente
Laboratorio de Inmunología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud.
Nuestro modelo animal tilapia fue aclimatado y cuidado en Laboratorio Húmedo del Departamento de Ecología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Financiado por CONACYT-SEMARNAT-2004-C01-00035 dentro del proyecto: "Evaluación de parámetros inmunológicos de tilapia como bioindicador de riesgo ambiental por contaminación de plaguicidas atrazina, endosulfán y diazinón en mantos acuíferos de Jalisco".

Este trabajo no hubiera podido ser realizado sin el apoyo y aliento de mi madre, y toda mi familia

Gracias a la Dra. Galina Zaitseva por sus recomendaciones de vida, tan valiosas como las brindadas para realizar este trabajo.

Gracias a mi Directora de tesis Biol. Ceci Tellez Bañuelos, por permitirme trabajar con ella y enseñarme lo que es el orden, la dedicación y el esfuerzo

Gracias a la Dra. Josefina Casas Solís por ser a lo largo de mi carrera una guía y apoyo constante

Gracias al Dr. Eduardo Juárez por el apoyo y enseñanzas que me brindo hasta en las cosas más sencillas pero que hubieran sido imposibles sin usted.

Gracias al Dr. Eduardo Alcocer por los consejos y enseñanzas en todos estos años.

Gracias a todos los maestros que a lo largo de estos cuatro años me formaron como bióloga

Gracias a todos mi amigos (Wendy, Adreissa, Bety, Victor, Felipe, Cesar, Osvaldo, Vladimir, Santana, Manuel, Nancy, Bere) que durante la realización de este trabajo, sus bromas, comentarios amenos y presencia hicieron mi vida más amena.

Contenido

Agradecimientos	3
Índice de figuras	5
Abreviaturas	6
Resumen	7
Introducción	8
Antecedentes	9
El endosulfán	10
El endosulfán y la respuesta inmune	12
Generalidades de tilapia	14
El sistema inmune de los peces teleósteos	15
Planteamiento del problema	21
Hipótesis	22
Objetivos	23
Diseño metodológico	24
Diseño experimental	25
Materiales y métodos	26
Resultados	29
Discusión	35
Conclusión	38
Literatura citada	39

Índice de figuras

Fig.1-Formula química del endosulfán	10
Fig.2-Principales Metabolitos del endosulfán	11
Fig.3- <i>Oreochromis niloticus</i>	14
Fig.4-Órganos Linfoides de <i>Oreochromis niloticus</i>	15
Fig.5-Membrana de fagocito activado que presenta el ensamblaje de la enzima NADPH	19
Fig.6-Efecto del endosulfán sobre el Índice Somático del Bazo	28
Fig.7-Índice de fagocitosis de macrófagos esplénicos	29
Fig.8-Porcentaje de macrófagos esplénicos activos	30
Fig.9- Porcentaje de macrófagos esplénicos FITC +	31
Fig.10- Índice de intensidad media de fluorescencia	32
Figura 11.- Efecto del endosulfán en la producción de ROS en macrófagos esplénicos	33

Abreviaturas

ATSDR	The Agency for toxic substances and disease registry
°C	grados Celsius
Cl	cloro
DDT	dicloro-difenil-tricloroetano
DMSO	dimetil sulfóxido
FS	Forward Scatter
FITC	fluoresceína-isotiocianato
GABA	ácido gamma amino butírico
GPX	glutación peroxidasa
GSH	glutación reducido
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
INR	intermediarios reactivos de nitrógeno
IRO	Intermediarios reactivos de oxígeno
Kg	kilogramo
L	litros
MAF	factor de activación de macrófagos
NADPH	nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato
NBT	nitro azul de tetrazolio
NCC	células citotóxicas no específicas
NK	células natural killer
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	solución tampón fosfato salino
pH	potencial de Hidrogeno
PMN	polimorfos nucleares
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SFB	suero fetal bovino
SOD	superóxido dismutasa
SS	Side Scatter
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa

Resumen

México es un país con una importante actividad agrícola, que requiere el uso constante de plaguicidas. En el año 2004 se vendieron 492 147 kg de endosulfán, siendo este uno de los plaguicidas organoclorados de más consumo. Éste, es utilizado para controlar diversos insectos pero su uso inadecuado genera contaminación. El sistema inmune de la tilapia, es un bioindicador sensible a la acción de los químicos. Las características fisiológicas, la presencia de órganos linfoides y su abundancia en los cuerpos de agua del país, convierten a la tilapia en un excelente modelo experimental que permite conocer los cambios en la respuesta inmune de organismos expuestos a endosulfán.

En el presente trabajo se evalúa la actividad fagocítica de tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a 7µg/ L de endosulfán durante 96 h. Se extrajo y peso el bazo para obtener su índice somático, posteriormente se le disgrego utilizando malla Nitex 100 µm. La suspensión celular esplénica se separo por gradiente de densidad y se obtuvo un anillo de macrófagos, se realizó una tinción con rojo neutro para confirmar la población celular de macrófagos esplénicos. Se obtuvo el índice de fagocitosis y el porcentaje de fagocitos activos por medio del método de adherencia al vidrio de Cunningham, también se cuantificó la actividad fagocítica de macrófagos esplénicos por medio de citometría de flujo y los resultados obtenidos coinciden con lo observado por el método de Cunningham, los animales expuestos a 7µg/L de endosulfán presentaron un incremento en su actividad fagocítica comparada con el grupo control, con una $P = < 0.001$ de significancia. También se encontró que durante la fagocitosis de *Candida albicans*, se incrementó significativamente la cantidad de ROS generada en los organismos expuestos a endosulfán. Lo anterior sugiere que la exposición a 7 µg/L de endosulfán produce una sobreestimulación de la respuesta inmune innata, lo que puede llevar al organismo a desarrollar procesos patológicos.

Introducción

El uso de plaguicidas produce un beneficio sustancial en la producción agropecuaria al incrementar el rendimiento de las cosechas, eleva la calidad de los alimentos y controla vectores de enfermedades en animales y en el hombre. Frente a estos beneficios, nace la necesidad de analizar la interacción de los organismos con los ingredientes activos de los insecticidas más utilizados en la región de Jalisco, con la finalidad de estudiar aquellos que presentan riesgos para la salud humana. (Walter, J. 2000). Rivero, O. *et al.*, (2001) menciona que numerosos estudios han encontrado residuos de plaguicidas en alimentos y organismos, incluyendo humanos, lo que puede llevar a intoxicaciones o efectos que pueden presentarse a mediano o largo plazo, como carcinogénesis, teratogénesis y mutagénesis, entre otros.

Los ecosistemas acuáticos son unos de los más impactados por la contaminación de plaguicidas, lo que se produce en forma directa por la descarga de remanentes y residuos o de manera indirecta por lixiviación y escorrentía de suelos contaminados. Los plaguicidas afectan la salud y diversidad de las comunidades de hidrobiontes, alteran la calidad del agua de consumo y produce un impacto negativo en actividades productivas como son la pesca y la acuicultura (Smith, R. y Smith, T. 2001).

En México el cultivo de tilapia representa una importante actividad económica. En el período 2000 al 2004 generó una derrama económica de 78 millones de dólares. La tilapia (*Oreochromis niloticus*) por sus características fisiológicas, la presencia de órganos linfoides y su abundancia en los cuerpos de agua del país, la convierte en un excelente modelo experimental que permite evaluar la respuesta inmune frente a los plaguicidas. El endosulfán es un plaguicida organoclorado muy utilizado en Jalisco y cuyo uso ha sido restringido en varios países (Zaitseva, G. *et al.*, 2006).

El conocer los efectos del endosulfán sobre la inmunidad innata de tilapia puede servir como un indicador de su inmunotoxicidad sobre los organismos presentes en el ecosistema acuático así como del impacto potencial sobre la salud humana.

Antecedentes

Desde la antigüedad el hombre ha empleado diversas sustancias para controlar a las especies no deseadas. Los sumerios utilizaron azufre para combatir plagas agrícolas, los chinos en el año 3000 antes de nuestra era utilizaron compuestos derivados de las plantas como insecticidas. A principios del siglo XVII, productos como "Paris green", "Bordeaux mixture" y el arsénico fueron utilizados para combatir plagas de insectos y hongos (Smith y Smith., 2001). Uno de los primeros compuestos utilizados fue el diclorodifenilcloroetano (DDT) sintetizado por Zeldner en 1874. Se utilizó por primera vez durante la segunda Guerra Mundial para proteger a los soldados estadounidenses contra enfermedades transmitidas por vectores y se retiró del mercado por sus efectos carcinogénicos, inmunotóxicos y mutagénicos (Ramírez, J. y Lacasaña, M. 2001).

De acuerdo a su estructura química los plaguicidas se clasifican en:

- Organofosforados: son un amplio grupo de ésteres de ácido fosfórico. Eliminan a las plagas al inhibir la acción de la acetilcolinesterasa. Los organofosforados más utilizados son: malatión (Maltox, Carbofos), paratión (Thiophos, Folidol). (Raheja, G. y Gill, K. 2007).
- Carbamatos: son derivados del ácido carbámico. Su mecanismo de acción plaguicida consiste en inhibir de forma reversible la acción de las colinesterasas. Los carbamatos más utilizados son: propoxur (Baygón, Uden), carbofurán (Furadán) (Cárdenas, O. y Morales, S. 2005).
- Piretroides: son insecticidas sintéticos similares a las piretrinas naturales, ligeramente tóxicos para los mamíferos. Algunos piretroides son: permetrina (Piretox), Deltametrina (Decis, K-Otrine) (Ramírez, J. y Lacasaña, M. 2001).
- Organoclorados: son moléculas orgánicas cloradas con alto peso molecular de estructura cíclica. Su mecanismo de acción plaguicida consiste en inhibir receptores de canales de Cl. Algunos organoclorados son: DDT (Clorofenotano), toxafeno (Toxakil), endosulfán (Thiodan) (Klaassen, C. y Slitt, A. 2005).

México es un país con una importante actividad agrícola, que requiere el uso constante de plaguicidas. En el año 2004 se vendieron 492 147 kg de endosulfán, siendo el plaguicida organoclorado más vendido. Su consumo masivo y desconocimiento del grado de peligrosidad han generado problemas de contaminación ambiental y de salud pública (INEGI, 2004).

El endosulfán

El endosulfán ($C_9H_6Cl_6O_3S$) (figura 1) es un insecticida organoclorado del grupo de los ciclodienos. Se aplica en cultivos de café, té, cereales, algodón, oleaginosas, hortalizas, cítricos, plantas ornamentales y tabaco para el control de diferentes insectos como: áfidos, escarabajos, gorgojos, mosca tsetse, saltahojas, pulgas, perforadores, ácaros. El producto comercial es mezcla de dos isómeros, alfa y beta, en relación aproximada 70:30 (Yuquan, L. *et al.*, 2000).

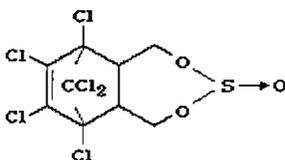


Figura 1.- Formula química del endosulfán (Ledirac, *et al.*, 2005)

Su propiedad insecticida fue descrita por Finkenbrink en 1956 y se comercializó a partir de 1960. La síntesis industrial y el uso de organoclorados genera subproductos persistentes en el medio ambiente, por ser altamente liposolubles sufren procesos de biomagnificación a través de las cadenas tróficas. Hay un creciente movimiento internacional para eliminar la producción y uso de estos compuestos. En particular los fabricantes de endosulfán sostienen que al ser un éster del ácido sulfuroso difiere de otros insecticidas organoclorados ciclodienos y que puede ser considerado por separado y no tan dañino, esto lo mantiene de forma indefinida en el mercado, sin embargo los síntomas agudos que produce en animales de laboratorio y en humanos no se distinguen de los causados por otros compuestos organoclorados-ciclodienos como el DDT, toxafeno y el hexaclorobenceno (Hayes, W. y Laws, E. 1991). Por sus efectos adversos al ambiente y a la salud de los organismos, el endosulfán se encuentra severamente restringido en Argentina, Brasil, Canadá, Dinamarca, Finlandia, Gran Bretaña, Holanda, Venezuela (Nivia, 1993).

La contaminación con un insecticida como el endosulfán se produce cuando alcanza lugares sobre los que no ha sido aplicado directamente. Para conocer el nivel de deterioro ambiental se utilizan biomarcadores que nos permiten conocer la calidad del ecosistema y los efectos del contaminante. Los biomarcadores son cambios cuantificables en componentes celulares y bioquímicos de un proceso, estructura o función en un sistema biológico que estuvo en contacto con el xenobiótico. Dichos cambios se manifiestan como lesiones histológicas, trastornos en la regulación hormonal, metabólica, osmorregulación y en alteraciones sobre la respuesta inmune (Ryan, B. *et al.*, 2007)

El endosulfán se absorbe por ingestión, inhalación y contacto con la piel. Una vez que llega al torrente sanguíneo se distribuye y alcanza su sitio de acción plaguicida, el sistema nervioso, impidiendo la movilidad del insecto. La biotransformación se lleva a cabo en el hígado donde se metaboliza. Sus principales metabolitos se observan en la figura 2 y son: endosulfán sulfato, endosulfán diol, endosulfán lactona y endosulfán hidroxietter. Por ser altamente insoluble en agua, los metabolitos endosulfán lactona y sulfato se acumulan en los tejidos grasos del organismo. Los metabolitos restantes endosulfán diol e hidroxietter se eliminan a través de la bilis, heces, orina y leche materna (Arrebola, F. *et al.*, 2001).

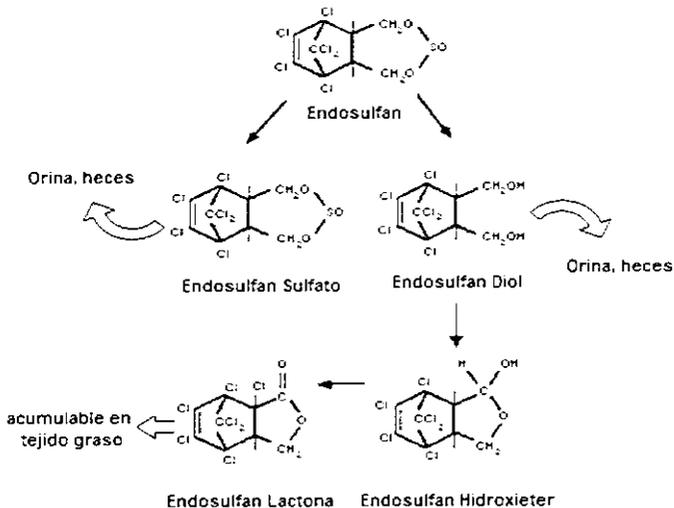


Figura 2.- Principales metabólicos del endosulfán (Stahuljak, B. y Valic, F. *et al.*, 1984)

El principal mecanismo plaguicida de toxicidad del endosulfán se ejerce en el sistema nervioso, actúa como antagonista del receptor del ácido γ -aminobutírico ($GABA_A$), asociado al canal iónico de cloro, lo que disminuye la captación de iones cloruro ocasionando repolarización parcial de la neurona y un estado de excitación incontrolable. Las personas intoxicadas presentan cefalea, náuseas, mareo, contracciones crónicas leves y algunos enfermos han mostrado convulsiones y signos prodrómicos (Ligong, C. *et al.*, 2006). Estudios recientes muestran que el endosulfán es citotóxico. En la línea celular HaCaT de queratinocitos humanos el endosulfán altera la actividad de la MAP quinasa dependiente de ROS, disminuyendo el crecimiento y afectando la diferenciación celular (Antherieu, S. *et al.*, 2007).

La ATSDR (Agency for toxic substances and disease registry) ha propuesto al sistema inmune como el biomarcador más sensible a la acción de los químicos. El sistema inmune es el compendio de células especializadas, tejido y órganos que le dan al organismo la habilidad de reconocer lo propio y defenderlo de lo extraño. La interacción de los xenobióticos con el sistema inmune puede ocasionar un cambio en el tamaño de los órganos linfoides, una supresión de la respuesta inmune dejando al organismo expuesto a los patógenos o un incremento de la respuesta ocasionando autoinmunidad o hipersensibilidad (Walter, J. 2000; Abadin, H. *et al.*, 2007).

El endosulfán y la respuesta inmune

Para entender de qué forma afecta el endosulfán al sistema inmune se han hecho estudios en diferentes grupos de vertebrados en su mayoría órganos y células de mamíferos por ejemplo:

Pistl, J. *et al.*, (2001) probaron que el endosulfán a una dosis de 10^{-4} M, equivalente a $40\mu\text{g/L}$ es altamente inmunotóxico y genotóxico al inhibir la linfoproliferación de células de ovejas y aumentar el número de micronúcleos.

Singh, N. y Sharma, A. (2007) administraron 1 mg/kg endosulfán en el alimento de ratas Wistar durante 15 días, se reportó una disminución del peso y aumento en la apoptosis de los órganos linfoides.

Han, E. *et al.*, (2007) en un estudio *in vitro* con macrófagos de ratón incubados con endosulfán a las concentraciones de 0.5, 1, 5 y 10 μ M por 24 h, reportaron la sobrestimulación del factor de transcripción NF- κ B, la cual indujo un aumento en la secreción de iNOS y de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α .

Ayub, M. y Thale, A. (2003) reportaron una reducción significativa de TNF- α en macrófagos peritoneales de ratón expuestos a 10 y 20 mg/ml de endosulfán por 24 h, sin observar efecto significativo en la síntesis de óxido nítrico ni en la lipoperoxidación lipídica.

También encontramos diversos estudios en organismos acuáticos expuestos a endosulfán, por ejemplo la investigación de Christin, M. *et al.*, (2003), quienes expusieron a dos especies de ranas (*Xenopus laevis* y *Rana pipiens*) a un coctel de plaguicidas (atrazina, metribuzina, endosulfán, landano, aldicar y dieldrin) durante 7 días, reportando la alteración de la respuesta inmune, y una reducción de células inmunes.

Altinok, I. *et al.*, (2007) analizaron los daños histológicos en los órganos de truchas (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas a .6 y 1.3 micro g/L de endosulfán por 21 días, observando lesiones en hígado, bazo, branquias y riñón anterior.

Harford, A. *et al.*, (2005) reportaron en un estudio *in vitro* en 4 especies de peces dulceacuícolas (*Melanotaenia fluviatilis*, *Bidyanus bidyanush*, *Macquaria ambigua* y *Maccullochella peelii*), que los peces de peso corporal 150-200g expuestos a 10 mg/L de endosulfán durante 18, 20, 22 y 48 h presentaron un incremento en la fagocitosis y en los peces de bajo peso corporal (5-10g) se observó un efecto inmunotóxico.

Investigaciones de exposiciones a plaguicidas no organoclorados como la realizada por Pruett, S. *et al.*, (2003) que administró durante 14 días 100, 200 o 300 mg/Kg de atrazina a ratones, observó una reducción en el tamaño del bazo y timo. Woo Cha *et al.*, (2000) administró intraperitonealmente 100 y 400 mg/Kg de carbamato etil por 7 días, reportando daños histológicos y atrofia del bazo y timo, además de suprimir su sistema inmune.

Los peces teleósteos, como tilapia (figura 3) presentan una respuesta inmune bien desarrollada e integrada, se encuentran similitudes funcionales en la respuesta observada con los vertebrados superiores. Son los primeros que presentan inmunoglobulinas, moléculas del complejo de histocompatibilidad, sistema del complemento y proteína C reactiva (Olabuena, S. 2000)

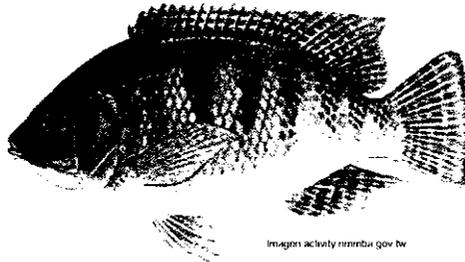


Figura 3.- Tilapia *Oreochromis niloticus*

Generalidades de Tilapia

La tilapia es un pez teleósteo del orden perciforme, perteneciente a la familia *Cichlidae*, originario de África, habita en la mayor parte de las regiones tropicales del mundo donde las condiciones son favorables para su reproducción y crecimiento. Se encuentra ampliamente distribuida por el sudeste asiático, América Central, el Caribe y el sur de Norteamérica. Habita aguas cálidas y su óptimo desarrollo se logra en temperaturas de los 22°C a los 28 °C. Los adultos pueden ser reproductivos por 2 o 3 años con una alta tasa de reproducción (Dominguez, M. *et al.*, 2004). Las tilapias comprenden dos géneros diferenciados por el tipo de reproducción: por incubación externa o interna (en la boca) de los huevos fecundados. El primer género conserva el nombre genérico de tilapia y al segundo se le asigna el nombre de *Oreochromis*. Dentro del genero *Oreochromis* existe varias especies y variedades híbridas, *Oreochromis niloticus* es la especie de tilapia mas distribuida en las presas de Jalisco. En los trabajos previos de nuestro laboratorio esta especie resultó ser una de las especies de tilapia que desarrollo una respuesta inmune más eficiente y una de las mas resistentes frente de un reto bacteriano con *Aeromona Hidrófila* (Casas,2006).

La tilapia ha representado una fuente de alimento fresco y congelado de alta calidad y alto valor nutricional. En México el consumo de este pez va en aumento, siendo en el año 2006 de 66 mil toneladas. Además se caracteriza por su resistencia física y adaptación a medios ambientes adversos como lo pueden ser aguas con bajas concentraciones de oxígeno disuelto e intervalos amplios de salinidad. Presenta una elevada productividad y alto rendimiento alimenticio, lo anterior convierte a esta especie en una de las más rentables para la acuicultura. En el año 2002 se produjeron 68,729 toneladas en nuestro país (Sagarpa, 2002).

Además de su importancia económica *Oreochromis niloticus* es un excelente modelo de laboratorio por sus características fisiológicas que permiten su fácil manejo en laboratorios húmedos, la representatividad dentro del estado y lo desarrollado de su respuesta inmune. Esto la hace apta para estudios de toxicidad y monitoreo de ecosistemas acuáticos como un buen modelo en investigación inmunotoxicológica (Ayub, M. y Thale, A. 2003; Zaitseva, G. *et al.*, 2006).

El sistema inmune de los peces teleósteos

El sistema inmune de los peces teleósteos a diferencia de los mamíferos, carece de ganglios linfáticos y de médula ósea, sin embargo los mecanismos básicos de la respuesta inmune en peces y mamíferos es muy similar (Olabuena, S. 2000). El sistema inmune de peces está constituido por los órganos linfoides como timo, riñón anterior y bazo (figura 4).

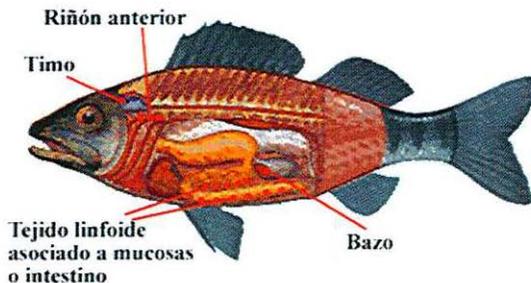


Figura 4.- Órganos linfoides de *Oreochromis niloticus* (Fernández, A. *et al*; 2002)

Timo es un órgano par, bilateral, situado debajo del epitelio faríngeo, dorso lateral y alojado en la parte superior interna de las cámaras branquiales. Aquí los linfocitos T maduran y alcanzan un estado funcional para después migrar a donde sean necesarios. Igual que en los mamíferos, se observa su involución en organismos de mayor edad (Magnadóttir, B. 2006).

Riñón anterior cefálico o pronefros es un sitio de origen y diferenciación de eritrocitos, granulocitos, linfocitos B y monocitos. Siendo un análogo de la médula ósea, de los ganglios y en parte de la glándula adrenal de los vertebrados superiores, es un órgano de filtración que contienen macrófagos que fagocitan los diferentes antígenos (Tizard, I. 2002).

Bazo, órgano en el que se produce la respuesta inmune frente a los antígenos transportados en la sangre, por lo que podemos encontrar macrófagos y linfocitos T y B. Ahí los macrófagos realizan una elevada actividad fagocítica y fungen como células presentadoras de antígeno como los linfocitos B, los cuales sintetizan una cantidad considerable de anticuerpos tipo Ig M (Vorgelegt, 2003). El **tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal** es el equivalente de placas de Peyer en los mamíferos, funciona como sitio de reconocimiento antigénico y proliferación linfocitaria.

La inmunidad en peces, al igual que en todos los vertebrados, esta presentada por la respuesta inmune innata y adaptativa. La respuesta inmune innata es el mecanismo de defensa filogenéticamente más antiguo, presente en todos los organismos multicelulares con regiones genéticas conservadas a través de la línea evolutiva, constituye la primera línea de defensa frente a los patógenos y en peces es su principal mecanismo de protección, dado que la respuesta inmune adaptativa (la cual potencia las funciones antimicrobianas de la inmunidad innata y proporciona una memoria del encuentro antigénico como una especialización de los mecanismos efectores; mediada por los linfocitos T y B) es más lenta que en los mamíferos. (Bols, N. *et al.*, 2001; Fernández, A. *et al.*, 2002).

El sistema inmune innato del pez consta de barreras epiteliales y de células y proteínas circulantes, que reconocen microorganismos o sustancias producidas en las infecciones e inician respuestas que eliminan a los patógenos. En los peces el mucus es una secreción presente en la piel, evita que los microorganismos se establezcan al estar en constante recambio. Está compuesto por mucinas,

precipitinas inespecíficas, aglutininas, proteína C-reactiva y lisozimas, las cuales actúan como antimicrobianos. Internamente el mucus tapiza las paredes del tracto alimentario, que junto con pH extremos y enzimas proteolíticas, sirven de defensa contra los patógenos (Ellis, A. 2001).

En el suero sanguíneo los peces cuentan con unas proteínas que aglutinan patógenos y presentan especificidad por pequeñas moléculas orgánicas, como la fosforilcolina que interaccionan con el complemento y con los receptores Fc de los linfocitos. Son llamadas proteínas de fase aguda y a diferencia de los mamíferos, donde aparecen por un breve período durante picos febriles o aumentan su concentración durante este periodo, en los peces estas proteínas son constituyentes normales del suero. Su concentración puede estar aumentada después de una infección bacteriana o estrés.

Las proteínas de fase aguda descritas en peces son:

- proteína C reactiva, opsoniza microorganismos y activa al complemento;
- transferrina, glicoproteína globular que presenta propiedades antimicrobianas, limita la cantidad de hierro endógeno disponible para los patógenos;
- a-antiproteasa, proteína análoga de la $\alpha 2$ -macroglobulina de los mamíferos, la cual neutraliza la actividad proteolítica de exotoxinas y estabiliza los lisosomas de macrófagos.

Otras proteínas relacionadas con la respuesta inmune en los peces teleósteos son:

- lisozima, encargada de degradar los mucopolisacáridos de la pared celular de bacterias, principalmente de Gram positivas;
- quitinasa, enzima que se desdobra en quitina, con alta actividad en el bazo, el plasma y los tejidos linfoides, tiene una función protectora contra la quitina de hongos y parásitos invertebrados;
- sistema del complemento, el cual participa en la destrucción y opsonización de microorganismos así como en la activación de fagocitos.

- citoquinas, median y regulan las reacciones inmunes e inflamatorias. Se han reportado las IL-1, IL-2, IL-3 y IL-6; el interferon (IFN) que se asemeja al tipo I de los vertebrados superiores y también se ha encontrado al tipo II. Se han descrito los genes del factor de transformación del crecimiento beta (TGR- β), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), de la eritropoyetina (EPO), del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y del factor de activación de los macrófagos (MAF) (Olabuenaga, S. 2000).

Las principales células efectoras de la inmunidad innata son los granulocitos, fagocitos mononucleares y células NCC (células citotóxicas no específicas). Estas células atacan a los microorganismos que han roto la barrera epitelial y penetran a los tejidos o a la circulación. La célula granulocítica más importante en peces son los neutrófilos constituyendo el 18% de los leucocitos en sangre periférica, también se presentan eosinófilos y basófilos en sangre, peritoneo y tejidos (Hrubec, 2000). Otras células importantes que participan en la inmunidad innata son las NCC que juegan un rol similar a las NK de los vertebrados superiores. Y ejercen una citotoxicidad inespecífica a células blanco sin reconocimiento previo, se encuentran en el riñón anterior, bazo, sangre periférica y timo (Evans, D. *et al.*, 2001). Los macrófagos son células derivadas de los monocitos presentes en tejidos y en las cavidades peritoneal y pericárdica, son abundantes en el bazo, tejido linfomieloide renal y branquias, estimulan la inflamación al secretar citoquinas y participan en la fagocitosis de microorganismos (Olabuenaga, S. 2000).

La fagocitosis es mediada principalmente por neutrófilos y macrófagos, consiste en un mecanismo en el cual se interiorizan patógenos para su posterior destrucción y excreción, se considera como un parámetro inmunológico a evaluar para predecir los efectos de los contaminantes sobre la salud de los organismos. Chan, C. *et al.*, en el 2005 expusieron al langostino *Macrobrachium rosenbergii* durante 48 y 96 h a una concentración de 0.2 y 0.4 mg/L de trichlorfon, pesticida organofosforado, reportando una disminución del estallido respiratorio y al ser expuestos por 168 h se observó una depresión de la respuesta inmune que ocasionó que los langostinos fueran susceptibles a ser infectados por *L. garvieae*. Bilrha *et al.*, en el 2004 trataron a cerdos lactantes de 8 meses con 1, 10 y 100 μ g de un coctel de organoclorados que incluía toxafeno, clordano, aldrín, dieldrín y DDT. Las células polimorfonucleares del grupo, que ingirió 100 μ g del coctel, presentaron mayor capacidad de fagocitar *E. coli*.

En peces, los sitios con mayor actividad fagocítica son el riñón y el bazo. Las células fagocíticas utilizan receptores presentes en su membrana para reconocer un patrón molecular común y constante de la superficie de los microorganismos denominado patrón molecular asociado a patógenos (PAMPs) (Moreno, C. *et al.*, 2003; Purcell, K. *et al.*, 2006).

Una vez que el fagocito está unido al microorganismo por medio de sus receptores, extiende proyecciones membranas hasta que engloba al patógeno en una vesícula llamada *fagosoma*. Para poder digerir a los microorganismos la célula competente genera una serie de cambios bioquímicos dependientes e independientes de oxígeno. Los mecanismos dependientes de oxígeno son intermediarios reactivos de oxígeno (IRO o ROS de abreviación en inglés) e intermediarios reactivos de nitrógeno (INR). Los mecanismos independientes de oxígeno son: péptidos cationicos, catepsina G, lisozima y lactoferrina (Sánchez, M. 2004). Al activarse los PAMPs, se estimula la acción de la enzima iNOS, la cual cataliza la conversión de arginina en citrulina y libera INR dentro de los fagolisosomas, que al unirse con los IRO se generan radicales de peroxinitrito muy reactivos, que pueden destruir microorganismos (Walsh, C. *et al.*, 2006). Los IRO son sustancias oxidantes generadas por la enzima oxidasa NADPH que se ensambla en la membrana fagolisosómica de los fagocitos activados (figura 5).

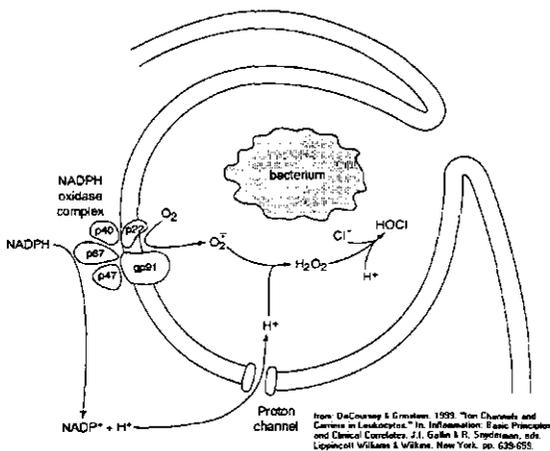


Figura 5.- Membrana de fagocito activado que presenta el ensamblaje de la enzima NADPH

El principal IRO generado es el superóxido el cual se transforma enzimáticamente en peróxido de hidrógeno, que utiliza la enzima mieloperoxidasa para convertir los iones haluro en ácidos hipohalosos reactivos, que son tóxicos para las bacterias. El proceso por el cual se producen los IRO se denomina "estallido respiratorio": Si se presenta alguna deficiencia en este metabolismo oxidativo, la capacidad bactericida se reduce notablemente conduciendo al organismo a la muerte (Murray, R. *et al.*, 2001; Rojas-Espinosa, O. *et al.*, 2004; Abbas *et al.*, 2001). La generación de ROS e iNOS son resultado de los procesos fisiológicos normales del organismo, pero algunas sustancias como los xenobióticos pueden generar una sobrestimulación de producción de estas moléculas de tal manera, que los mecanismos antioxidantes del organismos no sean suficientes y se produzca un estrés oxidativo que daña membrana, organelos y material genético de la célula.

Por las evidencias mostradas, nuestro equipo de trabajo se propuso evaluar en *O. niloticus* el efecto del endosulfán sobre la actividad fagocítica.

Planteamiento del problema

El endosulfán es un insecticida organoclorado ampliamente utilizado en México, estudios han demostrado su efecto tóxico e inmunosupresor en diferentes organismos acuáticos y mamíferos.

El pez teleosteo más cultivado en el país y presente en la mayoría de los cuerpos de agua de Jalisco es tilapia (*Oreochromis niloticus*), afectado en su hábitat por la presencia de plaguicidas incluyendo el endosulfán. No existen estudios que muestren el efecto del endosulfán sobre la respuesta inmune innata en *O. niloticus*

Por lo anterior, proponemos evaluar en este pez dulceacuícola la actividad fagocítica bajo una exposición aguda *in vivo* a plaguicida endosulfán.

Hipótesis

La exposición aguda de tilapia *Oreochromis niloticus* a dosis subletal de endosulfán disminuye el peso relativo del bazo, incrementa la actividad fagocítica y la producción de ROS en macrófagos esplénicos.

Objetivo General

Evaluar la actividad fagocítica en tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a endosulfán

Objetivos Particulares

1. Determinar el índice somático del bazo, en tilapia (*O. niloticus*) expuesta a endosulfán,
2. Evaluar la actividad fagocítica en macrófagos esplénicos de tilapia expuesta a endosulfán
 - Porcentaje de fagocitos activos por adherencia al vidrio de Cunningham,
 - Índice de fagocitosis por adherencia al vidrio de Cunningham,
 - Porcentaje de macrófagos esplénicos FITC+ por medio de citometría de flujo,
 - Intensidad media de fluorescencia por medio de citometría de flujo.
3. Cuantificar la producción de ROS en macrófagos esplénicos de tilapia expuesta a endosulfán por reducción de nitro-azul de tetrazolio (NBT).

Diseño Metodológico

➤ Tipo de Estudio:

experimental

➤ Universo de Estudio

tilapias juveniles machos (*Oreochromis niloticus*) con peso (~200g), de talla homogéneos (~25 cm) n=20

➤ Variable Independiente

dosis de endosulfán de 7 μ g/L

➤ Variables Dependientes:

❖ Índice somático del bazo

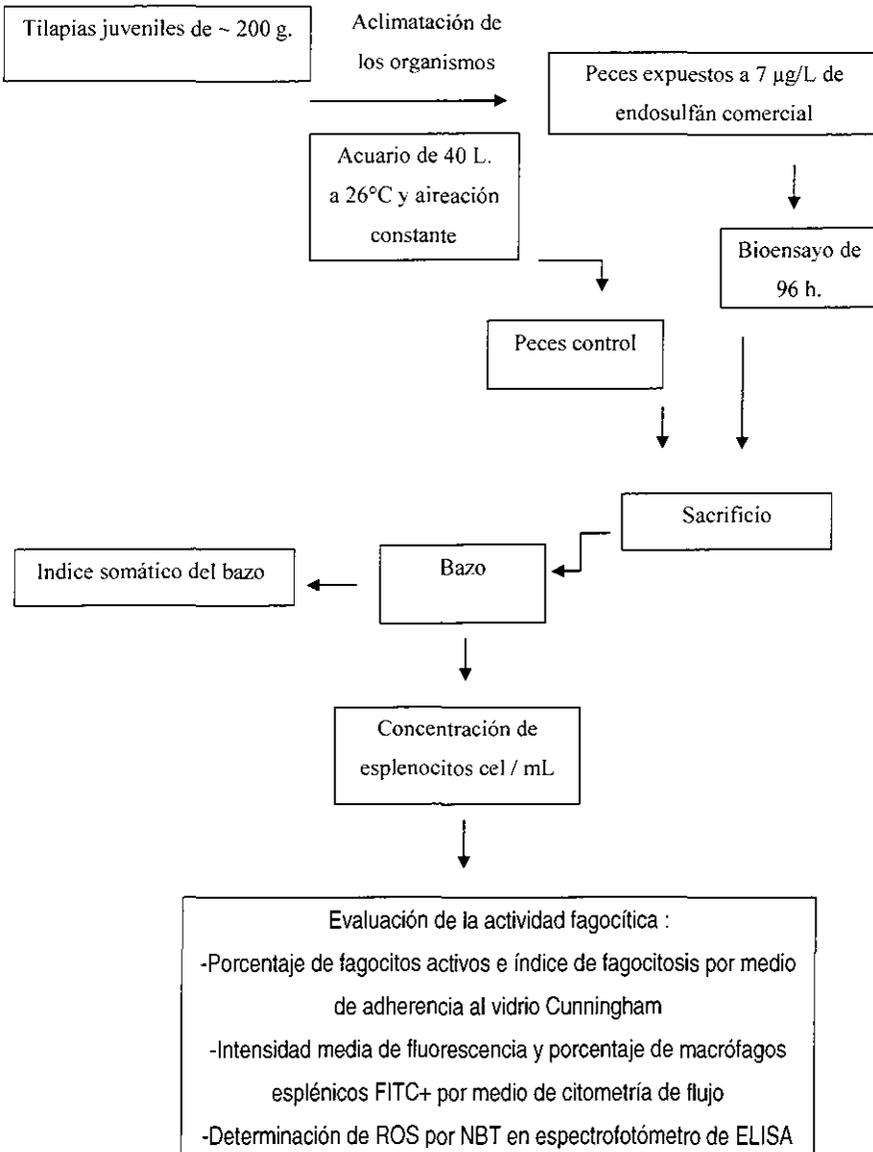
❖ Actividad fagocítica:

- Porcentaje de fagocitos activos
- Índice de fagocitosis
- Porcentaje de macrófagos esplénicos FITC+
- Índice de intensidad media de fluorescencia

❖ Producción de ROS:

- niveles de O₂⁻ por reducción de nitro-azul de tetrazolio (NBT)

Diseño Experimental



Materiales y Métodos

Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Nuestro modelo animal fue tilapia (*O. niloticus*) de peso y talla homogéneo (~200 g). Se aclimataron en el laboratorio húmedo por un periodo de dos semanas en peceras de 40 L de agua, con recambios diarios de un 30% a una temperatura de 26 °C con aeración constante. Después del periodo de aclimatación se les expuso a la dosis subletal (concentración por debajo de la CL₅₀ que produce la mínima mortalidad) que fue de 7µg/L de endosulfán comercial (Bayer)

Índice somático del bazo

Se extrajo y peso el bazo de los peces control y expuestos a endosulfán con previa anestesia de peces con aceite de clavo. Para obtener el índice somático del bazo se utilizó la siguiente fórmula (Vorgelet, 2003):

$$SSI = (\text{peso del bazo} / \text{peso pez} - \text{peso bazo}) * 100$$

Se realizó una prueba de viabilidad celular por el método de exclusión del colorante azul de tripano al 0.4%, con conteo celular en cámara de Neubauer.

Determinación de ROS por reducción de nitro-azul de tetrazolio (NBT)

La liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por células fagocitarias de tilapia expuesta a endosulfán se evaluó por medio de la técnica de reducción de NBT (nitro azul de tetrazolio) descrita por Rook *et al.*, en 1985 y modificada por Fatima, M. y Ahmad, I. en 2000.

Se disgregó el bazo de peces control y expuestos utilizando malla Nitex de microfilamentos de 100 µm. La suspensión celular se colocó en Histopaque densidad: 1.077 g/mL (Sigma Aldrich C.), para ser separada por gradiente de densidad y obtener un anillo de mononucleares de bazo, el cual fue lavado dos veces con PBS y resuspendido en 1 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 5% suero fetal bovino (SFB). También se obtuvo la sangre de peces expuestos y del grupo control por punción cardíaca. La sangre se colocó en tubos Eppendorf los cuales tenían

del anticoagulante heparina, se centrifugó a 2500 rpm por 20 min., el plasma obtenido se aspiró con pipeta Pasteur y coloco en un tubo Eppendorf para opsonizar durante 20 min. a *Candida albicans*. En tubos Eppendorf se colocaron 10×10^6 de *Candida albicans* opsonizadas por cada 1×10^6 de esplenocitos mas 500 μL de PBS conteniendo 0.1% de NBT (Sigma). Las preparaciones se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 2 h, agitándose periódicamente. Posteriormente las preparaciones celulares fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min. Se lavaron con 500 μL de metanol al 70% e incubadas a 60°C de calor seco durante 15 min. Se agregaron 500 μL de DMSO para después centrifugarse a 4500 rpm durante 5 min. Se tomaron 200 μL de cada muestra y se colocaron en una placa de ELISA de 96 pozos para su lectura por duplicado en un espectrofotómetro a 630 nm.

Adherencia al vidrio por el método de Cunningham

Para determinar el índice de fagocitosis de los esplenocitos de peces expuestos a endosulfán y del grupo control se disgrego el bazo en una caja de Petri utilizando malla Nitex 100 μm . La suspensión celular fue separada por gradiente de densidad con Histopaque 1077. Por último se realizo una tinción con rojo neutro para asegurar que la población celular obtenida fuera de macrófagos. La concentración celular (1×10^6) se coloco en cubreobjetos para dejarlas incubando durante 20 minutos a 26°C . Una vez pasado este tiempo, se lava el cubreobjetos con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) y se cubren con una suspensión de 1×10^7 de Zymosan. Se incubaron durante 15 minutos y al término del tiempo se lavaron los cubreobjetos con medios de cultivo RPMI 1640. Una vez que el cubreobjetos se secó, se tiñó con colorante Write.

Actividad Fagocítica por análisis de citometría de flujo

Se determinó el efecto del endosulfán *in vivo* sobre la actividad fagocítica de macrófagos esplénicos utilizando el procedimiento descrito por Harford *et al.*, (2005). De los peces control y expuestos a la dosis subletal de endosulfán se obtuvo el bazo, el cual fue disgregado para obtener la suspensión celular de macrófagos esplénicos como fue descrito anteriormente. Los macrófagos esplénicos obtenidos se ajustaron a 1×10^6 células/mL, y se realizó una tinción con rojo neutro para asegurar que la población celular obtenida fuera de macrófagos. Se incubaron con $1 \mu\text{m}$ de perlas fluorescentes de látex (FITC Polysciences Inc).

Aquellas células que fagocitaron las perlas con FITC tienen una emisión de fluorescencia a 520nm, mientras que las perlas no fagocitadas se excluyeron del análisis por el uso de "gating en vivo".

En el citómetro de flujo se colectaron 30,000 y 60,000 eventos para peces del grupo control y expuestos respectivamente, donde se permitió ubicar a las distintas poblaciones celulares como macrófagos, linfocitos y detritus, mismas que se separaron por su tamaño y granularidad (FS y SS). Además, se proporcionaron datos como el porcentaje de células FITC+ (macrófagos comprometidos en la fagocitosis) y la intensidad de fluorescencia media por célula FITC+ (el número de perlas ingeridas por macrófago). La viabilidad de las células se monitoreó a través de cambios en la estructura de la célula (región de detritus) por la exclusión de fluorescencia y tinción con yoduro de propidio (Sigma) añadido a la muestra 1 minuto antes del análisis de la muestra en el citómetro.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se procesaron en el programa estadístico SigmaStat, los gráficos fueron trabajados en SigmaPlot 2001. La comparación entre grupos se realizó con la prueba t de Student.

RESULTADOS

Cuantificación del índice somático del bazo

Al término de la exposición aguda a $7\mu\text{g/L}$ de endosulfán, se procedió a sacrificar a las tilapias y una vez extraído el bazo se pesó. El análisis estadístico como se observa en la figura 6, no mostró diferencias significativas en comparación con nuestro grupo control.

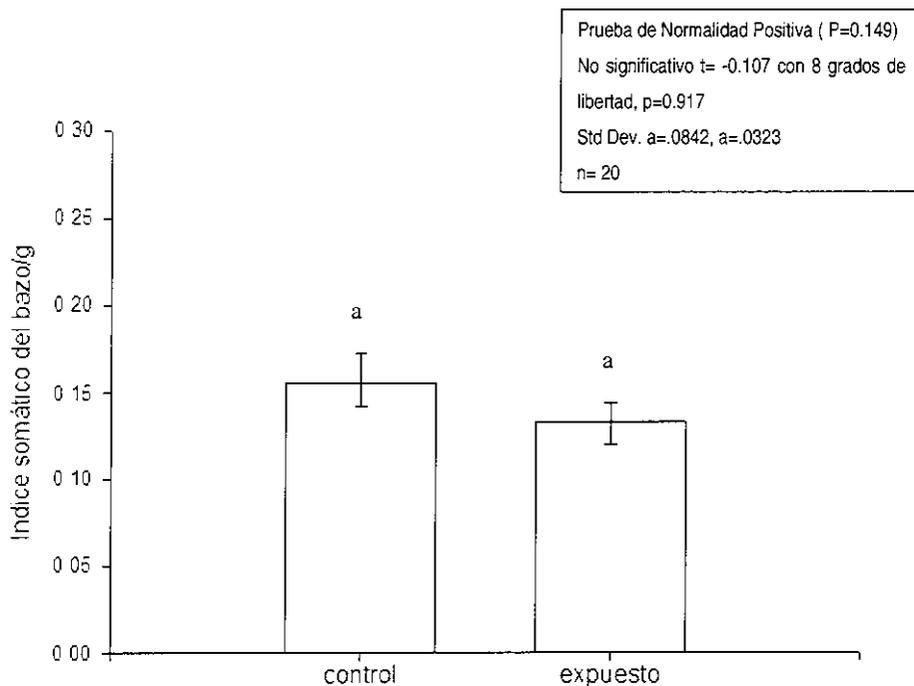


Figura 6.- Efecto del endosulfán sobre el índice somático del bazo.

Determinación de actividad fagocítica por el método de adherencia al vidrio de Cunningham

Índice de Fagocitosis

El índice de fagocitosis en peces expuestos a $7\mu\text{g/L}$ de endosulfán por 96 h mostró diferencia significativa ($p < 0.001$) con el índice de fagocitosis en tilapias control como se observa en la figura 7.

Los datos fueron procesados por medio de t - student.

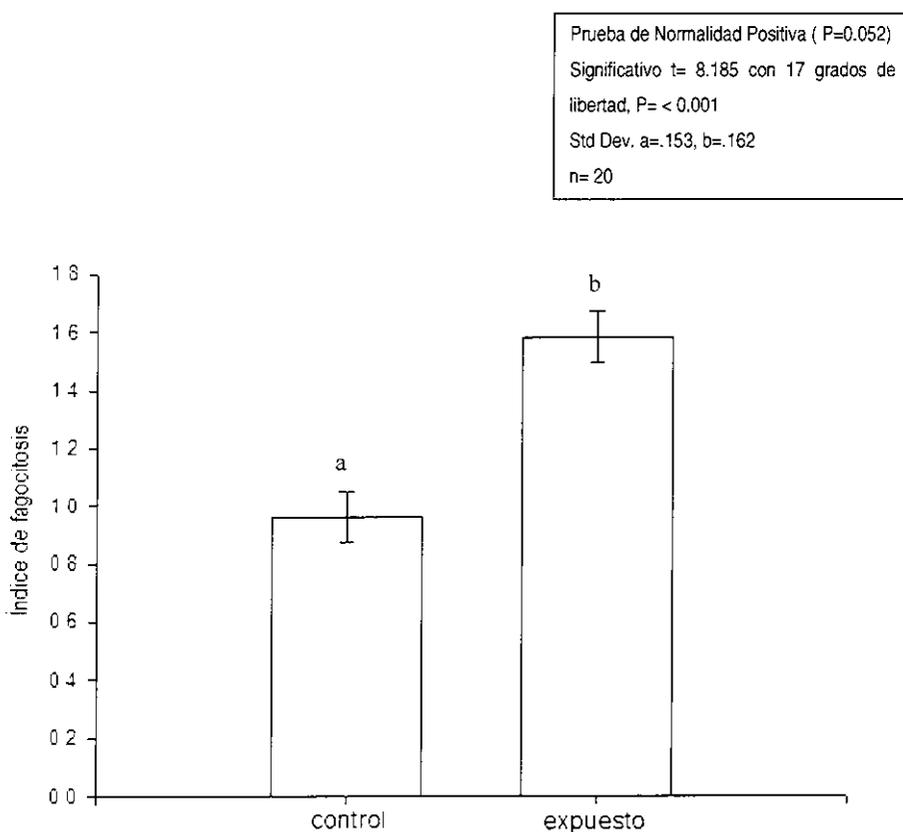


Figura 7.- Índice de fagocitosis de macrófagos esplénicos.

Porcentaje de fagocitos activos

El porcentaje de fagocitos activos en peces expuestos a 7µg/L de endosulfán por 96 h fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en comparación con el porcentaje de fagocitos en tilapias control como se observa en la figura 8. Los datos fueron procesados por medio de t - student ($n=20$).

Prueba de Normalidad Positiva ($P=0.313$)
Significativo t= 6.871 con 17 grados de libertad, $P= < 0.001$
Std Dev. a=.153, b=.162
n= 20

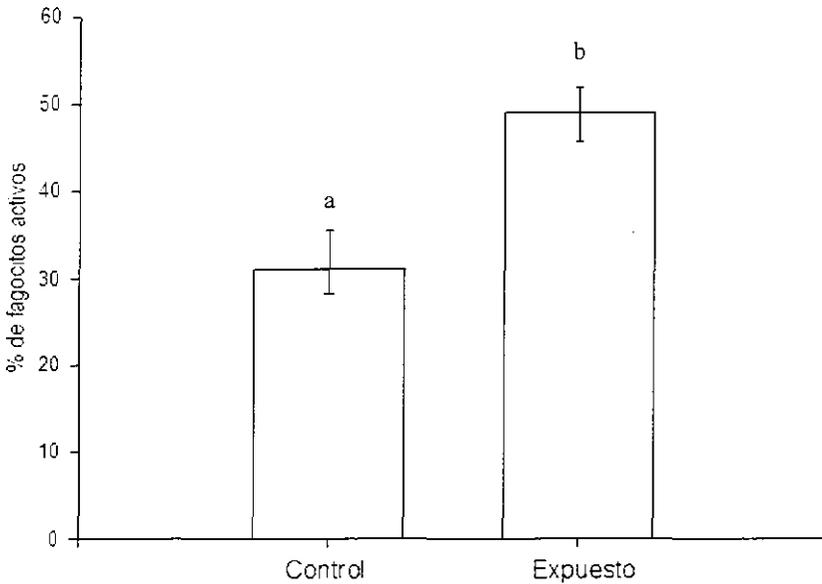


Figura 8.- Porcentaje de macrófagos esplénicos activos.

Análisis de porcentaje de macrófagos esplénicos FITC + por citometría de flujo

Los macrófagos esplénicos se incubaron con $1\mu\text{m}$ de perlas fluorescentes de látex (FITC Polysciences Inc). Aquellas células que fagocitaron las perlas con FITC tienen una emisión de fluorescencia a 520nm . El porcentaje de macrófagos esplénicos FITC + en peces expuestos a $7\mu\text{g/L}$ de endosulfán por 96 h mostró diferencias significativas ($p < 0.001$) en comparación con el grupo control. Los datos fueron procesados por medio de t - student y se presentan en la figura 9.

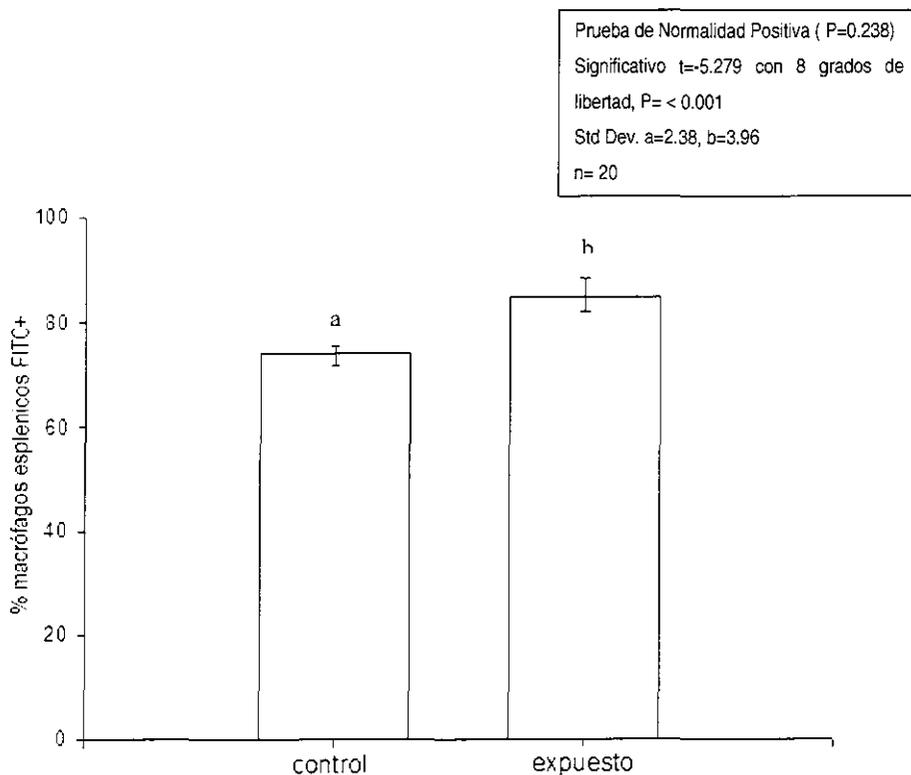


Figura 9-. Porcentaje de macrófagos esplénicos FITC +.

Análisis de intensidad media de fluorescencia por citometría de flujo

La intensidad media de fluorescencia en peces expuestos a $7\mu\text{g/L}$ de endosulfán por 96 h mostró diferencias significativas ($p < 0.002$), en comparación con la intensidad media de fluorescencia en peces del grupo control. Los datos fueron procesados por medio de t - student y se presentan en la figura 10.

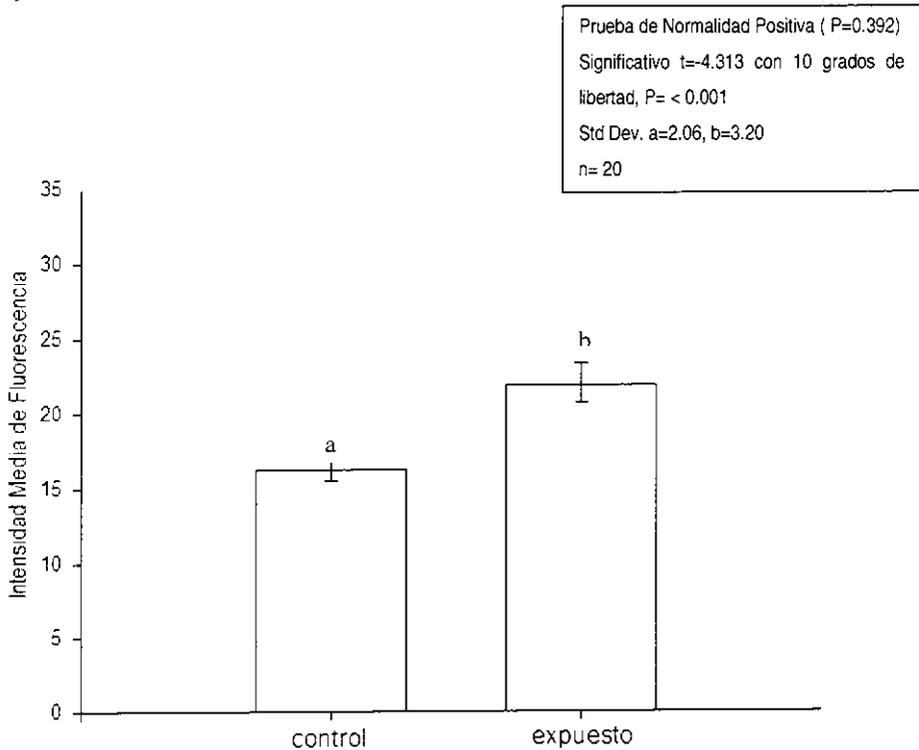


Figura 10.- Índice medio de fluorescencia.

Determinación de ROS por reducción de nitro-azul de tetrazolio (NBT)

La generación de ROS se incrementa significativamente ($P = < 0.002$) en esplenocitos de peces expuestos a $7\mu\text{g/L}$ de endosulfán por 96 h comparado con los esplenocitos de los peces control ver figura 11. Los datos fueron procesados por medio de t - student.

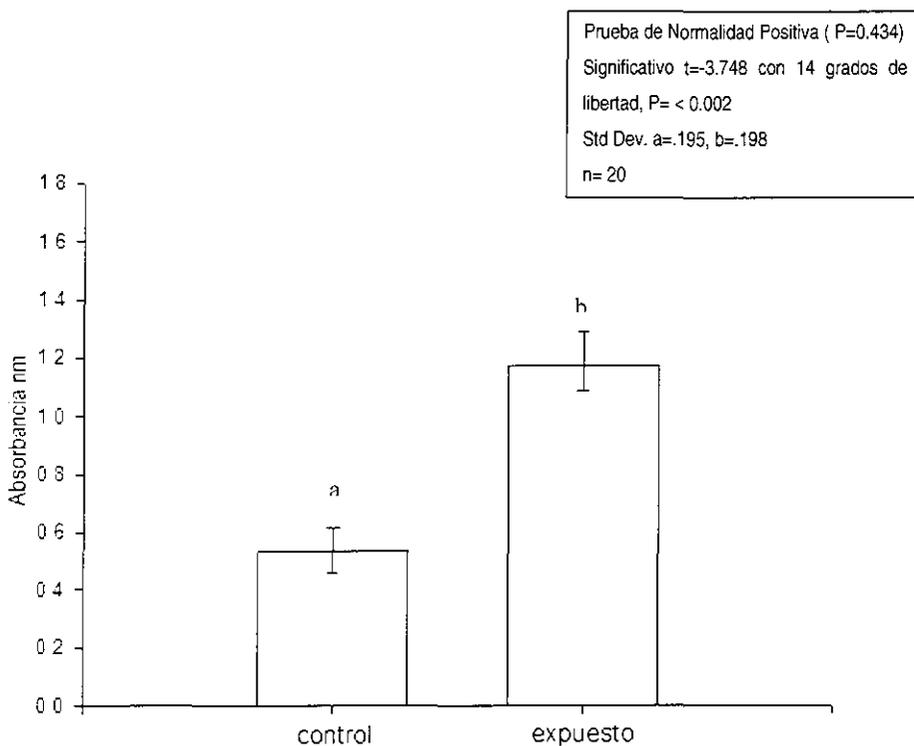


Figura 11.- Efecto del endosulfán en la producción de ROS en macrófagos esplénicos.

DISCUSIÓN

Para evaluar el daño agudo al sistema inmune innato por el plaguicida organoclorado endosulfán, las tilapias fueron expuestas a dosis subletal de 7 µg/L por 96 h, siendo la CL₅₀ de endosulfán para tilapia nilotica juvenil de 12.50µg/L (Tellez-Bañuelos, C. *et al.*, 2007)

En nuestra hipótesis consideramos la disminución del peso del bazo, principal órgano linfoide secundario de tilapia, por la exposición aguda a endosulfán, esto debido a investigaciones que reportan disminución en el tamaño de los órganos linfoides expuestos a plaguicidas (Banerjee, B. *et al* 1986, Dunier, M. y Siwicki, A. 1993., Pruett *et al.*, 2003., Woo Cha *et al.*, 2000, Singh, N. y Sharma, A, 2007), disminución del número de esplenocitos (Christin *et al* 2004) y lesiones histológicas en los al linfoides expuestos a endosulfán (Altionok *et al.*, 2007). Sin embargo, no encontramos diferencia significativa comparando el Índice somático del bazo entre los grupos experimentales. Aunque se observa una notable tendencia a la disminución de este parámetro en los peces expuestos a endosulfán. No encontramos estudios que reporten cambios en el tamaño de los órganos linfoides durante una exposición de 96 h, los estudios mencionados anteriormente, los cuales nos llevaron a formular la hipótesis de que el peso del bazo disminuiría bajo la exposición aguda a endosulfán, fueron realizados en tiempo más prolongados. El tiempo de exposición de 96 h podría ser insuficiente para que el endosulfán ocasionara un daño significativo sobre el peso del órgano. Para conocer si la tendencia presentada en nuestro estudio se convierte en un dato significativo será necesario realizar estudios con tiempos de exposición más prolongados.

En el bazo la actividad fagocítica es llevada a cabo por macrófagos, los cuales fueron separados de otras poblaciones celulares mediante gradiente de densidad, confirmando la obtención de esta población por medio de una tinción con rojo neutro. Cuantificamos la actividad fagocítica por ser considerada un parámetro inmunológico sensible para evaluar y predecir los efectos de los contaminantes sobre la salud de los organismos. Obteniendo el índice de fagocitosis y el porcentaje de fagocitos activos por medio del método de adherencia al vidrio de Cunningham, método clásico en el que generalmente se utiliza *Candida albicans* como sustrato para poder cuantificar la ingestión de las células. Nosotros utilizamos Zymosan, investigaciones previas evidencian que estos fragmentos de pared de *S. cerevisiae* inducen la fagocitosis debido a que activan la vía alterna del

complemento (Olabuena, S. 2000), y por presentar los receptores tipo TLR, (Yoshihiko *et al.*, 2008).

Observamos que el porcentaje de fagocitos activos e índice de fagocitosis es significativamente mayor en peces expuestos a 7µg/L de endosulfán por 96 h que en los peces del grupo control.

Confirmamos nuestro hallazgo del incremento de la actividad fagocítica determinada de forma directa con la técnica microscópica subjetiva adherencia al vidrio de Cunningham con la técnica indirecta como la fluorescencia por citometría de flujo, una metodología automatizada y más objetiva, la cual se comenzó a utilizar a partir de los años 60. Esta técnica nos provee de resultados más confiables debido a su sensibilidad. Ensayamos la actividad fagocítica de macrófagos esplénicos por medio de citometría de flujo y nuestros resultados coinciden con lo observado por el método de Cunningham: los macrófagos de peces expuestos a 7µg/L de endosulfán durante 96 h presentaron un mayor porcentaje de fagocitos-macrófagos FITC + comparado con el grupo control, así mismo la intensidad media de fluorescencia es mayor en los peces expuestos. Estos datos encontrados por nuestro grupo de trabajo coinciden con los resultados del estudio realizado por Harford *et al.*, (2005) donde se analizó la función fagocítica por citometría de flujo de células de riñón anterior en peces australianos: *Melanotaenia fluviatilis*, *Bidyanus bidyanus*, *Macquaria ambigua* y *Maccullochella peelii*, los dos últimos presentaron condiciones biológicas similares a tilapia nilotica, son peces de 150 a 200 g, dulceacuícolas; la exposición a concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/L de endosulfán indujo un incremento significativo dosis dependiente en el porcentaje de las células FITC+. Nuestros resultados sobre el aumento de la actividad fagocítica por la exposición aguda a endosulfán *in vivo* coinciden con los datos *in vitro* de Dorval *et al.*, 2003 y Han *et al.*, 2007 quienes encontraron la disminución de secreción de cortisol e incremento de interleucinas proinflamatorias en las células inmunes expuestas a endosulfán, tomando en cuenta que estas sustancias regulan la fagocitosis.

Durante la fagocitosis se produce un aumento en el consumo de glucosa y oxígeno, este mecanismo es llevado a cabo por el complejo enzimático NADPH-oxidasa que cataliza la formación del radical superóxido el cual constituye una de las fuentes endógenas más importantes de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el fagocito que junto a los derivados reactivos de nitrógeno y a las enzimas proteolíticas constituyen el mecanismo fundamental para la destrucción de microorganismos. La cuantificación de ROS es considerado un marcador de la activación del proceso de fagocitosis por

las células competentes como lo son los macrófagos (Johann *et al.*, 2007). La generación de ROS resulta indispensable en muchos procesos biológicos normales, cuando se presenta un desbalance entre la producción de ROS y las enzimas antioxidantes que los regulan, se produce un estrés oxidativo que daña a los tejidos. En nuestro estudio observamos que durante la fagocitosis de *Candida albicans* se incrementó significativamente la cantidad de ROS en los macrófagos esplénicos de peces expuestos a 7 µg/L de endosulfán por 96 h en comparación con la cantidad de ROS generados por los macrófagos esplénicos de los peces control. Lo que coincide con resultados reportados por Kannan *et al.*, (2000) y Ledirac, N. *et al.*, (2005), quienes encontraron un incremento de ROS dependiente de la cantidad de endosulfán administrada en ratones.

El estrés oxidativo es resultado de alguno de los siguientes factores: 1) incremento en los niveles de ROS, 2) fallas en el funcionamiento de las enzimas antioxidantes y 3) fallas en el funcionamiento de los mecanismos de reparación del daño oxidativo. Se ha reportado que el estrés oxidativo ocasionado por el endosulfán produce daño al sistema endocrino de trucha arcoíris, disminuyendo la secreción de cortisol (Dorval *et al.*, 2003), que a su vez puede ocasionar la desregulación de la respuesta inmune favoreciendo la actividad proinflamatoria con activación de macrófagos.

Lo anterior sugiere que el endosulfán produce una sobreestimulación de la respuesta inmune innata, lo que puede llevar al organismo a desarrollar diversos procesos patológicos. Autores como Han *et al.*, (2007) reportaron que el endosulfán incrementa la secreción de iNOS y de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α . El aumento de los niveles de iNOS han estado asociado a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o Parkinson (Elbaz *et al.*, 2007). Los procesos inflamatorios crónicos llevan al desarrollo de enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, entre otras (Wang, F. *et al.*, 2007; Gold, L. *et al.*, 2007).

Por los resultados observados se sugiere legislar el uso del endosulfán en México y se propone la utilización de plaguicidas conformados por compuestos menos tóxicos para los organismos no blanco.

CONCLUSIONES

» El órgano linfoide- bazo- de tilapia (*O. niloticus*) no presentó la reducción significativa en su tamaño por exposición aguda de 7µg/L de endosulfán.

» La actividad fagocítica en peces expuestos a endosulfán en nuestras condiciones experimentales se incrementó:

-El índice de fagocitosis presentó un aumento significativo en comparación con el índice de fagocitosis en tilapias control.

- El porcentaje de fagocitos activos en peces expuestos observó un incremento en comparación con el porcentaje de fagocitos activos del grupo control.

- La intensidad media de fluorescencia en peces expuestos mostró un aumento en comparación con índice medio de fluorescencia en tilapias control.

- El porcentaje de macrófagos esplénicos FITC+ fue mayor en peces expuestos en comparación con el porcentaje de macrófagos esplénicos FITC+ de las tilapias control.

» La producción de ROS en macrófagos esplénicos de tilapia (*O. niloticus*) presentó un significativo incremento por la exposición aguda a 7µg/L de endosulfán *in vivo*.

LITERATURA CITADA

- Abadin H., Chou C., Lladós T. 2007. Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: Immunological effects. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **47**(3): 249-56.
- Abbas, A., Kichtman, A., Dober, J. 2001. *Inmunología celular y molecular*. Madrid. Ed. Interamericana McGrawHill
- Altinok I., Capkin E. 2007. Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfán. *Toxicol Pathol.* **35**(3): 405-10
- Antherieu, S., Ledirac N., Dupuy A., Caron J., Rahmani R. 2007. Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. *J Cell Physiol* **213**(1): 177-86.
- Arrebola F., Martínez J., .2001. "Analysis of endosulfan and its metabolites in human serum using gas chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal Chromatogr Sci* **39**(5): 177-82.
- Ayub M., Thale A. 2003. The cavernous body of the human efferent tear ducts contributes to regulation of tear outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(11): 4900-7.
- Banerjee, B. y Hussain Q. 1986. Effect of sub-chronic endosulfán exposure on humoral and cell-mediated immune responses in albino rats. *Arch Toxicol* **59**(4):279-84
- Bilrha H., Roy R., Wagner E., Belles-Isles M., Bailey J., Ayotte P. 2004. Effects of gestational and lactational exposure to organochlorine compounds on cellular, humoral, and innate immunity in Swine. *Toxicological Sciences* **77**: 41-50
- Bols N., Brubacher J., Ganassin R., Lee L. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev.Comp. Immunol.* **25**: 853-873.

Cardenas, O. y Morales S. 2005. Estudio epidemiológico de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en siete departamentos colombianos, 1998-2001. *Biomédica* **25**(2):170-180

Chang C., Lee P. 2006. Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol* **20**(4): 574-85.

Christin, M. Gendron, A. Brousseau, P. Menard, L. Marcogliese, D. Cyr, D. Ruby, S. Fournier, M. 2003. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Environ Toxicol Chem.* **22**(5):1127-33

Dominguez M., Takemura A., Tsuchiya M. y Nakamura S. 2004 Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin level in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* **241**:491-500

Dorval J., Leblond V., Hontela A. 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfán, an organochlorine pesticide. *Aquatic Toxicology.* **63**: 229-241

Dunier, M. y Siwicki A. 1993. Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: a review. *Fish and Shellfish Immunology.* **3**, 423-438

Elbaz A., Dufouil C., Alépovitch A. 2007. Interaction between genes and environment in neurodegenerative diseases. *C.R. Biol.* **4**: 318-328

Ellis A. 2001 Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.*, **25**: 827-39

Evans, D., Leary, J. Jaso-Friedmann, L. 2001. *Dev Comp Immunol.* **25**(9):791-805

Fatima M., Ahmad I. 2000. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquat Toxicol* **49**(4): 243-250.

Fernández A. y Ruiz. 2002. Células y órganos. El sistema inmune de los teleósteos. *Aquatic* **16**:1-14.

Gold L., Ward M., Dosemeci M., De Roos A. 2007. Systemic autoimmune disease mortality and occupational exposures. *Arthritis Rheum.* **56**(10):3189-201

Han E., Hwang Y., Kim G., Jeong H. 2007. Inflammatory effect of endosulfan via NF-kappaB activation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **355**(4): 860-5.

Harford A., O'Halloran K., Wright P. 2005. The effects of in vitro pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aquat Toxicol* **75**(4): 330-42.

Harford A., O'Halloran K., Wright P. 2006. Flow cytometric analysis and optimisation for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish. *Fish Shellfish Immunol* **20**(4): 562-73.

Hayes, W. y Laws, E. 1991. Handbook of pesticide toxicology. San Diego, CA. Academic press. Vol. 2.

Hrubec, C. Jennifer L. Cardinale, Stephen A. Smith. 2000. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). *Vet Clinical Pathology*. Vol. 29 No. 1

INEGI. 2004. Boletín de información oportuna del sector alimentario Fuente Registros Administrativos Desglose geográfico Nacional Información de Estados Unidos Mexicanos **241**: 76.

Johann, Knethen, Lindemann, Brune. 2007. Recognition of apoptotic cells by macrophages activates the peroxisome proliferator-activated receptor- γ and attenuates the oxidative burst. *Cell Death and Differentiation*; **13**: 1533-40

Kannan, K., Holcombe, R., Jain, S., Alvarez-Hernandez, X., Chervenak, R., Wolf, R., Glass, J. 2000. Evidence for the induction of apoptosis by endosulfán in a human T-cell leukemic line. *Mol cell Biochem.* **205** (2):53-66

Klaassen, C. Slitt, A. 2005. Regulation of hepatic transporters by xenobiotic receptors. *Curr Drug Metab.* **6**(4):309-28

Ledirac N., Antherieu S., Dupuy A., Caron J., Rahmani R. 2005. Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species. *Toxicological Sciences* **86**(2): 444-452.

Ligong, C. Kathleen, D. John, C. 2006. Structural model for γ -aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding: Widely diverse structures fit the same site. *PNAS.* March **28**(13): 103-13.

Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish. *Fish and Shellfish Immunology* **20**(2): 137-51

Moreno, C., Sanchez-Ibarrola, A. 2003. Receptores tipo toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Rev. Med. Univ. Navarra.* **47**(3): 29-33

Murray, R., Mayes, P; Granner, D., Rodwell, V. 2001. *Bioquímica de Harper.* México, D.F. El Manual Moderno. 15ª. Edición.

Nivia 1993. Endosulfan. Red de Acción en Plaguicidas. Colombia.

Olabuenaga, S. 2000. Sistema immune en peces. *Gayana.* **64**(2): 205-15

Olabuenaga, S. 2000. Efecto in vitro del suero de la trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) sobre metacercarias del género *Tylodelphys* (Trematoda, Diplostomatidae). *Bol. Chil. Parasitol.* **55**

Pistl J, Kovalkovicová N, Kacmár P, Kusová I, Mikula I, Sutiaková I. 2001. Effect of endosulfan on peripheral sheep leukocytes in vitro. *Vet Hum Toxicol.* **43**(2):78-82

Purcell, K. Maureen, Smith, D., Hood, L., Winton, R., Roach, C. 2006. Conservation of toll like receptor signaling pathways in teleost fish. *Comp. Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. **1**(1):77-88

Pruett S. Fan R. Zheng Q. Myers P. Hébert P. 2003. Modeling and predicting immunological effects of chemical stressors: characterization of a quantitative biomarker for immunological changes caused by atrazina and ethanol. *Toxicological Sciences* **75** 343-354

Ramírez, J., Lacasaña, M. 2001. Plaguicidas: Clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*. **4**(2): 67-75

Raheja, G., Gill, K. 2007. Altered cholinergic metabolism and muscarinic receptor linked second messenger pathways after chronic exposure to dichlorvos in rat brain. *Toxicol Ind Health*. **23**(1): 25-37

Rivero, O., Rizo, P., Ponciano, G., Oláiz, G. 2001. Daños a la salud por Plaguicidas. México, D.F. Manual Moderno

Rojas-Espinosa, O., Arce-Paredes, P. 2004. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias, Tercera parte. *Bioquímica*. **29**(2): 55-67

Rook, G., Steele, J., Umar, S., Dockrell, H. 1985. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by gamma-interferon. *J Immunol Methods*. **82**(1):161-7

Ryan, B., Burke, T., Hubal, E., Cura, J., Mckone, T. 2007. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment. *Environmental Health Perspectives*. **115**(5):833-840

Sánchez, M. 2004. Melatonina: fagocitosis y metabolismo oxidativo en heterófilos de *Streptopelia risoria*. Variaciones con la edad. Facultad de Ciencias Biológicas. España. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura.

Singh, N. y Sharma, A. 2007. Citrinin and endosulfán induced teratogenic effect in Wistar rats. *J. appl Toxicol* 27(2):143-51

Smith, R., Smith, T. 2001. *Ecología*. Madrid, España. Pearson Educación. Cuarta edición.

Stahuljak, B., Valic F., 1984. International programe on chemical safety environmental. Health criteria 40. Endosulfán. World Health Organization.

Téllez-Bañuelos, C., Bretón, L. Santerre, A. Casas-Solís, J. Zaitseva, G. 2007. Efecto de la exposición aguda a endosulfán *in vivo* en la respuesta inmune innata de tilapia (*Oreochromis niloticus*). Semana de la Investigación Científica 2007. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara

Tizard, I. 2002. *Inmunología Veterinaria*. México, D.F. McGraw-Hill. Sexta Edición.

Vorgelegt. 2003. Effects of Sewage treatment Plant Effluent on the immune System of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis para obtener el grado de Dr. Universidad de Constanza.

Wang F., Roberts S., Butfiloski E., Morel L., Sobel E. 2007. Acceleration of autoimmunity by organochlorine pesticides: a comparison of splenic B-cell effects of chlordecone and estradiol in (NZBxNZW)F1 mice. *Toxicol Sci.* 99(1):141-52.

Walter, J. 2000. *Environmental Medicine, Part 4: Pesticides Biologically Persistent and Ubiquitous Toxins*. *Alternative Medicine Review.* 5(5): 432-46

Walsh, C., Toronto, J., Gilliland, T., Noyes, D., Bodine, A., Luer C. 2006. Nitric Oxide production by nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) and clearnose skate (*Raja eglanteria*) peripheral blood leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology.* 20: 40-6

TESIS/CUCBA

Woo S. Kyoung H. Poong K. Han M. Seop S. Cheon T. 2000. Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome p450. *Toxicology Letters*. **115** 173-181

Yuquan, L., Kanehisa, M., Tatsuya, T., Toru, T., Takeshi, S. 2000. Genotoxic Effects of α -Endosulfan and β -Endosulfan on Human HepG2 Cells. *Environmental Health Perspectives*. **108**(6)

Yoshihiko I., Yoshiyuki A., Takashi I., Noriko M., Hiroshi T., Naohito O., 2008. Dissociation of Toll-like receptor 2 mediated innate immune response to zymozan by organic solvent treatment without loss of dectin-1 reactivity. *Boil. Pharm-Bull.* **31**(1):13-18

Zaitseva G., Santerre L., Casas J., Peregrina J., León R. 2006. TILAPIA: Aspectos Biológicos y Productivos. México, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Ed. Universidad de Guadalajara.