

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA INTOXICACIÓN AGUDA DE ATRAZINA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :
MARCELA HERNÁNDEZ CORONADO

DIRECTOR DE TESIS: DR. MANUEL IVÁN GIRÓN PÉREZ
ASESOR DE TESIS: DRA. GALINA PETROVNA ZAITSEVA

Zapopan, Jalisco

Octubre de 2007



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología

278/ C. C. BIOLOGÍA

C. MARCELA HERNÁNDEZ CORONADO
PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: “ **Evaluación de la intoxicación aguda de atrazina sobre la respuesta inmune de tilapia (*Oreochromis niloticus*)** ” para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo al **M en C. MANUEL IVÁN GIRÓN PÉREZ** y el Asesor / a es: **DRA. GALINA PETROVNA ZAITSEVA.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”

Las Agujas, Zapopan., 6 de Octubre del 2005.

DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

DRA. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

C.c.p. M en C. MANUEL IVÁN GIRÓN PÉREZ - Director del trabajo

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 Intoxicación aguda de atrazina sobre la respuesta inmune de tilapia (*Oreochromis niloticus*)" que realizó la pasante Marcela Hernández Coronado con número de código 399387688 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




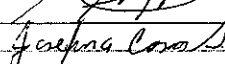
Marcela Hdz. Coronado
 Tesista

Marcela Hernández Coronado
 Zapopan, Jalisco a 24 de Septiembre de 2007.

Firma 
 Nombre Dr. **Manuel Iván Girón Pérez**
 Director del trabajo

Firma 
 Nombre Dra. **Galina Petrovna Zaitseva**
 Asesor

Uo. B. U. / [Signature]

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Javier García Velasco		
Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez		24 sep /07
Dr. Ramón Reynoso Orozco		27 sept./07
Supl. Dra. Josefina Casas Solís		24/sep/07

Agradezco al Departamento de Biología Celular y Molecular, por prestarme un lugar entre ellos. A mis sinodales: Dr. Alfonso Islas, Dr. Ramón Reynoso, Dra. Josefina Casas y Dr. Javier García por ayudarme a construir la tesis, por sus comentarios y su tiempo. A la Dra. Galina, por permitirme ser parte del proyecto, por su apoyo, sugerencias e interés. Al Dr. Iván Girón, por guiarme, por su tiempo, su paciencia y lo aprendido, porque en las diferencias crecemos.

A CONACyT por el apoyo económico.

A la Universidad de Guadalajara, a sus docentes e investigadores.

A mis padres, por sus libros, su música y sus genes. Por las conversaciones en la cocina y el apoyo diario. Por el amor y la aceptación incondicional que permite pasos seguros.

A mis hermanos, por caminar junto a mí. Por permitirme aprender de ellos y cuidar de mis pasos. Por tanto compartido y vivido.

A Carlos, por ese vuelo compartido que invita a planear en la distancia. Por ser el compañero de mí caminar.

A mi familia por tanto que se transmite en la sangre y todo lo demás que se aprende.

A mis amigos por alegrar los días difíciles, por las conversaciones y las risas.

ÍNDICE

Resumen	7
Introducción	8
Antecedentes	10
Los Plaguicidas como Sustancias Tóxicas	11
El Herbicida Atrazina	14
Sistema Inmune de Peces	18
Atrazina e Inmunotoxicología	20
Bioensayos y Biomarcadores	21
Modelo de Estudio	23
Planteamiento del Problema	25
Hipótesis	26
Objetivo General	27
Objetivos particulares	27
Material y Métodos	28
Resultados	38
Discusión	44
Conclusiones	49
Anexo I	50
Literatura Citada	52

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Categorías de toxicidad de plaguicidas para distintos organismos	13
Tabla 2. Estructura química de la atrazina y sus metabolitos	15
Figura 1. Diagrama de flujo: ensayos de linfoproliferación	32
Figura 2. Diagrama de flujo: concentración total de IgM	34
Figura 3. Diagrama de flujo: estallido respiratorio	36
Figura 4. CL ₅₀ de atrazina a para la tilapia nilótica	38
Figura 5. Peso Relativo del bazo y número de células mononucleares de tilapia	39
Figura 6. Índice de proliferación de células mononucleares de tilapia	40
Figura 7. Índice de proliferación de células de tilapia expuesta <i>in vitro</i>	41
Figura 8. Concentración de IgM presente en plasma de tilapia	42
Figura 9. Liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de células mononucleares de tilapia	43

RESUMEN

La atrazina es un herbicida del grupo de las triazinas utilizado ampliamente en todo el mundo. Debido a su alta movilidad en suelo y a su largo tiempo de vida media, se le considera como un peligroso contaminante del agua (Graymore et al., 2001). Dado que los peces son organismos frecuentemente expuestos a plaguicidas, es posible utilizarlos para monitorear ambientes acuáticos. Los cambios en su fisiología permiten evaluar las condiciones de los ambientes que habitan. La sensibilidad del sistema inmune a diversos factores presentes en el ambiente permite utilizar los diversos parámetros inmunológicos para evaluar el efecto tóxico de agentes contaminantes (Bols et al., 2001).

En este estudio, se evaluó el efecto sobre diversos parámetros de la respuesta inmune en grupos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) expuestos a una formulación comercial de atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-S-triazina) durante 96 h. Los resultados muestran que la atrazina es de ligera a moderadamente tóxica para tilapia nilótica. La exposición a dosis subletales (1.32 mg/L y 0.656 mg/L) no disminuye el peso relativo del bazo, la concentración de esplenocitos y la concentración total de IgM presente en plasma. Sin embargo, la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células mononúclares disminuye significativamente, por lo que la exposición de tilapia nilótica a atrazina puede comprometer su capacidad de respuesta inmune innata contra agentes infecciosos.

INTRODUCCIÓN

El control de plagas por medio de plaguicidas es una práctica ampliamente utilizada en la agricultura. La poca regulación y conciencia respecto a dichas sustancias pone en riesgo a los ecosistemas y a la salud.

Actualmente existe gran cantidad de sustancias para combatir plagas. Dada su toxicidad, el uso de muchas de ellas está restringido en diversos países del mundo. Sin embargo, en países como México, el uso de los plaguicidas no encuentra tal normatividad y, favorecido por leyes de mercado, se continúan empleando sustancias altamente nocivas. Tal es el caso de sustancias como DDT (dicloro-difeni-tricloroetano), clorobencilato, aldrín, lindano y paratión, cuyo uso ha sido prohibido por sus graves consecuencias a la salud y al ambiente pero que continúan comercializándose en el país.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la toxicidad del herbicida atrazina sobre el sistema inmune. Dadas las características de alta movilidad, persistencia y toxicidad, es un potencial contaminante de cuerpos de agua, por lo que las comunidades acuáticas podrían verse afectadas. La presencia de atrazina en el ambiente puede ocasionar cambios negativos en la cadena trófica, pudiendo incluso llegar al ser humano por medio del alimento. Al ser la tilapia una especie dulceacuícola ampliamente distribuida y de relevancia económica en nuestro país, es importante la realización de estudios sobre el efecto de la atrazina sobre el sistema inmune de dicha especie.

Este estudio ha sido financiado por CONACYT-SEMARNAT, como parte de un esfuerzo del gobierno y las instituciones educativas del país por conocer los posibles efectos adversos de los plaguicidas y de esta manera buscar alternativas para su regulación.

ANTECEDENTES

La cantidad de sustancias tóxicas vertidas al ambiente aumenta cada año, provocando daños en el medio ambiente, problemas de salud humana y de biodiversidad. Un compuesto se considera tóxico cuando al encontrarse en determinadas concentraciones y durante ciertos tiempos de exposición, afecta o modifica de manera nociva algún proceso bioquímico o fisiológico, implicando una disfunción que puede llegar a producir la muerte de los individuos expuestos (Lindenmayer & Burgman, 2005).

Las sustancias como los hidrocarburos, metales pesados y plaguicidas constituyen peligrosos contaminantes¹ para los ecosistemas y su biota. De esta manera, las especies sensibles pueden ser afectadas por dosis subletales o ser eliminadas por dosis letales; lo que afecta la cadena trófica y altera por consecuencia a las distintas especies. Así, los ecosistemas y sus poblaciones (incluyendo al ser humano) pueden estar directa o indirectamente afectados por la presencia de dichas sustancias tóxicas (Fleeger et. al., 2003).

Debido a su toxicidad y a la aplicación indiscriminada, los plaguicidas son sustancias contaminantes de alto riesgo. Desde hace muchos años el ser humano ha utilizado distintas sustancias para prevenir plagas en los cultivos. Los antiguos romanos utilizaban sulfuro para controlar insectos y sal para eliminar malezas, mientras que en el siglo XV las hormigas fueron controladas

¹ Un contaminante es una sustancia o forma de energía que esta presente en un ambiente al que no pertenece o se encuentra en niveles poco frecuentes. Generalmente, se utiliza para referirse a compuestos de origen antropogénico (ATSDR, 2004). Los contaminantes pueden encontrarse en concentraciones a las que aparentemente no causan efectos nocivos, pero cuando se incrementan sus niveles pueden ser tóxicos. Debido a que existen tóxicos de origen natural, un tóxico no siempre constituye un contaminante.

con mezclas de miel y arsénico. A finales del siglo XIX, los agricultores norteamericanos comenzaron a usar acetoarsénico de cobre, arseniato cálcico, sulfato de nicotina y sulfuro para controlar plagas de insectos en distintos cultivos, sin embargo los resultados fueron poco satisfactorios debido a los métodos de aplicación y a la baja eficiencia de los químicos. En 1939 Paul Müller sintetizó el DDT, una sustancia altamente efectiva para el combate de una gran variedad de plagas domésticas y agrícolas. Después de la Segunda Guerra Mundial, con la introducción de otros plaguicidas como el lindano, aldrin, dieldrin, endrin y 2,4-D (2,4 diclorofenoxiacético) el uso de los plaguicidas se intensificó notablemente (Delaplane, 2000).

El uso creciente de diversos tipos de plaguicidas en el mundo ha conducido a una severa contaminación ambiental. Por lo anterior es urgente realizar estudios para evaluar los efectos de este tipo de contaminantes sobre los organismos.

Los Plaguicidas como Sustancias Tóxicas

Los plaguicidas son sustancias tóxicas utilizadas para el combate de plagas agrícolas y urbanas. Se clasifican de acuerdo a su uso en insecticidas, fungicidas, aracnidas, nematocidas, moluscocidas, rodenticidas y herbicidas (Robledo & Romero, 2000). Otra forma de clasificar a los plaguicidas es de acuerdo a su estructura química, bajo este criterio existen los plaguicidas organoclorados, organofosforados, carbámicos y piretroides (Bartual, 2004).

El mecanismo de acción de los diferentes plaguicidas depende de su estructura. Generalmente, actúan efectuando cambios en el estado oxidativo de las células e interfiriendo en las rutas metabólicas (Kacmár et al., 1999).

Aún cuando los plaguicidas están diseñados para combatir plagas, muchos de ellos pueden ser un riesgo para los seres humanos y para el ambiente. Los efectos adversos de los plaguicidas dependen de cada uno de ellos. Existen algunos que afectan el sistema nervioso, como los organofosforados y carbámicos, mientras que otros pueden ser carcinogénicos, mutagénicos o irritantes de piel y mucosas. Con el fin de determinar el riesgo que representan dichas sustancias se debe analizar la exposición, el efecto y la relación entre ellos. La toxicidad o riesgo de un plaguicida se estima por medio de pruebas de exposición, las cuales pueden ser a corto plazo (agudas) o a largo plazo (crónicas). Los resultados de dichas pruebas se utilizan para establecer relaciones de *dosis-respuesta* y de *causa-efecto* entre la cantidad del plaguicida a la que se expuso al organismo y las consecuencias de ello. La Agencia de Protección Ambiental (Environment Protection Agency, EPA por sus siglas en inglés) establece categorías de toxicidad para distintos organismos, incluyendo al ser humano (Tabla 1). Esto con el fin de regular el uso de sustancias nocivas y alertar a la población de los riesgos de su uso (Environment Protection Agency, 2007).

**Categorías de Toxicidad para Mamíferos y Aves
Exposición Aguda**

CL₅₀ Concentración (ppm = mg/Kg)	Categoría Descriptiva de la EPA
< 10	Extremadamente tóxico
10 – 50	Altamente tóxico
51 – 500	Moderadamente tóxico
501 - 2000	Levemente tóxico
>2000	Prácticamente no tóxico

**Categorías de Toxicidad para Organismos Acuáticos
Exposición Aguda**

CL₅₀ Concentración (ppm = mg/Kg)	Categoría Descriptiva de la EPA
<0.1	Extremadamente tóxico
0.1 – 1	Altamente tóxico
>1 – 10	Moderadamente tóxico
>10 - 100	Levemente tóxico
>100	Prácticamente no tóxico

Categorías de Toxicidad de Plaguicidas para Seres Humanos

	Toxicidad I: Extremadamente Tóxico	Toxicidad II: Altamente Tóxico	Toxicidad III: Moderadamente Tóxico	Toxicidad IV: Ligeramente Tóxico
Dosis Letal 50 (DL ₅₀) Oral	< 50 mg/kg	50 - 500 mg/kg	500 - 5000 mg/kg	> 5000 mg/kg
DL ₅₀ Inhalación	< 0.2 mg/L	0.2 - 2 mg/L	2.0 - 20 mg/L	> 20 mg/L
DL ₅₀ Dérmica	< 200 mg/kg.	200 - 2000 mg/kg	2,000 - 20,000 mg/kg	> 20,000 mg/kg
Efectos en ojos	Corrosivo; Opacidad cornea, no reversible en 7 días	Opacidad cornea, reversible en 7 días. Irritación persiste.	Sin opacidad cornea. Irritación reversible en 7 días.	Sin irritación
Efectos en piel	Corrosivo	Irritación severa a las 72 hrs.	Irritación moderada a las 72 hrs.	Irritación ligera a las 72 hrs.

Tabla 1. Categorías de toxicidad de plaguicidas para distintos organismos.
EPA, 2007.

Por otra parte, para el objeto de evaluar el efecto tóxico que tienen los plaguicidas sobre la fisiología de los organismos se han realizado numerosos estudios; en los cuales se ha demostrado que suprimen la actividad de la glándula tiroidea (Smits et al., 2002), alteran el desarrollo de órganos reproductores, retardan la madurez sexual (Shina et al., 1999) y modifican negativamente parámetros hematológicos y bioquímicos séricos (Saxena et al., 2002; Jenkins et al., 2003). Así mismo, la proliferación y función de distintas células del sistema inmune son afectadas negativamente por la exposición a plaguicidas (Whalen et al., 2003).

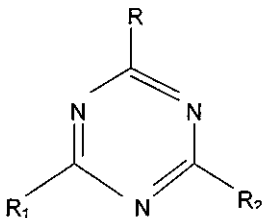
El crecimiento poblacional y el aumento de las necesidades humanas han traído como consecuencia la sobreexplotación de los recursos, la contaminación del ambiente así como un incremento en la producción. El uso de plaguicidas con este fin ha aumentado, siendo el grupo de los herbicidas una de las sustancias de mayor aplicación en actividades agrícolas.

El Herbicida Atrazina

La atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) es un herbicida orgánico nitrogenado derivado de la triazina (Mendoza & Lema, 2005). Debido a su alto espectro, suele utilizarse de manera preventiva o post-emergente. A altas concentraciones este compuesto actúa contra maleza; mientras que a bajas concentraciones puede usarse para el control selectivo de hierbas en germinación de varios cultivos, por ejemplo arbustos frutales (Filipov et al., 2005). Atrazina es uno de los herbicidas de mayor uso alrededor del mundo; desde su introducción en los años cincuenta, se ha empleado en actividades

forestales y agrícolas. Se estima que en el mundo, cada año son arrojadas al ambiente entre 70,000 y 90,000 toneladas de este herbicida (Graymore et al., 2001).

La atrazina es un compuesto muy persistente en el suelo y puede permanecer más de un año en el ambiente bajo condiciones secas o frías. Debido a su alta movilidad en suelo y a su largo tiempo de vida media (de 60 a 100 días), la atrazina es un peligroso contaminante del agua aún cuando presenta moderada solubilidad en la misma (Waring & Moore, 2004); puede ser absorbido por vía oral, dérmica, o por inhalación. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) lo clasifica como de toxicidad clase III o ligeramente tóxico (Hazardous Substances Databank, 1995). Además, el proceso metabólico de atrazina puede dar como resultado uno o varios metabolitos con persistencia y toxicidad variables (Graymore et al., 2001).



Compuesto	R	R ₁	R ₂
atrazina	Cl	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH ₂ CH ₃
deetilatrazina	Cl	NHCH(CH ₃) ₂	NH ₂
deisopopilatrazina	Cl	NH ₂	NHCH ₂ CH ₃
dídealquilatrazina	Cl	NH ₂	NH ₂
hidroxiatrazina	OH	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH ₂ CH ₃
deetilhidroxiatrazina	OH	NHCH(CH ₃) ₂	NH ₂
deisopropilhidroxiatrazi	OH	NH ₂	NHCH ₂ CH ₃

Tabla 2. Estructura química de la atrazina y sus metabolitos. Tomado de: Graymore et al. 2001.

El mecanismo de acción de atrazina en células vegetales, es a través de la inhibición de la fotosíntesis, esto ocurre por la unión irreversible al sitio específico de la proteína quinina (Q_B), lo que provoca el bloqueo del fotosistema II (Manske et. al., 2004; Wiegand et. al., 2001). Dado que los herbicidas han sido diseñados para ejercer su función sobre células vegetales, en muchos casos el mecanismo de acción sobre células animales no se conoce o está poco estudiado (Das et al., 2000).

En experimentos con animales de laboratorio, se ha demostrado que altas dosis de atrazina tienen efectos tóxicos severos, mientras que a bajas dosis no se han reportado efectos cancerígenos, mutagénicos o teratogénicos (Whalen et al., 2003). En ratas expuestas a altas dosis de atrazina (200 a 500 mg/kg), se ha observado signos de excitación seguidos de depresión, dificultad para respirar, falta de coordinación, espasmos musculares, hipotermia, convulsiones y muerte. A dosis letales, en animales experimentales, causan congestión, hemorragia en hígado, riñones y pulmones. Mientras que la exposición crónica a este compuesto causa temblores, cambios en el peso de órganos y daño en hígado y corazón (Hazardous Substances Databank, 1995).

La atrazina es un compuesto relativamente móvil que puede tener efectos nocivos sobre las comunidades de los ecosistemas acuáticos, ingresando a los mismos principalmente por escurrimiento de aguas pluviales provenientes de áreas agrícolas (Waring & Moore, 1998). Estudios en cuerpos de agua alrededor del mundo, han reportado la presencia de esta sustancia en diversas concentraciones (DuPreez & Van Vuren, 1992) que van desde menores de 0.02 hasta 2.00 $\mu\text{g/L}$ en Australia (Phyu et al., 2005); alrededor de

0.3 µg/L en Ontario, Canadá; 6.42 hasta 8.6 µg/L en Kansas, E.U.A. (DuPreez & Van Vuren, 1992); y de 2.00 hasta 21.0 µg/L en Iowa, E.U.A. (Manske et al., 2004). Sin embargo, en México, Centro y Sudamérica no se han realizado estudios o al menos no están reportados (anexo 1).

En organismos autótrofos de ecosistemas acuáticos, la atrazina tiene efectos directos. Así se ha visto que esta sustancia provoca diversos problemas en la flora; lo que repercute en la calidad del agua y disponibilidad de alimento para organismos herbívoros. Aunado a lo anterior, otras especies son afectadas indirectamente, lo que resulta en una disminución de la abundancia y la biodiversidad (Graymore et al., 2001).

Estudios en peces demuestran que la atrazina afecta el balance hidromineral (Prasad & Reddy, 1994), la actividad enzimática y el epitelio en branquias; además, ocasiona disturbios en la osmorregulación e inhibe la actividad de acetilcolinesterasa en suero sanguíneo y cerebro (Wiegand et al., 2001). La atrazina afecta parámetros hematológicos y metabólicos, altera el comportamiento y puede causar daño renal en peces (Waring & Moore, 2004). Se ha demostrado que se bioacumula en sangre y distintos tejidos (Grobler-Van Heerden et al., 1991), por lo que el consumo de peces contaminados puede contribuir a la exposición humana al herbicida (Whalen et al., 2003).

Los valores de la CL_{50} (concentración letal media) de atrazina para los organismos acuáticos es muy variable, los valores reportados para distintas especies de peces son de 4.5 a 11.0 mg/L para *Oncorhynchus mykiss*, de 5.6 a 10.4 mg/L para *Melanotenia fluviatilis* y de 15.7 a 20.2 mg/L para *Cyprinus carpio* (Phyu et al., 2005).

Sistema Inmune de Peces

Todos los animales, independientemente de su complejidad o historia evolutiva, deben ser capaces de excluir a los microorganismos invasores que pudieran causar enfermedad o muerte (Tizard, 2002). El sistema inmune es el encargado de mantener la homeostasis dentro de los organismos, así como de proteger a los mismos, de agentes extraños (antígenos) y enfermedades. La respuesta inmune involucra el reconocimiento del antígeno; así como los mecanismos de eliminación del mismo (Roitt et al., 1998).

Los conocimientos actuales y paradigmas de los mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inmune están basados en estudios realizados en mamíferos, principalmente en ratón. Sin embargo, en los últimos años ha surgido un interés por estudiar la inmunidad de peces debido a su importancia económica, al interés filogenético, y a las características propias del sistema inmune

El sistema inmune de los peces es, en términos generales, muy similar al de los vertebrados superiores aunque cuenta con características particulares. La carencia de médula ósea y ganglios linfáticos en los peces teleósteos es una de las principales diferencias con los mamíferos, lo que hace que no se pueda distinguir claramente entre órganos hematopoyéticos y órganos linfoides primarios y secundarios (Fernández et al., 2002). El timo en los peces es un órgano par y homogéneo, responsable de la diferenciación de los linfocitos T. El riñón anterior posee un gran número de macrófagos y linfocitos B, tiene capacidad hematopoyética y se considera un órgano homólogo de la médula ósea en mamíferos. El bazo no presenta diferencia clara entre la pulpa blanca y

la roja, sus funciones son muy similares a las del riñón anterior (Girón-Pérez et al., 2004).

Las células involucradas en el sistema inmune de los peces, son los leucocitos o glóbulos blancos que se encuentran en sangre circulante o en tejidos y, en ocasiones, pueden formar complejos como los centros melanomacrófágicos. Su clasificación se ha realizado por criterios morfológicos según los cuales se distinguen varios tipos: linfocitos, granulocitos, monocitos y macrófagos (Ellis, 1997).

Los linfocitos son células altamente diferenciadas y representan alrededor del 80% de los leucocitos circundantes. A nivel de funciones, son los responsables de la respuesta inmune adaptativa humoral y celular. Al igual que en mamíferos, existen dos poblaciones funcionalmente diferentes: linfocitos T y B. En peces se han descrito tres poblaciones de granulocitos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los neutrófilos tienen núcleo multilobulado y de tamaño variable, representan del 6 al 8% de los leucocitos totales, su principal función es la fagocitosis; los eosinófilos, son células que presentan núcleo bilobulado y excéntrico, intervienen en procesos de regulación de inflamación y defensa mediante degranulación; los basófilos contienen gránulos grandes de histamina y heparina, están involucrados en el inicio de la inflamación. Otro tipo de leucocitos presentes en los peces, son los *monocitos/macrófagos*; éstos son leucocitos grandes, su núcleo ocupa más de la mitad del volumen celular, constituyen la principal célula fagocítica en los peces, además de tener una participación importante en la presentación antigénica y en la cooperación celular (Tizard, 2002).

En años recientes, el interés en el estudio de la inmunología no se concentra únicamente en su importancia evolutiva y funcional. De igual forma, el sistema inmune ha cobrado importancia por su sensibilidad para reaccionar a sustancias tóxicas. Así, la toxicología ha empleado distintos parámetros inmunológicos como herramientas para medir los efectos de contaminantes sobre los organismos.

Atrazina e Inmunotoxicología

La inmunotoxicología es el área interdisciplinaria que estudia el efecto de sustancias tóxicas, como metales pesados y plaguicidas, sobre la respuesta inmune de los organismos (Kacmár et al., 1999).

Como ya se mencionó, la atrazina es uno de los herbicidas más usado alrededor del mundo. Ésto genera el interés de diferentes grupos de investigación en estudiar el efecto de esta sustancia sobre el sistema inmune y sus mecanismos reguladores. Así, se observa que la exposición de ratas juveniles machos a atrazina, disminuye la producción de anticuerpos y la hipersensibilidad tardía (Rooney et al., 2003). Además, la exposición aguda (periodos menores a 8 horas) de estos mamíferos a la atrazina, pueden causar cambios severos en los parámetros inmunológicos, tales como: disminución en el número de células $CD4^+$ y $CD8^+$ en el timo, disminución en el número de células nucleadas de bazo, baja en los porcentajes de células B, así como menor actividad de células NK. La atrazina también puede ocasionar disminución en la expresión de moléculas de histocompatibilidad (MHC) clase II, y en la respuesta de IgG1 y IgG2 (Pruett et al., 2003). Estudios realizados en roedores indican que dicha sustancia afecta al sistema inmune en varios

niveles de organización; así, se ha demostrado que la producción de anticuerpos y la respuesta inmune específica es disminuida por la exposición a atrazina (Karrow et al., 2005).

Hasta el momento no existen estudios reportados en la bibliografía, en los que se evalué el efecto de atrazina sobre parámetros del sistema inmune en peces. Dichos organismos son importantes para la evaluación del efecto de distintos xenobióticos y se han propuesto como biomarcadores de contaminación acuática.

Bioensayos y Biomarcadores

Los bioensayos son métodos cuantitativos que permiten estimar los efectos en un sistema biológico después de la exposición a un xenobiótico. Ésto a través de comparar las reacciones de los organismos expuestos a una sustancia, contra la que presentan organismos control. El principio de este tipo de ensayos se basa en la capacidad de los seres vivos para reaccionar a las condiciones ambientales, por lo que es importante determinar cuándo tal respuesta queda fuera de los límites de la normalidad (ISCID, 2006).

En los últimos años, el estudio de los efectos nocivos de xenobióticos en organismos acuáticos como peces, bivalvos y otros invertebrados ha ganado importancia. Los bioensayos con organismos acuáticos constituyen la única forma de determinar el grado de toxicidad de efluentes y compuestos químicos aislados (Chévre et. al., 2003), y proporcionan las bases para establecer una legislación en materia de contaminación acuática. Así mismo, a través de los

bioensayos se pueden proponer posibles biomarcadores de contaminación (Bols et al., 2001).

Los biomarcadores de contaminación son cambios a nivel celular o molecular que indican la exposición a contaminantes, la susceptibilidad o el daño provocado por estas sustancias (Walker, 1998). La Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos define un biomarcador o marcador biológico como la alteración inducida por xenobióticos en algún componente celular o bioquímico, o bien sobre un proceso, estructura o función que es medible a través del sistema biológico o de una muestra. Los biomarcadores pueden ser clasificados en: biomarcadores de efecto, biomarcadores de exposición y biomarcadores de susceptibilidad (ATSDR, 1994).

El sistema inmune de peces, al igual que el de otros vertebrados, está compuesto por mecanismos muy sensibles y finamente regulados. Por lo que diversos parámetros inmunológicos podrían usarse como biomarcadores de susceptibilidad y efecto. Entre las ventajas de utilizar el sistema inmune como biomarcador de contaminación, destacan las siguientes:

1. El sistema inmune relaciona directamente la interacción entre una especie con distintos organismos (parte fundamental de la ecología).
2. Los cambios que sufre el sistema inmune influyen en las poblaciones afectando la susceptibilidad de los individuos a las enfermedades.
3. Muchos componentes del sistema inmune se conservan evolutivamente, lo que puede significar que la sensibilidad a un contaminante particular es similar para diferentes especies. Ésto

permite hacer predicciones en cuanto al impacto ambiental provocado por una sustancia.

4. Finalmente, por sus características, se considera un indicador de cambios en un organismo. Y puede utilizarse para medir dichos cambios en presencia de sustancias tales como los plaguicidas.

En general, los peces son un grupo de animales importante para la ecotoxicología, ya que los cambios en su fisiología permiten evaluar cambios en los ambientes acuáticos y así conocer las condiciones de los ambientes que habitan (Bols et al., 2001). En México, la tilapia es un organismo presente en casi todos los cuerpos de agua dulce del país. Por lo que se considera útil para monitorear las condiciones ambientales de los mismos.

Modelo de Estudio

La tilapia es una especie comestible ampliamente cultivada alrededor del mundo, especialmente en México. Es un pez teleosteo del orden Perciforme y perteneciente a la familia Cichlidae. Es originario de África, y habita la mayor parte de las regiones tropicales del mundo donde las condiciones son favorables para su reproducción y crecimiento. En México, la tilapia, fue introducida exitosamente en 1964 (Arredondo, 1996).

Las tilapias comprenden dos géneros diferenciados por el tipo de reproducción: incubación externa (en nido) e interna (incuban los huevos en la boca). Los primeros conservan el nombre genérico de *Tilapia*, mientras que los segundos se conocen actualmente con el nombre genérico *Oreochromis* y está formado

por las especies: *O. niloticus*, *O. mossambicus* y *O. aureus* (Morales et al., 1998).

Se ha comprobado que este organismo presenta capacidad para sobrevivir y crecer en condiciones fisicoquímicas variables. Además, soporta diversas manipulaciones y alteraciones en condiciones de cultivo. Por lo que este pez es conocido por su alta resistencia física, capacidad de adaptación, rápido crecimiento, resistencia a las enfermedades, elevada productividad, tolerancia a desarrollarse en condiciones de alta densidad, habilidad para sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno disuelto e intervalos amplios de salinidad, además de su capacidad para alimentarse de una gran variedad de productos, lo que la hace muy rentable para los acuicultores (Arredondo, 1996).

Las características de alta resistencia y su gran distribución en los cuerpos de agua de México y el mundo, convierten a la tilapia en un buen modelo para estudios de toxicidad y monitoreo de ecosistemas acuáticos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de plaguicidas en el mundo aumenta cada año. En México, la actividad agrícola ha provocado el uso extensivo de insecticidas y herbicidas. Sin embargo, se cuenta con poca información sobre el efecto tóxico de estas sustancias sobre los organismos acuáticos, especies que por su hábitat están en contacto constante con ellos debido a su arrastre hacia cuerpos de agua.

El sistema inmune es uno de los sistemas fisiológicos que reflejan fácilmente el daño en los organismos por la exposición a contaminantes. Debido a su amplia distribución y a su importancia económica, la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) representa un buen modelo para estudiar el efecto inmunotóxico de los plaguicidas.

La atrazina es uno de los herbicidas mas utilizados en nuestro país, no obstante sus efectos nocivos están poco estudiados. Por lo que es importante evaluar el efecto de la exposición a atrazina sobre parámetros de la respuesta inmune.

HIPÓTESIS

La exposición aguda de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) a concentraciones subletales de atrazina provoca una disminución en el peso relativo del bazo, concentración de esplenocitos, capacidad proliferativa de esplenocitos, concentración de IgM y liberación de especies reactivas de oxígeno.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la exposición aguda (96 h) de atrazina sobre parámetros inmunológicos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la CL_{50} (concentración letal media) de atrazina para tilapia nilótica.
- Cuantificar el peso relativo del bazo y concentración de esplenocitos de tilapia nilótica expuesta a concentraciones subletales de atrazina durante 96 h.
- Evaluar el efecto de la exposición *in vivo* e *in vitro* de atrazina sobre la capacidad proliferativa de esplenocitos de tilapia nilótica.
- Determinar la concentración de IgM en plasma de tilapia nilótica expuesta a atrazina.
- Evaluar la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en fagocitos de tilapia nilótica expuesta a concentraciones subletales de atrazina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron tilapias juveniles, con un peso de 80 a 120 gramos, las cuales fueron proporcionadas por la empresa *Aquamol S.A. de R.L.* Una vez en el laboratorio, los peces se colocaron en estanques de 40 L, con aireación constante, a 28 °C. Bajo estas condiciones, los organismos fueron aclimatados por un periodo de 2 semanas.

Determinación de la CL₅₀

Para determinar la CL₅₀ de atrazina para tilapia nilótica, inicialmente se realizaron experimentos en los cuales se evaluó la mortalidad provocada por concentraciones desde 4.3 hasta 11.0 mg/L de atrazina (Hazardous Substances Databank, 1995); para esto se expusieron 5 organismos a cada una de las concentraciones durante 96 h. Una vez obtenidas los valores probables para la CL₅₀, se expusieron 10 peces a 3 diferentes concentraciones de atrazina (10.0, 10.5 y 11.0 mg/L) y se observó la respuesta de los organismos durante 96 h, periodo en el cual se determinó el número de organismos muertos. Los bioensayos se realizaron por triplicado y la CL₅₀ se determinó mediante el método estadístico PROBIT.

Para determinar el posible efecto inmunotóxico de atrazina, los peces (n=10) fueron expuestos a una octava parte de la concentración letal 50 (1/8 CL₅₀), así como a un dieciseisavo de la misma (1/16 CL₅₀).

Peso Relativo del Bazo

El bazo de peces expuestos a las dos concentraciones del plaguicida, 1/8 y 1/16 de la CL₅₀, (n=10) y de organismos control (n=10) fueron obtenidos en condiciones asépticas y colocado en una caja de Petri de peso conocido. El valor obtenido fue dividido entre el peso total del pez. El peso del órgano linfoide de los peces intoxicados se comparó con los valores obtenidos de peces no expuestos al herbicida.

La formula utilizada fue la siguiente:

$$PRB = [(peso\ del\ bazo) / (peso\ del\ pez)] (100)]$$

Ensayos del efecto de atrazina sobre la linfoproliferación *in vivo*

La capacidad proliferativa de esplenocitos de tilapia expuesta a atrazina, se evaluó utilizando la metodología descrita por Carmichael (1987). Bajo condiciones asépticas se obtuvo el bazo de peces (n=10) expuestos a 1/8 CL₅₀ y 1/16 CL₅₀ de atrazina y organismos control. Los bazos fueron disgregados y las células mononúcleares fueron obtenidas por gradiente de densidad (Boyüm, 1968) usando Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich Co.). La concentración de células mononúcleares por mililitro fue determinada por conteo en hemocitómetro. 1×10^6 de células se resuspendieron en RPMI-1640 (Invitrogen) adicionado con 2% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich Co.) y antibióticos, se estimularon con 20 ng/mL de forbol-myristato-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich Co.) y 1.0 µg/mL de Ionomicina (Sigma-Aldrich Co.). Colocadas en una placa

de 96 pozos, las células se incubaron durante 72 h en atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de humedad a 28 °C. Pasado este tiempo, se agregó 5 mg/mL de 3-(4,5-dimetiltiazolit-2)-2,5-bromuro difenil tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich Co.). 18 h después se agregaron 160 µL de solución reguladora (SDS-dimetilformamida) pH ácido, con el objetivo de diluir el formazán, compuesto sintetizado por las células que proliferaron. La densidad óptica fue determinada a 570 nm en un lector de microplacas OpsysMR (DYNEX technologies).

Para obtener el índice de proliferación (IE), la densidad óptica de los cultivos estimulados con los mitógenos, fue dividida entre la densidad óptica de las células no estimuladas. Los índices de proliferación obtenidos de los peces expuestos se compararon con valores de peces control.

$$IE = \frac{\text{densidad óptica (nm) de células estimuladas}}{\text{densidad óptica (nm) de células no estimuladas}}$$

Ensayos del efecto de atrazina sobre la linfoproliferación *in vitro*

El bazo de peces (n=10) no intoxicados se obtuvo en condiciones asépticas, la metodología para evaluar el efecto de atrazina *in vitro*, fue similar a la descrita en el párrafo anterior, con la variante importante que, además de poner en contacto 1x10⁶ de células con mitógeno (20 ng/mL de PMA más 1.0 µg/mL de Ionomicina), las células también se expusieron a diferentes concentraciones de

atrazina (0.5 y 2.0 ppm) con 95% de pureza (Carfi et al., 2006). Los ensayos fueron realizados por triplicado y como control se utilizaron células estimuladas y no estimuladas con mitógeno, no expuestas al herbicida.

Los cultivos celulares fueron incubados en las condiciones ya descritas y la proliferación celular fue determinada con la técnica de MTT, el índice de proliferación se obtuvo dividiendo el valor de la absorbancia de las células expuestas al herbicida (estimuladas y no estimuladas con mitógeno) entre el valor de absorbancia de las células no expuestas al herbicida y no estimuladas con mitógeno.

$$IE = \frac{\text{densidad óptica (nm) de células estimuladas (expuestas y no expuestas a atrazina)}}{\text{densidad óptica (nm) de células no estimuladas (no expuestas a atrazina)}}$$

Linfoproliferación *in vivo*

1×10^6 células mononúcleares de bazo de tilapia expuesta a 1/8 y 1/16 de la CL_{50} de atrazina y organismos control se resuspendieron en RPMI y se colocaron una placa de 96 pozos

Linfoproliferación *in vitro*

1×10^6 células mononúcleares de bazo de tilapia control, resuspendidas en RPMI, se colocaron en una placa de 96 pozos

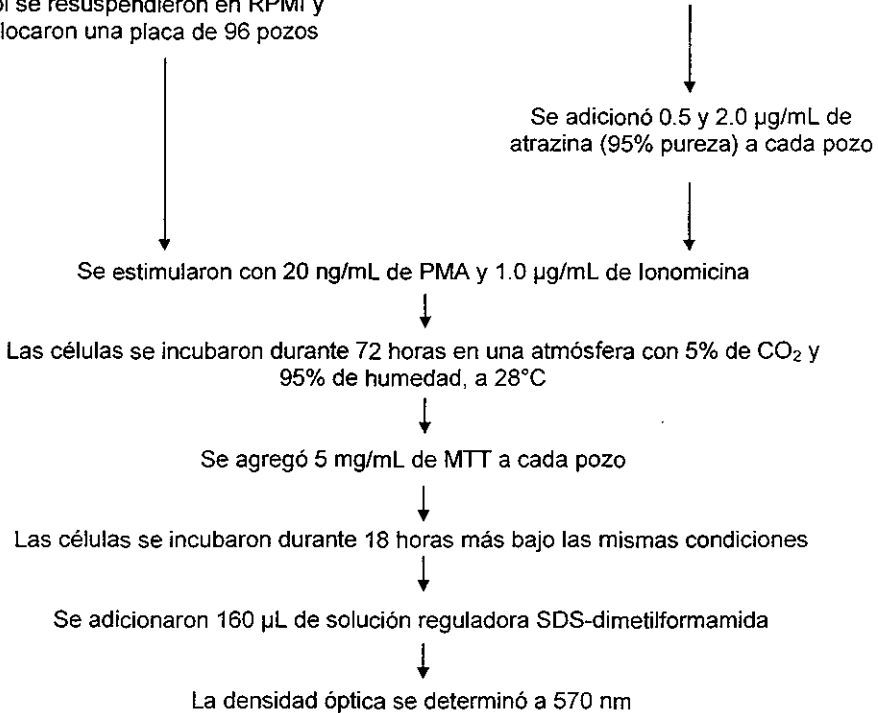


Figura 1. Diagrama de flujo: Ensayos de Linfoproliferación.

Concentración Total de IgM

La concentración total de IgM en plasma de tilapia, (organismos control y expuesta a 1/8 CL₅₀ y 1/16 CL₅₀ de atrazina), se determinó mediante el método de ELISA descrito por Takemura (1993).

Cada pozo de una placa de ELISA (Costar) fue cubierto con 100µL de α-IgM (6.8 µg/mL) disuelto en buffer de carbonato de sodio al 0.05 M, pH 9.6 e incubado a 25°C por 2 h. Los pozos fueron bloqueados con 200 µL de BSA (Sigma-Aldrich Co.) al 1% disuelto en buffer salino de fosfatos (PBS) a 10 mM, pH 7.4 y 0.05 % de Tween 20 (PBS-Tween). Las placas se dejaron reposar 60 minutos a 25 °C; se lavó tres veces con PBS-Tween. Finalmente, se adicionó a cada pozo, 100 µL de las muestras de plasma de tilapia (1:10000) o de anticuerpo estándar (IgM purificado de tilapia de concentración conocida), se incubó 24 h a 4 °C. Se agregó a cada pozo 100 µL de α-IgM conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (diluido 1:10,000 en PBS-Tween), se incubó 2 h a 25 °C, se realizaron tres lavados con PBS-Tween. Para medir la actividad de la enzima peroxidasa, se colocaron 100 µL de buffer de citratos 100 mM, pH 4.5, 0.01% de dicloruro de o-phenylenediamina (Sigma-Aldrich Co.) y 0.04% de H₂O₂. Después de un periodo de incubación de 30 min. a 25°C, la reacción enzimática fue detenida adicionando 25 µL de H₂SO₄ 4N. La densidad óptica de cada muestra fue determinada en un lector de microplacas OpsysMR (DYNEX technologies) a 490 nm. Mediante regresión lineal se llevo a cabo la conversión de densidad óptica a concentración de IgM.

Estallido Respiratorio

La liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por fagocitos de tilapia nilótica expuesta a atrazina, se evaluó por medio de la técnica de reducción de NBT (Nitro azul de tetrazolio) descrita por Rook, et al. (1985) y modificada por Fatima, et al. (2000). Se obtuvo el bazo de peces expuestos (1/8 CL₅₀ y 1/16 CL₅₀ de atrazina), así como del grupo control. El órgano linfoide se disgregó y las células mononucleares se obtuvieron mediante gradiente de densidad usando Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich Co.). La concentración de células fue determinada por conteo en hemocitómetro. Se colocaron 2X10⁶ de células de cada organismo, en tubos eppendorf. Se añadieron 500 µl de PBS conteniendo 0.1% de NBT y 3X10⁶ de levaduras *Candida albicans*. Las preparaciones se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h y se agitaron periódicamente. Posteriormente, las suspensiones celulares se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min. Las células se lavaron con metanol al 70%, y se incubaron a 60 °C, en calor seco, durante 15 min. Se agregaron 450 µl de NaOH 2M. y las suspensiones celulares se sonicaron durante 10 min. Se agregaron 500 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y las muestras se centrifugaron 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 espectrofotómetro a 630 nm. Como controles se utilizaron preparaciones de levaduras con NBT y en ausencia de células, así como células en presencia de NBT y en ausencia de levaduras.

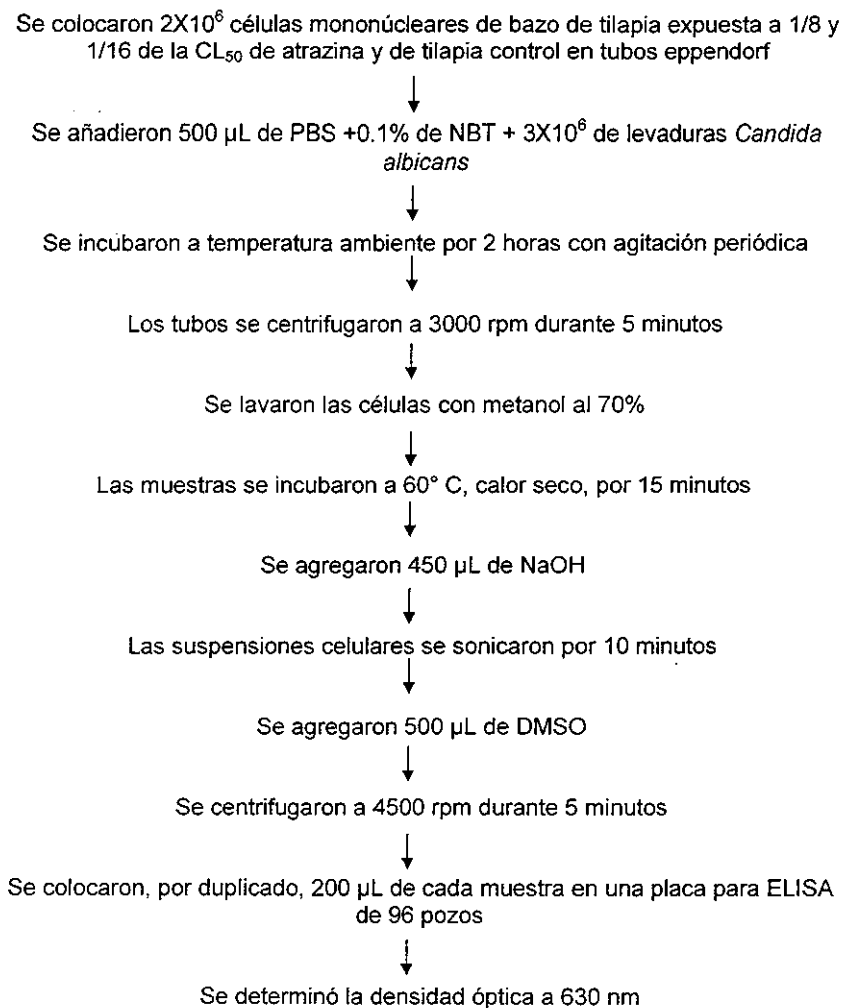


Figura 3. Diagrama de Flujo: Estallido Respiratorio (*Reducción de NBT*).

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía con el programa Sigma Stat 2.0[®]. En el caso de obtener diferencias significativas, se utilizó la prueba de diferencia mínima de medias de Tukey. Se consideró diferencia estadísticamente significativa entre grupos cuando el valor de p fue menor a 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTADOS

La Concentración Letal media (CL_{50}) es la concentración a la cual la mitad de los organismos expuestos muere. El resultado obtenido indicó que la CL_{50} de atrazina para la tilapia nilótica es de 10.5 mg/L (Fig. 4).

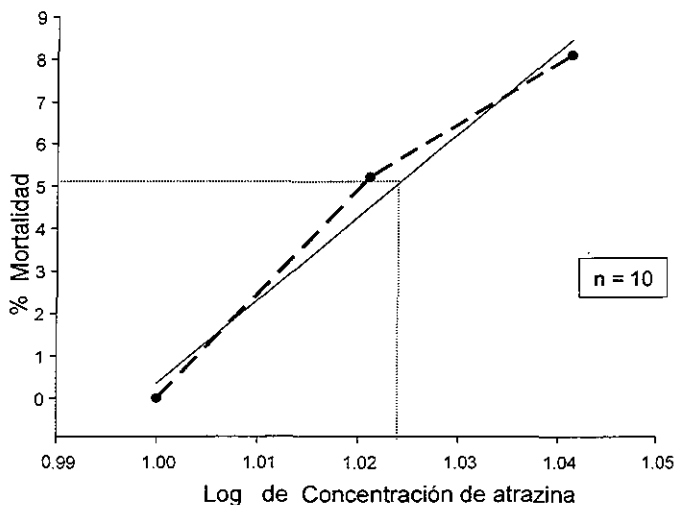


Figura 4. CL_{50} de atrazina para tilapia nilótica. Los peces fueron expuestos a distintas concentraciones de atrazina (10.0 mg/mL, 10.5 mg/mL y 11.0 mg/mL) y la cantidad de muertes fue contabilizada. El Log 10 de dichas concentraciones se graficó en el eje de las "X", mientras que el Probit empírico, equivalente al % de mortalidad se gráfico en el eje de las "Y". El ajuste de la recta se realizó por el método de mínimos cuadrados, utilizando la ecuación de la recta $Y=mX + b$.

Los resultados indican que la exposición a 1.32 mg/L y 0.656 mg/L de atrazina, en las condiciones evaluadas, no afecta significativamente ($p > 0.05$) el PRB, ni la concentración de células mononucleares presentes en el órgano (Fig. 5).

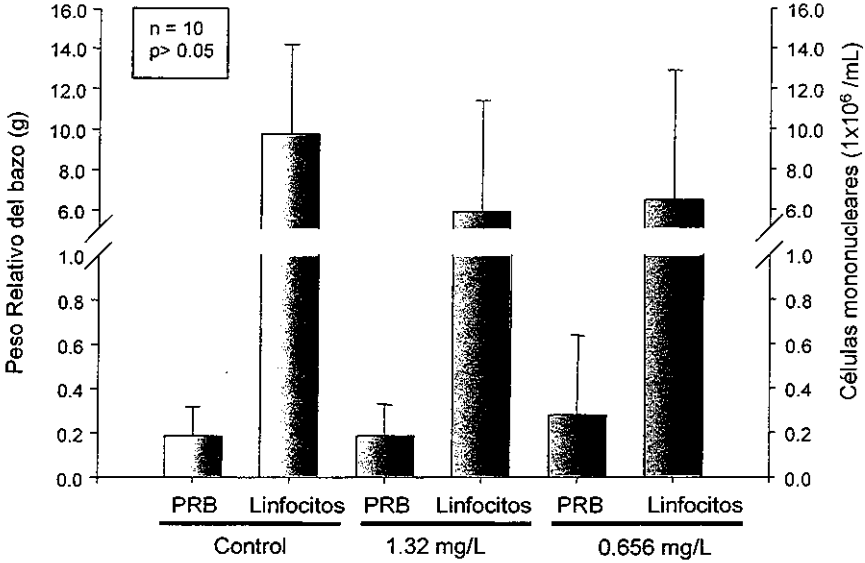


Figura 5. Peso relativo del bazo y número de células mononucleares (10^6) por mililitro en peces expuestos durante 96 h a atrazina (1.32 mg/mL y 0.656 mg/mL) y peces control. Los resultados son mostrados como media \pm desviación estándar.

Para evaluar el efecto de la exposición *in vivo* de tilapia nilótica a atrazina, los peces se expusieron al herbicida y los índices de proliferación se determinaron mediante la técnica de MTT. Los resultados indican que la exposición *in vivo* al herbicida, en las concentraciones probadas, no afecta significativamente la capacidad de respuesta a estímulos mitogénicos (PMA + ionomicina) por parte de las células mononucleares de tilapia (Fig. 6).

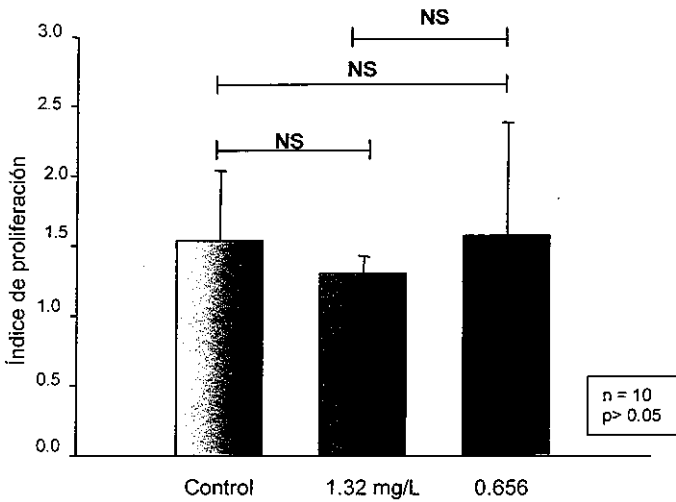


Figura 6. Índice de proliferación de células mononucleares de tilapia nilótica expuesta *in vivo* durante 96 h a 1.32 mg/L y 0.656 mg/L de atrazina. Las células fueron estimuladas con PMA (20 ng/mL) más ionomicina (1 µg/mL), y el índice se determinó mediante la técnica de MTT.

De igual forma, nuestros resultados indican que la exposición *in vitro* a atrazina, en las condiciones evaluadas, no afecta significativamente ($p > 0.05$) la capacidad de respuesta a los estímulos mitogénicos probados (Fig. 7).

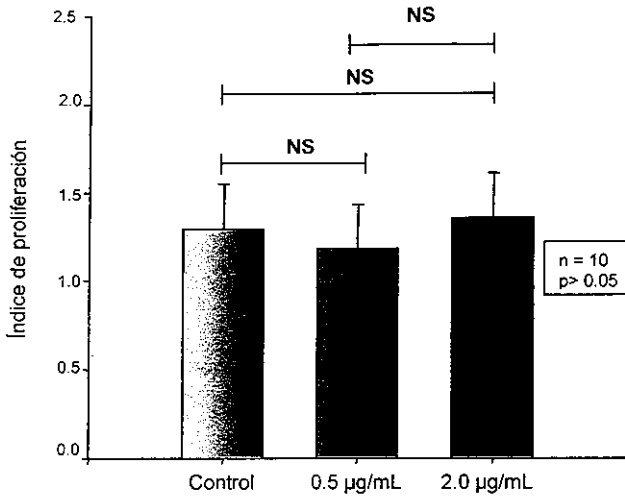


Figura 7. Índice de proliferación de células de tilapia expuesta *in vitro* a 0.5 µg/mL y 2.0 µg/mL de atrazina con 95% de pureza. Las células fueron expuestas al plaguicida y estimuladas con PMA (20 ng/mL) más ionomicina (1 µg/mL) durante 72 h. El índice de proliferación se determinó mediante la técnica de MTT. Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar.

Para evaluar el efecto de atrazina sobre la concentración de anticuerpos presentes en plasma de tilapia se determinó la concentración de IgM mediante el método de ELISA. Los resultados obtenidos indican que el herbicida, en las condiciones evaluadas, no afecta los niveles de IgM en plasma de tilapia nilótica (Fig. 8).

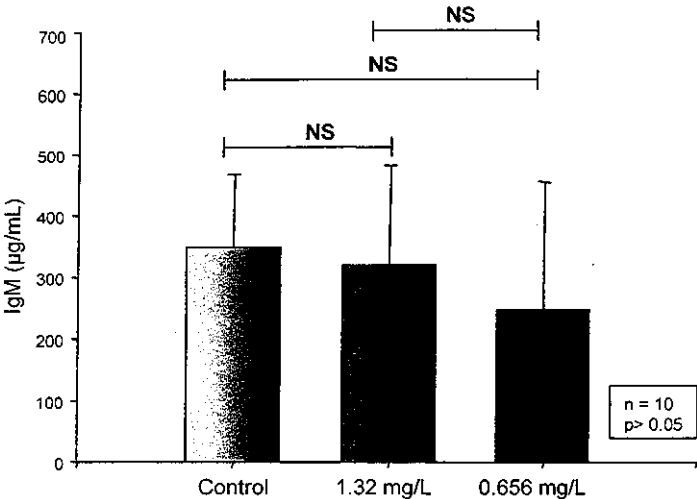


Figura 8. Concentraciones de IgM (µg/ml) presente en plasma de tilapia nilótica expuesta a atrazina (1.32 mg/L y 0.656 mg/L) durante 96 h. La determinación se realizó mediante ELISA tipo sándwich. Los valores son mostrados como media ± desviación estándar.

Los resultados obtenidos sobre la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) indican que la exposición a atrazina, en las concentraciones ya mencionadas, disminuye significativamente ($p < 0.05$) la liberación ROS por parte de células de bazo de tilapia nilótica expuesta a atrazina (Fig. 9).

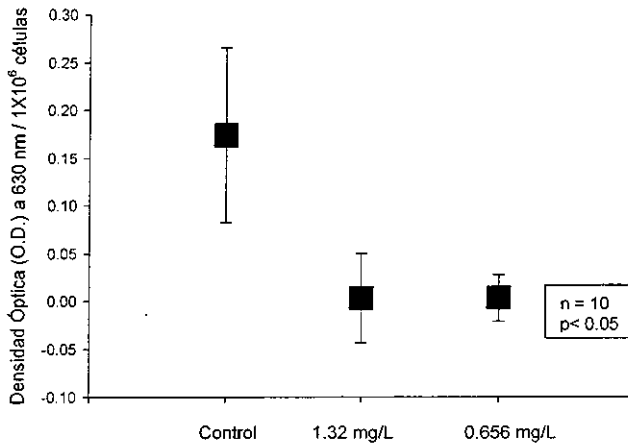


Figura 9. Liberación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en células mononucleares de bazo de tilapia nilótica expuesta a 1.32 mg/L y 0.656 mg/L de atrazina. La determinación se realizó mediante la técnica de NBT. Los resultados se muestran como media \pm desviación estándar.

DISCUSIÓN

La atrazina es uno de los herbicidas más utilizados en el mundo (Filipov et al. 2005); sin embargo, existen pocos estudios que evalúen el efecto de esta sustancia sobre los organismos acuáticos.

En el presente trabajo se determinó la toxicidad de atrazina, a través de la CL_{50} , y se evaluó el efecto de esta sustancia sobre la respuesta inmune de tilapia nilótica.

Los resultados obtenidos muestran que la CL_{50} de atrazina en 96 h de exposición para tilapia nilótica, en estadio juvenil (80-120 gramos de peso), es de 10.5 mg/L. Este valor es similar al reportado por Prasad, et al. (1994), quienes determinaron que la CL_{50} de atrazina, grado técnico, para *Oreochromis mossambicus* (10 ± 2 g) es de 8.8 mg/L; la ligera variación puede ser atribuida a la diferencia entre especies así como a diferencias en el peso de los organismos.

Así, se determinó que la atrazina presenta toxicidad leve a moderada según la tabla de categorías de toxicidad para organismos acuáticos. Dicha clasificación es igual a la establecida por la EPA para el herbicida (Environment Protection Agency, 2007).

Los resultados obtenidos muestran que la exposición aguda (96 h) a atrazina (1.32 y 0.656 mg/L) no disminuyó significativamente el peso relativo del bazo y número de células mononucleares presentes en el órgano linfóide, no obstante los resultados sugieren una tendencia a disminuir ambos parámetros en peces expuestos al herbicida. Numerosos datos coinciden con los obtenidos en nuestros experimentos. Estudios realizados en ratones hembras C57B1/6, de

8-10 semanas de edad, los cuales fueron expuestos a dosis única de 875.0-27.3 mg/Kg de peso (1/2-1/64 DL₅₀) de atrazina con 85.5% de pureza, muestran que la exposición al herbicida no induce cambios en el peso relativo del órgano linfóide, así como en el número y viabilidad celular (Fournier, et al., 1992). Sin embargo, estudios realizados en ratones hembra B6C3F1, a los cuales se administraron dosis de 25, 250 y 500 mg/Kg/día durante 14 días, señalan que el herbicida con exposición prolongada provoca una disminución significativa dosis-dependiente en el peso relativo de bazo y timo de ratón (Karrow et al., 2005).

Los resultados contrastantes de los experimentos realizados en ratón, sugieren que atrazina podría afectar el peso de órganos linfoides cuando los organismos están expuestos crónicamente al herbicida. No obstante, en peces no existen estudios que evalúen el efecto de atrazina en estas condiciones de exposición.

El mecanismo de acción de la atrazina sobre células animales podría ser interfiriendo con el oxígeno molecular presente en las células lo que podría menguar sus capacidades fisiológicas y funcionales. A bajas dosis dicho efecto podría no ser severo ni irreversible, permitiendo a las células realizar sus funciones básicas. Sin embargo, altas dosis podrían ocasionar daños significativos en órganos y tejidos.

Los valores obtenidos en nuestro estudio del efecto de atrazina *in vivo* e *in vitro* sobre la linfoproliferación muestran que, en las concentraciones y condiciones ensayadas, el herbicida no afecta la capacidad de respuesta celular al estímulo mitogénico de PMA más Ionomicina. No existen estudios publicados en donde

se evalúen parámetros similares en peces. Sin embargo, estudios realizados en dos especies de anfibios, *Xenopus laevis* y *Rana pipiens*, indican que la exposición durante 7, 14 y 21 días a una mezcla que contiene atrazina (21 ppb), metribucina (0.56 ppb), aldicarb (17 ppb), dieldrin (0.15 ppt), endosulfán (0.02 ppt) y lindano (0.33 ppt), afectó significativamente la proliferación de linfocitos de *Rana pipiens*; no obstante, los linfocitos de *X. laevis* no fueron afectados en presencia de la mezcla de plaguicida. Con estos datos no se puede inferir el efecto particular del herbicida atrazina, debido a que puede presentarse un efecto tóxico sinérgico entre los plaguicidas (Christin et al., 2004). Por otro lado, estudios realizados en ratones hembra de la cepa B6C3F1, expuestos a 24, 250 y 500 mg/kg/día de atrazina, durante 14 días, señalan que la capacidad proliferativa de esplenocitos estimulados con Concanavalina A o lipopolisacárido no se afecta significativamente (Karrow et al., 2005). De esta manera, los resultados obtenidos y los referidos en la bibliografía sugieren que la atrazina no afecta la capacidad linfoproliferativa. Sin embargo, el índice de estimulación tan bajo que muestran los controles (<1.5) no permite inferir conclusiones válidas a partir de nuestros resultados.

La concentración de IgM presente en plasma de tilapia nilótica expuesta durante 96 h a atrazina, en las concentraciones ya mencionadas, no se alteró significativamente, en comparación con los peces control; sin embargo, los datos muestran una tendencia negativa dosis-dependiente.

En un estudio realizado con pez dorado (*Carassius auratus*) expuesto durante 4 semanas a una mezcla de herbicidas, constituida por atrazina, simazina, diurón e isoproturon (cada uno a una concentración de 50 µg/L), se observó

una disminución significativa en los títulos de anticuerpos contra eritrocitos de borrego (Fatima et al., 2006). Por otro lado, en un estudio reportado por Karrow et al. (2005), se muestra que la concentración de IgM presente en suero de ratones hembra de la cepa B6C3F1, tratados con 25, 250 y 500 mg/Kg/día de atrazina durante 11 días, no disminuye significativamente con respecto al grupo control. Dadas las diferencias en cuanto a organismo modelo, protocolos experimentales, así como los pocos estudios publicados; no podemos inferir el efecto de atrazina sobre la producción de anticuerpos. Por lo que sería importante evaluar nuevamente las determinaciones de la concentración de IgM después de diferentes tiempos de exposición al herbicida (exposición aguda y crónica), así como determinar los niveles de inmunoglobulina después de la estimulación con sustancias inmunogénicas.

En el presente trabajo se determinó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), a través de la reducción de NBT. Los resultados obtenidos indican una disminución significativa en la producción de ROS en células de tilapia expuesta a atrazina, en comparación con las células de peces control.

Resultados similares fueron reportados en el molusco acuático, *Lymnaea stagnalis* (Gasterópoda), el cual fue expuesto a 10, 23, 50 y 100 µg/L de atrazina, durante 24, 96 y 504 h (Russo & Lagadic, 2004).

A pesar de que no se conoce un mecanismo de toxicidad de atrazina para células animales está bien establecido que este herbicida inhibe la producción de ATP y NADP⁺ presentes en la membrana de cloroplastos de células vegetales, esto provoca el aumento en la producción oxígeno molecular (O₂),

ocasionando la desecación de la planta (Bassard et al., 2003). Dado que moléculas similares están presentes en células animales, la atrazina podría provocar alteraciones en las mismas; pero a diferencia de lo que está establecido en vegetales, el herbicida podría disminuir la liberación de oxígeno molecular (O_2), de H_2O_2 y de radicales hidroxilo (OH^*), y con ello el estallido respiratorio de las células fagocíticas. Sin embargo, este mecanismo no está comprobado.

Es necesario realizar más estudios que permitan comprender el efecto adverso de los herbicidas, sobre los ecosistemas y sus poblaciones. Solamente a partir del conocimiento de ello podremos tomar medidas para prevenirlo.

CONCLUSIONES

- La atrazina es moderadamente tóxica para tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (CL_{50} =10.5 mg/L).
- La exposición aguda (96 h) a 1.32 mg/L y 0.656 mg/L de atrazina no afectó a la mayoría de los parámetros inmunológicos determinados. No se disminuye el peso relativo del bazo, la concentración de esplenocitos, la concentración de IgM presente en plasma de tilapia nilótica, así como tampoco se afecta negativamente la capacidad proliferativa de esplenocitos de dicha especie.
- La exposición a atrazina en las condiciones evaluadas reduce significativamente la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células mononucleares.

ANEXO I

Valores reportados para distintas concentraciones de Atrazina en cuerpos de agua ($\mu\text{g/L}$) y sedimentos ($\mu\text{g/Kg}$) de Estados Unidos y Canadá. Tomado de Graymore, et. al. 2001.

Cuerpo de agua	País	Concentración de atrazina	Comentarios	Referencia
Reservorios de agua para beber	EUA	> 88.4 $\mu\text{g/L}$		Fisher-Scherf et al. (1991)
Pozos de agua subterránea	EUA	0.1-88 $\mu\text{g/L}$	Agricultura intensa, incluyendo los estados del cinturón maicero	Readman et al. (1993) Chapman & Stranger (1992)
Ríos				
Pozos públicos de Kansas		0-100 $\mu\text{g/L}$		
Pensilvania	EUA	> 16 $\mu\text{g/L}$		Chapman & Stranger (1992)
Pozos subterráneos	EUA	0.013-1.11 $\mu\text{g/L}$	Agricultura	Chapman & Stranger (1992)
Maryland		> 3 $\mu\text{g/L}$		Pionke et al. (1988)
Pozos subterráneos	EUA	< 0.5-2.0 $\mu\text{g/L}$	Producción de maíz con uso de atrazina permanente	Chapman & Stranger (1992)
Agua subterránea "Big Springs"				
Virginia	EUA	2.5-10 $\mu\text{g/L}$		Ritter et al. (1996)
Pozos subterráneos				
Nebraska - agua subterránea	EUA	0-25.6 $\mu\text{g/L}$	Agricultura	Ritter et al. (1996)
Wisconsin - agua subterránea				
EUA - 1 22 río	EUA	8.8 $\mu\text{g/L}$	Pozos	Pionke et al. (1988)
	EUA	140 $\mu\text{g/L}$	Pozos	Pionke et al. (1988)
EUA - cinturón maicero			52% de los sitios excedieron	Thurman et al. (1991, 1992)
Río Mississippi	EUA	> 3 $\mu\text{g/L}$	3 $\mu\text{g/L}$ en el cinturón maicero EUA	Thurman et al. (1991, 1992)
			Varios sitios	Readman et al. (1993)
	EUA	0.1 - 108 $\mu\text{g/L}$	Tierras de cultivo (maíz, soya, sorgo, maíz y algodón)	Pereira & Hostettler (1993)
Río Mississippi	EUA	0.54 - 1.32 $\mu\text{g/L}$		
Río Yazoo - Mississippi			En Baton Rouge, Louisiana	Larson et al. (1995)
			Área agraria	Pereira & Hostettler (1993)
EUA - Midwestern	EUA	3.6 $\mu\text{g/L}$		Pereira & Hostettler (1990)
Ohio - Río Sandusky	EUA	0.157-0.229 $\mu\text{g/L}$		Solomon et al. (1996)
Ríos de Ohio			Cinturón maicero - ríos y arroyos	Solomon et al. (1996)
Ohio - Río White	EUA	2.0 $\mu\text{g/L}$	Área agraria	Chapman & Stranger (1992)
Ohio - Río Ohio	EUA	> 24 $\mu\text{g/L}$	Área agraria	Larson et al. (1995)
Iowa - Arroyo Roberts	EUA	11.3 $\mu\text{g/L}$	Área agraria	Larson et al. (1995)
Iowa - Río Iowa	EUA	0.054 - 18 $\mu\text{g/L}$	Área agraria	Kolpin & Kalkhoff (1993)
Iowa - Río De Moines	EUA	0.255 - 3.3 $\mu\text{g/L}$	Área agraria	Pereira & Hostettler (1993)
Iowa - Pozos	EUA	0.09 - 8.94 $\mu\text{g/L}$	Área agraria	Pereira & Hostettler (1993)
Nebraska - Río Platte	EUA	0.715 $\mu\text{g/L}$	Área agraria	Paterson et al. (1992)
California del Sur - Bahía Winyah	EUA	1.45 $\mu\text{g/L}$	Área agraria	Davies et al. (1993)
California del Sur - Norte	EUA	1.14 $\mu\text{g/L}$	Área agraria	Kucklick & Bidlemore (1994)
California del Sur - Río Pee Dee	EUA	1 - 18.9 $\mu\text{g/L}$	Bahía donde desembocan desechos agrícolas	Kucklick & Bidlemore (1994)
Río Minnesota				Kucklick & Bidlemore (1994)
Wisconsin - varios ríos	EUA	0.001-0.104 $\mu\text{g/L}$		Kucklick & Bidlemore (1994)
	EUA	0.003-0.748 $\mu\text{g/L}$		
Illinois - varios ríos			Minnesota	Schottler et al. (1994)
Arroyos Vermont	EUA	0.899 - 6.5 $\mu\text{g/L}$	St. Croix, Chippewa y ríos de Wisconsin	Pereira & Hostettler (1993)
EUA - Midwestern	EUA	0.217-0.278 $\mu\text{g/L}$		
Sedimentos de la Bahía Chesapeake	EUA	0.404-4.735 $\mu\text{g/L}$	Rock, Illinois y río Kaskaskia	Pereira & Hostettler (1993)
Sedimentos cultivivos - Kansas	EUA	< 1 - 7 $\mu\text{g/L}$	Atrazina es usada comúnmente	Gruessner & Watzin (1996)
Ontario - pozos de agua potable	EUA	0.05 - 11.9 $\mu\text{g/L}$	Reservorios	Salomon et al. (1996)
	EUA	< 799 $\mu\text{g/Kg}$	Actividades industriales y agrícolas intensivas	Douglas et al. (1993)
Ontario y Québec - Arroyos			Área agrícola	Douglas et al. (1993)
Ontario - Río Sydenham	EUA	1068 $\mu\text{g/Kg}$	Área agrícola con uso constante de atrazina por 20 años	Lakshminarayana et al. (1992)
Ontario - precipitaciones	Canadá	< 0.001-4.2 $\mu\text{g/L}$		Belluck et al. (1991) Hamilton et al. (1987)
Ontario - Arroyos urbanos				
Ontario - pozos rurales	Canadá	0.1 - 30.3 $\mu\text{g/L}$	Agrícola con uso de atrazina	Chapman & Stranger (1992)
Notario - pozos	Canadá	2.3 - 81 $\mu\text{g/L}$	Precipitación - 17 muestras	Hall et al. (1993)
Río St. Lawrence	Canadá	> 445 $\mu\text{g/L}$		
Descargas Río St. Lawrence			Kintore	
Arroyo Nissouri			Área agrícola	Chapman & Stranger (1992)
	Canadá	0.1 - 57 $\mu\text{g/L}$		Belluck et al. (1991)
	Canadá	0.1 - 74 $\mu\text{g/L}$	Muestras de río	Lemicux et al. (1995)
	Canadá	> 0.033 $\mu\text{g/L}$		Lemicux et al. (1995)
	Canadá	> 0.536 $\mu\text{g/L}$	Corre por área agrícola	Ng et al. (1995)
	Canadá	0.06 - 14.17 $\mu\text{g/L}$		

Valores reportados para distintas concentraciones de Atrazina en cuerpos de agua ($\mu\text{g/L}$) y sedimentos ($\mu\text{g/Kg}$) de Europa y África. Tomado de Graymore, et. al. 2001.

Cuerpo de agua	País	Concentración de atrazina	Comentarios	Referencia
Agua superficial	Inglaterra	0.2 – 1.4 $\mu\text{g/L}$	Área agrícola	Chapman & Stranger (1992)
Agua subterránea		0.2 – 0.5 $\mu\text{g/L}$		
Varios lagos	Suiza	0.001-0.46 $\mu\text{g/L}$	Alta concentración en zonas agrícolas	Chapman & Stranger (1992)
Varios ríos	Eslovenia	1 – 6 $\mu\text{g/L}$	Incremento reciente en agricultura y uso de atrazina	Zagagarc-Koncan (1996)
Agua subterránea (varios)	Alemania	> 0.5 $\mu\text{g/L}$	Atrazina utilizada ampliamente hasta 1991	Fisher-Scherl et al. (1991) Steinberg et al. (1995)
Agua superficial (varios)		> 1.5 $\mu\text{g/L}$		
Ebro Canal de drenaje	España	0.058-0.308 $\mu\text{g/L}$	Principalmente agrícola (arroz)	Readman et al. (1993)
Río Ebro		0.017-0.190 $\mu\text{g/L}$		
Delta de Lagunas Ebro		< 0.001-0.057 $\mu\text{g/L}$		
Delta del Ebro - sedimentos	España	0.015 – 0.07 $\mu\text{g/Kg}$	Principalmente agrícola (arroz)	Readman et al. (1993)
Río Rhone	Francia	0.040 – 0.291	Muy poblada, área industrial y agrícola	Readman et al. (1993)
Delta del río Rhone		0.017 – 0.386 $\mu\text{g/L}$		Tronczynski et al. (1993)
Río Rhone	Francia	12 – 33 ng/L	Región	Tronczynski et al. (1993)
Río Po	Italia	0.021 – 0.118 $\mu\text{g/L}$	Industrializada y muy cultivada, varios cultivos	Readman et al. (1993)
Adriatic norte		<0.003-0.018 $\mu\text{g/L}$	Atrazina dejó de usarse en 1989	Brambilla et al. (1993)
Ríos Axios, Loudias y Río Afiakmon	Grecia	< 0.05 – 0.7 $\mu\text{g/L}$	Agrícola-maíz, algodón, fruta, arroz, tabaco y horticultura. Golfo Thermaikos.	Readman et al. (1993)
Ríos Louros y Arachthos	Grecia	< 0.05 – 0.26 $\mu\text{g/L}$	Agricultura intensiva. Incluye cítricos, olivos, maíz, alfalfa y algodón.	Readman et al. (1993)
Golfo Amvrakikos		< 0.05 – 0.8 $\mu\text{g/L}$		
Golfo Thermaikos – sedimentos	Grecia	< 0.02 – 4.9 $\mu\text{g/Kg}$		Readman et al. (1993)
Golfo Amvrakikos - sedimentos	Grecia	0.8 – 2.4 $\mu\text{g/Kg}$		Readman et al. (1993)
Delta del río Nilo	Egipto	< 0.001 $\mu\text{g/L}$	Agricultura, principalmente algodón. Industrial.	Readman et al. (1993)
Delta del río Nilo - sedimentos	Egipto	< 0.001 $\mu\text{g/Kg}$		Readman et al. (1993)

Valores reportados para distintas concentraciones de Atrazina en cuerpos de agua ($\mu\text{g/L}$) y sedimentos ($\mu\text{g/Kg}$) de Australia. Tomado de Graymore, et. al. 2001.

Cuerpo de agua	País	Concentración de atrazina	Comentarios	Referencia
Irriagación Murrumbidgee	Australia	~ 150 $\mu\text{g/L}$ (maíz) ~ 45 $\mu\text{g/L}$ (arroz)	Agricultura intensiva, incluyendo maíz, y arroz	Chapman & Stranger (1992)
Shepparton	Australia	0.022 – 0.063 $\mu\text{g/L}$	Área agrícola	Chapman & Stranger (1992)
Pozos subterráneos				
Tazmania	Australia	< 0.01-53,000 $\mu\text{g/L}$	Plantaciones forestales	Davies et al. (1994)
Arroyos			Atrazina se usa extensivamente	
Tazmania	Australia	0.01 – 4.6 $\mu\text{g/L}$	Plantaciones forestales	Davies et al. (1994)
Gran Arroyo				
Tazmania	Australia	1.6 – 22 $\mu\text{g/Kg}$	Plantaciones forestales en el área	Davies et al. (1994)
Sedimentos Gran Arroyo		Por peso seco		

LITERATURA CITADA

- **Arredondo, F.J.L. & G.S. Lozano, 1996.** El cultivo de la tilapia en México. Primer curso internacional de producción de tilapia. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 7-9 en Casas S. J. 2002. Estudio comparativo de la respuesta inmune de cinco especies de Tilapia (*Oreochromis*). Tesis. Universidad de Guadalajara.
- **ATSDR, 2004.** Agency for Toxic Substances and Diseases Registry. En línea: www.atsdr.cdc.gov. Consultado: Agosto, 2007.
- **Bartual Sánchez, J. & M.J. Berenguer-Subilis, 2004.** Pesticidas: clasificación y riesgos principales. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Barcelona. Consultado: Junio, 2005.
- **Bols, N.C; J.L. Brubacher; R.C. Ganassin & E.J. Lee, 2001.** Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Develop. Comp. Immunol.* **25**: 853-873.
- **Bolyüm, A. 1968.** Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **97**: 77-89.
- **Carfi, M; A. Gennari; I. Malerba; E. Corsini; M. Pallardy; R. Pieters; H. Van Loveren; H.W. Vohr; T. Hartung & L. Gribaldo. 2006.** *In vitro* test to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. *Toxicol.* **229**: 11-22.
- **Carmichael, J; W.G. DeGraff; A. Gazdar; J. Minna & J. Mitchell, 1987.** Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.

- **Chèvre N; F. Gagne; P. Gagnon & C. Blaise. 2003.** Application of rough sets analysis to identify polluted aquatic sites based on battery of biomarkers: a comparison with classical methods. *Chemosphere*. **51**(1): 13-23.
- **Christin M.S; L. Ménard; A.D. Gendron; S. Ruby; D. Cyr; D.J, Marcogliese; L. Rollins-Smith & M. Fournier. 2004.** Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic Toxicology*. **67**: 33-43.
- **Das, P.C; W.K. McElroy & R.L. Cooper, 2000.** Differential Modulation of Catecholamines by Chlorotriazine Herbicides in Pheochromocytoma (PC12) cells *in vitro*. *Toxicol. Sci*. **56**: 324-331.
- **Delaplane, K.S. 2000.** Pesticide Usage in the United States: History, Benefits, Risks, and Trends. University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences. En línea: pubs.caes.uga.edu/caespubs/pubs/PDF/B1121.pdf. Consultado: Septiembre, 2007.
- **Du Preez, H. & H.J. Van Vuren, 1992.** Bioconcentration of atrazine in the banded tilapia, *Tilapia sparrmanni*. *Comp. Biochem. Physiol.* **101**(3): 651-655.
- **Environment Protection Agency, 2007.** En línea: www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_ders/toera_analysis_eco.htm. Consultado: Agosto, 2007.
- **Ellis, A.E. 1997.** The leucocytes of fish: A review. *J. Fish Biol.*, **11**: 453-491.

- **Fatima, M; S. N. Mandiki; J. Douxfils; F. Silvestre; P. Coppe & P. Kestemont 2007.** Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune-endocrine interactions in goldfish. Immune and antioxidant effects. *Aquat Toxicol.* **81**(2):159-67.
- **Fernández, A.B; I. de Blas & I. de Ruiz, 2002.** El sistema inmune de los teleósteos (1); células y órganos. *Aquatic.* **16**: 1-15.
- **Fitzsimmons, K. 2000.** Future trends of tilapia aquaculture in the Americas. *Tilapia Aquaculture in the Americas.* Vol. 2. The World Aquaculture Society. EU.
- **Fleeger, J.W; K,R, Carman & R.M. Nisbet, 2003.** Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci Total Environ;* **317**(1-3):207-33
- **Flipov, N.M; L.M. Pinchuk; B.L. Boyd & P.L. Crittenden, 2005.** Immunotoxic effects of short-term atrazina exposure in young male C57BL/6 mice. *Toxicological sciences.* **86**(2):324-332.
- **Fournier, M; J. Friberg; D. Girard; S. Mansour & K. Krzystyniak, 1992.** Limited immunotoxic potential of technical formulation of the herbicide atrazina (AAtrex) in mice. *Toxicology Letters.* **60**:263-274.
- **Girón-Pérez M.I. & G.P. Zaiteva, 2004.** La contaminación acuática y la inmunidad de los peces. *Scientia-CUCBA.* **6** (1-2): 83-90.
- **Graymore M; F. Stagnitti &G. Allinston, 2001.** Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International,* **26**:483-495.
- **Grobler-Van Heerden E; J. H. J. Van Vuren & H.H. Du Preez, 1991.** Bioconcentration of atrazina, zinc and iron in the blood of *tilapia sparrmanii* (Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **100**(3):629-633.

- **Hazardous Substances Databank. 1995.** U.S. National Library of Medicine. 8-17 en <http://extoxnet.orst.edu/pips/atrazine.htm>. Consultado: Junio, 2005.
- **ISCID, 2006.** Encyclopedia of Science and Philosophy. International Society for Complexity, Information and Design. En línea: <http://www.iscid.org/encyclopedia/> Consultado: Agosto 2007.
- **Jenkins, F; J. Smith; B. Rajanna; U. Shameem; K. Umadevi; V. Sandhya & R. Madhavi, 2003.** Effect of sublethal concentrations of endosulfan on hematological and serum biochemical parameters in the carp *Cyprinus carpio*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **70**: 993-997.
- **Kacmár, P; J. Pistl & I. Mikula, 1999.** Immunotoxicology and veterinary medicine. *Act. Vet. Brno.* **68**: 57-79.
- **Karrow, N.A; J.A. McCay; R.D. Brown; D.L. Musgrove; T.L.Guo;D.R. Germolec & K.L. White, 2005.** Oral exposure to atrazine modulates cell-mediated immune function and decreases host resistance to the B16F10 tumor model in female B6C3F1 mice. *Toxicology.* **209**(1):15-28.
- **Lindenmayer D. & M. Burgman, 2005.** Practical Conservation Biology. Capítulo 19: Sustainability and management. *CSIRO Publishing.* Australia.
- **Manske, M.K.; L. B. Beltz & K.R. Dhanwada, 2004.** Low-level atrazine exposure decreases cell proliferation in human fibroblasts. *Environ. Contam. Toxicol.* **46**: 438-444.
- **Morales, R; A. Arenal; R. Pimentel; I. Mendoza; A. Cruz; R. Martínez; F. Herrera; L. Taponés; M.P. Estrada & J. De la Fuente, 1998.** Caracterización del fondo genético de la línea de supertilapias

TESIS/UCBA

IG/03-F70. I caracteres morfométricos, merísticos y análisis de ADN. *Biotecnología aplicada*, **15**: 15-21 en Casas S. J. 2002. Estudio comparativo de la respuesta inmune de cinco especies de Tilapia (*Oreochromis*). Tesis. Universidad de Guadalajara.

- **Phyu Y. L; M. St. J. Warne & R.L. Lim, 2005.** Toxicity and bioavailability of atrazina and molinate to the freshwater fish (*Melanotenia fluviatilis*) under laboratory and simulated field conditions. *Science of the Total Environment*. **356**:86-99.
- **Prasad T. A. V. & D. C. Reddy, 1994.** Atrazine Toxicity on hydromineral balance of fish, *Tilapia mossambicus*. *Ecotoxicology and Environmental safety*. **28**:313-316.
- **Pruett, S.B; R. Fan; Q. Zheng; L.P. Myers & P. Hebert, 2003.** Modeling and predicting immunological effects of chemical stressors: characterization of a quantitative biomarker for immunological changes caused by atrazine and ethanol. *Toxicol Sci*. **75**(2):343-54.
- **Robledo, M & B. Romero. 2000.** Patrón de uso de plaguicidas en el municipio de San Blas. *IV Reunión de Investigación y Desarrollo Tecnológico de Nayarit*. 210.
- **Roitt, I; J. Brostoff & D. Male, 1998.** *Immunology*. Londres, UK. en Hudson Pélanne L. M. 2002. Use of the Immune System to Investigate the Toxicity Induced by Environmental Pollutants in Fish, Amphibian, and Mammalian Species. Tesis de maestría. Universidad de Virginia. EU.
- **Rook, G.A.W; J. Steele; S. Umar & H.M. Dockrell. 1985.** A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a

colorimetric assay for activation of human macrophages by γ -interferon.

Journal of Immunological Methods. **82**: 161-167.

- **Rooney, A.A; R.A. Matuika & R.W. Luebke, 2003.** Developmental atrazine exposure suppresses immune function in male, but not female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*. **76**(2):366-75.
- **Russo, J. & L. Lagadic, 2004.** Effects of environmental concentrations of atrazina on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environmental Pollution*. **127**:303-311.
- **Saxena, N.K & N. Seth, 2002.** Toxic effects of cypermetrin on certain hematologic aspect of fresh *Channa punctatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. **69**: 364-369.
- **Sinha, N; D. Narayan & K. Saxen, 1999.** Effect of endosulfanon the testis of grownig rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. **58**: 79-86.
- **Smits, J.E; K.J. Fernie; G. R. Bortolotti & T. A. Marchant, 2002.** Thyroid hormone suppression and cell-mediated immunomodulation in American Krestrels (*Falco sparverius*) exposed to PCBs. *Arch Environ. Contam. Toxicol*. **43**: 338-344.
- **Takemura, A. 1993.** Changes in an immunoglobulin M (IgM)-like protein during larval stages in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture*. **115**:233-241.
- **Tizard, I.R. 2002.** Inmunologia Veterinaria. Sexta Edición. McGraw-Hill. México.
- **Walker, C.H. 1996.** The use of biomarkers to measure the interactive effects of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **40**:65-70.

- **Waring C.P. & A. Moore. 2004.** The effect of atrazina on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water an after sea water transfer. *Aquatic Toxicology*. **66**:93-104.
- **Whalen, M. M; B. G. Loganathan; N. Yamashita & T. Saito, 2003.** Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides. *Chemico-Biological Interactions*, **145** (3):311-319.
- **Wiegand, C; E. Krause; C. Steinberg & S. Pflugmacher, 2001.** Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **49** (3):199-205.