

Generación: 2001 A

código: 093969324

---

**Universidad de Guadalajara**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y**  
**AGROPECUARIAS**

---



**“FUNCIÓN HEPÁTICA Y ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE CÉLULAS DE TILAPIA**  
**(*Oreochromis niloticus*) EXPUESTA A DIAZINÓN”**

---

**Tesis Profesional que para obtener el Título de**  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA**

José Alfredo Molina Sahagún

**Las Agujas, Zapopan, Jal. Enero de 2007**



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y**  
**Agropecuarias**

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura*  
*en Biología*  
734/ C. C. BIOLOGÍA

**C. JOSÉ ALFREDO MOLINA SAHAGÚN**  
**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: "Función hepática y actividad fagocítica de células de tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a diazinón" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **M en C. MANUEL IVÁN GIRÓN PÉREZ** y el Asesor /a es: **DRA. ANNE SANTERRE LUCAS** y el/la: **DRA. JOSEFINA CASAS SOLIS**.

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

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan., 30 de Junio del 2006.  
"2006. Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas.  
Don Benito Juárez García"

**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIADO EN BIOTECNIA

**DRA. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

**BIBLIOTECA CUCBA**

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

Dr. Carlos Álvarez Moya.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Carrera de Licenciado en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

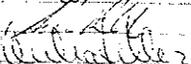
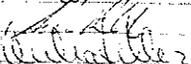
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS, opción TESIS con el título: **"FUNCIÓN HEPÁTICA Y ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE CÉLULAS DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) EXPUESTA A DIAZINÓN"** que realizó el/la pasante **José Alfredo Molina Sahagún** con número de código **093969324** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

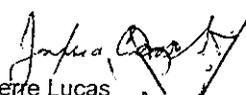
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente  
 Zapopan, Jalisco a 06 de Diciembre de 2006.

Firma   
 Nombre M en C Manuel Iván Girón Pérez  
 Director/a del trabajo

Firma   
 Nombre: Dra Anne Santerre Lucas  
 Dra. Josefina Casas Solís  
 Asesor(es)

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Edgardo Flores Torales		21 Dic / 06
M. en C. Aurora Rosas Ramírez		8 Dic / 06
M. en C. Martha Cecilia Téllez Bañuelos		8 Dic / 2006
Supl. Dra. Galina Petrovna Zaitseva		8 / 10 / 2006

  
 17 Dic 6 / 06  
 Carlos Álvarez Moya

**“FUNCIÓN HEPÁTICA Y ACTIVIDAD FAGOCÍTICA DE  
CÉLULAS DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)  
EXPUESTA A DIAZINÓN”**

**Alumno:**

**José Alfredo Molina Sahagún**

**Director:**

M. en C. Manuel Iván Girón Pérez

**Asesor(es):**

Dra Anne Santerre

Dra. Josefina Casas Solís

**El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunobiología  
Departamento de Biología Celular y Molecular  
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
Universidad de Guadalajara.**

### **FINANCIAMIENTO**

**El presente trabajo se realizó gracias al apoyo financiero de**

**PROPESTI-U de G. (2004, 2005) y**

**CONACYT-SEMARNAP (2004 C 01-035)**

**Se agradece, además, todo el apoyo proporcionado por el**

**COMITÉ DE SANIDAD ACUÍCOLA DE JALISCO A.C.**

**El presente trabajo se realizó bajo la colaboración de los Cuerpos Académicos de Biología de la Respuesta Inmune perteneciente a la Universidad de Guadalajara y Toxicología y Contaminación Acuática de la Universidad Autónoma de Nayarit.**

**Director:**

**M.C. Manuel Ivan Giron Pérez,**

**Universidad Autónoma de Nayarit.**

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis padres por su apoyo siempre incondicional.

A mis hermanos Cesar, Carlos y Guadalupe por ser siempre más que hermanos.

A mis grandes amigos Efraín, Santiago y Rafael.

Y a todos los maestros que colaboraron para llevar a cabo este trabajo

## INDICE

	Pagina
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCION	4
ANTECEDENTES	6
PLAGUICIDAS	6
PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS	7
DIAZINÓN	10
SISTEMA INMUNE Y FAGOCITOSIS EN PECES	11
INMUNOTOXICOLOGÍA Y PECES	14
Bioensayos y biomarcadores.	16
TILAPIA ( <i>Oreochromis spp</i> )	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
HIPOTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
METODOLOGÍA	22
RESULTADOS	26
Comportamiento de los organismos	
Determinación de la concentración letal 50 de diazinon en tilapia	
Efecto de diazinón sobre la actividad hepática:	
Efecto de diazinón sobre la actividad fagocítica	
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	36
LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS	37
BIBLIOGRAFIA	38

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1:** Condiciones experimentales del bioensayo

**Figura 1:** Rutas que sigue un tóxico en el organismo.

**Figura 2:** Estructura química de diazinón

**Figura 3:** Localización de los órganos linfoides de tilapia nilótica

**Figura 4:** Condiciones en las que son mantenidas (A) y capturadas (B) las tilapias en la granja acuícola Aquamol, S.C. de R.L.

**Figura 5:** Concentración letal 50 de diazinón para tilapia nilótica

**Figura 6:** Actividad de la enzima hepática Aspartato amino transferasa

**Figura 7:** Actividad de la enzima hepática Gama glutamin transferasa (GGT)

**Figura 8:** Actividad de la enzima hepática fosfatasa alcalina (ALP)

**Figura 9:** Actividad de la enzima hepática Alanino amino transferasa (ALT)

**Figura 10:** Concentración de proteínas plasmáticas en tilapia

**Figura 11:** Índice de fagocitosis de células presentes en sangre de tilapia nilótica

**Figura 12:** Porcentaje de células activas presentes en sangre de tilapia nilótica

**Figura 13:** Monocitos de sangre en tilapia

**Figura 14:** Monocitos de sangre en tilapia

## RESUMEN

La acuicultura se ha desarrollado rápidamente en los últimos años, lo que contribuye de manera significativa a la obtención de productos alimenticios con gran valor nutricional en respuesta a la creciente demanda de la población humana.

Los teleosteos engloban a la mayoría de los peces cultivados y entre ellos se encuentra la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), apreciada por su reproducción, crecimiento elevado, resistencia a la manipulación y a diferentes enfermedades de origen biótico o abiótico; así como a las condiciones estresantes de una granja acuícola.

El número de compuestos químicos liberados al medio ambiente aumenta año con año. Muchos de estos son los plaguicidas, empleados para el combate de plagas agrícolas y urbanas. Uno de los efectos nocivos ecológicos más importantes provocados por los plaguicidas, son los daños a los organismos acuáticos; la susceptibilidad de los peces a enfermedades aumenta en presencia de contaminantes en el agua.

El diazinón es un insecticida organofosforado extensivamente utilizado en México, altamente tóxico para los organismos acuáticos, que frecuentemente llega a contaminar los cuerpos de agua o las granjas en las cuales se cultiva *O. niloticus*, afectando el rendimiento de las mismas.

Lo anterior se podría deber en parte a que el diazinón modula de manera negativa la función hepática y la respuesta inmune, en particular la actividad fagocítica, uno de los procesos más importantes del sistema inmune y en general la fisiología de estos organismos.

Por lo anterior en el presente trabajo se estudió el efecto de la exposición aguda por diazinón sobre la función hepática y actividad fagocítica de células de tilapia. Los resultados experimentales indican que de las actividades de cuatro enzimas marcadoras del funcionamiento del hígado (alanino aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, gama glutamin-transferasa y fosfatasa alcalina) no cambiaron

de manera significativa entre grupos expuestos a diazinon (LC50 y  $\frac{1}{2}$  LC50) y grupo control, por lo que se destaca que en este modelo experimental la exposición aguda al diazinon no afectó el funcionamiento de este órgano encargado de la detoxificación y muy importante en la homeostasis del organismo.

La actividad fagocítica de las células de tilapia fue evaluada a través de la determinación de dos parámetros: índice de fagocitosis y porcentaje de fagocitos activos. Los resultados experimentales indican que la exposición aguda a concentraciones sub-letales de diazinón, disminuyó de manera significativa tanto el índice de fagocitosis como el porcentaje de células fagocíticas activas, con respecto al grupo control ( $p < 0.001$ ). Lo anterior indica que los organismos expuestos a diazinón serán más sensibles a retos que afecten su sistema inmune, tanto de origen biótico, como abiótico.

## INTRODUCCIÓN

Una alta proporción de productos alimenticios producidos en el campo se pierden anualmente debido a las malas hierbas e infecciones provocadas por hongos e insectos, por lo que los plaguicidas se utilizan intensivamente para el control de todo tipo de plagas. Sin embargo, su uso indiscriminado desencadena graves problemas de contaminación ambiental (Rodríguez, 2004).

La gran mayoría de los plaguicidas utilizados en actividades agrícolas, entran en contacto con los cuerpos de agua; Una vez arrojados al ambiente, son arrastrados por infinidad de rutas a este tipo de ecosistemas, donde no sólo afectan la flora y fauna acuática, sino que a toda la cadena trófica por el uso de agua contaminada en actividades humanas (agricultura y otras actividades pecuarias) (Bols, *et al.* 2001).

La mayoría de los estudios toxicológicos han sido realizados en modelos de mamíferos (Fleeger, *et al.* 2003). Sin embargo, evaluar los efectos tóxicos de los plaguicidas en organismos de importancia económica, como los peces, trae beneficios a la acuicultura. Además este tipo de organismos pueden ser utilizados como modelo en estudios toxicológicos que permite usarlos para el monitoreo de ecosistemas acuáticos. Los peces, además poseen un sistema inmune bien desarrollado, sensible a alteraciones por sustancias químicas como los plaguicidas, lo que los convierte en un biomarcador de efecto y susceptibilidad (Repetto, *et al.* 1996; Castaño, *et al.* 2001).

La evaluación de los efectos tóxicos de los plaguicidas, permite además conocer los elementos básicos necesarios para sugerir alternativas de tratamiento y

contrarrestar los efectos nocivos de estas sustancias. De todos los plaguicidas de uso común en México, el diazinón es el principal insecticida utilizado en actividades agropecuarias y representa un serio problema de contaminación para los cuerpos de agua.

Para evaluar el efecto de diazinón sobre el sistema inmune y parámetros hepáticos de tilapia, en el presente trabajo se evaluó la actividad de las células fagocíticas y actividad de enzimas hepáticas en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), la especie de pez dulce acuícola con mayor distribución e importancia económica en muchas partes del mundo incluyendo a México.

## ANTECEDENTES

### PLAGUICIDAS

El número de compuestos químicos producidos va en incremento año con año, al igual que su liberación al medio ambiente (Sakazaki *et al.*, 2001). Muchos de estos compuestos son los plaguicidas empleados para el combate de plagas agrícolas y urbanas (Galloway y Handy, 2003). El uso de estas sustancias es indiscriminado y en América Latina se ha triplicado de 1980 a la fecha. Se calcula que en México un trabajador agrícola está expuesto directamente a 4.5 kg por año (Repetto y Baliga, 1996).

El uso de plaguicidas es cada vez más frecuente, conforme crece la población y sus necesidades por alimentos, protección a la salud (enfermedades transmitidas por insectos) y la conservación de áreas verdes. Sin embargo, debido a que las plagas se hacen cada vez más resistentes a estas sustancias, las concentraciones de plaguicidas usadas van también en constante aumento, en consecuencia se incrementa la dosis mínima tolerada por las especies ya que ocasiona problemas de salud y ambientales (Rodríguez, 2004).

Los plaguicidas contaminan a todos los ecosistemas, pero los cuerpos de agua son quizás, los primeros afectados. Invariablemente todas las sustancias, utilizadas por el hombre, son arrastradas por infinidad de rutas hacia los cuerpos de agua; de esta manera las especies sensibles pueden verse afectadas por dosis subletales o eliminadas por dosis letales; lo que afecta la cadena trófica y altera por consecuencia a las especies tolerantes. Así, los ecosistemas y sus poblaciones (incluyendo al ser humano) pueden estar directa o indirectamente afectados por la presencia de estos compuestos tóxicos (Rodríguez, 2003).

Todos los plaguicidas, en dosis y concentraciones diferentes, tienen una característica común: la toxicidad. Un compuesto es tóxico cuando al encontrarse en determinadas concentraciones y durante ciertos tiempos, afecta o modifica algún proceso bioquímico o fisiológico, pudiendo incluso llegar a producir la muerte de los organismos expuestos (Martínez, 1991).

Los plaguicidas son clasificados de acuerdo a su uso y estructura química.

Por ejemplo, de acuerdo al tipo de plaga que combaten se agrupan en aracnidas, nematocidas, moluscocidas, rodenticidas, funguicidas, herbicidas e insecticidas.

Según su estructura química, los plaguicidas se agrupan en cuatro grupos principales: Organoclorados (DDT, lindano y endosulfán), Organofosforados (malatión, paratión y diazinón), Carbámicos (carbofuran y aldicarb) y Piretroides (cipermetrinas).

### PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS Y SU BIOTRANSFORMACIÓN EN EL HÍGADO:

Los plaguicidas más empleados actualmente son los organofosforados. Se comenzaron a sintetizar desde 1820, pero su auge comenzó hasta la segunda guerra mundial. En todo el mundo, han reemplazado el uso de los plaguicidas organoclorados, entre otras razones por que tienen igual efectividad pero son menos persistentes en el ambiente (Rodríguez, 2003).

El efecto producido, depende de la cantidad de tóxico que llegue en estado activo al sitio de acción y del tiempo que se le permita estar allí. De esta manera, la toxicodinamia de los plaguicidas consta de cuatro procesos muy complejos: absorción, distribución, metabolismo y excreción (figura 1).

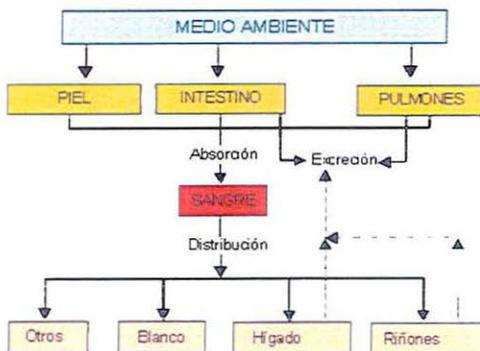


Figura 1. Rutas que sigue un tóxico en el organismo (tomado de Peña *et al.*, 2001).

El metabolismo es un proceso particularmente importante en la toxicodinamia de un plaguicida. De este depende en gran medida la reducción de la posibilidad que la sustancia produzca una respuesta tóxica. La maquinaria bioquímica utilizada para el metabolismo de sustancias tóxicas, es la misma para compuestos químicos endógenos de estructura química similar. Básicamente consiste en la biotransformación del tóxico, utilizando el conjunto de vías metabólicas, por medio de las cuales se incrementa la polaridad de un tóxico; facilitando su excreción del organismo. Sin embargo, en algunos casos, la biotransformación resulta en la producción de metabolitos que son más tóxicos que el compuesto original, a este proceso se denomina bioactivación.

Las reacciones bioquímicas de biotransformación se agrupan en dos conjuntos: reacciones de fase I y reacciones de fase II.

Las reacciones de fase I biotransforman los plaguicidas convirtiéndolos en sustratos para las enzimas de fase II, al mismo tiempo que los hace más hidrófilos. Durante la fase II, las reacciones de conjugación en las cuales un metabolito con enlaces de alta energía sede un grupo funcional polar al plaguicida, o su producto de transformación por la fase I.

Para llevar a cabo la biotransformación de los plaguicidas las células cuentan con sistemas enzimáticos como el citocromo p-450, localizado en el retículo endoplásmico; y formado por dos proteínas diferentes, una tiene función de reductasa y la otra de oxigenasa; esta última tiene un pico de absorción a 450 nm; que le da el nombre a este sistema enzimático (sistema p-450) (Peña *et al.*, 2001).

Todas las células del organismo, en teoría, tienen la capacidad de metabolizar los xenobióticos; pero el hígado tiene particular importancia en estos procesos, ya que en este órgano se realizan, en gran medida, las reacciones necesarias para la eliminación de los tóxicos, proceso denominado detoxificación. Las particularidades funcionales que hacen del hígado un órgano sumamente importante en estos procesos son:

- La gran irrigación de sangre que posee, la cual es una vía importante de transporte de tóxicos, principalmente a través de la vena aorta.
- La gran cantidad de enzimas hacen que el hígado tenga gran capacidad de biotransformación
- Tiene una importante función excretora, lo que provoca que los tóxicos se acumulen en este órgano.

Por estas razones, el hígado es también un órgano predispuesto a sufrir daños celulares y estructurales por sustancias tóxicas.

Una buena forma de evaluar la funcionalidad del hígado, es a través de la determinación de las enzimas hepáticas en el suero o plasma de los organismos ya que estas enzimas están situadas en el interior de las células. De esta manera, un aumento en el nivel de la enzima presente fuera de las células, indica una alteración del tejido.

En la búsqueda de pruebas útiles para evaluar la función hepática, se han hecho estudios de la actividad de enzimas que se originan en el hígado, pero que en precedencia de daño o destrucción de los hepatocitos son liberadas a la sangre.

La cuantificación de las enzimas: alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), proporciona parámetros que evidencian un daño directo sobre las células, principalmente del parénquima, sea por daño inflamatorio o tóxico.

Por su parte la actividad de las enzimas gama glutamin-transferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP) orienta sobre el compromiso de las vías biliares o bien de la colestasis de una enfermedad hepática. Por lo tanto estas enzimas son más bien indicadoras del sistema biliar.

## DIAZINÓN

El diazinón (figura 2) (O,O-dimetil-2-isopropil-6-metil(pirimidina-4-yl) fosforothioato); fue por primera vez registrado en los Estados Unidos en 1956 y actualmente tiene usos agrícolas y domésticos. Su uso estimado en actividades agrícolas es de 1.5 millones de libras anuales (Cox, 2000).

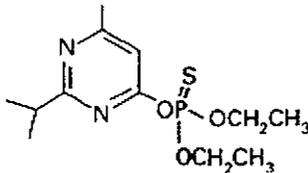


Figura 2. Estructura química de diazinón (O,O-dimetil-2-isopropil-6-metil(pirimidina-4-yl) fosforothioato) (imagen tomada de Cox, C. 2000).

En México el diazinón es el insecticida más usado y al igual que todos los plaguicidas organofosforados actúa a través de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), aumentando así la acumulación de acetilcolina (ACh) en las terminales nerviosas. La biotransformación del diazinón genera el diazoxón, también llamado diazinón-o-análogo, que es un metabolito que en algunos animales resulta ser más tóxico que el compuesto original (Cox, 2000).

El diazinón es usado en el campo para el combate de plagas de cultivo de maíz, arroz, árboles frutales, caña de azúcar, tabaco y hortalizas. En actividades domésticas se emplea para combatir cucarachas, hormigas, pulgas y en veterinaria, para el combate de moscas y garrapatas (Cox, 2000).

El diazinón está clasificado como un plaguicida de uso restringido. Dependiendo de la formulación puede ser clasificado como moderadamente tóxico (clase II) o altamente tóxico (clase III).

Los efectos adversos del diazinón no están bien claros, ya que no existen datos que indiquen daños sobre efectos reproductivos; los estudios de efectos

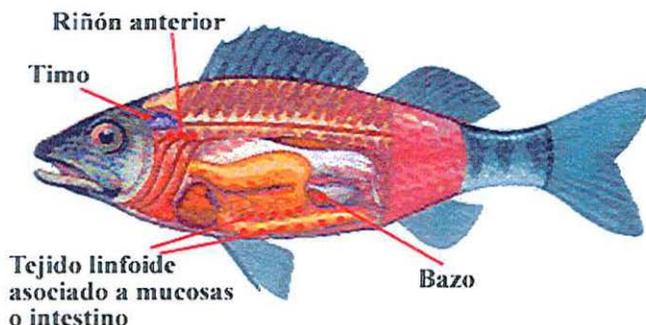
teratogénicos, se consideran inconclusos; y algunos estudios sugieren que el diazinón tiene efectos mutagénicos pero no carcinogénicos (Cox, 2000).

Por otra parte, uno de los efectos ecológicos más importantes provocados por los plaguicidas, en este caso por el diazinón, son los daños a los organismos acuáticos. Pues el diazinón es altamente tóxico para peces. Algunos datos indican que los peces de agua salada son más susceptibles a la intoxicación por diazinón que los peces de agua dulce; la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) reportada para trucha es de 2.6 a 3.2 ppm (Exttoxnet, 1996)

### SISTEMA INMUNE Y FAGOCITOSIS EN PECES

El sistema inmune de los peces esta formado de una serie de mecanismos entre los que se incluyen barreras mecánicas o de superficie, sistema de defensa celular y humoral inespecífico.

En los peces teleósteos existen órganos linfoides primarios y secundarios (figura 3), dentro de los primarios están el timo y el riñón anterior; mientras que el bazo y el tejido asociado a mucosas constituyen los órganos secundarios (Fernández *et al.*, 2002`



**Figura 3.** Localización de los órganos linfoides de tilapia nilótica. Los peces a diferencia de mamíferos, carecen de médula ósea.

Las células involucradas en el sistema inmune son los leucocitos o glóbulos blancos, que pueden encontrarse en sangre circulante o en tejidos y en ocasiones pueden formar complejos como los centros melanomacrofágicos. Se clasifican al

igual que en mamíferos, por criterios morfológicos en dos tipos: linfocitos, granulocitos polimorfonucleares y monocitos/macrófagos también llamados células mononucleares. Los linfocitos son células altamente diferenciadas y representan aproximadamente el 80% de los leucocitos circulantes. A nivel funcional son los responsables de la respuesta inmune específica 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: los neutrófilos, con núcleo multilobulado y de tamaño variable, representan del 6-8% de los leucocitos totales, su principal función es la fagocitosis; los eosinófilos, son células redondas que presentan núcleo bilobulado y excéntrico, intervienen en procesos de regulación de inflamación y defensa mediante degranulación; los basófilos, los cuales tienen grandes gránulos de histamina y heparina, involucrados en el inicio de la inflamación, se conoce muy poco de ellos y se pueden confundir con eosinófilos (Iwama *et al.*, 1996).

Los monocitos/macrófagos son leucocitos grandes, con núcleo que ocupa más de la mitad del volumen celular, y constituyen la principal célula fagocítica en los peces, además de tener una participación importante en la presentación antigénica y en cooperación celular (Iwama *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 2002).

### **Fagocitosis**

La fagocitosis es un mecanismo que permite a las células, principalmente monocitos/macrófagos y neutrófilos, eliminar de forma inespecífica el material extraño que invade al organismo, ya sea de naturaleza antigénica o no, así como material de desecho del propio organismo. Dentro de la inmunidad inespecífica que es la primera línea de defensa, la fagocitosis es uno de los procesos más importantes en la defensa de los animales poiquiloterms, porque es el menos influenciado por la temperatura; además de ser uno de los mecanismos de la respuesta inmune más conservados a lo largo de la evolución (Ruiz *et al.*, 2003).

El proceso completo se divide en tres fases: 1. Fijación de la partícula a la superficie celular; 2. Ingestión mediante pseudópodos e integración de la partícula fagocitada a vacuolas (fagosoma); 3. Desintegración de la partícula por medio de la liberación de enzimas de los lisosomas (fagolisosomas) (Iwama *et al.*, 1996).

Los xenobióticos pueden afectar el sistema inmune de los peces a muy diversos niveles: desde las barreras físicas y el sistema inmune innato, hasta el sistema inmune específico.

En branquias se han detectado lesiones histológicas y ultraestructurales después de la exposición de peces a metales pesados, plaguicidas y solventes orgánicos. El impacto de las lesiones estructurales en las branquias, además de disminuir una barrera contra microorganismos, puede afectar procesos como: respiración, osmorregulación y equilibrio ácido-base (Bols, 2001).

En cuanto a la respuesta inmune innata, ha sido descrito que los metales pesados modulan diferentes mecanismos como actividad fagocítica y lisozima sérica. Esta última se ha visto incrementada en peces expuestos por 30 días a cadmio, mercurio y zinc (Sánchez-Darbon *et al.*, 1999). Sin embargo, la exposición a galio demostró una disminución en la actividad de lisozima plasmática, concentración total de inmunoglobulinas y actividad fagocítica (Betoulle *et al.*, 2002). Por lo que los resultados de experimentos con metales suelen ser contradictorios.

Dado que la fagocitosis es un proceso complejo, que consta de varios pasos, los xenobióticos pueden alterar dicho proceso a diferentes niveles. Así, se ha observado que los metales como cadmio y níquel, aumentan la quimiotaxis de macrófagos y el estallido respiratorio es inhibido por mercurio y cadmio (Sánchez-Darbon *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha visto que el manganeso, estimula la fagocitosis por macrófagos de carpa expuestos a este metal (Cossaniri-Dunier, 1998), mientras que el níquel parece no tener efecto sobre el proceso fagocítico en dichas células (Browser *et al.*, 1994). Estos resultados muestran

## **El sistema inmune y la ecotoxicología.**

La regulación de todos los mecanismos involucrados en la respuesta inmune, hace que este sistema sea muy sensible a diversos factores presentes en el ambiente. Esta sensibilidad podría indicar el riesgo ambiental ocasionado por agentes contaminantes estresantes. Por esta razón diversos parámetros inmunológicos podrían ser usados como bioindicadores de toxicidad de sustancias contaminantes.

Entre las ventajas de utilizar el sistema inmune como biomarcador de contaminación, destacan las siguientes:

1. El sistema inmune se relaciona directamente con 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 (biomarcador). Y puede utilizarse para medir dichos cambios en presencia de sustancias tales como los plaguicidas.

Los peces son un grupo de animales especialmente importante para la ecotoxicología, ya que los cambios en su fisiología (entre ellos cambios en el sistema inmune) permiten evaluar cambios en los ambientes acuáticos y así conocer las condiciones de los ambientes que habitan (Bois *et al.*, 2001).

## **INMUNOTOXICOLOGÍA Y PECES:**

La inmunotoxicología es una interdisciplina relativamente nueva enfocada en la identificación y análisis de agentes químicos y factores ambientales que pueden

causar inmunomodulaciones incidentales y no deseadas. De esta manera el objetivo de la inmunotoxicología es proteger al género humano y a los animales de los efectos dañinos de agentes químicos presentes en su entorno.

Los efectos de los contaminantes sobre la respuesta inmune se pueden dar a través de cuatro vías principales:

- 1) acción directa o indirecta, ya sea de los propios xenobióticos o de los productos obtenidos de su biotransformación sobre las células inmunocompetentes.
- 2) Inducción de la respuesta inmune a xenobióticos
- 3) modificando antígenos propios y
- 4) alterando la comunicación del sistema inmune con otros sistemas del organismo; por ejemplo comunicación neuro-endocrino-inmunológica.

A través de cualquiera de las cuatro vías efectoras, el resultado puede ser una respuesta adversa llamada inmunotoxicidad, la cual resulta en alteraciones como autoinmunidad, supresión inmune, alergia u otros estados de hipersensibilidad (Kačmár *et al.*, 1999).

Además de los estudios experimentales con células humanas o sistemas murinos, los estudios con animales silvestres, entre ellos los peces, son muy relevantes, como modelos más reales sobre condiciones de exposición; e incluso los ensayos pueden ser realizados en medio ambientes naturales. Claro que esto, también tiene como consecuencia que se pueden controlar menos factores (Repetto *et al.*, 1996).

El interés en el uso de peces en investigación se ha incrementado en los últimos años, como animales experimentales en investigación biológica básica y biomédica. Un ejemplo de esto, es el uso de peces como modelo en investigación de cáncer y biología del desarrollo. Otra área que emplea de forma creciente estos organismos, es la toxicología, ya que los organismos acuáticos son muy importantes para evaluar la toxicidad de agentes químicos y muestras de agua, esto con fines regulatorios, para el desarrollo y evaluación segura de nuevas sustancias y productos o bien monitoreo ambiental y supervivencia

Para estudiar el impacto de las sustancias químicas en los procesos biológicos a nivel celular, las células aisladas de peces son reconocidas como modelos. Y cada día toman más importancia, esto por la aplicación de nuevos conceptos genómicos y proteómicos.

La evaluación de los efectos de los tóxicos sobre la capacidad del sistema inmune de los peces, es muy relevante en ecotoxicología; pues esto es clave en el conocimiento sobre los efectos de los agentes tóxicos sobre las poblaciones de animales acuáticos. Así, los datos obtenidos en las investigaciones pueden ser usados para valorar el riesgo de contaminación ambiental sobre la salud de las poblaciones de peces; esto con aplicaciones en acuicultura y ecotoxicología (Castaño *et al.*, 2001).

Por lo anterior, podemos decir que los peces son modelo más realista para evaluar el efecto inmunotóxico de sustancias disueltas comúnmente en agua, debido a que la práctica de la acuicultura se realiza en ambientes frecuentemente contaminados (Zelikoff, 1994). Los organismos acuáticos expuestos a contaminantes pueden morir como resultado de la exposición o simplemente pueden tener un pobre crecimiento, lo cual los hace no adecuados para el consumo humano y más susceptibles a enfermedades (Morgan y Branson, 2002).

### **Bioensayos y biomarcadores.**

El principio de los bioensayos se basa en la característica de los organismos para reaccionar a las condiciones ambientales, siendo importante determinar cuándo tal respuesta queda fuera de los límites de la normalidad. Estas reacciones se pueden manifestar en cuatro niveles de organización biológica:

- a) bioquímica y celular.
- b) individual, incluyendo la integración de respuestas bioquímicas, fisiológicas y conductuales.
- c) poblacional, que incluye alteraciones en la dinámica de poblaciones y

d) comunidades, resultando en cambios en su estructura y funcionamiento.

Los bioensayos con organismos acuáticos constituyen la única forma de determinar el grado de toxicidad de efluentes y compuestos químicos aislados, y proporcionan las bases para establecer una legislación en materia de contaminación acuática. Estas técnicas tienen como objetivo principal determinar las concentraciones o niveles de los factores que resulten seguros para los organismos, en el sentido de que garanticen su sobrevivencia, desarrollo y reproducción en condiciones de exposición continua (Martínez, 1991).

Además, por medio de los bioensayos, podemos encontrar posibles biomarcadores de contaminación, los cuales se definen como parámetros cuantificables, que sirven como indicadores de salud, riesgo de enfermedad y exposición a agentes ambientales.

#### **TILAPIA (*Oreochromis spp*)**

La tilapia es un pez teleosteo del orden Perciforme perteneciente a la familia Cichlidae; originario de África habita la mayor parte de las regiones tropicales del mundo, donde las condiciones son favorables para su reproducción y crecimiento. La tilapia es la especie acuícola con mayor distribución a nivel mundial ya que se encuentra presente en todos los continentes.

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 de *Oreochromis* y está formado principalmente por las especies: *O. niloticus*, *O. mossambicus* y *O. aureus* (Morales-Díaz, 1988). De las anteriores, la especie *Oreochromis niloticus* es la más explotada a nivel mundial y en nuestro laboratorio, estudios comparativos han demostrado que esta especie posee una mayor inmunocompetencia en comparación con las otras especies ya mencionadas (Casas-Solis, *et al.* 2006).

En México la tilapia se encuentra principalmente en los estados de la costa del Pacífico y se considera una de las especies de peces más apropiados para la piscicultura, ya que presenta diversas ventajas para su explotación:

- Fácil manejo y domesticación
- Crecimiento rápido en condiciones controladas
- Excelente conversión alimenticia
- Carne con alto contenido proteínico
- Aceptación en el mercado

Además, se ha comprobado que este organismo presenta capacidad para sobrevivir y crecer en condiciones fisicoquímicas variables. La tilapia soporta las diversas manipulaciones y alteraciones que recibe en condiciones de cultivo. Este pez es también 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 (OD) 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 y Lozano, 1996).

Además, 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**

La tilapia tiene gran importancia económica en México ya que es una de las principales especies explotadas por los acuicultores. Sin embargo, se han reportado importantes pérdidas económicas debido a infecciones y subsiguiente muerte que padecen estos organismos, esto pese a su alta resistencia y adaptabilidad.

El uso indiscriminado de ciertos plaguicidas como el compuesto organofosforado diazinón, uno de los insecticidas más utilizados en México, podría modular de manera negativa la función hepática, la respuesta inmune, y en general la fisiología de estos organismos y contribuir significativamente al problema antes mencionado.

Con base en lo anterior, es importante realizar estudios del efecto del diazinón sobre varios parámetros fisiológicos de los peces, uno de los primeros organismos que, por sus características medio ambientales, está en íntimo contacto con agentes contaminantes.

## **HIPOTESIS**

La intoxicación aguda con diazinón altera significativamente la función hepática y disminuye la capacidad fagocítica de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la intoxicación aguda por diazinón sobre la actividad hepática y fagocítica de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

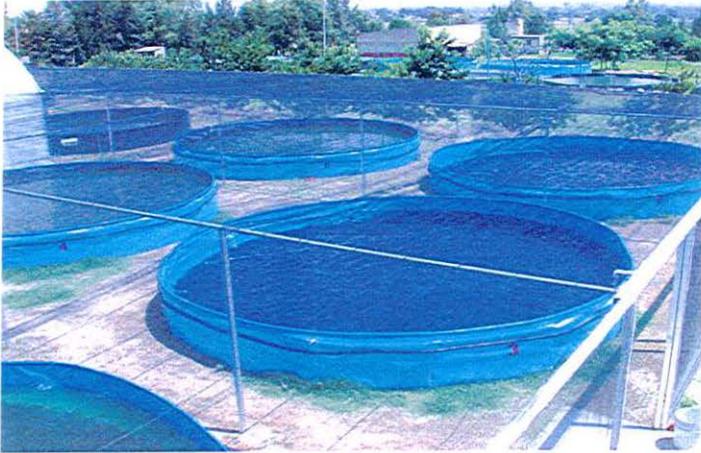
- Determinar la  $CL_{50}$  del diazinón para la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).
- Determinar el efecto de la exposición aguda por diazinón sobre la actividad hepática de la tilapia nilótica.
- Determinar el efecto de la exposición aguda por diazinón sobre la actividad fagocítica de la tilapia nilótica.

## METODOLOGÍA

### ORGANISMOS DE ESTUDIO

Se utilizaron tilapia machos de la especie *Oreochromis niloticus*, de 3 a 5 meses de edad, de 13 a 16 cm de talla y aproximadamente 80 g de peso en promedio. Los organismos de prueba fueron proporcionados por la empresa Aquamol SA de CV, localizada en la localidad de Jamay, Jalisco, México (figura 1A y 1B).

A



B



**Figura 4.** Condiciones en las que son mantenidas (A) y capturadas (B) las tilapias en la granja acuícola Aquamol, S.C. de R.L.

### **Aclimatación de los organismos**

Los peces fueron transportados en bolsas plásticas, a las cuales se les inyectó oxígeno para su traslado hasta el laboratorio. Posteriormente, fueron colocados en estanques para su aclimatación durante 15 días, manteniéndose a una temperatura aproximada de 28°C, en las instalaciones del Departamento de Ecología del CUCBA.

Para los bioensayos, se utilizaron acuarios con 30 L de agua de grifo y aireación constante, manteniendo la temperatura a  $28 \pm 1$  °C, por medio de termostatos. Se colocaron 10 organismos por acuario.

### **Bioensayo preliminar**

Se realizaron experimentos preliminares ensayando con diferentes concentraciones de diazinón, de presentación comercial de concentrado emulsionable al 25%, equivalente a 230 g de ingrediente activo por litro (ANAJALSA). A partir de esta, se preparó una solución de referencia con una concentración final de 23 g/L.

La concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) representa la cantidad, de un agente químico, requerida para matar el 50 % de los organismos en 96 horas. Con base en los datos reportados en la literatura sobre la CL<sub>50</sub> del diazinón para diferentes especies de peces, las concentraciones utilizadas en esta etapa fueron: 0.1, 1.0, 4.0, 6.0, 7.5, 8.0 y 12 ppm. Durante el tiempo de exposición (96 horas) se observó el comportamiento de los organismos; pasado este lapso de tiempo se determinó el porcentaje de mortalidad en cada condición.

### ***Determinación de la concentración letal de diazinón.***

Una vez obtenidas las concentraciones donde probablemente se encontraba la CL<sub>50</sub> se probaron las siguientes concentraciones de diazinón por 96 h: 8.0, 7.8, 7.5 y 7.0 ppm y se contó con un grupo control.

Desde el momento de aplicación de cada concentración de diazinón y durante el mayor tiempo posible de duración del bioensayo, se registraron los efectos visibles y mortalidad de los organismos.

Transcurrido el tiempo de exposición y una vez obtenidos los datos de mortalidad, estos fueron analizados por medio del método probit (el cual permite calcular la dosis letal que afecta al 50% de la población) utilizando el software "EPA probit program" versión 1.5.

**Tabla 1.** Condiciones experimentales del bioensayo

<b>Tipo de prueba</b>	<b>Estático</b>
Duración	96 horas
Foto-periodo	12 horas luz / 12 horas oscuridad
Volumen de agua en los acuarios	30 L
Etapa biológica de los organismos	Juvenil
Número de réplicas	3
Número de organismos/réplica	10
Aireación de los acuarios	Si
Temperatura	28 ±1 °C
Ph	7.4
Alimentación	No
Criterio de aceptación de la prueba	Mortalidad cero en los controles

***Efecto de diazinón sobre la actividad hepática:***

La evaluación de la función hepática, se determinó a través de la actividad de cuatro enzimas: aspartato aminotransferasa (AST); alanino aminotransferasa (ALT); glutamin-transferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP), además de la concentración de proteínas plasmáticas.

Se obtuvo 1 mL de sangre, por punción cardiaca, de los peces expuestos (96 h) a la CL<sub>50</sub>, ½ CL<sub>50</sub> y peces controles.

La sangre fue colocada en tubos con heparina y centrifugada a 2,500 rpm durante 20 minutos. La actividad de las enzimas se realizó en un equipo Synchron zx4 de Beckman Coulter.

#### **Determinación de la actividad fagocítica:**

De peces intoxicados con diazinón y peces controles, se obtuvo sangre por punción cardiaca; la cual se desfibrinó y colocó en cubreobjetos previamente desengrasados. Parte de la sangre obtenida se centrifugó para la obtención de suero autólogo como fuente de complemento.

Los cubreobjetos, con las células sanguíneas, se incubaron en atmósfera húmeda a 28°C durante 20 min. Se lavaron con solución balanceada de Hank's; y se adicionó a las mismas *Candida albicans* (1x10<sup>6</sup> levaduras previamente opsonizadas con el suero autólogo). Las preparaciones se incubaron nuevamente durante 40 minutos bajo las condiciones ya descritas. Pasado este tiempo, las preparaciones se lavaron y tiñeron por 1 minuto con colorante de Wright; se fijaron y observaron al microscopio con el objetivo de 100X para determinar el índice de fagocitosis y porcentaje de fagocitos activos.

La actividad fagocítica fue expresada como el número promedio de levaduras fagocitadas por las células, el cual fue calculado dividiendo el número total de levaduras fagocitadas por el total de células contadas (100-200 células). Por su parte, el porcentaje de fagocitos activos, fue determinado a través del conteo de 100-200 células fagocíticas, y determinando el porcentaje de estas, que al menos tenían una levadura en su interior (Muniz-Junqueira *et al.*, 2006; Giron-Pérez *et al.*, 2006).

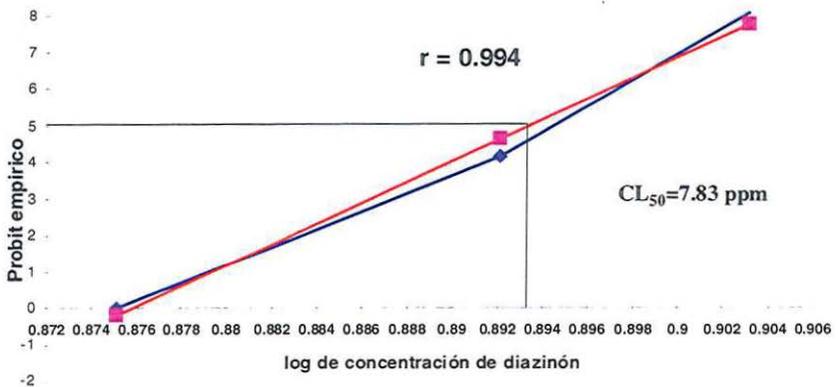
## RESULTADOS

### Comportamiento de los Organismos:

Una vez colocado el plaguicida, en las diferentes concentraciones, los peces mostraron anomalías en el nado. El color de los organismos se tornó más oscuro y con enrojecimiento en la región de las branquias. Sin embargo, la característica más marcada fueron los impulsos nerviosos descontrolados.

### Determinación de la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) de diazinón para tilapia:

La concentración letal 50 de diazinón para tilapia, fue determinada a través del método probit, usando el software "EPA probit analysis program" versión 1.5. Los resultados del análisis indican que la CL<sub>50</sub> de diazinón para tilapia nilótica es de 7.83 ppm (intervalo de confianza de 7.82 ppm y 7.87 ppm) con un límite de confianza de 95% (figura 5).



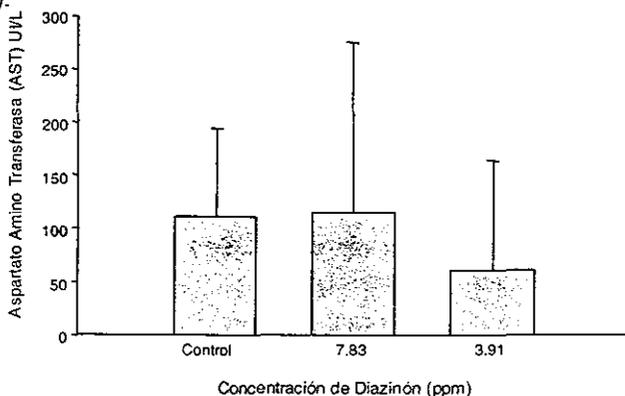
**Figura 5:** Concentración letal 50 de diazinón para tilapia nilótica. Los bioensayos se realizaron con 30 organismos por concentración (10 organismos por bioensayo y dos réplicas de los mismos). Los datos fueron analizados con el programa "EPA probit analysis". La CL<sub>50</sub> es igual al antilogaritmo de la concentración cuando el probit empírico es igual a 5.

### **Efecto de diazinón sobre la actividad hepática:**

Con la finalidad de evaluar el efecto de diazinón sobre el funcionamiento del hígado; la actividad enzimática de alanino aminotransferasa (ALT); glutamin transferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP); además de la concentración de proteínas, fueron determinadas en plasma de tilapia nilótica expuestas durante 96 horas a concentraciones subletales de diazinón.

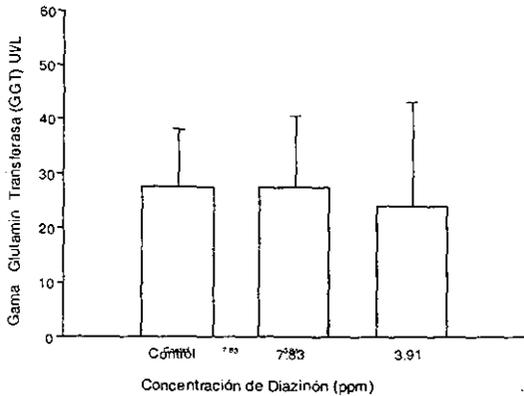
La actividad de la enzima aspartato amino transferasa (AST) fue evaluada en plasma de peces intoxicados con 7.83 ppm, 3.91 ppm y del grupo de peces control.

Los resultados obtenidos indican que la exposición aguda a diazinón no afecta, de manera significativa, la actividad hepática de los peces expuestos al plaguicida (figuras 6).



**Figura 6:** Actividad de la enzima hepática Aspartato amino transferasa (AST) presente en plasma de tilapia expuesta a concentraciones sub-letales de diazinón (96 h) y peces control. Los resultados (n=10) son expresados en media  $\pm$ DS. Después de la comparación mediante ANOVA de una variable, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

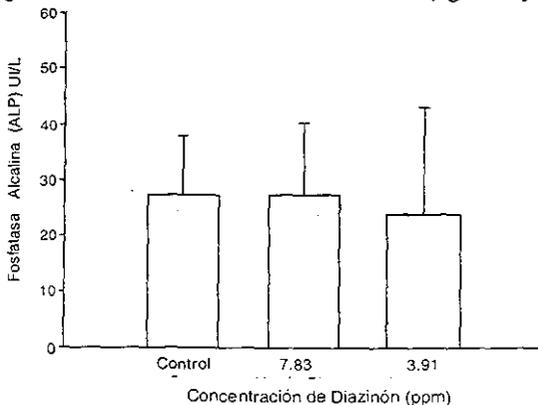
La actividad de la enzima gama-glutamin transferasa (GGT), presente en plasma de tilapia, fue evaluada en organismos intoxicados y grupo control. Los resultados indicaron que la exposición aguda a 7.83 ppm y 3.91 ppm de diazinón no afectó de manera significativa la actividad de dicha enzima (figura 7).



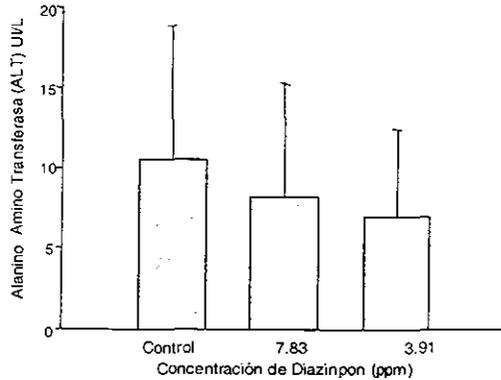
**Figura 7:** Actividad de la enzima hepática Gama glutamin transferasa (GGT) presente en plasma de tilapia expuesta a concentraciones sub-letales de diazinón (96 h) y peces control. Los resultados (n=10) son expresados en media  $\pm$ DS. Después de la comparación mediante ANOVA de una variable, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

La actividad de las enzimas fosfatasa alcalina (ALP) y alanino amino transferasa (ALT), fue determinada en plasma de tilapia nilótica expuesta a concentraciones subletales (7.83 ppm y 3.91 ppm) de diazinón por 96 horas.

Los resultados obtenidos indican que el plaguicida organofosforado no altera de manera significativa la actividad de estas enzimas (figura 8 y 9).



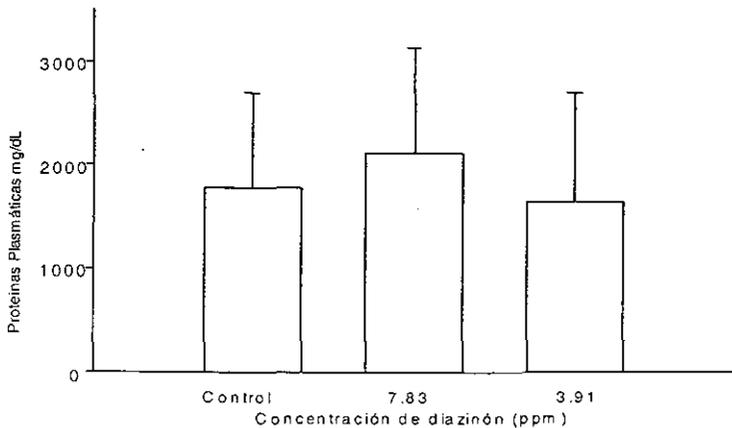
**Figura 8:** Actividad de la enzima hepática fosfatasa alcalina (ALP) presente en plasma de tilapia expuesta a concentraciones sub-letales de diazinón (96 h) y peces control. Los resultados (n=10) son expresados en media  $\pm$ DS. Después de la comparación mediante ANOVA de una variable, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 9:** Actividad de la enzima hepática Alanino amino transferasa (ALT) presente en plasma de tilapia expuesta a concentraciones sub-letales de diazinón (96 h) y peces control. Los resultados (n=10) son expresados en media  $\pm$ DS. Después de la comparación mediante ANOVA de una variable, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Dado que la capacidad de síntesis de proteínas hepáticas es un parámetro bioquímico para evaluar el buen funcionamiento del hígado; la concentración plasmática de proteínas, fue evaluada en tilapia expuesta a 7.83 ppm y 3.91 ppm, por 96 horas.

Los resultados obtenidos mostraron que la exposición aguda a diazinón, no altera de forma significativa la capacidad de síntesis proteínica (figura 10).



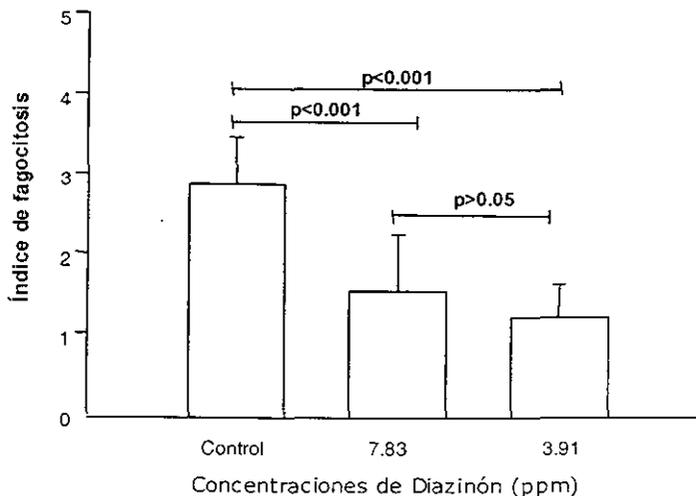
**Figura 10:** Concentración de proteínas plasmáticas en tilapia expuesta a concentraciones sub-letales de diazinón (96 h) y peces control. Los resultados (n=10) son expresados en media  $\pm$ DS. Después de la comparación mediante ANOVA de una variable, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

### **Efecto de diazinón sobre la actividad fagocítica:**

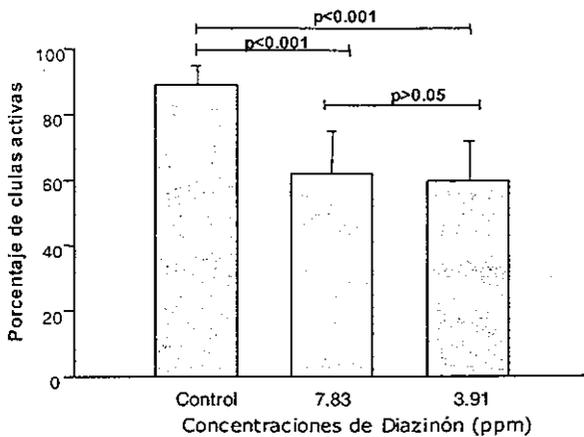
Para conocer el efecto del plaguicida organofosforado diazinón, sobre los mecanismos de la repuesta inmune innata, se evaluó la actividad fagocítica de las células polimorfonucleares presentes en sangre periférica de tilapia nilótica expuestas de forma aguda a concentraciones subletales del plaguicida.

La actividad fagocítica de las células fue evaluada a través de la determinación de dos parámetros: índice de fagocitosis y porcentaje de fagocitos activos.

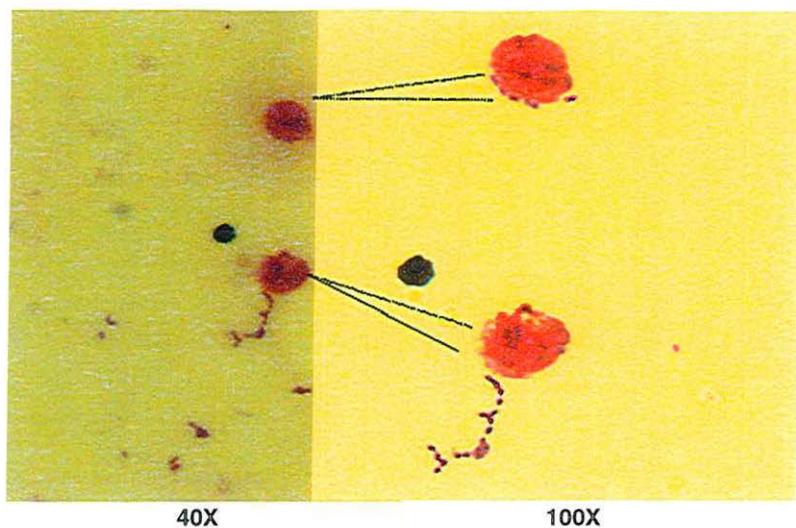
Los resultados obtenidos indican que la exposición aguda a concentraciones subletales de diazinón, disminuyó de manera significativa ( $p < 0.001$ ) tanto el índice de fagocitosis (figura 11), como el porcentaje de células fagocíticas activas (figura 12), con respecto al grupo control.



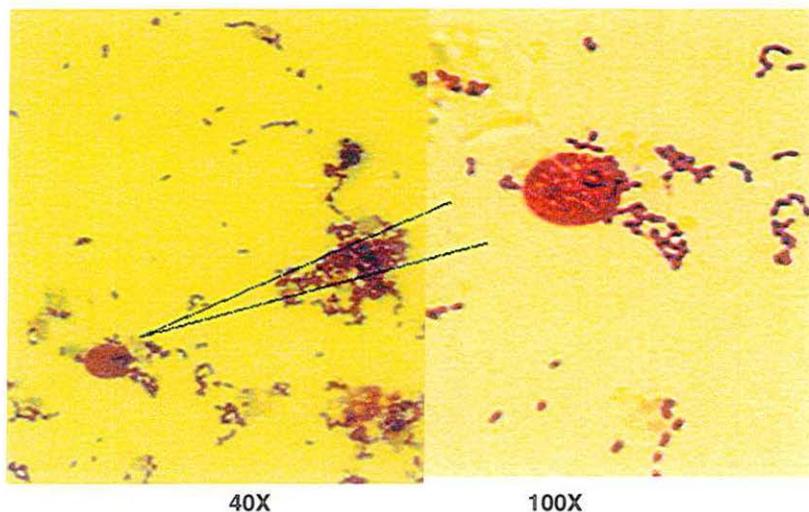
**Figura 11:** índice de fagocitosis de células presentes en sangre de tilapia nilótica (n=10) expuesta a concentraciones sub-letales (7.83 ppm y 3.91 ppm) de diazinón por 96 h, y peces control. Los datos representan la media  $\pm$ DS y fueron analizados mediante ANOVA de una variable y la prueba de medias de Tukey.



**Figura 12.** Porcentaje de células activas presentes en sangre de tilapia nilótica (n=10) expuesta a concentraciones sub-letales (7.83 ppm y 3.91 ppm) de diazinón por 96 h, y peces control. Los datos representan la media  $\pm$ DS y fueron analizados mediante ANOVA de una variable y la prueba de medias de Tukey.



**Figura 13.** Monocitos de sangre de tilapia, como se observan en la técnica de Cunningham. En la fotografía se muestran células inactivas (sin levaduras en su interior). Las imágenes se muestran a 40X y 100X de aumento.



**Figura 14.** Monocitos de sangre de tilapia, como se observan en la técnica de Cunningham. En la fotografía se observa una célula activa con varias levaduras (*Candida albicans*) en su interior. Las imágenes se muestran a 40X y 100X de aumento.

## DISCUSIÓN

El uso de plaguicidas es una forma relativamente económica y fácil de controlar plagas de muy diversos cultivos; pero al mismo tiempo estas sustancias son altamente tóxicas para otras especies sobre las cuales no se tenía la intención de incidir. Lo anterior se ve agravado por el empleo indiscriminado de estos compuestos, resultando en la contaminación del medio ambiente (Rao, 2006).

Los plaguicidas organofosforados son los insecticidas más utilizados en actividades agrícolas. Sin embargo, a pesar de que tienen una persistencia limitada en el ambiente y una toxicidad selectiva a insectos con respecto a mamíferos, cerca de una tercera parte de este tipo de plaguicidas muestra una toxicidad severa para los peces (Vittozzi *et al.*, 2001). No obstante, los efectos subletales de muchos plaguicidas organofosforados sobre la fisiología de los organismos acuáticos no han sido descritos en detalle (Morgan *et al.*, 2002).

Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la intoxicación aguda con diazinón, el insecticida más usado en México, sobre la funcionalidad del hígado, uno de los órganos más importantes en el proceso de desintoxicación así como sobre uno de los mecanismos más importantes de la respuesta inmune innata como es la fagocitosis.

Previo a la determinación de los efectos del diazinón sobre los diferentes parámetros fisiológicos, se determinó la concentración letal 50 de este plaguicida sobre la tilapia nilótica. Los resultados experimentales ( $CL_{50} = 7.83$  ppm) revelan que el diazinón es un plaguicida "altamente tóxico" para la especie estudiada, de acuerdo con lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Arias *et al.*, 1986)

Posterior a la determinación de la  $CL_{50}$ ; se evaluó el efecto de la exposición aguda a diazinon:  $CL_{50}$  (7.83 ppm) y  $\frac{1}{2} CL_{50}$  (3.91 ppm), sobre la actividad de las enzimas hepáticas ALP, AST, GGT, ALT y sobre la concentración de proteínas plasmáticas, las cuales son indicadoras de la función hepática, así como sobre la actividad fagocítica de células de sangre periférica de tilapia nilótica.

Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto del diazinón sobre la actividad hepática, sugieren que el diazinón no altera de manera significativa la funcionalidad del hígado. Específicamente, la actividad de alanino amino transferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) fueron similares en peces control e intoxicados; indicando que diazinón no daña el tejido parenquimatoso. Por otro lado, la actividad de la enzima glutamin transferasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALP) y la concentración total de proteínas plasmáticas, presentes en peces intoxicados, no cambiaron de manera significativa en peces expuestos al plaguicida en comparación con peces control. Esto sugiere que la exposición el plaguicida organofosforado a las concentraciones de 7.83 y 3.91 ppm no afecta significativamente el metabolismo hepático de tilapia *O. niloticus*.

Resultados similares fueron reportados por Lusková y colaboradores (2002) en Carpa (*Cyprinus carpio* L) quienes evaluaron el efecto de 32.5 ppm de diazinón sobre la actividad de ALP, AST, GGT, ALT en plasma de este pez. Estos autores concluyen que la exposición aguda a dosis subletales de diazinón no afecta la funcionalidad del tejido parenquimatoso, músculo esquelético y hepatocelular.

Uno de los mecanismos más importantes de la respuesta inmune innata es la fagocitosis, un mecanismo de defensa rudimentario, primitivo, pero generalmente muy eficiente de defensa contra agentes extraños (Silva *et al.*, 2002). En la sangre de peces, los neutrófilos y monocitos son las principales células responsables del mecanismo fagocítico. Estas células representan el 40-60% del total de leucocitos (Passantino, 2002; Neumann *et al.*, 2001). Lo cual es una muestra de la importancia de este mecanismo de defensa.

Nuestras observaciones indican que la exposición aguda a diazinón reduce de manera significativa el índice de fagocitosis y el porcentaje de células fagocíticas activas en peces intoxicados, esto comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ). Sin embargo el efecto negativo observado fue dosis independiente, pues la disminución en ambos parámetros fue similar en los peces intoxicados con ambas concentraciones del plaguicida. Esto confirma lo reportado en otros estudios, los

cuales muestran que el diazinón tiene un claro efecto negativo sobre la capacidad fagocítica (Dutta et al., 1997; Khalaf-Alah, 1999).

Otros experimentos realizados en ratón reportan un bajo numero de monocitos en sangre periférica de organismos intoxicados crónicamente con 25 mg, 2 mg y 0.2 mg/kg de diazinón (Neishabouri et al., 2004). Un decremento en las cuentas de neutrófilos y monocitos, así como anormalidades morfológicas en el bazo, timo y nódulos linfoides de ratón expuesto a 300 mg/kg de diazinon durante 45 días ha sido también reportado por Handy et al. (2002).

La disminución de uno de los mecanismos de la respuesta inmune innata más importantes como es la fagocitosis en peces expuestos a diazinón podría hacer más susceptibles a los organismos expuestos a este tipo de plaguicidas a padecer infecciones. Lo que obviamente repercute en la economía de las zonas en donde las especies acuáticas, como la tilapia, son explotadas con fines comerciales.

## CONCLUSIONES

- La  $CL_{50}$  del diazinon para la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) es 7.83 ppm.
- La exposición aguda ( $CL_{50}$  y  $\frac{1}{2} CL_{50}$ ) de la tilapia nilótica al diazinón no afecta su función hepática (actividad enzimática de ALP, AST, GGT, ALT y concentración de proteínas plasmáticas).
- La exposición aguda ( $CL_{50}$  y  $\frac{1}{2} CL_{50}$ ) de la tilapia nilótica al diazinón disminuye significativamente a la actividad fagocítica: porcentaje de células activas(%CA) e índice de fagocitosis (IP).
- La determinación de los parámetros inmunológicos en peces es útil como bioindicador de stress y posible alteración de la salud de estos organismos inducidos por los plaguicidas presentes en el medio ambiente.

## LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

Está bien establecido el papel que tiene el hígado en los mecanismos de detoxificación de los compuestos, proceso que frecuentemente puede provocar daño hepático. A pesar de que en el presente trabajo los datos de las determinaciones de actividad de enzimas hepáticas sugieren que no existe alteración funcional del hígado, para complementar nuestros datos es importante que en trabajos posteriores se realicen estudios histopatológicos que permitan evaluar la integridad tisular de este órgano.

No obstante que los resultados del presente trabajo revelan que la exposición aguda a concentraciones subletales de diazinón afecta la ingestión de partículas opsonizadas y provoca la disminución del número de células fagocíticas, con el objetivo de complementar los datos sobre alteración de la actividad fagocítica por diazinón, es necesario evaluar en trabajos futuros aspectos bioquímicos del proceso fagocítico, como liberación de radicales (estallido respiratorio) y otros mecanismos microbicidas. Además de evaluar parámetros como índice de ingestión y digestión.

## BIBLIOGRAFIA

- Arias, J.A. & Rojas, D. (1986). Efecto de plaguicidas en el medio ambiente. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. 1-4. pp.
- Arredondo-Figueroa, J.L., Lozano-García, S. (1996). Cultivo de tilapia en México. En: Primer curso internacional de producción de tilapia. UNAM. *AUAMI-SEMARNAP*. División de educación continua. México. 7-18.
- Betoulle, S.; Etienne, J.C y Vernet, G. 2002. Acute immunotoxicity of gallium to carp (*Cyprinus carpio* L). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **68**: 817-823.
- Bols, N.C; Brubacher, J.L; Ganassin, R.C; Lee, L.E.J. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dep Comp Immunol.* **25**: 853-873.
- Browser, D.H.; Frenkel, K. y Zelikoff, J.T. 1994. Effect of *in vitro* nickel exposure on the macrophage-mediated immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **52**: 367-373.
- Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L. 2001. The use of fish cells in ecotoxicology. *ECVAM Workshop 47. ATLA.* **31**: 317-351.
- Cossaniri-Dunier, M. 1998. Effect of manganese ions on the immune response of carp, (*Cyprinus carpio*) against *Yersinia ruckeri*. *Dev. Comp. Immunol.* **12**: 573-579.
- Cox, C. 2000. Diazinon: toxicology. *J. Pesticide Reform.* **20**: 15-21.
- Dutta, H.M., Quadri, N., Ojha, J., Singh, N.K., Adhakari, S., Munshi, J.S., Roy, P.K. 1997. Effect of diazinon on macrophages of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, a cytochemical evaluation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58**: 135-141.
- Extoxnet. Archived at Oregon State University. 1996. Pesticide Information Profiles.

- Fernández, A. B., de Blas, I., Ruiz, I. 2002. El sistema inmune de los teleosteos (I). Células y Órganos. *Aquatic*. **16**: 1-15.
- Galloway, T., Handy, R. 2003. Immunotoxicity of organophosphorus pesticides. *Ecotoxicol*. **12**: 345-363.
- Girón-Pérez, M.I.; Bárcelos-García, R. Vidal-Chavez, Z.G., Romero-Bañuelos, C.A. y Robledo-Marengo, M.L. 2006. Effect of chlorpyrifos on the hematology and phagocytic activity of Nile tilapia cells (*Orochromis niloticus*). *Toxicol. Mechanisms. Methods*. **16**: 1-5.
- Iwama, G., Nakanishi, T. (1996). The fish immune system. *Academic Press*. USA. Pp 51-60.
- Kacmar, P., Pistf, J., Mikula, I. 1999. Immunotoxicology and veterinary medicine. *Acta Vet Brno*. **68**: 57-79.
- Khalaf-Allah, S.S. 1999. Effect of water pollution on some hematological, biochemical and immunological parameters in *Tilapia nilotica* fish. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. **106**: 67-71.
- Luskova, V., Svoboda, M. y Kolarova, J. 2002. The effect of diazinon on blood plasma biochemistry in carp (*Cyprinus carpio* L). *Acta. Vet. Brno*. **71**: 117-123.
- Martínez, J. F. 1991. La importancia de los bioensayos en la evaluación de la toxicidad aguda. *Univ. Ciencia y Tecnología*. **1**: 37-44.
- Morales-Diaz, A. 1988. Manual teórico para el cultivo de tilapia en los centros acuícolas de la secretaría de pesca. pp: 181-183.
- Morgan, E.R. y Brunson, M.W. 2002. Toxicities of agricultural pesticides to selected aquatic organisms. *Southern Regional Aquaculture Center-SRAC- Publication 4600*.
- Muniz-Junqueira, M.I., Kamib, R. S., de Paula-Coelho, V., Junqueira, L. 2006. Effects of pravastatin on the in vitro phagocytic function and hydrogen peroxide production by monocytes of healthy individuals. *Int. Immunopharmacol*. **6**: 53-60.
- Neishabouri, E.Z., Hassan, Z.M., Azizi, E., Ostad, S.N. 2004. Evaluation of immunotoxicity induced by diazinon in C57BL/6 mice. *Toxicology*. **196**: 173-179.

- Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., Belosevic, M. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Develop. Comp. Immunol.* **25**: 807-825.
- Peña, C.E., Dean, E., Carter y Ayala-Fierro, F. 2001. Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>.
- Rao, J.V. 2006. Sublethal effects of an organophosphorus insecticida (PRP-II) on biochemical parameters of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* **143**: 492-498.
- Repetto, R., Baliga, S. (1996). Pesticides and the immune system: the public health risks. *World Resources Institute*. Pp 3-8.
- Rodríguez, A. R. (2004). Metabolismo de las toxinas ambientales. Fondo de cultura económica. Pp:61.
- Rodríguez, A.R. (2003). Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. Fondo de cultura económica. Pp:56.
- Ruiz, I., Fernández, A.B. y de Blas, I. 2003. El sistema inmune de los teleósteos (IV): Principales factores que afectan a la respuesta inmune. *Aquatic.* **19**: 1-7.
- Sanchez-Dardon, J., Voccina, I., Hontela, A., Chilmonczyk, S., Dunier, M., Boermans, H., Blakely, B. y Fournier, M. 1999. Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 1492-1497.
- Silva, J.R.M.C., Staines, N.A., Hernandez-Blazquez, F.J., Porto-Neto, L.R., Borges, J.C.S. 2002. Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage of *Notothenia coriiceps*. *Journal of Fish Biology.* **60**: 466-478.
- Vittozzi, L.; Fabrizi, L.; Di Consiglio, E. y Testai, E. 2001. Mechanistic aspect of organophosphorothionate toxicity in fish and humans. *Environ. International.* **26**: 125-129.

- Sakazaki, H., Ueno, H., Uematani, K., Utsumi, H., Nakamuro, K. 2001. Immunotoxicological evaluation of environmental chemicals utilizing mouse lymphocytes mitogenesis test. *J. Health. Science.* 47: 258-271.
- Zelikoff, J.T. Fish immunotoxicology. (1994) En: Dean, J.H; Luster, M.I; Munson, A.E & Kimber, I. Immunotoxicology and immunopharmacology. New York : Raven Press. Pp: 71-96.