

Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
División de Ciencias Biológicas y Ambientales



“Efecto de la exposición aguda *in vivo* a endosulfán en el porcentaje y la actividad citotóxica de células NCC esplénicas y la expresión del gen granzima de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*)”.

Tesis
Que para obtener el título de
Licenciado en biología

Presenta
Víctor Hugo Siordia Sánchez

Directora: Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos
Asesores: Dra. Anne Marguerite Helene Santerre
Dr. Luís Felipe Jave Suárez
Dr. Pablo Cesar Ortiz Lazareno

Zapopan, Jalisco. 18 diciembre 2012



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD-BIO-113/2012

C. VÍCTOR HUGO SIORDIA SANCHEZ
PRESENTE

Manifiestamos 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 "Efecto de la exposición aguda *in vivo* a endosulfán en el porcentaje y la actividad citotóxica de células NCC esplénicas y la expresión del gen granzima de tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*)", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director(a) de dicho trabajo al **Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos** y como asesor/a(s) a: **Dr. Pablo Cesar Ortiz Lazareno**; **Dr. Luis Felipe Jave Suárez** y **Dra. Anne Marguerite Helene Santerre**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 21 de junio, del 2012.


DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIATURA EN BIOLÓGIA


M.C. VERÓNICA PALOMERA AVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias,
 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: "**Efecto de la exposición aguda *in vivo* a endosulfán en el porcentaje y la actividad citotóxica de células NCC esplénicas y la expresión del gen granzima de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*)**"; que realizó el pasante: **Victor Hugo Siordia Sánchez** con número de código **304521331**, 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
 Piensa y Trabaja

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, 06 de Noviembre del 2012


 Dra. Anne Marguerite Helene Santerre


 Dr. Luis Felipe Jave Suárez


 Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos
 Directora del trabajo


 Dr. Pablo César Ortiz Lazareno
 Asesorías

Nombre completo de los Encargados a su favor por el Comité de Titulación

Fecha de aprobación

Fecha de derogación

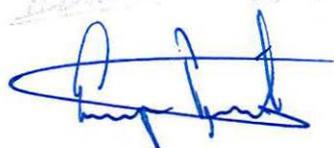
Dra. Galina Petrovna Zaitseva

Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez

M. C. Eduardo Juárez Carrillo

Supl.

Dra. Anne Marguerite Helene Santerre



SEDE

El presente trabajo se realizó en Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias CUCBA, Universidad de Guadalajara. En los Laboratorios de Inmunología y de Biomarcadores Moleculares y Genética Molecular del Departamento de Biología Celular y Molecular.

Y

En la División de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (IMSS). En los laboratorios de Inmunofarmacología, Cultivo Celular y de Inmunología Molecular.

APOYO FINANCIERO

Cuerpo Académico: “Biología de la Respuesta Inmune”. CA-482 y al Programa de becas Universitarias 2012. Folio: 20120076504.

DEDICATORIA

A mi madre y a mi padre

A mis hermanos

A Joel y Víctor

Al lector...

RECONOCIMIENTO

Mi respeto a la Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos por su incomparable dedicación y acompañamiento científico, su disposición, humanidad, conocimiento, actitud, personalidad y enseñanzas que me brindo durante el transcurso de la licenciatura y más aún en el desarrollo de esta investigación.
¡Gracias Doctora!

Mi admiración por esculpir y enseñarme el verdadero significado de la humildad, la persistencia, la paciencia, la esperanza e instruirme diestramente en el arte de las ciencias.
¡Muchas Gracias!

AGRADECIMIENTOS

Dra. Anne Santerre, por su apoyo incondicional y asesoría en el ámbito académico y científico; así como su calidez humana que me brindo durante toda la licenciatura y la investigación.

Dr. Pablo Cesar Ortiz Lazareno, por su responsabilidad y dedicación científica; así como su espléndida asesoría y contribuciones que facilitaron la realización de esta investigación

Dr. Luis Felipe Jave Suárez, por su dedicación y generosidad científica; al igual que su grandiosa asesoría, contribución, paciencia y comprensión en la realización de esta investigación.

M. C. Eduardo Juárez Carrillo, por su ayuda, asesoría y espacio donde realizar parte de esta investigación.

Amigos y compañeros de la licenciatura, por sus consejos y apoyo.

A los estudiantes de Doctorado en la División de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), quienes por su disposición y apoyo permanente hicieron mi camino más cálido y relajado.

A la Med. C. Alejandra Güereca Estrada, por su ayuda, compañía y amistad durante la investigación.

INDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	5
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Endosulfán	10
2.1.1 El endosulfán y sus efectos biológicos	10
2.1.2 Características fisicoquímicas	12
2.1.3 Toxicidad y mecanismos de acción	13
2.1.4 Clasificación de la toxicidad	15
2.1.5 Ecotoxicidad y riesgo ambiental	15
2.1.6 Persistencia, bioacumulación y dispersión	16
2.2 Modelo de experimentación	17
2.2.1 Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	17
2.2.2 Ciclo de vida de la tilapia	19
2.2.3 Requerimientos ambientales	19
2.2.4 Nutrición y alimentación	20
2.2.5 Acuicultura	20
2.3 Inmunología del pez	21
2.3.1 Órganos linfoides	21
2.3.2 Respuesta inmune innata	21
2.3.2.1 Respuesta inmune innata mediada por células	22
2.3.3 Respuesta inmune adaptativa	22
2.3.3.1 Respuesta inmune adaptativa mediada por células	23

2.3.4 Células citotóxicas inespecíficas (NCC)	23
2.3.4.1 Funciones de las NCC	24
2.3.4.2 Mecanismos de activación citotóxica de las NCC	25
2.3.4.3 Granzima	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos particulares	31
6. DISEÑO METODOLÓGICO	32
7. MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1 Universo de estudio	33
7.2 Preparación del endosulfán	33
7.3 Obtención de las NCC	33
7.4 Análisis del inmunofenotipo de las NCC por citometría de flujo	34
7.5 Preparación de la línea celular HL-60 para el ensayo de citotoxicidad	34
7.6 Ensayo de citotoxicidad de las células NCC por citometría de flujo	34
7.7 Análisis para la expresión del gen de la granzima en células NCC por qRT-PCR	35
7.8 Análisis estadístico	36
8. RESULTADOS	37
8.1 Condiciones de cultivo de los peces y obtención del bazo	37
8.2 Obtención de la fracción enriquecida de NCC	38
8.3 Identificación del inmunofenotipo de las NCC esplénicas	39
8.4 Efecto del endosulfán <i>in vivo</i> en el número de NCC esplénicas	40
8.5 Efecto del endosulfán <i>in vivo</i> en la actividad citotóxica de las NCC sobre	

células blanco HL-60	41
8.6 Efecto del endosulfán <i>in vivo</i> en la expresión del gen granzima en NCC esplénicas	44
9. DISCUSIÓN	45
10. CONCLUSIONES	48
11. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO	49
12. ANEXOS	50
12.1 Catálogo de empresas formuladoras y comercializadoras de endosulfán en México	50
12.2 Condiciones y parámetros físico-químicos de <i>O. niloticus</i>	54
12.3 Tablas de alimentación y requerimiento proteico de <i>O. niloticus</i>	55
13. MATERIALES, EQUIPO E INSUMOS REQUERIDOS EN LA INVESTIGACIÓN	56
14. BIBLIOGRAFÍA	58

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α	A (alfa)
Ab	Anti-cuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
~	Aproximadamente
Asp-asa	Aspartasa
AY918866	
AY918867	Accesiones del banco de genes
β	B (beta)
BOX	Motivo en caja (prolina-secuencia hidrofóbica)
CAS	Susceptibilidad celular de apoptosis
cDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena complementaria
CE	Clasificación, etiquetado y envasado de las sustancias
CIBO	Centro de Investigación Biomédica de Occidente
CICOPLAFEST	Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas
CL	Concentración letal
Cl	Cloro
cm	Centímetro
CMM	Centros melanomacrofágicos
CRS	Células rojas sanguíneas
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
CUCBA	Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
δ	D (delta)
DL ₅₀	Dosis letal 50
$\Delta\Delta$ CP	Punto de cruce delta delta (entre grupos experimentales)
Δ CP	Punto de cruce delta (entre muestras experimentales)
Dr.	Doctor
Dra.	Doctora
DS	Desviación estándar
ϵ	E (épsilon)
ES	Error estándar
<i>et al</i>	<i>Et alii (y otros)</i>
FADD	Proteína asociada a Fas con dominio de muerte
FasL	Fas ligando
FasLs	Fas ligando soluble
FasR	Fas receptor
Fc	Fracción cristalizante
FB	Factores de bioacumulación

Fig	Figura
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Dispersor frontal (Forward scatter)
fyn	Proto-oncogen de la familia src
γ	G (gama)
g	Gramo
GABA	Ácido gamma-amino butírico
°C	Grados centígrados
GEF	Global Environment Facility
GeneBank	Banco de Genes
GRTL-1	Granzima de tilapia 1
θ	T (teta)
h	Hora(s)
HL-60	Células humanas promielocíticas de leucemia
<i>I. e.</i>	<i>Id est (esto es, es decir)</i>
Igs	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INF	Interferon
ITCR	Industrial Toxicology Research Centre
IUPAQ	Unión internacional de química pura y aplicada
kDa	Kilo Dalton
Kg	Kilogramo
L	Litro
lck	Proteína tirosina quinasa específica de leucocitos
μ	M (mi)
\pm	Más o menos
>	Mayor que
m	Metro
mAb5C6	Anticuerpo monoclonal 5C6
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
<	Menor que
Met-asa	Metionasa
mg	Miligramo
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	Minuto
mL	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NCC	Células citotóxicas inespecíficas (Non-specific cytotoxic cells)

NCCRP-1	Receptor de las células citotóxicas inespecíficas 1
NK	Asesinas naturales (Natural killers)
NKTag	Natural killer target antigen
O.	<i>Oreochromis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
π	P (pi)
%	Por ciento
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCM	Muerte celular programada
pg	Picogramos
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
PNUMA (UNEP)	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
ppb	Parte por billón
ppm	Parte por millón
PRM	Motivo rico en prolina
PTS	Substancias tóxicas persistentes
PXT	Picrotoxina
RAPAM	Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo en tiempo real
RIA	Respuesta inmune adaptativa
RII	Respuesta inmune innata
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo (Roswell Park Memorial Institute)
Σ	S (Sumatoria)
S	Svedberg
S. A. de C. V.	Sociedad anónima de capital variable
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
S. C. de R. L.	Sociedad cooperativa de responsabilidad limitada
SASF	Factores séricos de activación al estrés
SEMARNAT	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
SFB	Suero fetal bovino
SI	Sistema inmune
SQA	Servicio de compendios químicos
src	Sarcoma
SSC	Dispersor lateral
Tc	T cooperadores
TNF	Factor de necrosis tumoral

TRAIL
IP

TNF relacionado con el ligando de la inducción-apoptosis
Yoduro de propidio

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Estructura química del endosulfán	10
Figura 2. Exposición directa e indirecta de endosulfán	11
Figura 3. Neurotoxicidad	12
Figura 4 Receptor GABA	14
Figura 5. Introducción de plaguicidas en el ecosistema	16
Figura 6. Distribución de plaguicidas en el ambiente	17
Figura 7. <i>Oreochromis niloticus</i>	18
Figura 8. Morfología interna de <i>O. niloticus</i>	18
Figura 9. Ciclo de vida en <i>O. niloticus</i>	19
Figura 10. Principales órganos linfoides de <i>O. niloticus</i>	21
Figura 11. Electromicrografía de NCC	22
Figura 12. Modelo hipotético de la proteína NCCRP-1	24
Figura 13. Receptores de muerte celular	25
Figura 14. Células HL-60	26
Figura 15. Citotoxicidad inducida	27
Figura 16. Zootecnia de los organismos	37
Figura 17. Bazos de tilapia del Nilo en PBS 1X	37
Figura 18. Determinación de temperatura óptima de centrifugación para la obtención de las NCC	38
Figura 19. Células inmunocompetentes de <i>O. niloticus</i>	38
Figura 20. Inmunofenotipificación de las NCC	39
Figura 21. Efecto del endosulfán <i>in vivo</i> sobre el número de NCC esplénicas	40
Figura 22. Efecto del endosulfán <i>in vivo</i> sobre el porcentaje de las NCC esplénicas de <i>O. niloticus</i>	40
Figura 23. Identificación de la células	41
Figura 24. Histogramas representativos de actividad citotóxica de las NCC sobre células HL-60	42
Figura 25. Efecto del endosulfán <i>in vivo</i> en la actividad citotóxica de las NCC sobre HL-60	43

Figura 26. Efecto *in vivo* del endosulfán sobre la expresión del gen granzima en las NCC esplénicas 44

TABLAS

Tabla 1. Características del endosulfán	13
Tabla 2. Clasificación toxicológica de plaguicidas por la OMS	15
Tabla 3. Condiciones de la qRT-PCR para granzima y β-actina en el LightCycler® 2.0	35
Tabla 4. Cebadores de granzima y β-actina	36

RESUMEN

ANTECEDENTES. Estudios recientes demuestran la incidencia de enfermedades relacionadas con alteración del sistema inmune y derivadas del uso de plaguicidas. El endosulfán es un plaguicida organoclorado de amplio uso en México, pero restringido en por lo menos 73 países debido a las regulaciones ejercidas por el Convenio de Estocolmo y Róterdam. El endosulfán ejerce efectos adversos no solo sobre la salud, sino al medio ambiente debido a su gran estabilidad fisicoquímica.

OBJETIVO. Estudiar el efecto del endosulfán *in vivo* sobre la inmunidad innata de la tilapia nilótica juvenil (*Oreochromis niloticus*) bajo una exposición aguda a concentración subletal, en el inmunofenotipo de las NCC esplénicas, así como su efecto en la actividad citotóxica de estas células y la expresión del gen granzima.

MÉTODOS. Se trabajó con esplenocitos de *O. niloticus* expuestos y no expuestos a endosulfán. Se emplearon gradientes densitométricos para separar los monocitos y posteriormente la citometría de flujo para diferenciarlos de otras poblaciones celulares y cuantificar las NCC así como evaluar el potencial citotóxico de estas células frente a células blanco HL-60; también se empleó la qRT-PCR para evaluar la expresión del gen granzima en células NCC.

RESULTADOS. La inmunofenotipificación indica que la exposición al endosulfán con una dosis de 7 ppm durante 96 h, tiende a aumentar la población de NCC, sin embargo, existe una disminución de la actividad citotóxica de estas células, de igual manera se registró un decremento en la expresión del gen de la granzima; mostrando un efecto negativo sobre la actividad citotóxica de esta estirpe celular.

CONCLUSIÓN. El endosulfán es un insecticida inmunotóxico para la tilapia nilótica juvenil debido a que indujo alteraciones en la respuesta inmune innata de las células NCC en las condiciones experimentales de exposición *in vivo*, por corto tiempo y a 7 ppm; este compuesto organoclorado tiende a modificar los parámetros de la inmunidad innata de la tilapia nilótica juvenil. Tomando en cuenta que este pesticida es estable (persistente en ambiente) y bioacumulable los datos presentados aquí apoyan las disposiciones internacionales en la restricción en su uso.

1. INTRODUCCIÓN

El endosulfán es un insecticida organoclorado (CAS 115-29-7) de amplio uso en México, pero restringido en varios países por sus efectos adversos al medio ambiente y a la salud. Se produjo después de la Segunda Guerra Mundial para el control de insectos rizófagos y caulifagos.

Los compuestos organoclorados son muy escasos en la naturaleza, por lo cual los organismos no lo metabolizan. Esta característica y el hecho de ser altamente fotoestables y lipofílicos explica porque tienden a la bioacumulación y biomagnificación a través de las cadenas alimenticias (Ware *et al.*, 2004). Además cuentan con potencial de transporte a larga distancia en el ambiente (por evaporación y lixiviación) lo que les permite entrar en contacto con mantos acuíferos y cuerpos superficiales de agua. El Convenio de Estocolmo y Róterdam en la Unión Europea recomendaron la prohibición de su empleo (UNEP, 2009a; UNEP 2009b; UNEP, 2010). Además otros países como Estados Unidos, Canadá, Japón, Colombia, Venezuela, Belice, Jamaica, Paraguay, Sta. Lucía y Brasil cuentan con fecha límite para su cancelación (www.rapam.org).

En México se aplica en 41 cultivos, en tratamientos ornamentales y para formulación o manufacturación de otros plaguicidas. El insecticida es regulado por la CICOPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas) organismo de gobierno conformado por representantes de la Secretaría de Salud, de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (INE, 2011).

Los peces en especial la tilapia (*Oreochromis niloticus*) son excelentes modelos para estudios inmunotoxicológicos y son eficientes sistemas modelo-costo, al ser equiparables con pequeños mamíferos. Investigaciones previas muestran que el endosulfán en macrófagos esplénicos de tilapia *in vivo*, en un periodo corto de exposición a concentración baja, favorece la viabilidad celular e induce la activación inespecífica y estrés oxidativo (Télliez-Bañuelos, *et al* 2009). Otros autores reportan a este insecticida como un xenoestrógeno al inducir proliferación de células cancerígenas como MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7; cáncer de mama), así como factor de riesgo en mamíferos para cáncer endometrial (Weiderpass *et al.*, 2000; Bonefeld-Jorgensen *et al.*, 2005).

En teleósteos la respuesta inmune (RI) se encuentra ampliamente desarrollada (Watts *et al.*, 2001) debido a que están expuestos en primera instancia a los xenobióticos (Bols *et al.*, 2001) y que la alteración de la función inmune puede incrementar la susceptibilidad a patógenos y aumentar los niveles de estrés relacionados con la contaminación ambiental (Rice *et al.*, 1996).

En el presente proyecto se evaluó el efecto de la exposición aguda *in vivo* a endosulfán en el porcentaje y la actividad citotóxica de células citotóxicas no específicas (NCC) esplénicas y la expresión del gen granzima de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

2. ANTECEDENTES

2.1 Endosulfán

El endosulfán es un plaguicida perteneciente al grupo de los organoclorados (*Fig. 1*), dentro del grupo ciclodieno. Los organoclorados son compuestos orgánicos con enlaces covalentes entre átomos de carbono y cloro. Su gran estabilidad fisicoquímica, hace que sean muy persistentes en el ambiente (Ware *et al.*, 2004). Se emplea como fumigante en cultivos de vegetales, frutas, arroz, algodón, nueces de la India, té, café tabaco y árboles para madera (Nayar *et al.*, 1992) como preservante de la misma, así como para el control de la mosca tsé-tsé y termitas (Anon, 1984; Naqvi *et al.*, 1993). Actualmente, el endosulfán cuenta con 86 marcas comerciales en nuestro país (*Anexo 1*) (INE, 2011).

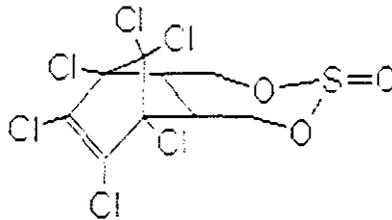


Figura 1. Estructura química del endosulfán.
(Anon, 1989).

El pesticida actúa como veneno de contacto y es altamente lipofílico, lo cual favorece su acumulación en el tejido graso de los organismos a través de cadenas alimenticias (Sosan *et al.*, 2008). Su uso extensivo genera diversos efectos biológicos en organismo no blanco.

2.1.1 El endosulfán y sus efectos biológicos

El endosulfán modifica los parámetros fisiológicos de los organismos expuestos y con ello desencadena problemas en la respuesta inmune (alergias, procesos inflamatorios crónicos, enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide y lupus), además de incrementar los riesgos de cáncer testicular, de próstata y mama (Migliore *et al.*, 2002; Okoumassoun *et al.*, 2003; Hernández-Flores *et al.*, 2005; Siddiqui *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Narita *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que el endosulfán es altamente tóxico en forma aguda ya sea inhalado o por vía oral, así como ligeramente tóxico por vía dérmica. Este compuesto afecta fuertemente el sistema

nervioso y sus efectos neurotóxicos han sido observados también en animales en estudios agudos, subcrónicos y crónicos, como en seres humanos por exposición ocupacional o intencional (INE, 2011). El insecticida en cortos periodos de intoxicación puede resultar en irritabilidad, inquietud, espasmos musculares, convulsiones y muerte. Los efectos crónicos del endosulfán en animales expuestos incluyen afectaciones en riñón, hígado, sangre y glándula paratiroidea. Existe también evidencia que el endosulfán actúa como disruptor endócrino así como depresor del sistema inmunológico en animales a dosis que no inducen ninguna otra señal clara de toxicidad (Anon, 1997; ATSDR, 2000). En seres humanos, hay evidencias de daño hepático, renal y al DNA a largo plazo por exposición ocupacional (Fig. 2) (INE, 2004; UNEP, 2009a).



Figura 2. Exposición directa e indirecta de endosulfán. Mediante la aspersión en cultivos. Fuente: <http://www.laargentinaadiario.com.ar/site/sociedad/el-endosulfan-que-habria-matado-dos-chicos-en-corrientes-e-intoxico-otros-esta-prohibido-en>

Los efectos adversos del endosulfán en la salud son de índole cardiotoxico, carcinogénico, disruptor endocrino, neurotóxico e inmunotóxico, hematológicos ya que daña las células rojas sanguíneas en concentraciones de 1ppb-1ppm (Daniel *et al.*, 1986; Hack *et al.*, 1995; Pistl *et al.*, 2003; Kalender *et al.*, 2004; Schoeters *et al.*, 2008; Suñol *et al.*, 2008). Este insecticida contamina los ambientes acuáticos con dosis subletales debido a que se acumula en los tejidos, por lo cual se reporta como de muy alta toxicidad (Téllez-Bañuelos *et al.*, 2010).

Tiene efectos neurotóxicos al inhibir la acetilcolinesterasa (Fig. 3) del cerebro, causando descargas descontroladas de acetilcolina y también se han reportado que puede causar ataques epilépticos recurrentes (Navqui *et al.*, 1993; Kutluhan *et al.*, 2003).

Existen varios reportes de efectos genotóxicos del endosulfán: en la cinética del ciclo celular en mamíferos, promoción de intercambio entre cromátides hermanas en embriones de rata y efectos

mutagénicos en insectos que permiten concluir que el endosulfán es probablemente mutagénico (ATSDR, 2000). En el potencial cancerígeno científicos de RAPAM reportan sobre la capacidad del endosulfán para iniciar y promover cáncer: “Endosulfán and Carcinogenicity: a Summary of Evidence (Watts, 2011)” disponible en: <http://www.ine.gob.mx/sqre-eventos>; así como genotóxico en ostiones y peces el endosulfán sigue en revisión como se evidencia en el documento: “Efectos nocivos del endosulfán en la salud humana UNEP/POPS/POPRC.6/12 (UNEP, 2010)” donde se presenta información adicional sobre sus efectos en la salud.

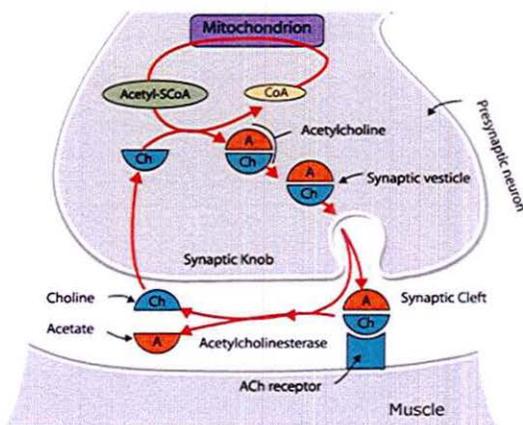


Figura 3. Neurotoxicidad (acetilcolinesterasa). Fuente: <http://www.psicofarmacos.info/images/graficos/Neuromuscular-full.jpg>

2.1.2 Características fisicoquímicas

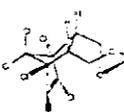
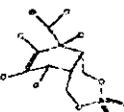
Nombre químico por IUPAQ (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, por sus siglas en inglés): 6,7,8,9,10,10-hexacloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahidro-6,9-metano-2,4,3-benzodioxatiepín-3-óxido. Con fórmula química: $C_9H_6Cl_6O_3S$. Peso molecular de 406.95. El endosulfán grado técnico es un sólido cristalino en forma de escamas de color crema a marrón, con un ligero olor a dióxido de sulfuro (Anon, 1997). Es sensible a los ácidos, a los álcalis, es poco soluble en agua (1.4 mg/L), pero se disuelve en xileno, cloroformo, kerosene y en la mayoría de los solventes orgánicos; es fotoestable y no inflamable (ATSDR, 2000).

Este producto técnico está formulado por una mezcla de los isómeros endosulfán I (alfa) y

endosulfán II (beta). Contiene por lo menos 94% de los isómeros alfa y beta puros en una proporción 7:3, respectivamente. El principal metabolito del endosulfán es, el sulfato de endosulfán, puede encontrarse en el ambiente por fotólisis del endosulfán o como resultado de la oxidación de éste por microorganismos. Otros productos de degradación incluyen; endosulfán diol, endosulfán lactona, endosulfán éter, endosulfán hidroxietter, endosulfán ácido carboxílico. En muchas ocasiones se utiliza el término “endosulfán suma” o “ Σ endosulfán” que incluye a los dos isómeros, alfa y beta (Tabla 1) (UNEP, 2009a).

Las propiedades insecticida del endosulfán fueron descritas por W. Finkenbrink en 1956, desarrollado en Alemania por Hoechst y registrado en Estados Unidos en 1960, época en la que no había requisitos estrictos para registrar plaguicidas, estos fueron establecidos hasta 1975 (Nivia *et al.*, 1993). Se mezcla con la mayoría de los fungicidas y es compatible con la mayoría de los plaguicidas (Anon, 1989). El endosulfán es de rápida evaporación y se considera persistente en el medio ambiente, con una vida media de 28 a 391 días en suelo y de 18 a 21 días en agua (UNEP, 2009b).

Tabla 1. Características del endosulfán, endosulfán alfa, endosulfán beta y sulfato de endosulfán. Fuentes: Toxicological Profile for Endosulfán, ATSDR, 2000. Pesticide Action Network North America, Pesticides Database.

Nombre común Fórmula química Número CAS	Endosulfán	Endosulfán I (alfa) <chem>C9H6Cl6O3S</chem>	Endosulfán II (beta)	Sulfato de endosulfán <chem>C9H6Cl6O4S</chem>
	115-29-7	959-98-8	33213-65-9	1031-07-8
Estructura				
Log K _{ow}	3.55 a 3.62	3.83	3.52	3.66
Log K _{oc}	3.5	3.55	—	—

2.1.3 Toxicidad y mecanismos de acción

El mecanismo de acción del endosulfán es por interacción antagonista no competitiva con los receptores del ácido gamma-amino butírico (GABA) en el cerebro; en insectos este receptor es el principal blanco nervioso en la inhibición del canal clorinado (Casida *et al.*, 2004). El enlace con el receptor del GABA induce la incorporación de iones cloruro por las neuronas, lo que provoca la

hiperpolarización de la membrana celular. El bloqueo del gradiente de potencial eléctrico se traduce en una repolarización sólo parcial de la neurona y un estado de excitación incontrolable.

Existen dos clases de receptores GABA β y GABA α . El receptor GABA α , es un complejo proteico oligomérico, el cual cuenta con sitios de unión para GABA, benzodiazepinas y picrotoxina (PXT). El neurotransmisor GABA induce al receptor GABA α (Fig. 3) esto favorece la apertura del canal iónico selectivo a cloro (Cl $^-$) y conduce el flujo de Cl $^-$ al interior de la neurona a través de un gradiente electroquímico (Pomes *et al.*, 1994). El mecanismo de acción del pesticida se explica cuando el endosulfán se une al sitio de reconocimiento de la PXT (ubicado en el canal Cl $^-$ acoplado al receptor GABA), lo que determina la disrupción del flujo de Cl $^-$, bloqueando el paso del anión al interior de la neurona, lo que genera hiperexcitación neuronal (Suñol *et al.*, 2008).

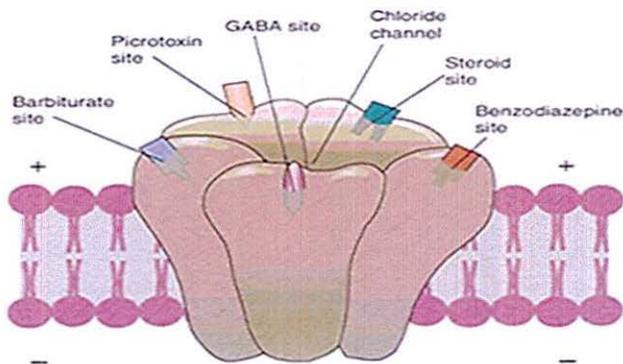


Figura 4. Receptor GABA. Fuente: <http://gomerville.com/2009/10/12/>

Los insecticidas son un factor de riesgo para la salud de los organismos no blanco, como mamíferos y peces, debido a que en estos los linfocitos, macrófagos y NCC, al igual que neuronas, presentan receptores GABA α (Alam *et al.*, 2006; Praveen *et al.*, 2006b; Reyes-García *et al.*, 2007; Suñol *et al.*, 2008). Para identificar y evaluar los perfiles toxicológicos de insecticidas en organismos no blanco, se han clasificado tres niveles de exposición: aguda (1-14 días), intermedia (15- 364 días) y crónica (>365 días) (Abadin *et al.*, 2007). En tilapia nilótica (*O. niloticus*) se ha reportado una CL $_{50}$ de 12.79 μ g/L para juveniles de peso 150-200 g (Téllez-Bañuelos *et al.*, 2009).

2.1.4 Clasificación de la toxicidad

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) clasifica al endosulfán como Categoría Ib –Altamente Peligroso. La Unión Europea también lo califica como Altamente Peligroso. La Organización Mundial de la Salud (OMS) agrupa al endosulfán en Categoría II (Tabla 2) – Moderadamente Peligroso. Se ha considerado que la clasificación de la OMS es inapropiada, tomando en cuenta la tipificación aceptada en países de todo el mundo y la información disponible sobre su toxicidad. La clasificación de la OMS se basa principalmente en el valor DL_{50} para toxicidad aguda reportada por la empresa fabricante (Romeo, 2000). El Centro de Investigación Toxicológica Industrial (ITRC) de la India, es el centro nodal para el proyecto PNUMA-GEF de Evaluación de Sustancias Tóxicas Persistentes (PTS) para la región del Océano Índico y ha clasificado al endosulfán como Extremadamente Peligroso (Anon, 1989).

Tabla 2. Clasificación toxicológica de plaguicidas por la OMS.

Fuente: <http://plaguicidasyhogar.com.ar/toxico.html>

CATEGORÍA TOXICOLÓGICA	Símbolo pictográfico para cada categoría	DL ₅₀ aguda (rata): mg de formulación por kg de peso corporal			
		Por vía oral		Por vía cutánea	
		Sólido	Líquido	Sólido	Líquido
Ia EXTREMADAMENTE PELIGROSOS	 MUY TÓXICO	5 ó menos	20 ó menos	10 ó menos	40 ó menos
Ib ALTAMENTE PELIGROSOS	 TÓXICO	5-50	20-200	10-100	40-400
II MODERADAMENTE PELIGROSOS	 DANINO	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III LIGERAMENTE PELIGROSOS	CUIDADO	500-2000	2000-3000	Más de 1000	Más de 4000
IV	PRECAUCIÓN	Más de 2000	Más de 3000		

Se reportó que el isómero alfa de endosulfán es tres veces más tóxico (DL_{50} de 76 mg/kg) que el isómero beta (DL_{50} de 240 mg/kg) en ratas hembras (ATSDR, 2000).

2.1.5 Ecotoxicidad y riesgo ambiental

El endosulfán entra al medio ambiente cuando se aplica como plaguicida y se distribuye en el

aire, el agua, suelos y sedimentos (Fig. 5). Generalmente, el endosulfán se degrada en cuestión de semanas, sin embargo también puede permanecer adherido a partículas de suelo por varios años sin modificar su estructura original. Estudios sugieren que la exposición al endosulfán puede resultar en riesgos agudos y crónicos preocupantes tanto para organismos acuáticos como para organismos terrestres. En peces se ha demostrado efectos tóxicos en la reproducción y en el desarrollo de estos organismos. También es tóxico para aves y mamíferos, así como para organismos invertebrados acuáticos. El endosulfán afecta también la fotosíntesis en algas y otras plantas acuáticas, y produce efectos fitotóxicos incluso en cultivos comerciales que han sido tratados con este plaguicida. Adicionalmente, se han detectado efectos ecotoxicológicos particularmente preocupantes como: efectos genotóxicos y embriotóxicos en ostiones; efectos neurotóxicos en sapos y efectos inmunotóxicos en peces, entre otros (UNEP, 2009a).

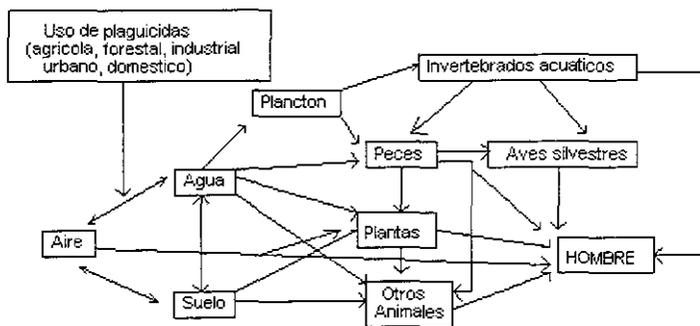


Figura 5. Introducción de los plaguicidas en el ecosistema. Fuente: Monterrosas, 1988.

2.1.6 Persistencia, bioacumulación y dispersión

El isómero alfa de endosulfán se degrada en un promedio de 27.5 días (intervalo de 12 a 39 días) en condiciones aerobias en cinco tipos de suelos diferentes; mientras que el isómero beta se degrada en un promedio de 157 días (intervalo de 108 a 264 días) en las mismas condiciones (UNEP, 2007). Los valores altos como bajos de la vida media del endosulfán han sido reportados en la literatura (UNEP, 2009a).

Los valores de bioacumulación reportados varían desde 20 hasta 11,600 (concentración en organismos entre la concentración del medio) en peces de agua dulce y salada (UNEP, 2007) y los valores experimentales validados arrojan factores de bioconcentración de 1000 a 3000 para peces

(UNEP, 2009 a). Los factores de bioacumulación (BAF) en 3 especies de peces del Ártico para “endosulfán Σ ” fueron de 1690 hasta 7280. En grasa de beluga y foca, este factor alcanza un promedio de 3.95×10^5 (UNEP, 2009 a). El promedio de la concentración detectada en las regiones del Ártico oscila entre 2 y 10 $\mu\text{g/L}$ (UNEP, 2007). Así mismo en sangre y tejido adiposo de osos polares y de rorcuales (ballena de aleta) de esa región. Una extensa revisión del potencial de transporte a larga distancia es presentada en los documentos UNEP, 2009a y UNEP, 2009b. La presencia de endosulfán en áreas como el Ártico y la Antártida, confirman que tiene suficiente persistencia y potencial de transporte para moverse alrededor del planeta (Fig. 6) y es altamente tóxico para organismos acuáticos.

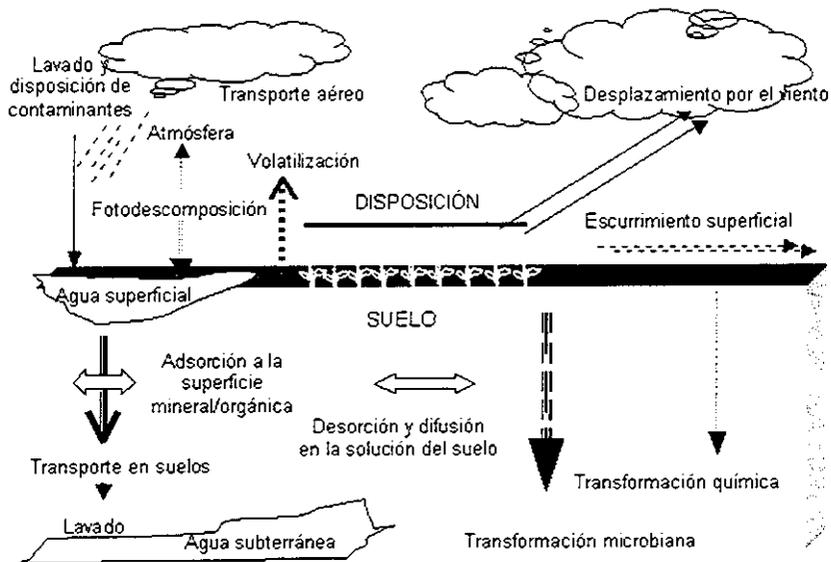


Figura 6. Distribución de plaguicidas en el ambiente. Fuente: <http://www.monografias.com/trabajos14/losplaguicidas/losplaguicidas.shtml>

2.2 Modelo de experimentación

2.2.1 Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

La tilapia es un pez teleósteo (una de las tres infra clases de los peces óseos, con cola homocerca, escamas cicloideas o ctenoideas, vejigas natatorias habitualmente presentes y carentes de espiráculos) dulceacuícola (Fig. 7 y 8) con la siguiente taxonomía:

Reino: Animalia
Phylum: Chordata.
Subphylum: Craneata
Superclase: Gnatostomata
Serie: Pisces
Clase: Actinopterygii
Infraclase: Teleostei
Orden: Perciformes
Suborden: Percoidei
Familia: Cichlidae
Género: *Oreochromis*

Especie: *mossambicus* (Peters, 1852)
niloticus (Linnaeus, 1758)
aureus (Steindachner, 1864)

Subespecies: *O. niloticus*. Var. Stirling, Egiptia, Tailandesa.

O. aureus. Var. Rocky Mountain.

Líneas: *O. mossambicus*. Gris, roja, anaranjada.

O. niloticus. Gris, roja.

O. aureus. Gris, roja, azul, blanca.

Nota: En el presente estudio se trabajó con *O. niloticus*

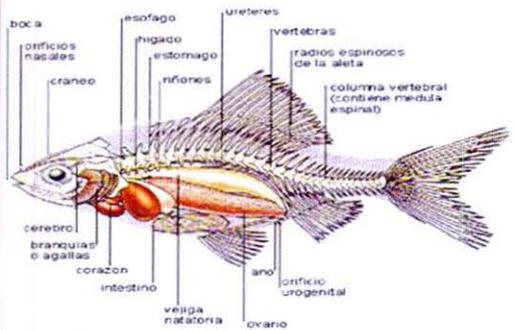


Figura 7. *Oreochromis niloticus* (tilapia nilótica). Figura 8. Morfología interna de *O. niloticus*. Fuente: Manual de producción de tilapia (Cantor, 2007).

2.2.2 Ciclo de vida de la tilapia

Bien definido en las etapas: huevo, alevín, cría, juvenil y adulto. Para reproducirse requieren de temperaturas mayores a los 24°C, se reproducen entre 6 y 8 veces al año. Su talla comercial es de 250 y 500 g, y se alcanza entre 6 y 12 meses (depende de alimentación, temperatura, densidad, calidad genética y manejo) (Fig. 9) (Zaitseva *et al.*, 2006).

2.2.3 Requerimientos ambientales

Las tilapias poseen gran resistencia a condiciones ambientales extremas; no obstante, los parámetros óptimos (Anexo 2) repercuten positivamente en el desarrollo; con rangos de temperatura que van de los 26-30°C con una ideal de 28°C; el oxígeno se recomienda un grado superior a 5 ppm (pueden tolerar hasta 1 ppm); el pH está relacionado con los nitritos, alimentos degradados, heces fecales y orina, así como con los dos parámetros expuestos con anterioridad, se recomienda un pH neutro (7) u oscilante entre 6.5 a 9; por último el parámetro nitrito y amonio (altamente tóxico) no debe de sobrepasar de 0.1 ppm (Zaitseva *et al.*, 2006).

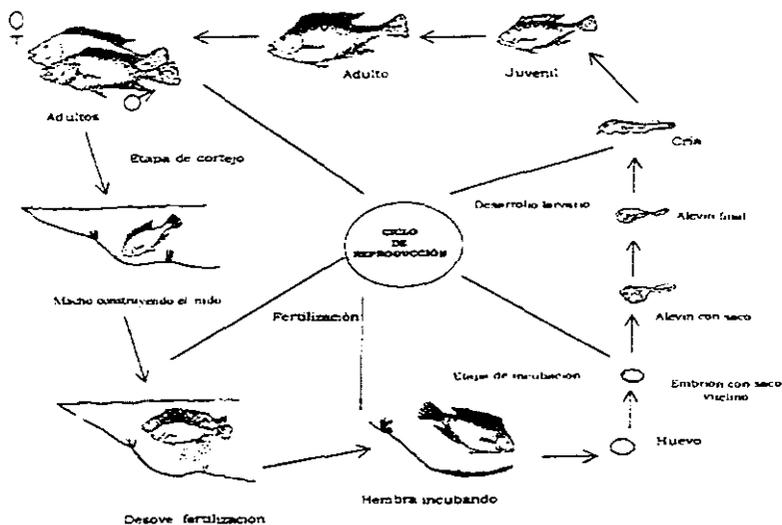


Figura 9. Ciclo de vida en *O. niloticus*. Fuente: Manual de producción de tilapia (Cantor, 2007).

2.2.4 Nutrición y alimentación

Las tilapias para su óptimo crecimiento requieren de una alimentación balanceada, con requerimientos proteicos entre 25 y 45% con disminución de un 5% por etapa. Se recomiendan lípidos no menos del 4%; fibra no más del 6%; minerales y vitaminas alrededor del 5% (guardando relación con la etapa o etapa del pez) que puede ser proporcionada naturalmente o artificialmente (pelets). El método de alimentación puede ser por demanda de los organismos o por tablas de alimentación en base al peso de los organismos (~ 5% del peso total) y la temperatura del agua (*Anexo 3*). Se recomienda el suministro diario en 2 o 3 raciones para un mejor aprovechamiento (Zaitseva *et al.*, 2006).

2.2.5 Acuicultura

La tilapia nilótica es una de las especies más rentables para la acuicultura (FAO., 2009). Se introdujo a México a partir de 1960. Es un pez que solo desarrolla infecciones cuando factores (bacterias, parásitos, virus, hongos, protozoos, moluscos, crustáceos, anélidos, parámetros fisicoquímicos del agua, predadores y tóxicos disueltos) afectan el funcionamiento de su sistema inmune (Zaitseva *et al.*, 2006).

Existen reportes de los efectos de la luz (color) medioambiental en relación con el comportamiento, sobrevivencia y crecimiento (Kawamoto *et al.*, 1951; Fanta, 1955); así como de los niveles de estrés, mostrando la luz blanca como un ligero estresante, que puede ser potencializador de otros factores de estrés fisiológicos o toxicológicos (Volpato *et al.*, 2001). Aunado a ello la cronobiología de los organismos y su ciclo circadiano es mediado por una serie de factores fisiológicos del organismo captación de la luz mediante los bastones, conos retinales, el SNC, la glándula pineal y el axis renal; al igual que la síntesis de melatonina); las cuales corresponden a las denominadas unidades cronobiológicas o zeitgebers (ZT) (Arjona *et al.*, 2004; Martínez-Chavez, 2008a; Martínez-Chavez *et al.*, 2008b).

El sistema inmune (SI) de peces es un indicador sensible de la salud y frecuentemente se utiliza para monitorear la sanidad en acuicultura (Watts *et al.*, 2001). La evaluación del SI es una herramienta que infiere exposición del organismo a algún agente tóxico y mide los efectos biológicos desfavorables (Tejeda-Vera *et al.*, 2007) a través de parámetros funcionales como apoptosis, niveles séricos de inmunoglobulinas y citotoxicidad de células competentes las cuales son sensibles en varias especies de peces (Rice *et al.*, 1996).

2.3 Inmunología del pez

El SI comprende una serie de células, tejidos y órganos altamente especializados que mantienen homeostasis y la habilidad protectora ante xenobióticos (Magnadottir, 2006). Debido a esta especificidad la respuesta inmune de los organismos se divide en: respuesta inmune innata (RII) o inespecífica y respuesta inmune adaptativa (RIA) o específica, ambas funcionales en peces teleósteos. La RII se ve afectada por cambios inesperados en el medio ambiente y cuando se desarrolla en un hábitat estresante agudo o crónico (Fernández *et al.*, 2002; Domínguez *et al.*, 2004; Bowden, 2008).

2.3.1 Órganos linfoides.

Los órganos linfoides primarios en peces óseos son: timo bilobulado y riñón anterior. Los secundarios son el bazo y el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (Fig. 10) (Huttenhuis *et al.*, 2006; Zapata *et al.* 2006). Los peces carecen de médula ósea, nódulos linfáticos y amígdalas, y la función de estos órganos las desarrolla el riñón anterior (Olabuena, 2000; Fernández *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2004).

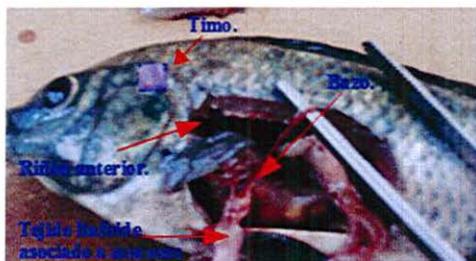


Figura 10. Principales órganos linfoides de *O. niloticus*.

2.3.2 Respuesta inmune innata

En peces teleósteos el epitelio como la secreción de mucus forma una barrera física que lo protege del medio ambiente. El mucus contiene proteínas y carbohidratos que previenen la colonización de parásitos, bacterias y hongos; además de la mucina contiene precipitinas inespecíficas, aglutininas, opsoninas, pentraxinas, proteína C-reactiva, suero amiloide P, lectinas (como la de unión a manosa) y lisozima (barrera química primaria). La lisozima es una enzima mucolítica antimicrobiana con capacidad para degradar mucopolisacáridos de la pared celular bacteriana (tipo Gram+) causando

lisis (Grinde *et al.*, 2003; Magnadottir, 2006) además es considerada como la forma más antigua y conservada del reconocimiento de lo no propio o peligroso (Fletcher, 2001; Matzinger, 2002; Volanakis *et al.*, 2004). La proteína C reactiva es una proteína que aglutina y en la concentración óptima participa en el reconocimiento y defensa en contra de ciertas bacterias e interactúa con otras moléculas como el complemento y los receptores Fc en linfocitos (Edagawa *et al.*, 2003).

También se reporta que los peces cuentan con péptidos antimicrobianos, los cuales ejercen diversas funciones como la inhibición productiva de proteasa $\alpha 2$ -macroglobulina y $\alpha 1$ -antitripsina (Bowden *et al.*, 1997), otros bloquean la actividad lítica e impiden o retardan el crecimiento bacteriano (Stafford & Belosevic, 2003). Los péptidos antimicrobianos reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son los lipopolisacáridos bacterianos, flagelinas, ácido teicoico y peptidoglicano, DNA con motivos CpG y RNA de doble cadena asociado a virus los cuales son reconocidos por patrones proteicos o receptores (PRP/R) (Medzhitov & Janeway, 2002; Magnadottir, 2010). Recientemente un importante grupo de receptores tipo Toll (TLR's) han mostrado una organización, expresión y características similares a las observadas en mamíferos (Bricknell & Dalmo, 2005).

2.3.2.1 Respuesta inmune innata mediada por células.

Entre las células involucradas en la RRI en peces se encuentran células citotóxicas no específicas (NCC) posibles progenitoras de las células (Natural Killer) y las células fagocíticas. Las NCC ejercen citotoxicidad inespecífica contra diferentes células blanco sin previo reconocimiento (*Fig. 11*), estas células se encuentran principalmente en riñón anterior, bazo, sangre periférica y timo; son células no adherentes y resistentes a la irradiación (Greenlee *et al.*, 2001). En tanto, las células fagocíticas, poseen el mecanismo más ampliamente distribuido (fagocitosis), efectuada por granulocitos y fagocitos mononucleares (Zaitseva *et al.*, 2006).

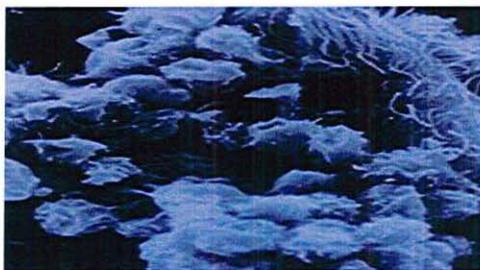


Figura 11: Electro micrografía de NCC. Organismo blanco (*Tetrahymena pyriformis*) tratada con formalina. Fuente: Tomada y modificada (Evans & Cooper, 1990).

2.3.3 Respuesta inmune adaptativa.¹

La RIA humoral en peces está representada por anticuerpos (Ab/Ac) e inmunoglobulinas (Ig) que son glicoproteínas. La Ig reportada en teleósteos es la clase “IgM like”, un tetrámero con dos cadenas livianas y dos pesadas de un PM ~ 700 y un coeficiente de sedimentación de 17 S; existen formas monoméricas en suero. Las células productoras de Ac derivan de linfocitos B, que por la interacción con el antígeno se transforman en células plasmáticas (poseen un citoplasma basófilo, no granular) localizadas en tejido conectivo, bazo, riñón anterior y sangre. Este mecanismo guarda una memoria inmunológica en función al ambiente y temperatura (Fange, 2002; Koumans *et al.*, 2004; Zaitseva *et al.*, 2006).

2.3.3.1 Respuesta inmune adaptativa mediada por células.

En teleósteos los linfocitos (producidos en riñón anterior y timo) participan en los mecanismos de inmunidad celular. Esta respuesta tiene un amplio rango e involucra otros linajes celulares, como macrófagos, NCC, linfocitos T y linfocitos B; así como la producción de citoquinas (IL), con lo que aumenta la capacidad de defensa (Fange, 2002; Wolke, 2002; Zaitseva *et al.*, 2006).

Las citoquinas son glicoproteínas moduladoras de las células inmunocompetentes, como IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, Interferón (IFN), factor de activación de macrófagos, TNF- α y el receptor soluble para IL-2, entre otras. (Verburg *et al.*, 2002). El IFN es una molécula importante que ejerce actividad antiviral, es producida en respuesta a virus, estimulación inmune o química (Rogel *et al.*, 2002).

2.3.4 Células citotóxicas inespecíficas (NCC)

Las NCC son células pequeñas, no granulares, ubicadas en órganos linfoides (i.e. pronefros y bazo) pero escasas en sangre (Shen *et al.*, 2002). Las NCC de teleósteos son el equivalente a las células NK (natural killer cells) de mamíferos (Evans *et al.*, 1992); con las cuales se relacionan evolutivamente (Tizard, 2000). Las NCC son consideradas mediadoras de citotoxicidad en la inmunidad innata y fueron las primeras efectoras de la resistencia a la citotoxicidad innata caracterizadas en peces teleósteos (Evans *et al.*, 1984b; Graves *et al.*, 1985).

Estudios demuestran que en ausencia de moléculas exógenas solubles como las citoquinas las células tumorales se unen a las NCC desencadenando la inducción de muerte celular produciendo

¹ Solo se hace referencia a el sistema inmune de peces (no se trabajara con este tipo de inmunidad).

apoptosis bidireccional (Oumouna *et al.*, 2001). El receptor NCCRP-1 (Nonspecific cytotoxic cells receptor 1) (Fig. 12) es el único identificado para el antígeno de NCC y es responsable del reconocimiento (no aloespecífico), la señalización y activación. (Jaso-Friedmann *et al.*, 1997). El receptor NCCRP-1 descrito como de tipo III reconoce un ligando referido como “natural killer target antigen” (NKTag) (Evans *et al.*, 1988; Leary *et al.*, 1994).

El mejor método para la identificación de las NCC es mediante el uso de anticuerpos monoclonales como el mAb5C6 identificado por su especificidad contra las NCC del “pez gato” (Evans *et al.*, 1988).

También se ha sugerido que las NCC; así como tejidos con alto contenido de NCC indican susceptibilidad celular de apoptosis (CAS) en *O. niloticus* (Praveen *et al.*, 2006b).

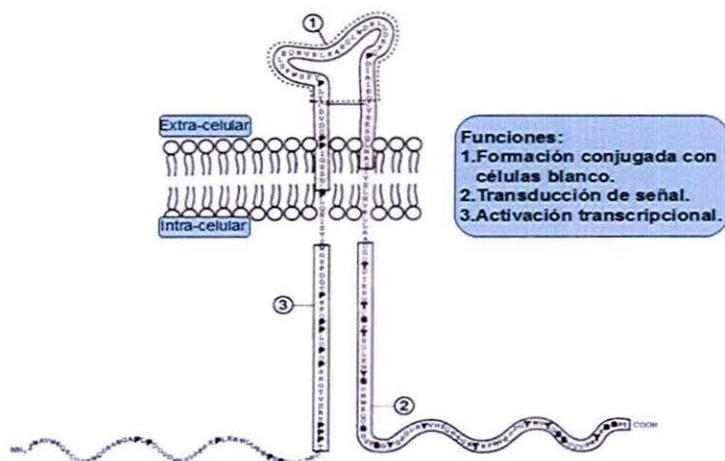


Figura 12. Modelo hipotético de la proteína NCCRP-1; con tres dominios: un dominio extra celular de unión al antígeno; un dominio intracelular (terminal N) que contiene los motivos PRM, BOX-1 y BOX-2; y un dominio (terminal C) formado por múltiples sitios de fosforilación de quinasas. Fuente: (Jaso-Friedmann *et al.*, 2001) modificado.

2.3.4.1 Funciones de las NCC

Las NCC son el principal mediador de la citotoxicidad en la inmunidad innata, al generar lisis en parásitos protozoarios, células virales transformadas, bacterias (productos que intensifican la respuesta inflamatoria) y células tumorales (Evans *et al.*, 1984 a; Graves *et al.*, 1985a; Graves *et al.*, 1985b).

Las NCC inducen la muerte celular mediante FasR+ en líneas de leucemia humana HL-60, vía la secreción de FasL soluble (Jaso-Friedman *et al.*, 2000a; Jaso-Friedman *et al.*, 2000b). La dependencia de perforina (granzima), en el sistema FasL/FasR, TNF-alfa y TNF relacionado con el ligando de la inducción-apoptosis (TRAIL) por parte de NCC (Wiley *et al.*, 1995) no se ha elucidado (Fig. 13). Las NCC pueden ser reguladas de manera positiva o negativa por el complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-1), por lo cual es considerado no específico pero dependiente de antígeno (Bishop *et al.*, 2000).

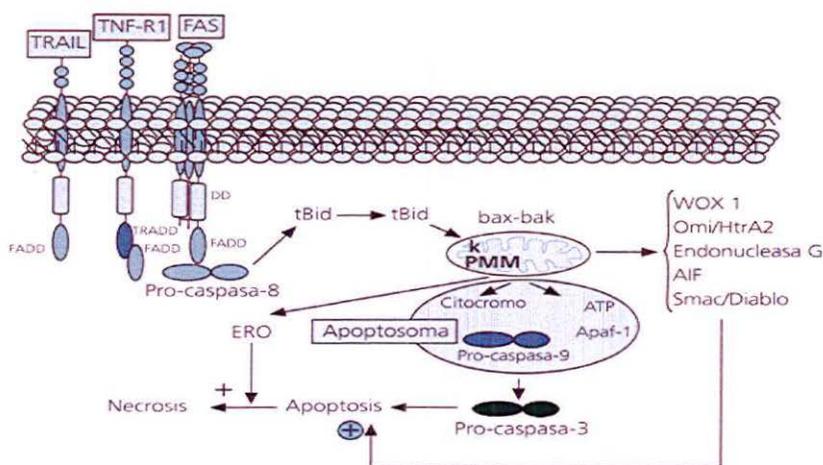


Fig. 13. Receptores de muerte celular. compuestos por un dominio extracelular rico en cisteína, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático de muerte celular (DD) que está unido dependiendo del caso a un dominio de muerte celular asociado a Fas (FADD) o un dominio asociado al receptor de TNF (TRADD). Fuente: (Muntane *et al.*, 2007).

2.3.4.2 Mecanismos de activación citotóxica de las NCC

La citotoxicidad de las NCC requiere que la célula efectora entre en contacto físico con la célula blanco; este proceso se le conoce como formación conjugada (Jaso-Friedman *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1996; Jaso-Friedman *et al.*, 1997). Una de las respuestas inmediatas en la activación citotóxica de las NCC es el incremento en la fosforilación en proteínas de membrana (Fig. 12) (Jaso-Friedman *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1994; Ruiz *et al.*, 2001; Jaso-Friedmann *et al.*, 2001).

El ligamiento cruzado de NCCRP-1 con el anticuerpo monoclonal 5C6 incrementa la citotoxicidad de NCC y la expresión de NCCRP-1, así como los niveles de quinasas proto-oncogénicas

de la familia src [sarcoma] (lck, fyn y src) (Jaso-Friedmann *et al.*, 1995). También el suero puede contener factores de activación citotóxica causados por algún tipo de estrés en el hábitat, llamados SASF (stress activated serum factors) lo cual amplifica la actividad de las NCC; indicando la presencia de factores solubles tipo citoquinas (Jaso-Friedman *et al.*, 2000).

Fas ligando o CD95L (FasL) ha sido encontrado en NCC permeabilizadas obtenidas del bazo y ha sido previamente demostrado que las NCC emplea FasL soluble (sFasL) para eliminar la célula blanco incluyendo líneas celulares tumorales y parásitos protozoarios (Bishop *et al.*, 2000; Jaso-Friedman *et al.*, 2000a; Jaso-Friedmann *et al.*, 2000b). Por ello la tilapia secreta FasL como principal medio para eliminar objetivos como: HL-60 (Human promyelocytic leukemia cells) (Fig. 14) (Evans *et al.*, 1984). Otros estudios definen la existencia de proteínas adaptadoras y mediadores solubles que promueven la apoptosis en células de teleósteos, demostrando la presencia de FADD (Fas-Associated Protein with Death Domain), CAS (Cellular Apoptosis Susceptibility) y FasL en NCC activadas (Evans *et al.*, 2000). Así mismo, ésta reportado que en ensayos citotóxicos entre 3 y 12 horas son necesarias para que el evento lítico ocurra así como la presencia del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) soluble o de membrana (Tsutsui *et al.*, 1996; Bishop *et al.*, 2002).

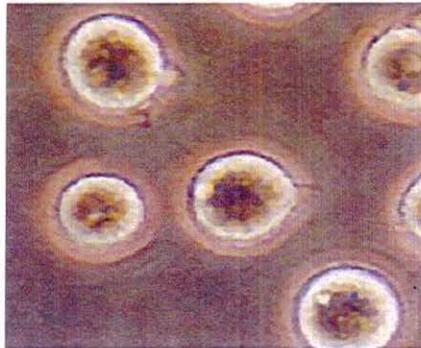


Figura 14. Células HL-60 (40X). Ampliadas con aumento digital.

En tilapia la susceptibilidad celular de apoptosis (CAS) ha sido identificada previamente; su expresión es regulada en la protección apoptótica de las NCC tratadas con activación del factor de estrés en suero (SASF) (Evans *et al.*, 2000; Praven *et al.*, 2006b). La atenuación de CAS reduce la sensibilidad de las células a los mediadores de apoptosis TNF- α y β ; la CAS es expresada en células proliferativas, pero su expresión disminuye en células y tejidos quiescentes (Wellman *et al.*, 1997; Boni

et al., 1999; Praven *et al.*, 2006b). La susceptibilidad celular de apoptosis juega un rol importante en desarrollo de cáncer y es considerado “switch” determinante de cuando la célula debe proliferar o ir hacia apoptosis (Brinkmann *et al.*, 1996; Brinkmann, 1998).

2.3.4.3 Granzima

Las granzimas pertenecen a la familia de proteasas de serina, constituyendo en mamíferos el mayor número de los componentes granulares tanto de linfocitos T citotóxicos (CTLs) y NK, los cuales juegan un papel importante en la inducción de muerte en células blanco (Trapani, 2001; Russel and Ley, 2002; Liberman, 2003). Las granzimas son clasificadas con base en las especificaciones primarias de su sustrato y por su actividad enzimática ya sea; triptasa, Asp-asa, Met-asa y quinasa. Granzimas A y K tienen actividad triptasa, granzima B con actividad Asp-asa, granzima M con actividad Met-asa (Kam *et al.*, 2000).

Se ha reportado la existencia de granzima en las NCC de *Ictalurus punctatus* y *Oreochromis niloticus* (Praven *et al.*, 2004). El requerimiento de calcio por parte de las NCC para la inducción de citotoxicidad, es una indicación de que estas células usan la vía de eliminación “exocitosis granular” (Fig. 15) (Carlson *et al.*, 1985); originalmente se pensaba que la perforina causaba la lisis celular al penetrar la membrana celular de la célula objetivo, pero trabajos recientes apoyan la teoría de que las perforinas habilitan a las granzimas para escapar de los endosomas en el citosol de la célula objetivo (Pinkoski *et al.*, 1998; Metkar *et al.*, 2002). Así también se reportó la secuencia completa de la granzima en tilapia (TLGR-1) (Praven *et al.*, 2004) con registro en GenBank (AY918867 para el gen completo y AY918866 para el mRNA); de igual manera se comprobó la expresión medida tanto de granzima como de β -actina (el gen constitutivo) en bazo (Janganan *et al.*, 2009).

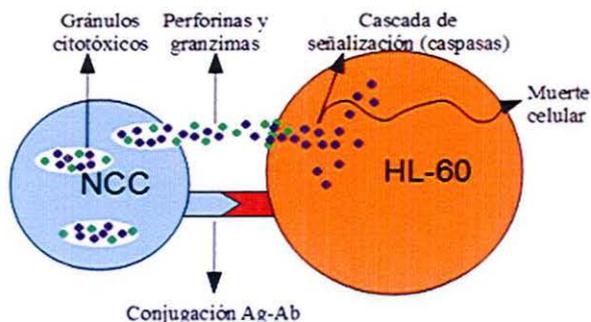


Figura 15. Citotoxicidad inducida .Mediante perforinas (verde) y granzima (púrpura).

Las actinas son proteínas conservadas que ejercen importantes papeles en el mantenimiento de la estructura citoesquelética, motilidad y división celular, movimientos intracelulares y procesos contráctiles (Clarke *et al.*, 1977; Herman, 1993). El número de isoformas de actina en teleósteos son nueve y pueden ser divididas en dos grandes categorías citoplasmáticas (β y γ) y musculares (α) (Vandekerckhove *et al.*, 1984 Venkatesh *et al.*, 1996). En el pez *Takifugu rubripes* fueron caracterizados los siguientes genes tipo actina: seis de tipo muscular (dos actinas α -esqueléticas, tres actinas α -cardíacas y una actina α -anómala tipo testicular) y tres de tipo citoplasmáticas (dos actinas β -citoplasmáticas y una actina β -citoplasmática tipo vascular) (Venkatesh *et al.*, 1996; Poletto *et al.*, 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El endosulfán es un insecticida de amplio uso en México, pero restringido en varios países por sus efectos adversos al medio ambiente y la salud. Este pesticida posee características fisicoquímicas que favorecen la contaminación de los mantos acuíferos y de organismos no blanco por biomagnificación en la cadena trófica. Uno de los organismos acuáticos no blanco del endosulfán es la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) que representa un excelente sistema modelo-costo en los estudios inmunotoxicológicos. Está reportado que el endosulfán induce una activación inespecífica en macrófagos esplénicos en *O. niloticus* expuesto *in vivo* en un periodo corto a concentración subletal. No obstante, se desconoce el efecto del insecticida sobre parámetros citotóxicos de la respuesta inmune innata de la tilapia. Contar con información sobre el efecto del endosulfán sobre la RII de tilapia, permitirá emitir recomendaciones sobre el uso de este insecticida organoclorado y el riesgo potencial que representa para los organismos acuáticos.

4. HIPÓTESIS

El endosulfán incrementa el porcentaje, la actividad citotóxica y la expresión de granzima en las NCC esplénicas de la tilapia nilótica expuesta por un periodo corto y a concentración subletal en un modelo *in vivo*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la exposición aguda *in vivo* a endosulfán en el porcentaje y la actividad citotóxica de células NCC esplénicas y la expresión del gen granzima de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

5.2 Objetivos Particulares

1.- Identificar el inmunofenotipo de las NCC esplénicas.

❖ Para grupo control y expuesto:

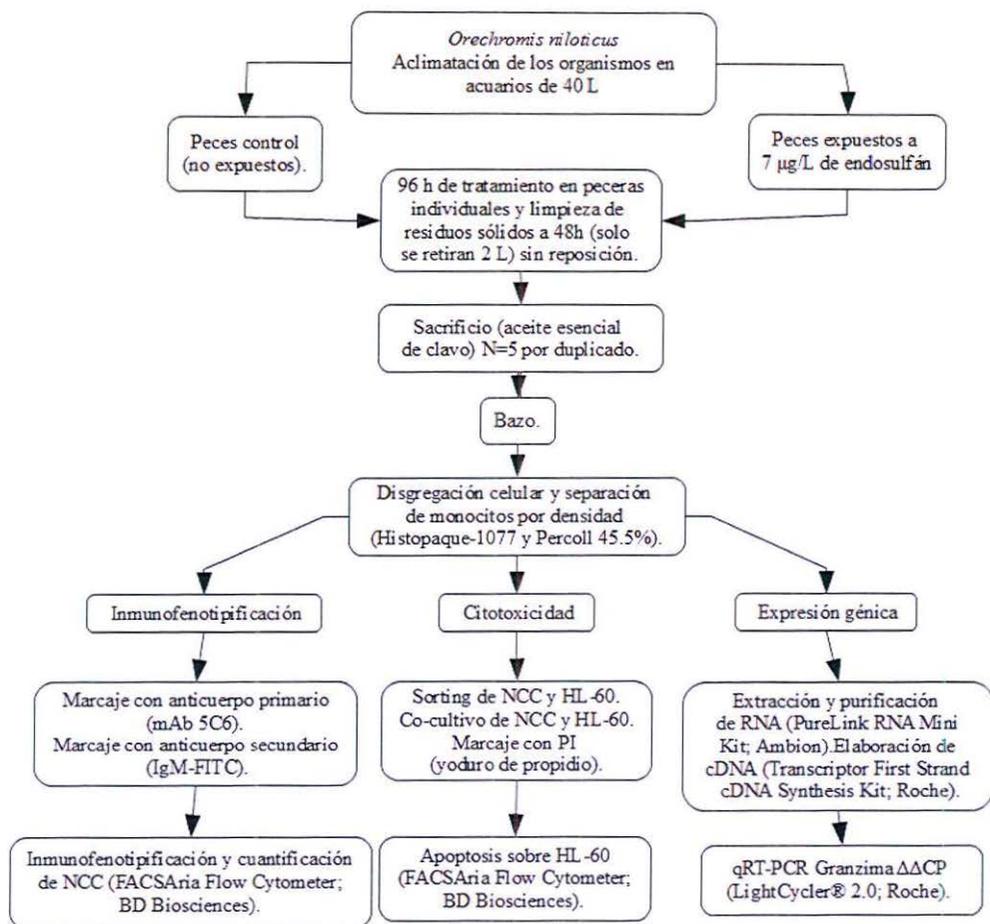
2.- Cuantificar el porcentaje de las NCC.

3.- Determinar la actividad citotóxica de las NCC sobre células blanco.

4.- Medir la expresión del gen granzima.

6. DISEÑO METODOLÓGICO

Efecto *in vivo* del endosulfán en tilapia nilótica juvenil (acción sobre las NCC)



Se empleó la prueba t de Student
significancia estadística entre los
grupos con $p < 0.05$.

7. MATERIALES Y MÉTODOS²

7.1 Universo de estudio

Tilapia nilótica, machos juveniles con peso (200-250 g) y talla homogénea (~25 cm), proporcionados por la empresa Aquamol S.C. de R. L.; ubicada en el municipio de Ajijic, Jalisco. Los peces fueron aclimatados por 3 meses para obtener peso ideal; posteriormente se traspasaron a acuarios de 40 L a 27°C +/- 2°C con aireación, pH constante, monitoreo de nitritos y amonio. Los organismos fueron alimentados con pellets Nutripec. El tamaño de muestra para peces expuestos y control fue de 5 por duplicado.

7.2 Preparación del endosulfán

Para la realización del ensayo *in vivo*, el endosulfán grado técnico fue disuelto en agua destilada (1:100); esta solución se añadió y mezcló directamente a los acuarios hasta alcanzar una concentración de 7 ppb (o 7 µg/L) la cual es equivalente a 1/2 CL₅₀ para tilapia nilótica juvenil (Téllez-Bañuelos *et al.*, 2009).

7.3 Obtención de las NCC

Los peces fueron sacrificados por anestesia profunda con aceite esencial de clavo (4 gotas / 100 g de peso) y se obtuvo el bazo en condiciones asépticas. Después se procedió de disgregar el órgano linfóide con una malla de nailon (~10 µm) en 2.5 mL de PBS; se sometió a purificaciones en gradientes densitométricos de Histopaque-1077 (1.100 mL / 1 mL de solución disgregada o sangre total) por centrifugación a 2500 rpm durante 20 min a 28°C se recuperó la interfase y se realizó una segunda purificación sobre un gradiente de Percoll al 45.5% seguido de una centrifugación a 2500 rpm durante 17 min a 28°C. Las células de la interfase (fracción enriquecida en NCC) fueron recolectadas, lavadas y resuspendidas en RPMI 1640 con L-glutamina suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

La viabilidad celular fue mediada en presencia de azul de tripano - preparación 1:1 suspensión celular y azul de tripano-. La concentración celular se determinó como un χ (promedio) de células viables en cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer * 10000 * 2 / Volumen (1mL) = Concentración / mL. Posteriormente se restaron las células muertas con la siguiente ecuación: % de células muertas

2 Todos los reactivos, kits e instrumental tienen casa comercial y número de catálogo en: Materiales, equipo e insumos requeridos en la investigación.

=células vivas (p) / 100 = X y para las células muertas = (ζ) / X = % de células muertas.

Las NCC (200,000 células / 100 μ L) se mantuvieron en medio RPMI- 1640 suplementado en frío hasta realizar el marcaje con anticuerpos, o a temperatura ambiente en el caso del ensayo de citotoxicidad

7.4 Análisis del inmunofenotipo de las NCC por citometría de flujo

Para determinar el inmunofenotipo se tomaron 200 000 NCC en un volumen final de 100 μ L e incubaron con 5 μ L (1 μ g) de anticuerpo monoclonal 5C6 por 1 h a 4°C en oscuridad con agitaciones ocasionales. Posteriormente las células se lavaron dos veces en 500 μ L de PBS frío a 2000 rpm / 10 min y después se resuspendieron en 100 μ L de PBS e incubaron con 2 μ L (1 μ g) del anticuerpo secundario IgM anti-ratón conjugado con FITC por 30 min a 4°C en oscuridad con agitación ocasional. Nuevamente se lavaron dos veces en 500 μ L de PBS frío a 2000 rpm / 5 min. Se descartó el sobrenadante y resuspendieron las NCC en 500 μ L de PBS. Luego las células marcadas fueron analizadas en el citómetro FACSAria (BD) y se determinó la intensidad de fluorescencia media (IFM) para evaluar la expresión del receptor NCCRP-1, tanto del grupo control como del expuesto a endosulfán. Para establecer el control negativo se utilizó un isotipo sin anticuerpo monoclonal. El análisis del ensayo se realizó con el programa FACSDiva (BD).

7.5 Preparación de la línea celular HL-60 para el ensayo de citotoxicidad

Como célula blanco para los ensayos de citotoxicidad de las NCC de tilapia del Nilo se trabajó con la línea celular HL-60 (células de leucemia promielocítica) (Jaso-Friedman *et al.*, 2000; Oumouna *et al.*, 2001). Las células HL-60 se incubaron en suspensión en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con SFB (10%) a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El tiempo de proliferación de esta población celular fue de 36 a 48 horas.

7.6 Ensayo de citotoxicidad de las células NCC por citometría de flujo

Una vez obtenidas las células HL-60 (T: Blanco) y las NCC (E: Efectoras) se procedió al co-cultivo en placas de 96 pozos en una relación T-E: 1:1; 1:10; 1:20 y 1:40 respectivamente, ajustando cada condición experimental a un volumen de 200 μ L con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado

con SFB. Se incubó a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 4 h. También se incluyeron controles negativos [sólo células marcadas con yoduro de propidio (IP)] y positivos [células blanco tratadas con etopósido (compuesto inductor de apoptosis) más IP]. Luego, se cosecharon y recolectaron en tubos de 2 mL, se añadió 1 mL de PBS y posteriormente se centrifugaron a 1800 rpm, durante 7 minutos, este lavado que se repitió dos veces.

Después, las células se decantaron y suspendieron en 200 µL de PBS. Se añadieron 10 µL de IP por muestra e incubaron durante 10 minutos protegidos de la luz. Finalmente, se evaluaron las muestras en el citómetro FACSAria (BD). Los resultados fueron analizados con el programa FACSDiva (BD).

7.7 Análisis para la expresión del gen de la granzima en células NCC por qRT-PCR

Para medir la expresión del gen de la granzima en la NCC se aisló y purificó el RNA total de las células (esplenocitos) extraídas de los peces tratados o no con endosulfán con el mini Kit PureLink RNA. El cDNA fue sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando el Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis. La qRT-PCR se realizó utilizando un LightCycler® 2.0 y el kit LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I. El programa de PCR optimizado durante ensayos preliminares se representa en la siguiente tabla (Tabla 3)

El análisis de los productos de PCR fue realizado con el software LightCycler®.

Tabla 3. Condiciones de la qRT-PCR para granzima y β-actina en el LightCycler® 2.0

GRANZIMA:					β-ACTINA:						
Modo de análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura	Tiempo	M. de adquisición	Modo de análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura	Tiempo	M. de adquisición
		Pre-incubación:					Pre-incubación:				
Ninguno	1		95°C	10"	Ninguno	Ninguno	1		95°C	10"	Ninguno
		Amplificación:					Amplificación:				
Cuantificación	40	Desnaturalización	95°C	10"	Ninguno	Cuantificación	40	Desnaturalización	95°C	10"	Ninguno
		Alineación	62°C	10"	Ninguno			Alineación	60°C	10"	Ninguno
		Extensión	72°C	16"	Simple			Extensión	72°C	19"	Simple
		Curva de disociación:					Curva de disociación:				
C. de disociación	1	Desnaturalización	95°C	0"	Ninguno	C. de disociación	1	Desnaturalización	95°C	0"	Ninguno
		Alineación	65°C	60"	Ninguno			Alineación	65°C	60"	Ninguno
		Disociación	95°C RR=0.1°C/s	0"	Continuo			Disociación	95°C RR=0.1°C/s	0"	Continuo
		Enfriamiento:					Enfriamiento:				
Ninguno	1		40°C	30"	Ninguno	Ninguno	1		40°C	30"	Ninguno

Cada muestra fue procesada en triplicado (cDNA y qRT-PCR). Los datos fueron expresados como cantidades relativas utilizando como gen de referencia al de la (β-actina). Los cebadores que se

utilizaron se muestran en la siguiente tabla (*Tabla 4*). Fueron diseñados con el programa Oligo V.6, y las secuencias obtenidas de la base de datos GenBank.

Tabla 4. Cebadores de granzima y β -actina.

Gen	Cebadores Sentido Anti sentido	ID del gen	Tamaño esperado en pb
Granzima	5'- ATC ATG CTC CTC AAA CTC TCG -3' 5'- GGG CCA CCA GAA TCA CC -3'	AY918866	290
β -actina	5'- GGC ATC GCA CCT TCT ACA AT -3' 5'- TCT CAC GCT CAG TTG TGG TAG T -3'	EF206796.1	366

7.8 Análisis estadístico

Las medias \pm DS o ES se determinaron en cada grupo de estudio por experimento. Se aplicó la prueba "t de Student" a dos colas, utilizando el software Gnumeric 1.10.16. Valores con $p < 0.05$ fueron considerados significativamente diferentes entre grupos.

8. RESULTADOS

8.1 Condiciones de cultivo de los peces y obtención del bazo

Durante el estudio la temperatura del agua se mantuvo en un rango de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con aireación constante (*Fig 16*) y los parámetros de calidad del agua se mantuvieron óptimos (pH de 7 a 8.5, nitritos de 0.5 a 1 ppm y amonio de 0.0069 a 0.043 ppm o mg/L).



Figura 16. Zootecnia de los organismos.

Después de 96 h de exposición a endosulfán los peces fueron sacrificados y se obtuvo el bazo con pesos promedios de $\sim 0.19 \pm 0.05$ g (*Fig. 17*).



Figura 17. Bazos de tilapia del Nilo en PBS IX.

8.2 Obtención de fracción enriquecida de NCC

Para obtener la fracción celular enriquecida en NCC fue necesario trabajar un protocolo de doble separación por gradiente de densidad (Histopaque-1077 y Percoll al 45.5%). Además se determinó la temperatura óptima de centrifugación la cual fue de 28°C (Fig. 18).

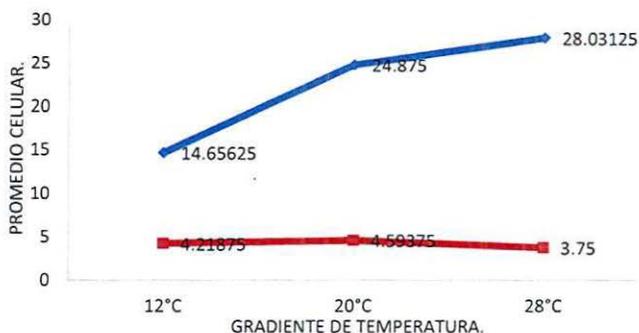


Figura 18. Determinación de temperatura óptima de centrifugación para la obtención de las NCC. Valores de conteo celular en promedio. Azul = Células viables. Rojo = Células muertas.

A la temperatura de centrifugación de 28°C se obtuvieron $\sim 1'200,000 \pm 100,000$ células / mL (por pez). Se muestra una imagen representativa (Fig. 19) de una célula NCC donde se aprecia su tamaño promedio ($\sim 3 \mu\text{m}$) y de un macrófago ($\sim 7 \mu\text{m}$) obtenidos del bazo en tilapia del Nilo.

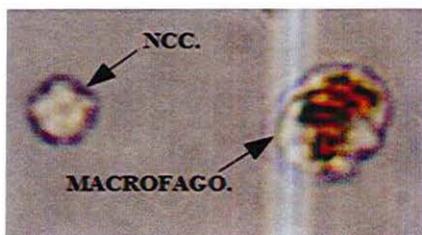


Figura 19: Células inmunocompetentes de *O. niloticus*. Observadas a 40X mediante tinción exclusiva: azul de tripano y rojo neutro.

8.3 Identificación del inmunofenotipo de las NCC esplénicas.

Para identificar el inmunofenotipo se trabajó con un protocolo por citometría de flujo empleando un marcaje indirecto con el fluorocromo FITC. La identificación de la población inmunocompetente se basó en características celulares de tamaño FSC (forward scatter) y complejidad SSC (side scatter) (Fig. 20).

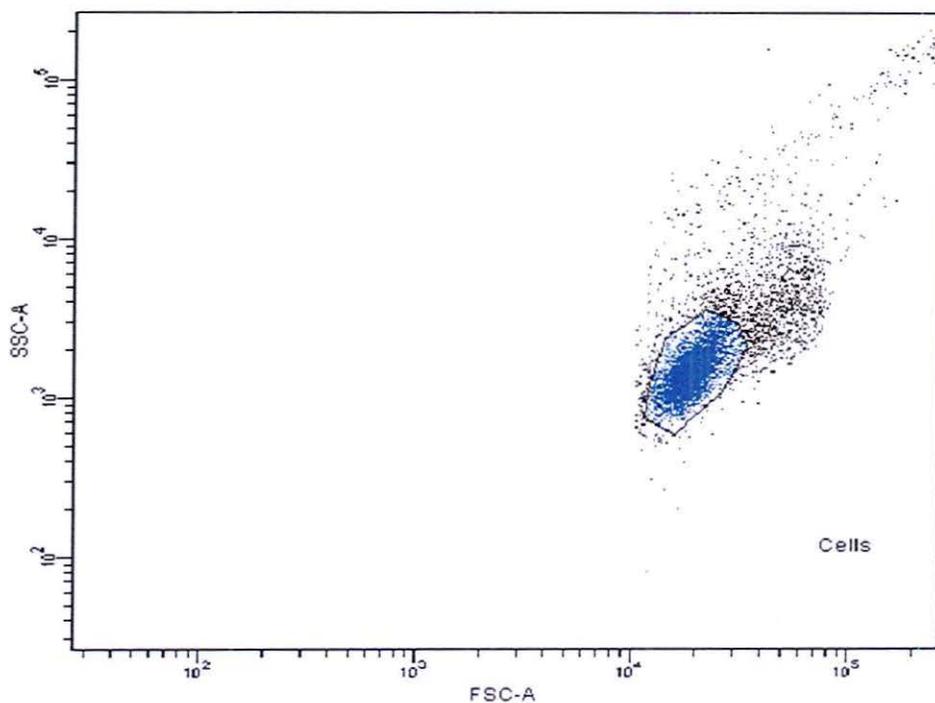


Figura 20. Inmunofenotipificación de las NCC (azul). *Dot plot* representativo, donde se observa una media constante en la dispersión frontal FSC (tamaño) en la cuarta década y para la dispersión lateral SSC (complejidad) en la tercera década.

8.4 Efecto del endosulfán *in vivo* en el número de NCC esplénicas.

Para evaluar el efecto del endosulfán en el porcentaje de la población NCC esplénicas se comparó la IMF entre grupos (Fig. 21).

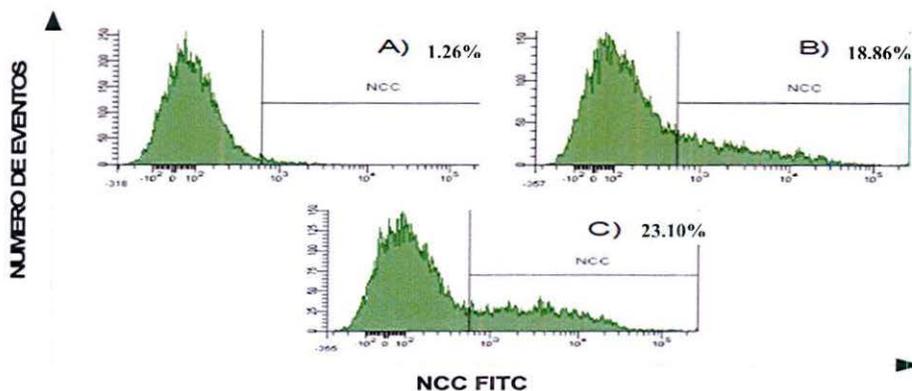


Figura 21. Efecto del endosulfán *in vivo* sobre el número de NCC esplénicas. Histogramas representativos del ensayo de inmunofenotipificación. El valor del cuadrante superior derecho muestra el porcentaje de NCC por condición experimental. A) isotipo; B) Control sin tratamiento y C) Expuesto a endosulfán.

Aun cuando no se observó una diferencia significativa ($p > 0.05$), el grupo expuesto a endosulfán mostro un porcentaje de células positivas al fluorocromo (2310.67 ± 866.42) más elevado que el grupo control (1886.78 ± 530.44) (Fig. 22).

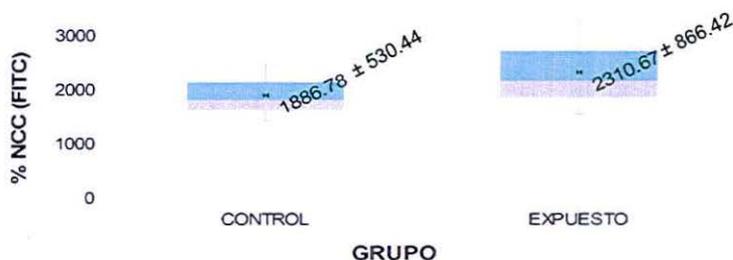


Figura 22. Efecto del endosulfán *in vivo* sobre el porcentaje de las NCC esplénicas de *O. niloticus*. Se aplicó la prueba *t* de Student para comprobación de las medias \pm DS entre grupos.

♦=media.

8.5 Efecto del endosulfán *in vivo* en la actividad citotóxica de las NCC sobre células blanco HL-60.

Previo al ensayo de citotoxicidad se realizó una identificación de las células blanco (HL-60) como de la efectora (NCC) por medio de una dispersión de puntos (Dot Plot), según el tamaño (FSS) y complejidad (SSC) (Fig. 23).

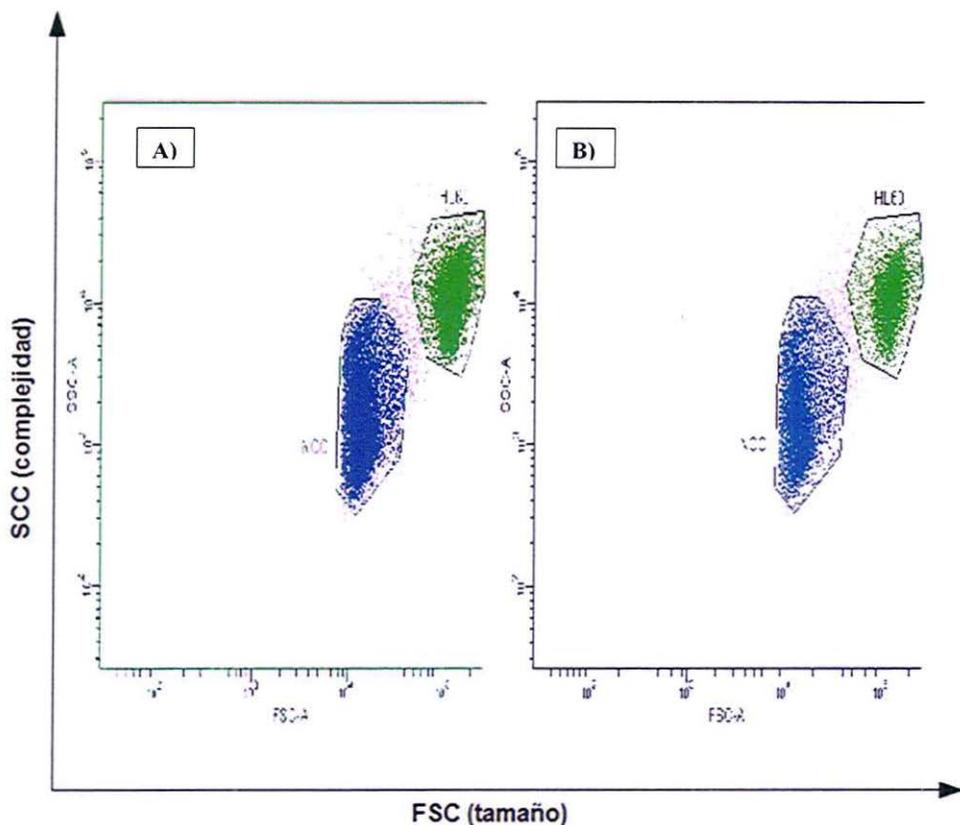


Figura 23. Identificación de las células blanco HL-60 (verdes) y la célula efectora NCC (azul) por "Dot Plot", previo a la evaluación de la actividad citotóxica. Grupos experimentales: A) Control y B) Expuesto.

Para comprobar el potencial citotóxico de las NCC de los organismos control y expuestos se ensayaron co-cultivos por 4 h, con diferentes relaciones de las células blanco: efectora 1:1, 1:10, 1:20 y

1:40. Las células muertas o apoptóticas fueron cuantificadas como porcentaje de células positivas al PI.

No se observaron valores líticos significativos en las relaciones 1:1 [(3.15 ± 0.56) (2.55 ± 0.20)]; 1:10 [(5.4 ± 0.54) (4.35 ± 0.20)] y 1:20 [(6.05 ± 0.11) (4.7 ± 0.54)] entre el grupo control y expuesto (Fig. 24 y 25).

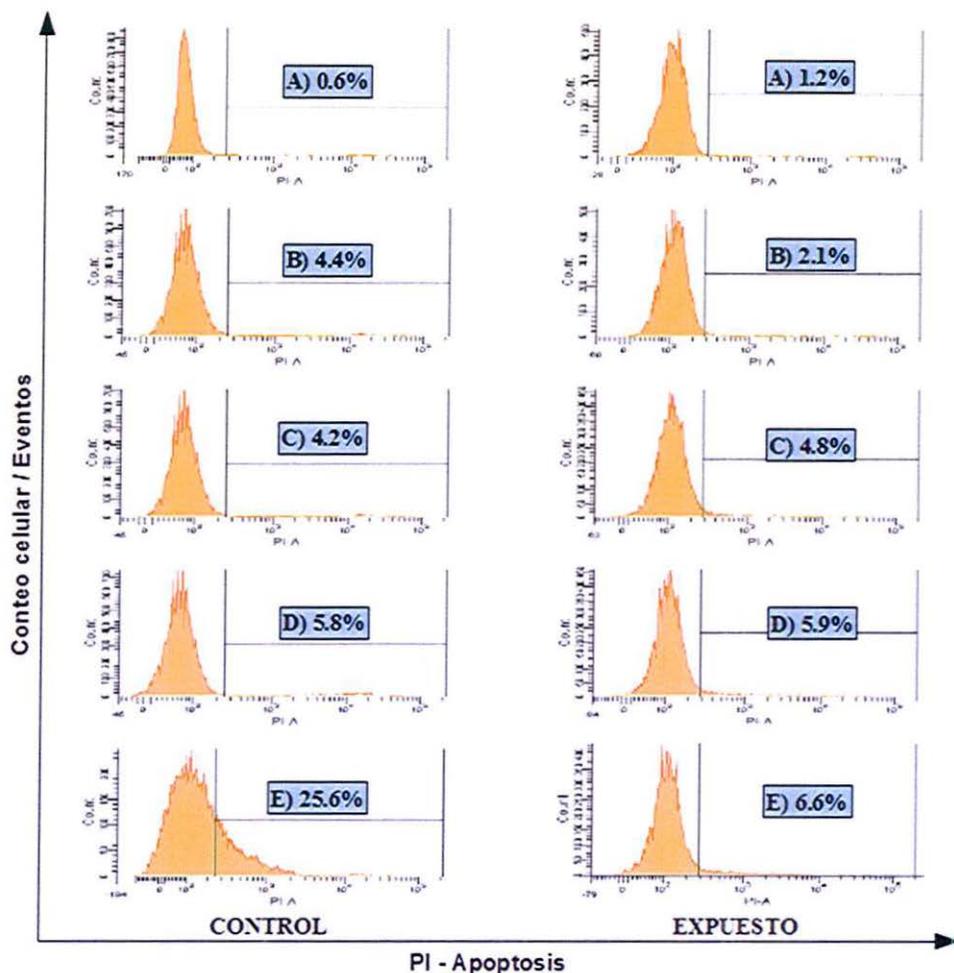


Figura 24. Histogramas representativos de actividad citotóxica de las NCC sobre células HL-60. En el cuadrante superior derecho se muestra el porcentaje de apoptosis de los grupos control y expuesto. A) isotipo; B) 1:1; C) 1:10; D) 1:20 y E) 1:40 respectivamente.

Sin embargo, el co-cultivo 1:40 presentó una marcada disminución de la actividad lítica en el grupo expuesto (5.35 ± 0.55) en comparación con el grupo control (19.9 ± 2.54) con $p > 0.05$ (Fig. 25).

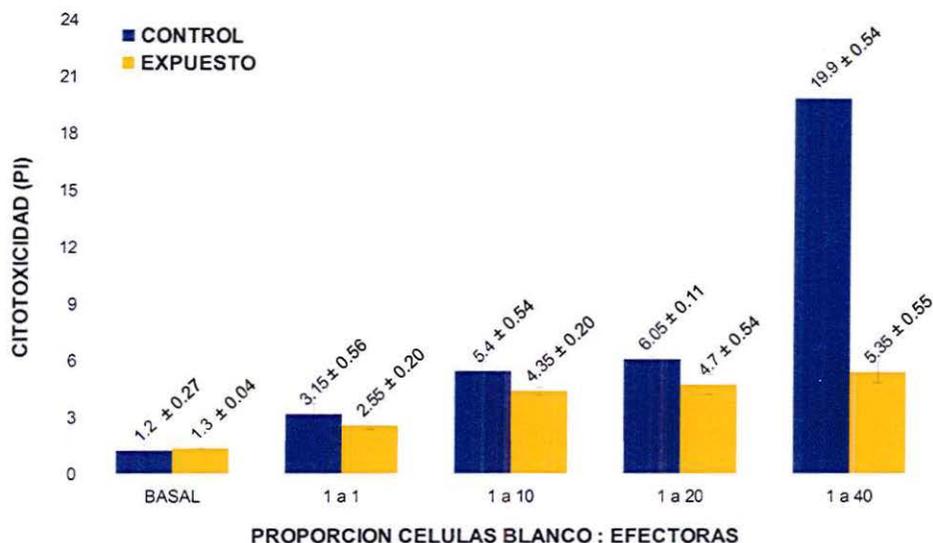


Figura 25. Efecto del endosulfán *in vivo* en la actividad citotóxica de las NCC sobre HL-60. Se aplicó la prueba de *t* de Student para la comparación de las medias \pm ES entre grupos. \pm = error estándar.

8.6 Efecto del endosulfán *in vivo* en la expresión del gen granzima en NCC esplénicas.

Para valorar la expresión del gen granzima entre grupos experimentales por efecto del endosulfán; se empleó una qRT-PCR comparando entre $\Delta\Delta CP$. En el ensayo se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la expresión del gen de esta citolisina en el grupo expuesto al insecticida (0.306 ± 0.318) en comparación con el grupo control (1.0 ± 0.0) (Fig. 26).

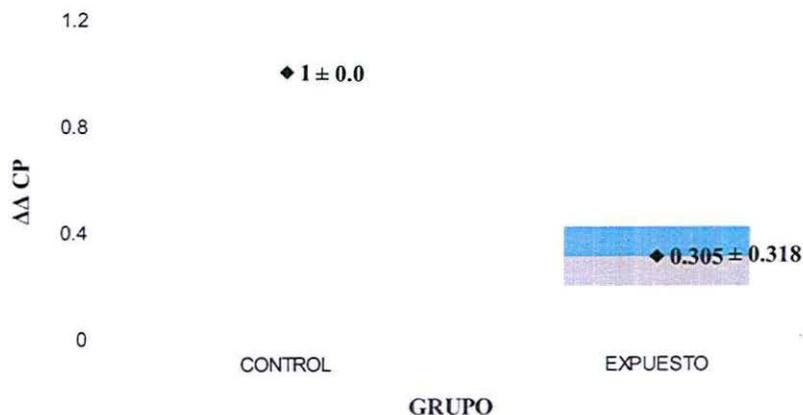


Figura 26. Efecto *in vivo* del endosulfán sobre la expresión del gen granzima en las NCC esplénicas. Se aplicó la prueba *t* de Student para comparación de las medias \pm DS entre grupos. \blacklozenge =media.

9. DISCUSIÓN

Las NCC es un linaje celular equivalente a las células NK de mamíferos y son consideradas mediadoras de la citotoxicidad en la inmunidad innata en los peces mediante la vía FasL y/o la exocitosis celular.

Como primer objetivo se identificó el inmunofenotipo de las NCC esplénicas de *O. niloticus* utilizando el protocolo descrito por Jaso-Friedman *et al.* (1996). Se observó 15% de NCC FITC⁺ en el bazo. En un ensayo no radiométrico en riñón anterior de *Ictalurus punctatus* Evans *et al.* (2000a) reportaron un 95% de NCC FITC⁺. Esta diferencia se puede deber al órgano de estudio ya que el riñón anterior es un órgano linfoide primario mientras que el bazo es un órgano linfoide secundario. Nuestros resultados coinciden con el estudio realizado por Jaso-Friedmann *et al.* (1999), quienes encontraron una rica expresión de las NCC en riñón anterior e hígado en tilapia nilótica, mientras que en bazo el porcentaje de las NCC fue también reducido.

El efecto del endosulfán en el porcentaje de células NCC fue otro parámetro que se evaluó y aun cuando la diferencia no fue significativa se muestra una tendencia de incremento (4.23%) en el grupo expuesto en relación al grupo control. Tryphonas *et al.* (2003), reportaron en ratas Sprague-Dawley hembras tratadas con trans-nonaclor (0.25 y 2.5 mg/kg) durante 28 días vía *ad gavage*, a 2.5 mg/kg un aumento en el porcentaje de las células NK en sangre periférica. Téllez-Bañuelos *et al.* (2011), en linfocitos esplénicos de tilapia del Nilo, en un protocolo de igual condición experimental en concentración y tiempo de exposición que el presentado aquí, evidenciaron que el endosulfán tiene un efecto proliferativo.

La actividad citotóxica fue medida en relación al IMF generado por IP al realizar co-cultivos por 4 h de células blanco (HL-60) y NCC. Se demostró que en una proporción blanco efectora (B:E) de 1:40 las NCC de peces expuestos a endosulfán presentaron una disminución del 73.11% en su actividad citotóxica en comparación con el grupo control. De los escasos reportes que existen sobre el efecto del endosulfán en este parámetro podemos citar a Wade *et al.* (2002) quienes encontraron que en ratas hembras Sprague-Dawley la administración de un coctel de insecticidas, por 70 días, vía *ad gavage*, indujo un efecto bifásico, es decir que a dosis baja se incrementó la actividad lítica de las células NK; mientras que con dosis mayor disminuyó significativamente esta función. Cabe mencionar que esta mezcla de insecticidas incluye al endosulfán (50 ng) y fue observada originalmente en tejidos reproductivos de pobladores canadienses.

Además, Beach *et al.* (2006), obtuvieron que en células NK humanas expuestas a una

concentración de 5 μ M [α -clordano (88 ± 5), γ -clordano (92 ± 8), oxiclordano (69 ± 11), heptacloro (58 ± 10), DDT (61 ± 13) y PCP (76 ± 12)] por 24 h una disminución en la actividad lítica frente a células tumorales (K562) en comparación al control; por su parte Daniel *et al.*, (2002) reportaron en sangre de personas expuestas de manera ocupacional por 6 meses a varios insecticidas (DDT, DDE, DDD, PCP, PCBs HCB y HCHs), una disminución en la concentración de citoquinas (IL-2, IL-10 IL-12 e IFN- γ), las cuales son indispensables en la activación de la respuesta citolítica de las células NK. Lemaire *et al.* (2006) reportaron que en células HeLa el endosulfán actúa como un xenoestrógeno al unirse al receptor ER- α . Este dato es congruente con el reporte de Vidal (2006) quien citó que los estrógenos *in vivo* disminuyen la actividad lítica de las células NK. Sugerimos entonces que el endosulfán a baja concentración promueve la disminución de la actividad citotóxica probablemente debido a su condición de xenoestrógeno.

Como último objetivo medimos el efecto *in vivo* del endosulfán en concentración subletal y por 96 h de expresión del gen granzima de tilapia del Nilo y observamos una disminución del 69.5% en la expresión del gen en el grupo expuesto al pesticida en comparación con el grupo no expuesto.

No se encontró información sobre el efecto del endosulfán en este parámetro *in vivo*. Sin embargo, de los escasos trabajos *in vitro*, coincidimos con Li *et al.* (2002 y 2005) quienes expusieron por 15 h células NK humanas y murinas al insecticida organofosforado dimetil 2,2-dichlorovinilfosfato (DDVP) a diferentes dosis (0.11, 0.22 y 0.45 mM) y observaron una disminución gradual pero marcada en la expresión del mRNA de perforina (~20%), granzima (~45%), granulosa (~35%) así como la inhibición de la actividad citolítica de las células NK (~53%), CTL (~40%) y LAK (~18%) en comparación con el control; además de reducir los niveles intracelulares de granzima B (~10%) y granzima A3/K (~47%). Por los resultados observados en el presente trabajo sugerimos que el endosulfán en su calidad de xenoestrógeno abate la actividad citolítica y altera en forma proporcional la señalización intracelular, posiblemente a través de la vía JAK/STAT y del factor de transcripción AP-1 Babichuk *et al.* (1996); Dipanjan & Lieberman (2008); Thierfelder *et al.* (1996), en la liberación de granzima y activación de las NCC esplénicas.

En una recopilación de los resultados del presente trabajo y literatura es factible proponer que el endosulfán en una cascada de eventos promueve la proliferación y disminuye la citotoxicidad vía exocitosis celular así como en la expresión del gen de la granzima. Como consecuencia la exposición a endosulfán podría disminuir la función de las células NCC esplénicas de tilapia nilótica, así como su participación en la respuesta inmune innata.

Por lo anterior es importante hacer conciencia sobre el riesgo toxicológico que rodea a este

compuesto. Aun cuando se trabajó con un modelo teleósteo, los resultados pueden extrapolar para otros organismos incluyendo al humano. Se recomienda tomar medidas regulatorias para el uso de este insecticida que afectan el ambiente y la salud de los diferentes organismos o bien plantear alternativas en el control integrado de plagas; así como informar a los consumidores acerca de los efectos adversos de los insecticidas.

10. CONCLUSIONES

El endosulfán es un insecticida inmunotóxico para la tilapia nilótica juvenil debido a que indujo alteraciones en la respuesta inmune innata de las células NCC.

In vivo, en tilapia nilótica juvenil el endosulfán en la concentración y exposición evaluada:

- Mostró tendencia a incrementar la población de NCC esplénicas.
- Disminuyó la actividad citotóxica en co-cultivo con células HL-60.
- Redujo la expresión del gen de la granzima en forma significativa.

11. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

El modelo experimental de teleosteo es relativamente flexible debido a sus requerimientos fisicoquímicos, es un excelente modelo inmunotoxicológico con el cual trabajar; dado a que su ambiente está rodeado de un fluido constante.

Para complementar la inmunofenotipificación sería recomendable utilizar anticuerpos (escasos para este organismo) que se adhieran a los receptores de las NCC e indiquen si se encuentran en estado de activación.

Sugerimos para los ensayos de citotoxicidad trabajar con células que sean compatibles en temperatura de co-cultivo para evitar muerte celular por shock térmico.

También sería de gran utilidad generar curvas regresivas o logarítmicas con las cuales observar en qué momento se llega a una meseta de tolerancia; ya que podríamos vislumbrar si los efectos son tiempo independiente y/o dosis dependiente sobre las NCC, puesto que cualquier actividad inmune innata se ve activada de inmediato y posteriormente se dirige a inmunidad adaptativa.

Es recomendable realizar la medición de citoquinas asociadas a la actividad citotóxica.

Es importante indagar en la expresión de perforina y granulosina, ya que si también disminuyen sugiere una inmunoregulación negativa integral de las cascadas de señalización mediante AP-1. Además, sería congruente incorporar la interacción de FasL/FasR, así como TNF-R y TRAIL; ya que son receptores de muerte celular.

12. ANEXOS

12.1 Catálogo de empresas formuladoras y comercializadoras de Endosulfán en México.

Cat.	EMPRESA	NOMBRE COMERCIAL	Ingrediente activo	Registro
I	AGREVO MEXICANA S.A. DE C.V.	PARAMETHYL PLUS	Endosulfán + Paration Metilico "uso restringido"	RSCO-MEZC-1108-003-009-045
		ENDOSULFÁN TÉCNICO	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-006-019-097
		THIODAN 35 CE	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-038-009-035
		THIODAN 50 PM	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-073-002-050
I	INSECTICIDAS NACIONALES COREY S.A. DE C.V.	ENDOCORAL 30-15%	Endosulfán + Paration Metilico "uso restringido"	RSCO-MEZC-1108-301-009-045
II	AGM DE MÉXICO S.A. DE C.V.	BIOSULFAN 35	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-330-009-035
II	AGRICOLA INDUSTRIAL TAMAYO S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN 35%	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-067-009-035
II	AGRICULTORES ASOCIADOS DE SINALOA S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN 35%	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-002-009-035
II	AGRICULTURA NACIONAL DE JALISCO S.A. DE C.V.	THIOSULFÁN 35-E	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-303-009-035
II	AGRICULTURA NACIONAL S.A. DE C.V.	FANTOM 35E	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-350-009-035
		ENDOSULFÁN TÉCNICO	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-356-019-094
II	AGRO FARM INDUSTRIAL DEL PACÍFICO S.A. DE C.V.	SULTAN 35	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-321-009-034
II	AGROFORMULADORA DELTA S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN 35	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-005-009-035
II	AGROFRIENDS DE MÉXICO S.A. DE C.V.	AGROSULFAN 35	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-307-009-035
II	AGROINDUSTRIAS DEL NORTE S.A. DE C.V.	AGROSULFAN 35%	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-326-009-035
II	AGROMUNDO S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN TÉCNICO	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-312-019-095
		ENDOSULFÁN 95% T	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-015-019-095
II	AGROQUÍMICA DE URUAPAN SA	ENDOSULFÁN 35%	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-009-009-035
II	AGROQUÍMICA TRIDENTE S.A. DE C.V.	TRIDANE350 TRIDENTE	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-058-009-033
II	AGROQUÍMICOS RIVAS S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN 35-CE	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-319-009-035
II	AGROQUÍMICOS VERSA S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN 35%	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-049-009-035
		SUFAN 35/ BINGO 35	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-354-009-035
II	AVENTIS CROPSCIENCE MÉXICO S.A. DE C.V.	THIODAN HF/GALA HF/ CAPATAZ HF/PHASER HF	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-374-009-030
		THIODAN 50 PM/GALA 50 PM/CAPATAZ 50 PM /PHASER 50 PM	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-338-002-050

II	BAYER DE MÉXICO S.A. DE C.V.	THIONEX 35 C E	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-045-009-035
		ENDOSULFÁN TÉCNICO / THIODAN TÉCNICO	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-332-019-097
		THIODAN 35 CE / PHASER 35 CE / CAPATAZ 35 CE / GALA 35 C.E	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-334-009-033
		ENDOSULFÁN TÉCNICO	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-372-017-094
II	BIESTERFELD DE MEXICO S.A. DE C.V.	BIESTELFAN / ENDOPRO / ENDOMAX	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-380-019-094
II	CHEMIMPORT, S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN TÉCNICO	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-301-018-095
II	DERMET, S.A. DE C.V.	DERFAN 35 Y/O FANMET 35	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-359-009-035
II	EMPRESAS LONGORIA, S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN 35% C E	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-316-009-035
II	FERTILIZANTES E INSECTICIDAS MISION, S.A. DE C.V.	HORNET 350 / ENDOSULFÁN 350	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-368-009-035
II	FMC AGROQUIMICA DE MEXICO, S. DE R.L. DE C.V.	ZOLL 35 CE	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-384-009-033
II	GLOBE CHEMICALS, S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN TÉCNICO 94%	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-378-019-094
II	GOWAN MEXICANA, S.A.P.I. DE C.V.	GOWAN ENDOSULFÁN 3 CE / ENDOX 360 CE / PROSULFÁN 3 CE / AGROPULL 360 CE	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-314-009-033
		GOWAN ENDOSULFÁN 50 PH	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-322-002-053
II	INDUSTRIAS AGRICOLAS, S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN 35%	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-013-017-095
		ENDOSULFÁN 35%	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-019-009-035
II	INGENIERIA INDUSTRIAL, S.A. DE C.V.	ALGODAN 350	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-360-009-035
II	INSECTICIDAS DE OCCIDENTE, S.A. DE C.V.	TOXIDIAN 35%	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-022-009-035
II	INSECTICIDAS DEL PACIFICO, S.A. DE C.V.	ENDOFAN 35%	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-024-009-035
II	INSECTICIDAS NACIONALES COREY, S.A. DE C.V.	ENDOCORAL 35% C.E.	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-025-009-035
II	KOOR INTERCOMERCIAL, S.A.	THIONEX 350 EC / MANTIS 350 CE / THIONEX 350 CE / ENDOSULFÁN 350 CE / BRAGADO 350 CE /	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-386-009-033
		THIONEX TÉCNICO / VELOSULFÁN TÉCNICO	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-004-017-094
II	MAKHTESHIM-AGAN DE MEXICO, S.A. DE C.V.	THIONEX TÉCNICO	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-336-017-094
II	MELESIO HECTOR CARDENAS MENDOZA Y/O AGROCAR	THIOCAR 35	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-370-009-035

II	MEZCLAS Y FERTILIZANTES, S.A. DE C.V.	PODEROSO 35 C E	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-362-009-035
II	NACIONAL AGROQUIMICA, S.A. DE C.V.	NASADAN 35	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-065-009-035
II	NAYCHEM, S.A. DE C.V.	ENDOSULFAN 35 E	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-070-009-035
II	PETRO DE OCCIDENTE, S.A. DE C.V.	AGROFAN 35 CE	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-313-009-035
II	PLAGUICIDAS MEXICANOS, S.A. DE C.V.	PLAGUI-DAN 35%	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-074-009-035
II	POLAQUIMIA, S.A. DE C.V.	ENDOPOL	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-308-009-035
II	POLISULFUROS DE MEXICO, S.A. DE C.V.	ENDOPOL THIOSUL 35	Endosulfan Endosulfan	RSCO-INAC-0126-392-009-033 RSCO-INAC-0126-315-009-035
II	PROAGRO DEL NOROESTE, S.A. DE C.V.	PRONEX 35% / THIOJAM 35 / ASPEN 35 / COUCH 35 / FANCY 35 / FANG 35	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-364-009-035
II	PRODUCTOS BASICOS, S.A. DE C.V.	ENDOSULFAN 35 %	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-302-009-035
II	PROMOTORA DE TECNICA AGROPECUARIA, S.A. DE C.V	ENDOSULFAN 95% TECNICO	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-014-019-095
II	PROVEEDORA AGRICOLA LAGUNERA, S.A. DE C.V.	ENDOSULFAN 35	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-034-009-035
II	PROVINDUSTRIAS DE OCCIDENTE, S.A. DE C.V.	POSULFAN 35	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-352-009-035
II	PYOSA, S.A. DE C.V.	DESTROY/PANTHE R	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-376-009-035
II	QUIMICA AGRICOLA DEL VALLE DE CULIACAN, S.A. DE	THIO-VAC	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-076-009-035
II	QUIMICA LUCAVA, S.A. DE C.V.	THIO-VAC 35-F LUCASULFAN TECNICO	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-366-009-035 RSCO-INAC-0126-324-019-094
II	QUIMICA SAGAL, S.A. DE C.V.	LUCASULFAN 35 C E / METEORO 35 CE / ENDOSULFAN QL 35 CE / FARFAN 35 CE / STEEL 35 CE	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-305-009-035
II	QUIMICAL, S.A. DE C.V.	MISULFAN / AGROSULFAN / AGRISULFAN	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-394-009-035
II	RHONE POULENC AGRO, S.A. DE C.V.	ENDOSULFAN 35 E	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-306-009-035
II	SEMILLAS DEL PACIFICO, S.A. DE C.V.	ENDOSULFAN TECNICO	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-008-019-097
II	SINTESIS Y FORMULACIONES DE ALTA TECNOLOGIA, S.A.	ENDOSULFAN 37B	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-041-009-035
II	TECNICA AGRICOLA CHIAPAS, S.A. DE CV	THIOFIXAN TECNICO	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-342-017-094
II	UNITED PHOSPHORUS DE MEXICO, S.A. DE C.V	THIOFIXAN	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-344-009-035
II		TACSAFAN	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-388-009-035
II		USULFAN 35% EC / TIOKIL 35 / ENDOKILL / POLICIA	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-358-009-035
II		USULFAN TECNICO / ENDOSULFAN TECNICO	Endosulfan	RSCO-INAC-0126-346-019-094

II	VAMEX DE LOS MOCHIS S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN 35 %	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-069-009-035
II	VELSIMEX, S.A. DE C.V.	VELDOSULFAN 35 C.E. / ENDOSTAR 35 CE / AGRISULFAN 35 CE / DOFAN 35 CE / TOPSULFAN 35	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-055-009-035
III	BAYER DE MEXICO, S.A. DE C.V.	THIODAN 26 CS / THIODAN ULTRACAPS SEVIDAN 70 P.H.	Endosulfán Carbario + Endosulfán	RSCO-INAC-0126-390-085-026 RSCO-MEZC-1102-001-002-070
III	PROVEEDORA AGROINDUSTRIAL DE SINALOA, S.A. DE	ENDOS 35	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-340-009-035
III	VELSIMEX, S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN TECNICO	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-001-017-094
IV	NAYCHEM, S.A. DE C.V.	ENDOSULFÁN 4 %	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-015-001-004
IV	PLAGUICIDAS MEXICANOS, S.A. DE C.V.	PLAGUI-DAN 4% POLVO	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-080-001-004
IV	QUIMICA LUCAVA, S.A. DE C.V.	LUCASULFAN 4% P	Endosulfán	RSCO-INAC-0126-310-001-004

Fuente: www.cofepris.gob.mx Base de registros Sanitarios de Plaguicidas otorgados. Documento: [reglag.pdf](#)

Cabe notar que la información proporcionada por COFEPRIS al Secretariado del Convenio de Estocolmo indica 85 registros del endosulfán para uso agrícola en 20 cultivos por lo que este cuadro y la sección de usos debe confirmarse por COFEPRIS.

<http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/POPRCMeetings/POPRC4/ResponsesonAnnexE/Endosulfan/tabid/460/language/en-US/Default.aspx>

12.2 Condiciones y parámetros físico-químicos de *O. niloticus*.

PARAMETRO	RANGOS IDEALES
Oxígeno Disuelto (OD)	3 a 10 mg/l
Ozono	0 a 0.005 mg/l
Temperatura	24 a 28 °C
PH	6.5 a 9.0
Dureza (Alcalinidad: CaCO ₃)	10 a 500 mg/l
Magnesio (Mg)	0 a 36 mg/l
Manganeso (Mn)	0 a 0.01 mg/l
Calcio	5 a 160 mg/l
Dióxido de Carbono (CO ₂)	0 a 2.0 mg/l
Amonio Total	Hasta 2.0 mg/l
Amonio (NH ₃ : no ionizado)	0 a 0.05 mg/l
Nitritos (NO ₂)	0 a 0.1 mg/l
Fosfatos (PO ₄)	0.5 a 1.5 mg/l
Fósforo Total	0.01 a 3.0 mg/l
Fósforo soluble	0 a 10 mg/l
Sulfuro de Hidrógeno o Ac. Sulfhídrico (H ₂ S)	0 a 0.003 mg/l
Acido Cianhídrico (HCN)	0 a 0.1 mg/l
Gas Metano (CH ₄)	0 a 0.15 mg/l
Cadmio en aguas duras	0 a 0.003 mg/l
Cadmio en aguas blandas	0 a 0.004 mg/l
Cloro	0 a 0.003 mg/l
Cobre en aguas duras	0 a 0.03 mg/l
Cobre en aguas blandas	0 a 0.006 mg/l
Cromo (Cr)	0 a 0.03 mg/l
Hierro (Fe)	0 a 0.015 mg/l
Mercurio (Hg)	0 a 0.0002 mg/l
Níquel (Ni)	0 a 0.02 mg/l
Plomo (Pb)	0 0.03 mg/l
Turbidez (Disco Secchi)	30 a 40 cm
Sólidos Disueltos	0 a 30 mg/l
Sulfatos (SO ₄ ²⁻)	0 a 500 mg/l
Zinc (Zn)	0 a 0.05 mg/l

*Valores en mg/L = ppm.

Fuente: *Manual de producción de tilapia (Cantor, 2007)*.

12.3 Tablas de alimentación y requerimiento proteico de *O. niloticus*.

Edad (semanas)	Peso promedio (grs)	Crecimiento diario (grs/día)	Alimento diario (% de peso)	FCA
0	1		15	0.83
1	3	0.27	10	0.85
2	5	0.27	8	0.85
3	7	0.34	5.8	0.86
4	10	0.36	5.7	0.90
5	13	0.46	5.5	0.90
6	17	0.58	5.1	0.90
7	22	0.71	5.1	0.91
8	29	0.93	5.0	0.95
9	37	1.14	4.5	0.98
10	46	1.29	4.3	0.98
11	56	1.51	4.2	1.00
12	69	1.79	4.1	1.03
13	83	2.07	4.0	1.03
14	100	2.43	4.0	1.10
15	120	2.85	3.5	1.15
16	140	2.86	3.4	1.15
17	162	3.14	3.2	1.25
18	184	3.14	2.9	1.25
19	207	3.29	2.8	1.26
20	231	3.43	2.6	1.28
21	256	3.57	2.4	1.28
22	282	3.71	2.3	1.28
23	309	3.85	2.2	1.30
24	337	4.0	2.1	1.37
25	355	4.0	1.9	1.37
26	393	4.0	1.8	1.37
27	422	4.14	1.7	1.37
28	451	4.14	1.6	1.37
29	480	4.14	1.5	1.34
30	509	4.14	1.4	1.34
31	538	4.14	1.4	1.35
32	567	4.14	1.4	1.45
33	596	4.14	1.3	1.47
34	629	4.14	1.3	1.49
35	654	4.14	1.2	1.49
36	683	4.14	1.1	1.65

Fuente: Manual de producción de tilapia (Cantor, 2007).

Rango de peso (grs)	Nivel óptimo de proteína (%)
Larva a 0.5	40 – 45%
0.5 a 10	40 – 35%
10 a 30	30 – 35
30 a 250	30 – 35%
250 a talla comercial	25 – 35%

13. MATERIALES, EQUIPO E INSUMOS REQUERIDOS EN LA INVESTIGACIÓN.

Reactivos y sustancias:

Nombre:	Empresa:	Num. Catalogo:
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich	D5652
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich	R6504
RPMI no Phenol Red	Gibco	11835-055 180M93 SSA
Etoposido	Lemery	IV
Yoduro de Propidio	eBioscience	BMS500FI/300
Anti-Mouse IgM(μ -chain specific)-FITC	Sigma-Aldrich	076K60261
mAb 5C6	Affinity BioReagents	MAI-760
Heparina	Pisa	Inhepar
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich	10771
Percoll	Sigma-Aldrich	P4937
Trypan Blue solution	Sigma-Aldrich	T8154
UltraPure Agarose	Invitrogen	15510-027
TBE	Sigma-Aldrich	T4415
BrEt	Sigma-Aldrich	E-4391
2-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M3148
Primer granzima forward y reverse	Acceso Lab Integrated DNA	-----
Primer β -actina forward y reverse	Technologies	55783947(8)
HL-60	ATCC	CCL-240
Nutripec	Purina	2506 AP

Kits de extracción y purificación:

Nombre:	Empresa:	Num. Catalogo:
PureLink RNA Mini Kit	Ambion	12183-018A
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche	4897030001
LighCycler® FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I	Roche	3515869001
Kit para disección	Guttek	Varios

Equipos e instrumental:

Nombre:	Empresa:	Num. Catalogo:
Centrifuga	Jouan	CR412
Centrifuga	Heraeus	75005286
LighCycler 2.0	Roche	3531414001
LighCycler Capillaries (20 μ L)	Roche	4929292001
LighCycler Centrifuge Adapters	Roche	11909312001
Synergy HT	BioTek	SIAFRT
96 well cell culture cluster	Costar	3585
Tubos para centrifugacion 15 mL	Corning	430052

Tubos para centrifugacion 50 mL	Corning	430829
Tubos para citometría	BD Falcon	734-0000
Tubos Eppendorf 1.5 mL	Plastibrand	7805
Microtubos 2 mL	Axygen	MCT-200-C
Puntas para micropipeta 1000 µL	Corning	4846
Puntas para micropipeta 200 µL	Axygen	T-210-Y
Puntas para micropipeta 10 µL	Axygen	T-300-L
Jeringas de 5 mL	BD Plastipak	302539
Micropipetas	Rainin - Gilson	Varios
Cámara de Neubauer	Brand	1110000
Citometro BD FACSAria	BD Biosciences	Configurado
Microscopio	Carl Zeiss	Axiostar

14. BIBLIOGRAFIA

- Abadin H. G., C. H. Chou, *et al.* 2007. "Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: immunological effects". *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 47(3):249-256.
- Alam, S., D. L. Laughton, *et al.* 2006. "Human peripheral blood mononuclear cells express GABA_A receptor subunits". *Mol. Immunol.* 43(9):1432-1442.
- Anon. 1984. *Environment Health Criteria 40- Endosulfán*. IPCS (International Program on Chemical Safety) – WHO Geneva.
- Anon. 1989. *Toxicity Data Hand Book. Vol:III, Pesticide-A*. Industrial Toxicology Research Center (Council of Scientific and Industrial Research) Lucknow, India.
- Anon. 1997. *NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards*. US Dept. of Health and Human Services- National Institute for Occupational Safety and Health.
- Arjona, A., Nadka, B. and Dipak K. S. 2004. "Circadian rhythms of granzyme B, perforin, INF- γ , and NK cell cytolytic activity in the spleen: effects of chronic ethanol". *J. Immunol.* 172:2811-2817.
- ATSDR, 2000. "Toxicological Profile for Endosulfán". Pesticide Action Network North America, Pesticides Database.
- Babichuk, C. K., Duggan, B. L., Bleackley, R. C. 1996. "In vivo regulation of murine granzyme B gene transcription in activated primary T cells". *J. Biol. Chem.* 271:16485–93.
- Beach, T. M. and M. M. Whalen. 2006. "Effects of organochlorine pesticides on interleukin secretion from lymphocytes". *Hum. Exp. Toxicol.* 25(11):651-7.
- Bishop, G. R., Jaso-Friedmann, L., Evans, D. L. 2000. "Activation-induced programmed cell death of nonspecific cytotoxic cells and inhibition by apoptosis regulatory factors". *Cellular Immunology.* 199:126-137.
- Bishop, G. R., Taylor, S., Jaso-Friedmann, L., Evans, D. L. 2002. "Mechanism of nonspecific cytotoxic cell regulation of apoptosis: cytokine-like activity of Fas ligand". *Fish & Shellfish Immunol.* 13:47-67.
- Bols, N. C., J. L. Brubacher, *et al.* 2001. "Ecotoxicology and innate immunity in fish". *Dev. Comp. Immunol.* 25(8-9):853-873.
- Bonefeld-Jorgensen, E. C., H. T. Grunfelt, *et al.* 2005. "Effect of pesticides on estrogen receptor transactivation *in vitro*: a comparison of stable transfected MVLN and transient transfected MCF-7 cells". *Mol. Cell Endocrinol.* 244(1-2):20-30.
- Boni, R., Wellman, A., Man, Y. G., Hofbahuer, G., Brinkmann, U. 1999. "Expression of the proliferation and apoptosis-associated CAS protein in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions". *American J. Dermatol.* 21:125-8.

- Bowden, T.J., Butler, R., Bricknell, I. R., Ellis, A. E. 1997 “Serum trypsin-inhibitory activity in five species of farmed fish”. *Fish Shellfish Immunol.* (7):377 – 385.
- Bowden, T. J. 2008. “Modulation of the immune system of fish by their environment”. *Fish Shellfish Immunol.* 25(4):373-383.
- Bricknell, I., Dalmo, R. A. 2005. “The use of immunostimulants in fish larval aquaculture”. *Fish Shellfish Immunol.* 19:457–472.
- Brinkmann, U., Brinkmann, E., Gallo, M., Scherf, U., Pastan, I. 1996. “Role of CAS, a human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1, in toxin and tumor necrosis factor mediated apoptosis”. *Biochemistry.* 35:6891-9.
- Brinkmann, U. 1998. “CAS, the human homologue of the yeast chromosome-segregation gene CSE1, in proliferation, apoptosis and cancer”. *American J. Hum. Gen.* 62:509-13.
- Cantor, A. Fernando. 2007. “Manual de producción de tilapia”. Secretaria del Desarrollo Rural del Estado de Puebla.
- Carlson, R. L., Evans, D. L., Graves, S. S. 1985. “Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). V. Metabolic requirements of lysis”. *Dev. Comp. Immunol.* 9:271-280.
- Casida, J. E. and G. B. Quisad. 2004. “Why insecticides are more toxic to insects than people: The unique toxicology of insects”. *J. Pestic. Sci.* 29:81-86.
- Daniel, C. S., Agarwal, S., Agarwal, S. S. 1986. “Human Red blood cell membrane damage by endosulfan”. *Toxicol. Lett.* 32(2):113-8.
- Daniel, V., W. Huber, *et al.* 2002. “Associations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) 4.4 and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) 4.4 blood levels with plasma IL-4”. *Arch. Environ. Health.* 57(6):541-7.
- Dipanjan, C., Lieberman, J. 2008. “Death by a thousand cuts: Granzyme pathways of programmed cell death”. *Annu. Rev. Immunol.* 26:389–420.
- Dominguez M., T. A., Tsuchiya M., Nakamura Shigeo. 2004. “Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*”. *Aquaculture.* 241:491-500.
- Edagawa, T., M. Murata, M. Hattori, M. Onuma & H. Kodama. 2003. “Cell surface C-reactive protein of rainbow trout lymphocytes”. *Dev. Comp. Immunol.* 17:119-127.
- Evans, D. L., Carlson, R. L., Graves, S. S., Hogan, K. T. 1984 a. “Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*). IV. Target cell binding and recycling capacity”. *Developmental and Comparative Immunology.* 8:823-833.
- Evans, D. L., Hogan, K. T., Graves, S. S., Carlson, R. L., Floyd, E., Dawe, D. L. 1984 b. “Nonspecific cytotoxic cells in fish (*Ictalurus punctatus*) III. Biophysical and biochemical properties affecting cytolysis”. *Dev. Com. Immunol.* 8:599.

- Evans, D. L., Smith, E. E., Jaso-Friedmann, L., St. John, A., Koren, H. S., and Harris, D. T. 1988. "Identification of a putative antigen receptor on fish nonspecific cytotoxic cells with monoclonal antibodies". *J. Immunol.* 141(1):324-332.
- Evans, D. L. & Cooper E. L. 1990. "Natural killer cells in ectothermic vertebrates". *BioSciences.* 40(10):745-749.
- Evans, D. L., Jaso-Friedmann L. 1992. "Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish". *Annu. Rev. Fish Dis.* 2:109-121.
- Evans, D. L., Jaso-Friedmann L. 1994. "The role of protein phosphatases in the regulation of nonspecific cytotoxic cell activity". *Dev. Comp. Immunol.* 18:137-46.
- Evans, D. L., Leary III J. H., Jaso-Friedmann L. 1996. "Mapping of the epitope recognized by nonspecific cytotoxic cells: determination of the fine specificity using synthetic peptides". *Scan. J. Immunol.* 43:556-65.
- Evans, D. L., Taylor, S. L., Leary III J. H., Bishop, G. R. & Jaso-Friedmann L. 2000. "*In vivo* activation of nonspecific cytotoxic cells by *Streptococcus iniae* and amplification with apoptosis regulatory factor(s)". *Fish & Shellfish Immunol.* 1:419-434.
- Evans, D. L., Oumouna, M. & Jaso-Friedmann L. 2000a. "Nonradiometric detection of cytotoxicity of teleost nonspecific cytotoxic cells" *Met. Cell Science.* 22:233-237.
- Faisal M., Ahmed II., Peters G., Cooper E. L. 1989. "Natural cytotoxicity of tilapia leukocytes" *Dis. Aquatic Org.* 7:17-22.
- Fange, R. 2002. "Fish blood cells". *Fish Physiology.* 64-103.
- Fanta, E. 1955. "Influence of background color on the behavior of the *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Arquivos de Biologia e Tecnologia.* 38:1237-1251.
- FAO. 2009. "The state of world fisheries and aquaculture 2008". ISBN 978-92-5-106029-2. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0250e/i0250e.pdf>
- Fernández, A. B., D. B. I., Ruiz I. 2002. "El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos". *Aquatic* 16:1-14.
- Fletcher, T. C. 2001. "Non-antibody molecules and the defense mechanism of fish" *Stress and Fish*, Acad. Press.
- Ghoneum M., Faisal M., Peters G., Ahmed II., Cooper E. L. 1988. "Suppression of natural cytotoxic cell activity by social aggressiveness in tilapia". *Dev. Comp. Immunol.* 12:595-602.
- Graves, S. S., Evans, D. L., Dawe, D. L. 1985 a. "Antiprotozoan activity of nonspecific cytotoxic cells (NCC) from the channel catfish (*Ictalurus punctatus*)". *J. Immunol.* 134(1):78.
- Graves, S. S., Evans, D. L., Dawe, D. L. 1985 b. "Mobilization and activation of nonspecific cytotoxic cells (NCC) in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) infected with

- Ichthyophthirius multifiliis*". *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 8:43-51.
- Greenlee, A. R., R. A. Brown & S. S. Ristow. 2001. "Nonspecific cytotoxic cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) kill YAC-1 targets by both necrotic and apoptotic mechanism. *Dev. Comp. Immunol.* 15:153-164.
- Grinde, B., O. Lie, T. Poppe & R. Salte. 2003. "Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture". *Aquaculture.* 18:299-304.
- Hack, R., E. Ebert, *et al.* 1995. "Chronic toxicity and carcinogenicity studies with the insecticide endosulfán in rats and mice". *Food Chem. Toxicol.* 33(11):941-950.
- Hernandez-Flores, G., P. C. Gomez-Contreras, *et al.* 2005. "Gamma-irradiation induced apoptosis in peritoneal macrophages by oxidative stress. Implications of antioxidants in caspase mitochondrial pathway". *Anticancer. Res.* 25(6B):4091-100.
- Huttenhuis, H. B., C. P. Grou, *et al.* 2006. "Carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune factors are present before hatching". *Fish Shellfish Immunol.* 20(4):586-96.
- INE. 2004. Instituto Nacional de Ecología. México.
- INE. 2011. "Diagnostico de la situación del endosulfán en México". Consultora: Irina Ilze Lema. Instituto Nacional de Ecología. México.
- Janganan, A., Areechon, N., Prapansak, S. 2009. "Molecular characterization and expression analysis of complementary DNA (cDNA) encoding granzyme gene in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)". Kasetart University Annual Conference, Bangkok, Thailand. (Submitted).
- Jaso-Friedmann, L., Leary, III, J. H., Evans, D. L. 1994. "Pathways of signaling in nonspecific cytotoxic cells: effects of protein kinase and phosphatase inhibitors and evidence for membrane tyrosine phosphorylation". *Cell. Immunol.* 153:142-153.
- Jaso-Friedmann, L., Leary, III, J. H., Evans, D. L. 1995. "Monoclonal antibody binding to a receptor on nonspecific cytotoxic cells (NCC) increases the expression of proto-oncogene kinases and protein kinase C". *Cell. Signal.* 7:463-70.
- Jaso-Friedmann, L., Leary III J. H., Weisman Z., Evans D. L. 1996. "Activation of nonspecific cytotoxic cells with a multiple antigenic peptide: specificity and requirements for receptor crosslinkage". *Cell. Immunol.* 170:195-201.
- Jaso-Friedmann, L., Leary, III, J. H., Evans, D. L. 1997. "NCCRP-1: a novel receptor protein sequenced from teleost nonspecific cytotoxic cells". *Mol. Immunol.* 34:955-965.
- Jaso-Friedmann, L., Leary, III, J. H., Evans, D. L. 2001. "The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties". *Dev. Comp. Immunol.* 25:701-707.
- Jaso-Friedmann, L., Evans D. L. 1999. "Mechanism of cellular cytotoxic innate resistance in tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Dev. Comp. Immunol.* 23:27-35.

- Jaso-Friedmann, L., Ruiz, J. Bishop G. R., Evans D. L. 2000 a. "Immunoregulation of innate immunity in tilapia: activation of nonspecific cytotoxic cells by cytokine-like factors". *Dev. Comp. Immunol.* 24:25-36.
- Jaso-Friedmann, L., Leary H. J., Evans D. L. 2000 b. "Role of nonspecific cytotoxic cells in the induction of programmed cell death of pathogenic protozoans: participation of the Fas ligand-Fas receptor system". *Exp. Parasitol.* 96:75-88.
- Kalender, S., Y. Kalender, *et al.* 2004. "Endosulfán-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E". *Toxicology.* 202(3):227-235.
- Kam, C. M., Huding, D., Powers, J. C. 2000. "Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors". *Biochim. Biophys. Acta.* 1477:307-323.
- Kawamoto N. Y. & Takeda M. 1951. "The influence of wave lengths of lighth on the behavior of young fish". Report of Faculty of Fisheries, Prefectural University of Mie. 1:41-53.
- Koumans-Van Diepen, J. C. E., M. H. M. Van de Lisdonk., A. J. L. Taverne-Thiele., B. M. Verburg-Van-Kemenade & J. H. W. M. Rombout. 2004. "Characterization of immunoglobulin-binding leukocytes in carp (*Cyprinus carpio L.*)". *Dev. Comp. Immunol.* 18:45-56.
- Kutluhan, S., Akhan, G., Gulnerkin, F., Kurdoglu, E. 2003. "Three cases of recurrent epileptic seizures caused by Endosulfan". *Neurol. India.* 51(1):102-3.
- Leary, J. H., III, Evans, D. L. and Jaso-Friedmann, L. 1994. "Partial amino acid sequence of a novel protozoan parasite antigen that inhibits nonspecific cytotoxic cell activity". *Scan. J. Immunol.* 40:158-164.
- Lemaire, G., Wissem, M., Pascale M., Patrick, B., Roger, R. 2006. "Activation of α - and β - estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines". *Life Sci.* 79:1160-1169.
- Li, Q., N. Nagahara, *et al.* 2002. "Organophosphorus pesticides markedly inhibit the activities of natural killer, cytotoxic T lymphocyte and lymphokine-activated killer: a proposed inhibiting mechanism via granzyme inhibition". *Toxicology.* 172(3):181-90.
- Li, Q., A. Nakadai, *et al.* 2005. "Dimethyl 2,2-dichlorovinyl phosphate (DDVP) markedly decreases the expression of perforin, granzyme A and granulysin in human NK-92CI cell line". *Toxicology.* 213(1-2):107-16.
- Liberman, J. 2003. "The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal". *Nat. Rev. Immunol.* 3:361-370.
- Magnadottir, B. 2006. "Innate immunity of fish (overview)". *Fish Shellfish Immunol.* 20(2):137-51.
- Magnadottir, B. 2010. "Immunological control of fish diseases". *Mar. Biotechnol.* 12:361-379.
- Martinez-Chavez, Carlos C. 2008a. "Photic entrainment and onset of puberty in Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus niloticus*)". Thesis. Institute of aquaculture, University of Stirling.

- Martinez-Chavez, Carlos C., Al-Khamees, S., Campos Mendoza, A., Penman, D. J., Migaud H. 2008b. "Clock controlled endogenous melatonin rhythms in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus niloticus*) and African catfish (*Clarias gariepinus*). *Chronobiol. Int.* 25(1):31-49.
- Matzinger, P. 2002. "An innate sense of danger". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 961(1):341-342.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A. Jr. 2002 "Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system". *Science.* 296:298-300.
- Metkar, S. S., B. Wang, et al. 2002. "Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation". *Immunity.* 16:417-428.
- Migliore, L., L. Petrozzini, et al. 2002. "Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients". *Neurology.* 58(12):1809-15.
- Muntane, J., Gonzalez, R., Ranchal, I., Collado, J. A., Lopez-sanchez, L. M., Herencia, C., Rodriguez-Ariza, A., Muñoz-Castañeda, J. R., M. de la Mata. 2007. "Mecanismos de lesión hepatocelular". *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 99(7):405-410.
- Naqvi, S. M. and C. Vaishnavi. 1993. "Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfán insecticide to non-target animals". *Comp. Biochem. Physiol. C.* 105(3):347-61.
- Narita, S., R. M. Goldblum, et al. 2007. "Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators". *Environ. Health Perspect.* 115(1):48-52.
- Nayar, K. K., Ananta Krishnan, T. N. and David B.V. 1992. "General and Applied Entomology". Tata McGraw Hill Publishing Co. Ltd., New Delhi, India.
- Nivia, E. 1993. "Endosulfan". Red de acción en plaguicidas. Palmira, Colombia.
http://www.rapaluruaguay.org/endosulfan/Endosulfan_Nivia.doc
- Okoumassoun, L. E., D. Averill-Bates, et al. 2003. "Possible mechanism underlying the mitogenic action of heptachlor in rat hepatocytes". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 193(3):356-69.
- Olabuenaga, S. E. 2000. "Fish immune system". *Guyana.* 64(2):205-215.
- Oumouna, M., Jaso-Friedmann L., Evans, D. L. 2001. "Flow cytometry- based assay for determination of teleost cytotoxic cell lysis of target cells". *Cytometry.* 45:259-266.
- Pinkoski, M. J., M. Hobman, et al. 1998. "Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood.* 92:1044-1054.
- Pistl, J., N. Kovalkovicova, et al. 2003. "Determination of the immunotoxic potential of pesticides on functional activity of sheep leukocytes in vitro". *Toxicology.* 188(1):73-81.

- Poletto, A. B., Wasko, A. P., Olivera, C., Azevedo, A., Carvalho, R. F., Silva, M. D. P., Foresti, F., Cesar, M. 2008. "Identities among actin-encoding cDNAs of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and other eukaryote species revealed by nucleotide and amino acid sequence analyses". *Gen. Mol. Biol.* 31(1):352-356.
- Pomes, A., E. Rodriguez-Farre, et al. 1994. "Disruption of GABA-dependent chloride flux by cyclodienes and hexachlorocyclohexanes in primary cultures of cortical neurons". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271(3):1616-23.
- Praveen, K., Evans, D. L., Jaso-Friedmann, L. 2004. "Evidence for the existence of granzyme-like serine proteases in teleost cytotoxic cells". *J. Mol. Evol.* 58:449-459.
- Praveen, K., J. H. Leary, 3rd, et al. 2006 a. "Molecular characterization and expression of a granzyme of and ectothermic vertebrate with chymase-like activity expressed in the cytotoxic cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).". *Immunogenetics.* 58(1):41-55.
- Praveen, K., J. H. Leary III, Evans, D. L., Jaso-Friedmann, L. 2006 b. "Molecular cloning of cellular apoptosis susceptibility (CAS) gene in *Oreochromis niloticus* and its proposed role in regulation of non-specific cytotoxic cell (NCC) functions". *Fish Shellfish Immunol.* 20:647-655.
- Review Committee at its fifth meeting. 2009.
<http://chm.pops.int/Convention/POPs%20Review%20Committee/Chemicals/tabid/781/language/en-GB/Default.aspx> UNEP/POPS/POPRC.5/10/Add.2
- Reyes-Garcia, M. G., F. Hernandez-Hernandez, et al. 2007. "GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulate their IL-6/IL-12 production". *J. Neuroimmunol.* 188(1-2):64-68.
- Rice, C. D., D. H. Kergosien, et al. 1996. "Innate immune function as a bioindicator of pollution stress in fish". *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33(2):186-192.
- Rogel-Gaillard, C., S. Chilmonczyk & P. De Kinkelin. 2002. "In vitro induction of interferon-like activity from rainbow trout leukocytes stimulated by Egtved virus". *Fish Shellfish immunol.* 3:383-394.
- Romeo F. Quijano. 2000. "Risk Assessment in a third world reality: An Endosulfán case History". *International Journal of Occupational and Environment Health.* Vol. 6, No. 4.
- Ruiz, J., Leary H. J., Jaso-Friedmann L. 2001. "Phosphorylation-induced activation of tilapia nonspecific cytotoxic cells by serum cytokines". *Dis. Aquat. Organ.* (Submitted).
- Ruiz, I., Fernández A. B., de Blas I. 2003. "El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune especifica". *Aquatic.* 18:33-38.
- Russell, J. H., Ley, T. J. 2002. "Lymphocyte-mediated cytotoxicity". *Annu. Rev. Immunol.* 20:323-370.
- Schoeters, G., E. Den Hond, et al. 2008. "Endocrine disruptors and abnormalities of pubertal development". *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102(2):168-175.

- Shen, L., T. B. Stuge, *et al.* 2002. "Channel catfish cytotoxic cells: a mini-review". *Dev. Comp. Immunol.* 26(2):141-149.
- Siddiqui, M. K., M. Anand, *et al.* 2005. "Biomonitoring of organochlorines in women with benign and malignant breast disease". *Environ. Res.* 98(2):250-7.
- Sosan, M. B., A. E. Akingbohunbe, *et al.* 2008. "Insecticide residues in the blood serum and domestic water source of cacao farmers in Southwestern Nigeria". *Chemosphere.* 72(5):781-4.
- Stafford, J. L., Belosevic, M. 2003. "Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation". *Dev. Comp. Immunol.* 27:539– 554.
- Suñol, C., Z. Babot, *et al.* 2008. "Studies with neuronal cells: From basic studies of mechanism of neurotoxicity to the prediction of chemical toxicity". *Toxicol In Vitro.* 22(5):1350-1355.
- Tejeda-Vera, R., E. Lopez-Lopez, *et al.* 2007. "Biomarkers and bioindicators of the health condition of *Ameioba splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameioba River, Mexico". *Environ. Int.* 33(4):521-531.
- Télez-Bañuelos, M. C., A. Santerre, *et al.* 2009. "Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentrations of endosulfán". *Fish Shellfish Immunol.* 27(2):105-111.
- Télez-Bañuelos, M. C., A. Santerre, *et al.* 2010. "Endosulfán increases seric interleukin-2 like (IL-2L) factor and immunoglobulin M (IgM) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Challenged with *Aeromonas hydrophila*". *Fish Shellfish Immunol.* 28(2):401-405.
- Télez-Bañuelos, M. C., *et al.* 2011. "Effects of low concentration of endosulfán on proliferation, ERK1/2 pathway, apoptosis and senescence in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) splenocytes". *Fish Shellfish Immunol.* 31(6):1291-1296.
- Thierfelder, W. E., Van Deursen, J. M., Yamamoto, K., Tripp, R. A., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Sangster, M. Y., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G. C., Ihle, J. N. 1996. "Requirement for Stat4 in interleukin-12 mediated responses of natural killer and T cells". *Nature.* 382(6587):171-4.
- Tizard, I. 2000. "the phylogeny of the immune system". *Veterinary Immunology an Introduction.* 467-469.
- Trapani, J. A. 2001. "Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases". *Genome Biol.* 2:3014.1-3014.7.
- Tryphonas, H., G. Bondy, *et al.* (2003). "Effects of cis-nonachlor, trans-nonachlor and chlordane on the immune system of Sprague-Dawley rats following a 28-day oral (gavage) treatment." *Food Chem. Toxicol.* 41(1): 107-18.
- Tsutsui, H., Nakanishi, K., Natsui, K., Higashino, K., Okamura, H., Miyazawa, Y. & Kaneda, K. 1996. "IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity

or murine natural killer cell clones". *J. Immunol.* 157:3967-3973.

- UNEP. 2007. "Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente Propuesta sobre el endosulfán UNEP/POPS/POPRC.3/5 Examen de un producto químico, endosulfán, recientemente propuesto para su inclusión en los anexos A, B o C del Convenio Ginebra, 19 a 23 de noviembre de 2007. <http://chm.pops.int/default.aspx>
- UNEP. 2009 a. "Endosulfán. Risk Profile. Adopted by the persistent Organic Pollutants
- UNEP, 2009 b. "Endosulfán. Supporting document for the draft risk profile on endosulfán". Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. UNEP/POPS/POPRC.5/INF/9. Disponible en: <http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/hrPOPRCMeetings/POPRC5/POPRC5Documents/tabid/592/language/fr-CH/Default.aspx>
- UNEP. 2010. UNEP/POPS/POPRC.6/12 "Adverse effects of endosulfán on human health. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. <http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/POPRCMeetings/POPRC6/POPRC6Documents/tabid/783/language/en-US/Default.aspx>
- Vandekerckhove, J., Weber, K. 1984. "Chordate muscle actin differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins". *J. Mol. Biol.* 179:391-413.
- Venkatesh, B., Tay, B.H., Elgar, G., Brenner, S. 1996. "Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes". *J. Mol. Biol.* 259: 655-665.
- Verburg-Van-Kemenade, B. M. L., F. A. A. Weyts, R. Debets & G. Flink. 2002. "Carp macrophages and neutrophilic granulocytes secrete an interleukin 1-like factor". *Dev. Com. Immunol.* 19:59-70.
- Vidal Gomez, J. 2006. "Psiconeuroinmunología". Universitat de Barcelona. España. Pag. 81.
- Volanakis, E., X. Yuanyuan & K. J. Macon. 2004. "Defense molecules". Wiley-Liss. New York.
- Volpato, G. I. and R. E. Barreto. 2001. "Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia". *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34(8):1041-1045.
- Wade, M. G., W. G. Foster, *et al.* 2002. "Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects". *Toxicol. Sci.* 67(1):131-43.
- Wang, X. F., S. Li, *et al.* 2006. "Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease". *Neurobiol. Dis.* 23(1):198-205.
- Ware, G. W. A. W., D. M. 2004. "The pesticide book". 6°. University of Minnesota, MeisterPro Information Resources.
- Watts, M., B. L. Munday, *et al.* 2001. "Immune responses of teleost fish". *Aust. Vet. J.* 79(8):570-574.

- Watts, M. 2011. "Endosulfán and Carcinogenicity: a Summary of Evidence". Senior Science Advisor Pesticide Action Network (PAN) Asia and the Pacific. Disponible en: www.ine.gob.mx.
- Wellman, A., Krenacs, L., Fest, T., Scherf, U., Pastan, I., Raffeld, M. *et al.* 1997. "Localization of the cell proliferation and apoptosis-associated CAS protein in lymphoid neoplasm". *American J. Phat.* 150:25-30.
- Weiderpass, E., H. O. Adami, *et al.* 2000. "Organochlorines and endometrial cancer risk". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(5)487-493.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C. & Smith, C. A. 1995. "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis". *Immunity.* 3:673-682.
- Wolke, R. E. 2002. "Phatology of bacterial and fungal diseases affecting fish". *Phatology of fishes.* 33-37.
- Zaitseva, G., Santerre, L., Casas, S. J., Peregrina, S. J., Leon, S. R. 2006. "TILAPIA. Aspectos biológicos y productivos". México. Universidad de Guadalajara.
- Zapata, P. O. 2006. "Evaluación ecotoxicológica en peces de diferentes ecosistemas costeros del sur del Golfo de México". Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Unidad Mérida. Disponible en: http://www.ine.gob.mx/descargas/sqre/fc2_9_omar_zapata.pdf