

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS



“Estudio *in vitro* del efecto de plaguicida endosulfán sobre proliferación en linfocitos de sangre periférica humana”

**TRABAJO DE TITULACIÓN
EN LA MODALIDAD DE
TESIS PARA OBTENER EL
TÍTULO DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA**

P R E S E N T A

JAIME GÓMEZ VILLELA

ZAPOPAN, JAL., JULIO, 2015

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



“Estudio *in vitro* del efecto de plaguicida endosulfán sobre proliferación en linfocitos de sangre periférica humana”

Tesis para obtener el título de licenciado en Biología

Presenta

Jaime Gómez Villela

Director de Tesis

Dr. Jesse Haramati

Asesores de Tesis

Dra. Galina Petrovna Zaitseva

Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. JAIME GÓMEZ VILLELA
PRESENTE

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: **"Estudio in vitro del efecto de plaguicida endosulfán sobre proliferación en linfocitos de sangre periférica humana."**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo: **Dr. Jesse Haramati** y como asesores a: **Dra. Galina Petrovna Zaitseva** y a **Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos**

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

ATENTAMENTE

"PIENSA Y TRABAJA"

"Año del Centenario de la Escuela Preparatoria de Jalisco"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 20 de noviembre de 2014


DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COMITE DE
TITULACION



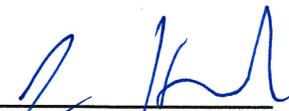

DRA. CLAUDIA AURORA URIBE MÚ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

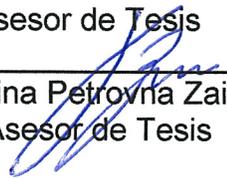
Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis, opción 1 con el título: **“Estudio *in vitro* del efecto de plaguicida endosulfán sobre proliferación en linfocitos de sangre periférica humana** “que realizó el/la pasante Gómez Villela Jaime con número de código 208449562 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
 Las Agujas, Zapopan, Jal., Julio del 2015.


 Dr. Jesse Haramati
 Director de Tesis


 Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos
 Asesor de Tesis

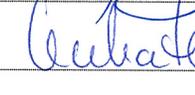
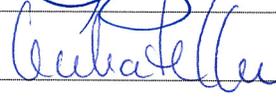

 Dra. Galina Petrovna Zaitseva
 Asesor de Tesis

COMITE DE
 TITULACION





09/07/15

| Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación | Firma de aprobado | Fecha de aprobación |
|--|--|---------------------|
| Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez |  | 8 Jul 2015 |
| Dra. Josefina Casas Solís |  | 8/Julio/2015 |
| M.C. Rosa María Domínguez Arias |  | 8/Julio/2015 |
| Supl. Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos |  | 7 julio 2015 |

Dedicatoria

A mi madre, que día a día me apoya para que todo mi trabajo y esfuerzo se vea reflejado en mi vida.

A mi padre, que siempre me apoya tanto emocionalmente como económicamente.

A mis hermanas Elizabeth y Fernanda, quienes siempre me brindan sus palabras de aliento y quienes me apoyan incondicionalmente.

A la pequeña Aiko que siempre me hace sonreír y me motiva a seguir adelante.

A mis amigos quienes día a día me motivan a seguir creciendo en la investigación.

Al lector...

Agradecimientos

Al Dr. Jesse Haramati por haber sido una persona que no solo me brindo sus conocimientos, sino que me ayudó a llevar a cabo este trabajo en todo momento. Por haber tenido una infinita paciencia, compromiso y guiarme cuando no encontraba una solución, además de siempre brindarme más de lo que yo esperaba saber.

Doctor, usted se ganó mi admiración, respeto y confianza, sin usted no hubiera podido llevar a cabo esta tesis. Me enseñó que con humildad, paciencia y una excelente actitud los trabajos que se tengan, podrán salir adelante. ¡Muchas gracias!

A la Dra. Galina Petrovna Zaitseva por haber creído en mí, y darme la oportunidad de estar en algunos de sus proyectos. Por darme consejos útiles para mi formación como biólogo y siempre tener una buena disposición para apoyarme.

Al Dr. Edgardo Flores Torales por haberme apoyado en este proyecto y brindarme su tiempo para enseñarme a realizar cultivo celular.

A la Dra. Martha Cecilia Téllez Bañuelos por su disposición, actitud y ayuda para poder llevar a cabo esta tesis.

Gracias Dra. Claudia Aurora Uribe Mú y Dr. Alejandro Muñoz Urías, por siempre motivarme en mi carrera, su amabilidad, tiempo, consejos y apoyarme como estudiante.

A mis maestros de esta hermosa carrera, por haberme dado las herramientas para poder seguir adelante en la investigación.

A mi madre, por acompañarme de inicio a fin en esta tesis. ¡Gracias!

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS..... | 5 |
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS..... | 7 |
| RESUMEN..... | 8 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 9 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 10 |
| 2.1 Plaguicidas y su clasificación..... | 10 |
| 2.1.2 Plaguicidas en México..... | 11 |
| 2.2 Endosulfán..... | 12 |
| 2.2.2 Propiedades físicas y químicas del endosulfán..... | 14 |
| 2.2.3 Mecanismo de acción del endosulfán..... | 15 |
| 2.2.4 Persistencia..... | 17 |
| 2.2.5 Endosulfán y salud humana..... | 17 |
| 2.2.6 Endosulfán y respuesta inmune..... | 19 |
| 2.3 Modelo experimental..... | 20 |
| 2.3.1 Sangre periférica humana (<i>Homo sapiens</i>)..... | 21 |
| 2.4 Respuesta de proliferación linfocitaria con presencia de mitógenos..... | 22 |
| 2.5 Dimorfismo sexual de la respuesta inmune..... | 23 |
| 2.6 Protocolo de linfoproliferación con WST-1..... | 25 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 26 |
| 4. HIPÓTESIS..... | 26 |
| 5. OBJETIVOS..... | 26 |
| 5.1 Objetivo general..... | 26 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 26 |

| | |
|--|----|
| 6. DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 27 |
| 7. METODOLOGÍA..... | 28 |
| 7.1.1 Tipo de estudio..... | 28 |
| 7.1.2 Universo de estudio..... | 28 |
| 7.2 Cultivo celular..... | 28 |
| 7.2.1 Extracción de PBMC..... | 28 |
| 7.2.2 Conteo y viabilidad celular..... | 30 |
| 7.3 Preparación de endosulfán..... | 30 |
| 7.4 Ensayo de linfoproliferación..... | 31 |
| 7.5 Análisis Estadístico..... | 31 |
| 8. RESULTADOS..... | 32 |
| 8.1 Linforproliferación celular..... | 32 |
| 8.2 Efecto inhibitorio endosulfán 17µM..... | 33 |
| 8.3 Efecto linfoproliferativo endosulfán 0.1 µM..... | 35 |
| 8.4 Efecto de endosulfán 17µM en presencia de PHA..... | 36 |
| 9. DISCUSIÓN..... | 38 |
| 10. CONCLUSIONES..... | 41 |
| 11. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA..... | 42 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructuras químicas ciclodienos clorados..... | 13 |
| Figura 2. Estructura química del endosulfán y sus isómeros..... | 15 |
| Figura 3. Receptor a GABA..... | 16 |
| Figura 4. Componentes de la sangre..... | 21 |
| Figura 5. Mecanismo de acción de WST-1..... | 25 |
| Figura 6. Distribución de los componentes sanguíneos antes y después de centrifugar con exposición de líquido de densidad..... | 29 |
| Figura 7. Separación de los componentes sanguíneos indicando la presencia de anillo celular..... | 29 |
| Figura 8. Distribución de la sangre en diferentes gradientes de densidad..... | 30 |
| Figura 9. Efecto de dosis/respuesta del endosulfán. | 32 |
| Figura 10. Efecto inhibitorio del endosulfán en concentración de 17µM..... | 34 |
| Figura 11. Efecto de la linfoproliferación en concentración 0.1µM de endosulfán | 36 |

| | |
|--|----|
| Figura 12. Efectos de endosulfán sobre proliferación inducido por PHA..... | 37 |
|--|----|

TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Pesticidas prohibidos en México..... | 11 |
| Tabla 2. Plaguicidas con restricción en México..... | 12 |
| Tabla 3. Plaguicidas prohibidos en otros países y vigentes en México..... | 12 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|---------------------|--|
| bw | Peso corporal (Body weight) |
| μL | Microlitros |
| μM | Micromolar |
| AIM-V | Medio de cultivo (Alstroemeria-Mosaic Virus) |
| CAS | Susceptibilidad celular de apoptosis |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| g | Gramos |
| GABA | Ácido gamma amino butírico |
| INEGI | Instituto Nacional de estadística, geografía e informática |
| Log Koc | Coefficiente de estimación coeficiente absorción |
| Log K _{ow} | Coefficiente de reparto octanol-agua |
| M | Molar |
| mL | Mililitros |
| mol | Unidad de cantidad de una sustancia |
| nm | Nanómetro |
| PBMC | Célula mononuclear de sangre periférica humana |
| PBS | Buffer (amortiguador) fosfato salino |
| pH | Potencial hidrógeno |
| PHA | Fitohemaglutinina |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RPMI | Medio de cultivo (Roswell Park Memorial Institute) |
| SFB | Suero fetal bovino |
| α | Alfa |
| β | Beta |

RESUMEN

ANTECEDENTES. Diversos estudios se han llevado a cabo en diferentes modelos experimentales *in vivo* como el de tilapia (*Oreochromis niloticus*), linfoma en ratón (*Mus musculus*) o *in vitro* con esplenocitos de tilapia y en queratinocitos humanos (HaCaT), los cuales demostraron que el uso de plaguicidas provoca alteraciones en la respuesta inmune. El endosulfán es un plaguicida organoclorado el cual ha sido altamente restringido en al menos 73 países tales como Argentina, Brasil, Canadá, Noruega, Holanda y la Gran Bretaña entre otros, por su persistencia y potencial de transporte a larga distancia en el ambiente, pero que aún se utiliza en México. **OBJETIVO.** Evaluar el efecto de endosulfán *in vitro* sobre proliferación de linfocitos humanos de sangre periférica expuesta a diferentes concentraciones de endosulfán con y sin mitógeno, así como realizar una evaluación de dimorfismo sexual en presencia de este tóxico. **MÉTODOS.** Se trabajó con células mononucleares de sangre periférica humana separadas por gradiente de densidad, posteriormente cultivadas en concentraciones de 10^5 células/mL expuestas a diferentes concentraciones de endosulfán (de 0.1 a 25 μ M) y mitógeno PHA. Se empleó espectrofotometría con el uso del kit WST-1 para evaluar los efectos del pesticida en la proliferación celular. **RESULTADOS.** Endosulfán en una baja concentración (0.1 μ M) tiene tendencia al incremento de linfoproliferación en exposición de cultivos a 24h y provoca un aumento en la capacidad blastogénica linfocitaria frente a mitógeno PHA comparando con la proliferación de las células estimuladas solo con PHA y no tratadas previamente con endosulfán; en concentración 17 μ M produce un efecto inhibitorio temprano en hombre respecto a mujer. **CONCLUSIONES.** 0.1 μ M *per se* potencializa la proliferación y significativamente incrementa los efectos del mitógeno PHA. En la concentración de 17 μ M o mayores disminuye significativamente la proliferación celular. En los hombres los linfocitos se ven significativamente más afectados en periodo corto (24h), sin embargo en periodos más largos de exposición la alteración de la proliferación es igual para ambos géneros.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial desde inicios del siglo XIX el uso de plaguicidas sintéticos ha ido en aumento debido al desarrollo de la industria petrolera. El uso de estas sustancias provoca contaminación y alteraciones en la hidrósfera, suelos y seres vivos. Los plaguicidas son sustancias o mezcla de sustancias que se usan de manera intensiva para controlar plagas agrícolas e insectos vectores de enfermedades en humanos y en los animales, así como, para el control de insectos y ácaros que afectan la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y alimento para animales. Sin embargo, se reconoce que son sustancias químicamente complejas, que una vez aplicadas en el ambiente, están sujetas a una serie de transformaciones a nivel físico, químico y biológico (fenómenos de adsorción y absorción sobre suelos y plantas, volatilización, fotólisis y degradación química o microbiana). Además que también pueden ser arrastrados por las corrientes de aire y agua que permiten su transporte a grandes distancias; hay que añadir que los residuos volátiles pasan a la atmósfera y regresan con la lluvia a otros lugares. Estas transformaciones pueden conducir a la generación de fracciones o a la degradación total de los compuestos que en sus diversas formas pueden llegar a afectar en los diferentes niveles de un ecosistema incluyendo al hombre (Galán-Huertos, 2003).

Los plaguicidas llegaron a México desde finales del siglo XIX con gran variedad de estos productos, tales como compuestos de arseniato de plomo y caldo de Bordelés hasta plaguicidas sintéticos de gran diversidad de ellos con la introducción del dithiothreitol (DTT) y otros plaguicidas organoclorados, que poseen una toxicidad persistente en los suelos y repercusiones en la salud humana como daños neurotóxicos, teratogénicos y cancerígenos (Sánchez y Sánchez, 1984). En México se usa el 60% de los 22 plaguicidas conocidos como perjudiciales para la salud y el medio ambiente, de ellos el 42% se fabrican en el país, de 90 plaguicidas que han sido prohibidos o restringidos en los Estados Unidos, 30 se usan en México, incluyendo endosulfán (INEGI, 1992).

2. ANTECEDENTES

2.1. Plaguicidas y su clasificación

A medida que crece la población mundial también aumenta la necesidad de mantener la producción de alimentos y la capacidad de mantener los suelos fértiles. La obtención de alimentos requiere del uso de plaguicidas para alcanzar el equilibrio entre las plantas de cultivo y sus competidores. Estos compuestos químicos llegan al suelo y a los alimentos de manera directa o indirecta originando problemas de contaminación (Sánchez y Sánchez, 1984).

La utilización de plaguicidas es muy antigua ya que los sumerios utilizaron azufre para poder combatir plagas agrícolas, los chinos usaron compuestos derivados de plantas y para el siglo XVII se introdujeron productos tales como el caldo de Bordelés que era una mezcla de sulfato de cobre más cal hidratada para la eliminación de algunas especies de hongos (Masía y Moltoni, 2012).

Dentro de los plaguicidas orgánicos más importantes existen los siguientes:

Derivados Halógenos: Los cuales son compuestos orgánicos que contienen generalmente átomos de cloro (Cl) en su molécula, y poseen una alta toxicidad en los insectos. Dentro de este grupo podemos encontrar tres grupos de los cuales se distinguen:

- a) Derivados halógenos de hidrocarburos alifáticos que son utilizados principalmente como fumigantes: *metilbromuro, 1, 2-diciclopropano, etc.*
- b) Derivados halogenados de hidrocarburos aliacíclicos con importancia práctica como insecticidas y fungicidas: *HCH, toxafenol, clordano, heptacloro, aldrín, dialdrín, endrín, etc.*
- c) Derivados halogenados aromáticos: Tienen propiedades insecticidas, acaricidas, herbicidas y fungicidas dependiendo de la naturaleza del átomo de halógeno, del número de ellos en la molécula de benceno y su posición del anillo: *DTT, DDD, metoxiclor, hexaclorobenceno, etc.* (Sánchez y Sánchez, 1984).

Organoclorados: Moléculas orgánicas cloradas con alto peso molecular de estructura cíclica, que su mecanismo de acción consiste en inhibir los canales de cloro (Henaó, 1986).

Organofosforados: Constituidos de ésteres de ácido fosfórico, en general altamente tóxicos con un precedente en los gases de guerra, a menudo conocidos bajo el apelativo de ‘gases nerviosos’, entre los que se encuentran el *sarin*, *tabun* y *soman*, y que se desarrollaron de manera especial a partir de la Segunda Guerra Mundial (Obiols, 1999).

Carbamatos: Estos compuestos tienen una estructura química basada en el ácido carbámico, con una serie de radicales que le dan la acción anticolinesterásica, en el caso de añadir un radical bencénico al éter de oxígeno o bien un hidrógeno o un radical metomilo al átomo de nitrógeno dando lugar a los metil y dimetilcarbamatos. Los ditiocarbamatos tienen actividad antifúngica y herbicida, con poco efecto anticolinesterásico (Córdoba *et al.*, 2001).

Piretroides: Piretro es una mezcla de sustancias químicas que ocurre naturalmente en ciertas flores de crisantemos. Las propiedades insecticidas del piretro se descubrieron en Asia alrededor de los años 1800s y se usó para matar garrapatas y varios tipos de insectos, tales como pulgas y mosquitos (ATSDR, 2003).

2.1.2 Plaguicidas en México

México es un país en el cual existe una amplia variedad de pesticidas utilizados en el campo, algunos han sido prohibidos gracias a su amplia gama de toxicidad y persistencia en suelos y aguas (Tabla 1).

| Pesticidas prohibidos en México | | | |
|---------------------------------|-----------|-------------------------------|-----------|
| Acetato o propionato de fenil | DBCP | Fluoroacetato de sodio (1080) | Schradan |
| Mercurio | Dialifor | Fumisel | Formotion |
| Acido 2,4,5-T | Dieldrina | Mirex/Monuron | Triamifos |
| Aldrina | Dinoseb | Nitrofen | Erbon |
| Cianofos | Endrina | Kepone/Clordecone | Cloranil |

Tabla 1. Pesticidas prohibidos en México **Fuente:** Diario Oficial de la Federación del 3 de enero de 1991.

Existen algunos otros plaguicidas los cuales aún se permite su comercialización, sin embargo su uso ha sido restringido en el catálogo oficial de plaguicidas (Tabla 2).

| Plaguicidas Restringidos | |
|--------------------------|-----------------|
| DDT | Metoxicloro |
| BHC | Mevinfos |
| Aldicarb | Paraquat |
| Dicofol | Pentaclorofenol |
| Forato | Quintozeno |
| Lindano | |

Tabla 2. Plaguicidas con restricción en México. **Fuente:** Diario Oficial de la Federación el 19 de agosto de 1991.

Finalmente debemos considerar que existen algunos pesticidas que en otros países han sido severamente prohibidos y en nuestro país aún están en uso.

| | | | |
|------------------|--------------|--------------------------|-------------|
| Alaclor* | Metidati6n | Paraquat* | Fosfamid6n |
| Aldicarb* | Metamidofos* | Parati6n Metilico | Kadetrina |
| Azinfos Metilico | Metoxicloro* | Pentaclorofenol | Linuron |
| Captafol | Mevinfos* | Quintoceno* | Maneb |
| Carbarilo | Monocrotofos | Sulprofos | Triazofos |
| Captan | Ometoato | Diur6n | Tridemorf |
| Clordano | Oxyfluorfen | <u>Endosulf6n</u> | Vamidothion |
| DDT | Dicofol* | Forato* | 2,4-D |

Tabla 3. Plaguicidas prohibidos en otros pa6ses y vigentes en M6xico. **Fuente:** Bolet6n de la Red de Acci6n sobre Plaguicidas y Alternativas en M6xico (RAPAM, 1998).

2.2 Endosulf6n

El endosulf6n ($C_9H_6Cl_6O_3S$) es un plaguicida organoclorado del grupo de los ciclodienos (Fig.1). Se introdujo en el medio agr6cola en el a6o de 1956 y emergi6 como uno de los

productos químicos usados para controlar una amplia variedad de insectos en la agricultura (Ware *et al.*, 2004). El uso de endosulfán está severamente restringido en Argentina, Brasil, Canadá, Holanda, Noruega y Gran Bretaña por sus efectos adversos al ambiente y para la salud de los organismos (Nivia, 1993)

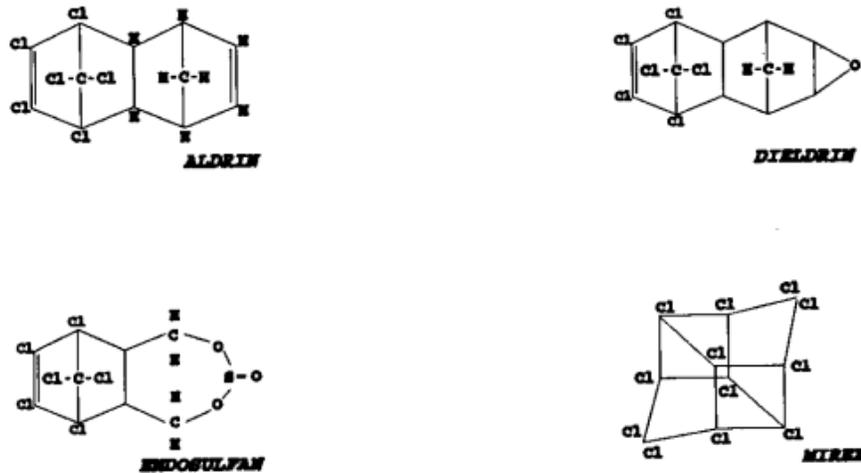


Figura 1. Estructuras químicas ciclodienos clorados. **Fuente:** (Henaó, 1986).

El endosulfán controla plagas de insectos de los órdenes: Lepidóptera (mariposas, polillas), Coleóptera (escarabajos), Heteróptera (chinches), Homóptera (cochinillas) y Thysanóptera (piojos de plantas o trips) que atacan cultivos de cítricos, oleaginosos y verduras. También se aplica en plantas ornamentales y, en el pasado, con uso industrial y doméstico como conservador de madera. Tiene la propiedad de desplazarse a largas distancias del sitio aplicado por su fácil y rápida evaporación. Este insecticida se considera persistente en medio ambiente, con una vida media de 28 a 391 días en suelo y de 18 a 21 días en agua (Siddiqui *et al.*, 2005).

La síntesis industrial y el uso de organoclorados genera subproductos persistentes en el medio ambiente, por ser altamente liposolubles sufren procesos de biomagnificación a través de las cadenas tróficas. Hay un creciente movimiento internacional para la eliminación y producción de estos compuestos. En particular los fabricantes de endosulfán sostienen que al ser un éster del ácido sulfuroso difiere de otros insecticidas organoclorados ciclodienos y

que puede ser considerado por separado y no tan dañino, esto lo tiene de forma indefinida en el mercado, sin embargo los síntomas agudos que produce en animales de laboratorio y en humanos no se distinguen de los causados por otros compuestos organoclorados ciclodienos como el DDT, Toxafeno y hexaclorobenceno (Hayes, W. y Laws, E. 1991).

2.2.2 Propiedades físicas y químicas del endosulfán

La masa molecular del endosulfán es de 406.95 g/mol y su solubilidad en agua es de 1.4mg/L. El isómero α (Fig. 2) posee un punto de fusión de 109°C y constituye un 70% de la mezcla pura mientras que el isómero β tiene un punto de fusión de 213°C y constituye el 30% de la mezcla. El producto técnico del endosulfán contiene un 90-95% de la mezcla pura, su presentación es un sólido cristalino de color pardo con olor a dióxido de sulfuro y se funde a una temperatura de 70- 100 °C. Es estable a la luz solar y se hidroliza lentamente en agua con ácido y rápidamente por bases alcohólicas y SO₂. La descomposición es catalizada por el hierro que se corroe. El endosulfán es moderadamente soluble en la mayoría de los solventes orgánicos, pero altamente insoluble en agua. La presión de vapor del endosulfán en presentación comercial es de 9×10^{-3} mm Hg, y su densidad es de 1.745. (Hayes W. y Laws E., 1991).

Ambos isómeros de endosulfán se someten a la fotólisis con la exposición de la luz solar y su vida media es alrededor de los 7 días. El endosulfán diol es el producto de la fotólisis primaria; posteriormente es degradado a endosulfán α -hidroxi éter. En agua, el endosulfán se somete a hidrólisis endosulfán-diol. La velocidad de hidrólisis está influenciada por el pH. La degradación oxidativa también se produce a pH 7, las vidas medias para hidrólisis y oxidación fueron de 22 y 25 días respectivamente; a pH 5 las vidas medias eran de 54 y 51 días respectivamente (ATSDR, 2000a).

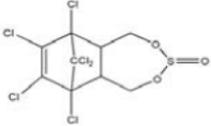
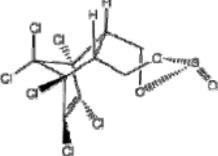
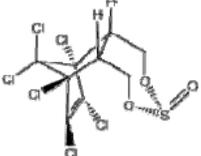
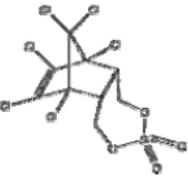
| Nombre común | Endosulfán | Endosulfán I (alfa) | Endosulfán II (beta) | Sulfato de endosulfán |
|---------------------|---|---|--|---|
| Fórmula química | C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S | | | C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₄ S |
| Número CAS | 115-29-7 | 959-98-8 | 33213-65-9 | 1031-07-8 |
| Estructura |  |  |  |  |
| Log K _{ow} | 3.55 a 3.62 | 3.83 | 3.52 | 3.66 |
| Log K _{oc} | 3.5 | 3.55 | -- | -- |

Figura 2. Estructura química del endosulfán y sus isómeros. **Fuente:** (ATSDR, 2000a).

2.2.3 Mecanismo de acción del endosulfán

El endosulfán se une al sitio de reconocimiento de la picrotoxina (PTX) ubicado en el canal de Cl⁻ acoplado al receptor de GABA A (Figura 3) en las neuronas, lo que determina una disrupción del flujo de Cl⁻ dependiente de GABA, bloquea el paso del anión a través del canal iónico asociado a este receptor lo que lleva a una hiperexcitación neuronal. La acción de los plaguicidas en los insectos es justamente causar hiperexcitabilidad del sistema nervioso central (SNC) hasta la muerte. Los linfocitos, macrófagos y células citotóxicas no específicas (NCC) que son consideradas precursoras evolutivas de las células NK (Jaso-Friedmann *et al.*, 2001), poseen canales Cl⁻ acoplados al receptor de GABA (Praveen *et al.*, 2006). Además se ha reportado en macrófagos peritoneales de ratón la participación del sistema GABA-érgico en la síntesis de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-12) (Reyes-García *et al.*, 2007). Se tiene evidencia que el endosulfán altera parámetros funcionales y estructurales en células inmunocompetentes *e.g.* en linfocitos T de *Rana pipiens* canadiense una exposición de 21 días a una mezcla de plaguicidas donde se incluye el endosulfán- con dosis 0,1, 10 y 100X, se observó una disminución significativa en la proliferación (Christin *et al.*, 2004) y en linfocitos de riñón anterior de peces dulceacuícolas australianos con diferente peso corporal expuestos

a 10 mg/L, el endosulfán induce una polaridad en el conteo de linfocitos que va desde una inmunosupresión hasta la inmunoestimulación (Harford *et al.*, 2005).

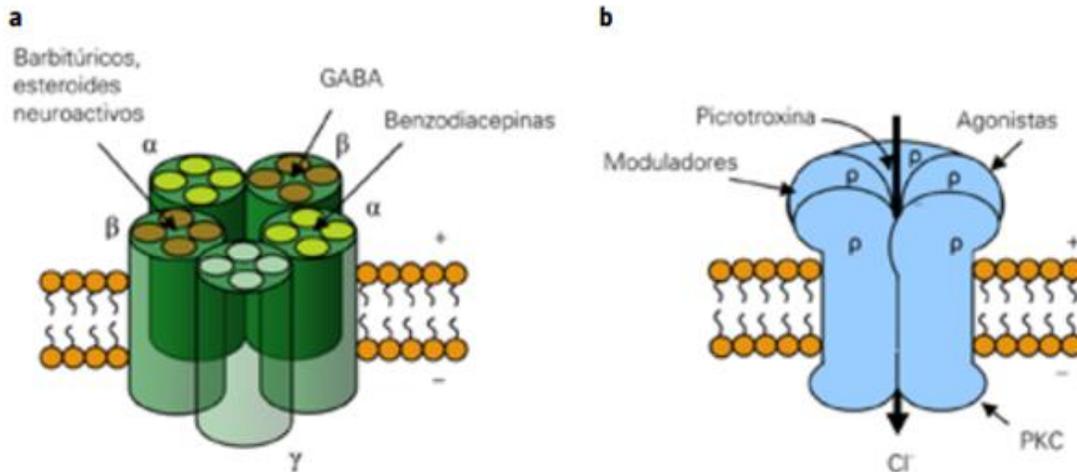


Figura 3. Receptor GABA. **Fuente:** (Celso, 2011)

El endosulfán se metaboliza pobremente y la mayoría se convierte a endosulfán sulfato. Se encontró en tres especies de peces de pez gato que el hígado era el órgano principal de almacenamiento y degradación del endosulfán. El endosulfán sulfato fue el principal metabolito intermediario y los productos de detoxificación fueron endosulfán-alcohol y endosulfán-éter (García-Camero y Soler Rodríguez, 2005). En ratas se ha reportado que el endosulfán activa las enzimas hepáticas aminopirina-n-demetilasa (81%) y anilina hidroxilasa (59%) (Srikanth *et al.*, 1990).

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, 2009).

Uno más de los efectos en organismos no blanco es el que sugiere Lemaire *et al.*, 2006 quienes muestran que en concentraciones de 10 μ M del pesticida activa el receptor α -estrógeno en células HELN (células derivadas de la línea celular HeLa), lo que promueve la proliferación.

Téllez Bañuelos *et al.*, 2010 mencionan que el endosulfán es un xenoestrógeno que modifica señalizaciones celulares claves (sostenida fosforilación de pERK1/2, efecto antiapoptótico e inducción de senescencia), así también que este incrementa la IL-2 e IgM en tilapia nilótica juvenil.

2.2.4 Persistencia

Sobre la base de estudios de laboratorio, que mostraron valores de DT50 < 30 días, no se prevé que el endosulfán alfa y beta tengan persistencia en el suelo. No obstante, estudios sobre el terreno mostraron valores de DT50 en el suelo de 3 a 8 meses para el endosulfán de calidad técnica y el sulfato de endosulfán (Pesticide Manual, 2003) y 900 días para el endosulfán beta (IPCS, 1984; C.E., 2005). La vida media estimada para la combinación de residuos tóxicos (endosulfán más sulfato de endosulfán) fluctuaron entre alrededor de 9 meses y 6 años. No se prevé la persistencia del endosulfán en el agua, excepto en condiciones de acidez, en las que las semividas pueden alcanzar > 200 días (EPA, 2002).

2.2.5 Endosulfán y la salud humana

La toxicidad oral aguda del endosulfán es elevada y la OMS lo ha clasificado como “moderadamente peligroso”. El examen del uso del endosulfán en el algodón en Australia y los Estados Unidos en proporciones de aplicación comparables a las utilizadas en el Sahel llevó a adoptar medidas estrictas para reducir la exposición ocupacional a niveles aceptables

en aquellos países. En Australia, sólo las personas autorizadas con una licencia de aplicador de plaguicidas pueden suministrar productos que contengan endosulfán. Dichas personas deben utilizar equipo protector personal (PPE) completo, que comprende overoles en el cuello y las muñecas, y también guantes largos de PVC en el momento de llenar el pulverizador y un respirador con una máscara completa para la cara. En los Estados Unidos, los aplicadores deben llevar overoles sobre pantalones y camisas de manga larga y, también, calzado y guantes resistentes a los productos químicos y un respirador. Se han puesto en práctica medidas de ingeniería suplementarias para reducir la exposición durante la mezcla y la carga del producto químico.

Los síntomas clínicos por intoxicación por endosulfán incluyen: vómitos, agitación, convulsiones, cianosis, disnea, espuma en la boca y respiración ruidosa. Existe evidencia en ratas que el endosulfán se absorbe rápidamente entre (60 y 87%), en el tracto gastrointestinal, del cual 60% se acumula dentro de las 24 horas. También se produce asimilación a través de la piel, de manera lenta pero casi completa, según lo descrito. La distribución es rápida y en ratas los niveles pico en sangre ocurren a las 7 y > 18 horas, para machos y hembras respectivamente. El metabolismo se produce en el hígado y los riñones, y entre los metabolitos se encuentran: sulfato de endosulfán, endosulfán-diol, endosulfán-éter, endosulfán-hidroxi-éter, endosulfán- lactona y conjugados no específicos de estos metabolitos. El metabolismo es amplio y sólo entre el 15 y el 18% se mantiene sin cambios en las heces. El pesticida no se acumula de manera importante en la grasa o en otros tejidos: en ratas, con dosis durante 7 días, el 3.7 y el 4.7% permaneció en órganos y tejidos (machos y hembras, respectivamente); en ratas, el 1.5% se acumula en los riñones y el hígado después de una dosis única; en ratones, el 0.4% duró después de 24 días y se detectaron pequeñas cantidades después de 35 días. Pareciera que el insecticida persiste preferentemente en el hígado y los riñones. La LD50 de endosulfán varía ampliamente según la vía de administración, la especie, el vehículo y el sexo del animal. El pesticida, administrado por cualquier vía, es más tóxico en ratas hembra que en la rata macho y, sobre la base de un solo estudio, esta diferencia entre los sexos también se manifiesta en los ratones. Una batería de exámenes realizados para medir la toxicidad aguda en varias especies mostró que el

compuesto es muy tóxico después de la administración por vía oral o inhalatoria y que su toxicidad para la piel es baja (C.E., 2005, USEPA, 2002 e IPCS, 1984): valores de LD50 oral en ratas: entre 10 y 35 mg/kg del peso corporal (la cifra más baja corresponde sólo a las hembras).

- **Valores dérmicos de LD50** en ratas: desde 74 mg/kg en hembras a > de 4.000 mg/kg bw en machos,
- **Valor inhalatorio de LC50:** 0,0126 mg/L (12,6 mg/m³) en ratas hembra a 0,5 mg/L (sin especificaciones sobre sexo ni especie) (C.R., 2011).

Sajad *et al.*, (2009) mencionan que la exposición de este pesticida es de 3.02±/ 2.62 ng/mL en sangre periférica en Delhi, India una población expuesta a este plaguicida a niveles basales en alimentos y agua, mientras que Dalvie *et al.*, (2008) mencionan que la concentración de este insecticida es 530 ng/mL en trabajadores del campo en el sur de África y 24h después de la aplicación del endosulfán este se aumenta 60 ±/ 90 µg/mL.

2.2.6 Endosulfán y la respuesta inmune

Téllez-Bañuelos *et al.*, en el 2011 reportaron por primera vez que el endosulfán en concentraciones bajas (7ppb *in vivo* y 7µg/mL *in vitro*) durante corta exposición (96h y 72h respectivamente) induce la proliferación de esplenocitos en tilapia nilótica juvenil (*Oreochromis niloticus*). Esto pudo significar la activación inespecífica de los linfocitos del bazo bajo el efecto del pesticida. Así mismo mencionan que otro mecanismo posible involucrado en la activación de esplenocitos por el contacto *in vivo*, es el incremento de la interleucina 2 (IL-2), la cual induce la proliferación linfocitaria, esto refuerza con la información dada por Téllez-Bañuelos *et al.*, en el 2010. Así mismo se demostró que existe un decremento en cuanto al índice de proliferación bajo los efectos de un mitógeno tal como lo hizo Christin *et al.*, (2004), ellos reportaron estos mismos resultados con los mitógenos PHA y Con A en esplenocitos del anfibio *Rana pipiens* expuesta *in vivo* durante 21 días a contaminantes ambientales incluyendo endosulfán a concentraciones bajas (30 ppb) y Aggrawal *et al.*, (2008), observaron una drástica disminución de proliferación de los

esplenocitos bajo estímulo mitogénico en pollos expuestos *in vivo* pero durante 60 días y a concentraciones altas de 30ppm de endosulfán. Sin embargo, Wade *et al.*, (2002), reportaron la ausencia del efecto de dosis muy bajas de endosulfán (50ng/kg/día) en una mezcla de contaminantes encontrados en tejidos humanos, sobre la capacidad de respuesta proliferativa de los esplenocitos bajo estímulo mitogénico en rata Wistar. Téllez-Bañuelos *et al.*, (2011) sugieren con base en los trabajos de Han *et al.*, (2005) y Reyes-García *et al.*, (2007) que la alteración del flujo de cloro al inhibir su canal iónico asociado a receptores de GABA- A por el endosulfán, como el mecanismo intrínseco de su acción insecticida; lo que lleva a su vez al incremento del calcio intracelular y, como consecuencia, a la activación del factor de transcripción NF- κ B también en las células de la respuesta inmune, lo que aumenta la síntesis de interleucinas, incluyendo a la pro-proliferativa IL-2.

Ledirac *et al.*, (2005) reportan la activación por el endosulfán de la ruta ERK1/2 de MAP-kinasa en cultivo celular, lo que puede inducir la expresión de genes involucrados en procesos de senescencia. Esto puede contribuir a la sobrevivencia de células mutantes y posible efecto cancerogénico, así mismo proteger de apoptosis a los clones autorreactivos de linfocitos, que lleva al desarrollo de las enfermedades autoinmunes, más aun conociendo el efecto estrogénico de endosulfán (PESTICIDE RISKS 2008; Wade *et al.*, 2002).

Rubio-Chávez (2014), mencionó que la exposición crónica por 24 semanas de ratones BALB/C a dosis subletal (2mg/kg) de endosulfán induce a la inflamación severa de colón y aceleración de aparición de elementos preneoplásicos como criptas aberrante (en ratones tratados con el pesticida a las 12 semanas en comparación con 24 semanas del grupo con solo DMH), así como un incremento de niveles séricos de interleucinas pro inflamatorias como IL-6 en 5 semanas y TNF- α en 30 y 41 semanas, así como un aumento de IL-10 en 30 y 41 semanas de post exposición en ambos sexos, lo cual conlleva a linfoma no Hodgkin en 52 semanas de post exposición.

2.3 Sangre periférica humana (*Homo sapiens*)

La sangre es un tejido líquido, al que puede considerarse como una variedad de tejido conectivo, que circula por el aparato cardiovascular gracias al impulso que le proporciona el corazón. Se compone de plasma y células (glóbulos rojos, blancos y plaquetas). Su misión es transportar O_2 , sustancias nutritivas, hormonas y agentes anti infecciosos (anticuerpos) a los tejidos y retirar de ellos el CO_2 y otros productos de desecho y eliminarlos del cuerpo. La distribución casi ubicua de la sangre en el cuerpo y sus singulares características químicas la convierten en eficazísimo sistema de transporte.

Las proteínas plasmáticas ejercen una presión osmótica que influye en el intercambio de líquido entre la sangre y los tejidos. Esas proteínas se combinan también con muchas sustancias, como el hierro, tiroxina y hormonas esteroides para formar complejos transportables que liberan los componentes activos en los puntos adecuados (Keele *et al.*, 1965).

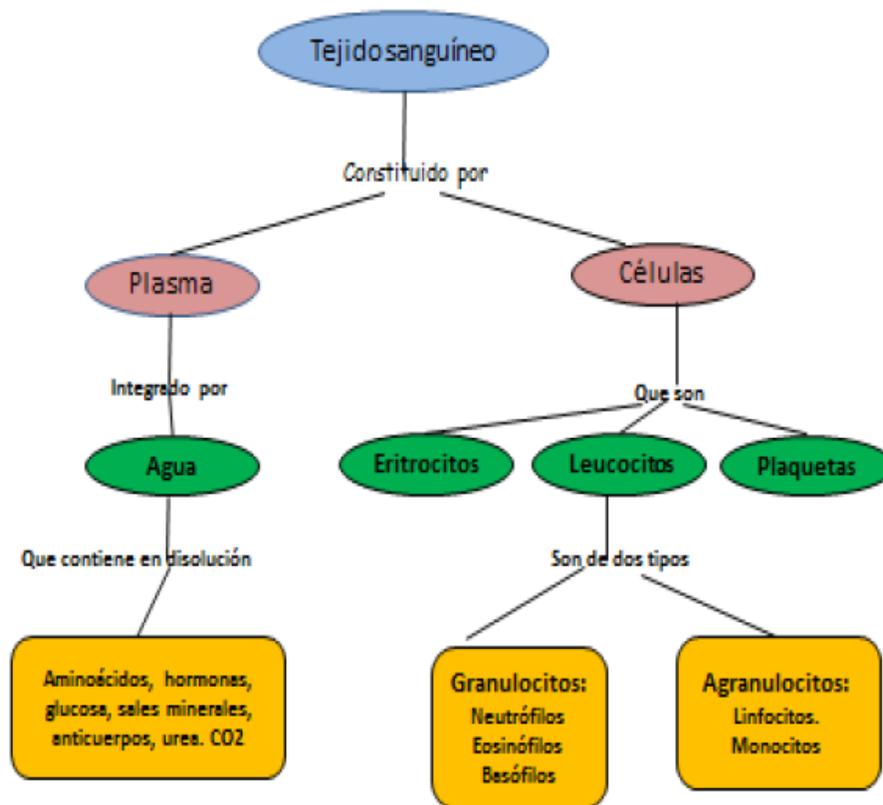


Figura 4. Componentes de la sangre **Fuente:** (Montalvo, 2007.)

Las células sanguíneas se dividen principalmente en tres grupos, los hematíes o eritrocitos (glóbulos rojos), los leucocitos (glóbulos blancos) y las plaquetas.

Los eritrocitos son discos bicóncavos, no nucleados circulares; extraordinariamente elásticos y pueden experimentar una deformación al atravesar capilares estrechos. El diámetro de un eritrocito sano es de 7,3 μ con valores extremos de 5,5-8,8 μ . El número medio de eritrocitos en el varón adulto es de 5,5 millones por mm^3 ; en la mujer es de 4,8 millones. Parece ser que el método de recuento puede arrojar un error de $\pm 15\%$.

Los leucocitos o glóbulos blancos principalmente se dividen en tres grupos: Granulocitos, linfocitos y monocitos.

Los granulocitos (10 a 14 μ), caracterizados por la presencia de gránulos en el citoplasma y por su núcleo lobulado. Se componen de neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares), eosinófilos y basófilos.

Linfocitos (pequeños de 7 a 10 μ ; grandes de 10 a 14 μ), son células redondas, sin gránulos provistas de grandes núcleos redondos que prácticamente llevan sustancia celular (Keele *et al.*, 1965).

Monocitos (10 a 18 μ) es la célula más grande y representan un 5.3% del total de leucocitos circulantes, sus núcleos tienen forma de riñón, se forman en la médula ósea donde permanecen unas 24 horas y después pasan a la sangre, circulando unos 2 días antes de emigrar hacia los tejidos en donde se transforman en macrófagos que tienen la capacidad de fagocitar, como los neutrófilos. También participan en las respuestas inmunológicas, mediante la presentación de antígenos que puedan ser reconocidos por los linfocitos como estimulando la formación de linfocitos. (Infermera virtual, 2013)

2.4 Respuesta de proliferación linfocitaria con mitógenos

Algunas de las moléculas que pueden llegar a producir una activación de respuesta mitótica en los linfocitos son las lectinas, éstas tienden a adherirse a las glicoproteínas de la membrana celular y como resultado se induce a la división celular. Algunas lectinas se suelen

extraer de algunas plantas tales como la fitohemaglutinina (PHA) que se obtiene del *Phaseolus vulgaris*, algunas otras pueden ser la concanavalina A (Con A) y el mitógeno PWM que se obtienen de *Canavalia ensiformis*. La PHA comprende de 5 glicoproteínas tetraméricas (PM= 115 000 ±4130 D), isolectinas formadas por 2 polipéptidos (L=leucocito y E=eritrocito) en combinaciones L4, L3E1, L2E2, L1E3, E4. Las subunidades tipo E (PM= 31 700± 600 D) mayores que las L, son responsables de la eritroaglutinación, pero muestran poca actividad mitogénica o ninguna. Las subunidades L (PM= 29 900 ± 200 D) confieren propiedades leucoaglutinantes a la proteína nativa y tienen la máxima actividad estimulante de la mitosis. (Ruíz *et al.*, 2005)

2.5 Dimorfismo sexual de la respuesta inmune

En la mayoría de las especies cada sexo presenta características bien diferenciadas lo que se denomina como dimorfismo sexual (DS), el cual se refiere a las diferencias que pueden existir ya sea en forma cualitativa o cuantitativa, en estructuras o funciones entre los distintos sexos dentro de los miembros de una misma especie. El sistema inmune de hombre y mujer esta diferenciado fuertemente por la incidencia de enfermedades autoinmunes, las cual está más elevado en mujeres que en hombres. Esto debido a que las mujeres producen una mayor producción de auto-anticuerpos. Típicamente, el sistema inmune en mujeres presenta una respuesta de tipo humoral más fuerte y producen niveles más altos de inmunoglobulinas circulantes. Las citocinas influyen en la producción de inmunoglobulinas las cuales están elevadas en hembras, particularmente, hay una polarización al lado de las citocinas y respuestas Th2 en mujeres y Th1 en hombres. La presencia y actividad de los esteroides sexuales tienen un papel importante en esta polarización. Los estrógenos regulan y reducen las células en sitios de inflamación y aumentan IL-4 e IL-10, y reducen IL-2 e IFN-g. La testosterona puede bajar la respuesta de células B, y niveles TNF, IL-1, e IL-6. (De León-Nava y Morales-Montór, 2006).

El papel de estrógenos no endógenos en la época moderna es notable. La alta incidencia de enfermedades autoinmunes puede ser relacionado con estrógenos ambientales, incluyendo estrógeno no-humano y moléculas o químicos con actividades parecidos a estrógenos o a sus metabolitos. En este grupo hay xenoestrógenos (hormonas aplicadas a animales de producción), fitoestrogenos (de plantas) y estrógenos industriales los cuales incluyen pesticidas, detergentes, y plásticos. Está reportado que la presencia de estrógenos ambientales puede tener efectos en estudios *in vitro* e *in vivo* sobre el sistema inmune: por ejemplo, las células NK están inhibidos por altas concentraciones, y activadas por bajas concentraciones; la proliferación de células PBMC de ratones y la respuesta específica frente antígenos celulares están inhibidas por altas concentraciones de estrógenos ambientales. (Chighizola y Meroni, 2012)

Algunos estudios, (Chambers *et al.*, 2000), sustentan que el sistema neuroendocrino e inmune están íntimamente integrados en un sistema único de regulación homeostático en una compleja organización del metabolismo corporal. Las hormonas son moléculas de comunicación y desarrollo del sistema neuroendocrino. Desde su descubrimiento, estaba clara que los receptores de hormonas esteroides no están solamente expresados en células involucrados con el desarrollo de características sexuales. En el caso de los receptores de estrógenos (un blanco de endosulfán) hay reportes de receptores nucleares en las células de sistema inmune, principalmente T y B (Greene *et al.* 1984 y Stimson. 1988). La presencia de hormonas sexuales en el microambiente tímico y del bazo en ambos sexos durante la diferenciación de linfocitos puede jugar un papel importante para el establecimiento del dimorfismo sexual de la respuesta inmune. Los andrógenos ejercen una influencia considerable sobre el tamaño y la composición del timo, principal órgano linfoide (Olsen *et al.*, 1998). Los linfocitos T después de madurar en el timo salen a poblar los órganos linfoides secundarios, de los cuales el bazo es de mayor importancia en la respuesta inmune. El bazo es la masa de tejido linfático más grande del cuerpo. En los embriones de mamíferos placentarios, el esbozo del bazo aparece como un engrosamiento del mesénquima en el mesenterio dorsal del estómago durante la quinta semana del desarrollo embrionario. Más tarde el tejido parenquimatoso del bazo se hace del tipo mieloide, que contiene todas las

etapas del desarrollo de los granulocitos y eritrocitos. El desarrollo de los linfocitos y los monocitos en el bazo se presenta durante toda la vida. El bazo es un importante órgano linfopoyético, donde proliferan los linfocitos T y B (esplenocitos), que se forman en los nódulos de la pulpa blanca (Abbas *et al.*, 2002). En los linfocitos del timo y del bazo, así como en los linfocitos de sangre periférica, se encuentran receptores para los andrógenos a través de los cuales la testosterona realiza su acción sobre la respuesta inmune (Cohen *et al.*, 1983). Los linfocitos maduros tratados *in vitro* con andrógenos, reducen la producción de IL-2 e IL-4, además, la testosterona disminuye el desarrollo de células CD4+ y la síntesis de anticuerpos, provoca una maduración insuficiente de los linfocitos B e impide la regeneración de tejido linfoide, así explican el efecto inmunosupresor de la testosterona (Cutolo *et al.*, 1995).

2.6 Método de evaluación de la proliferación celular con el kit de WST-1

El ensayo se basa en la escisión enzimática de tetrazolium WST-1 de la sal de formazán por las deshidrogenasas mitocondriales presentes en las células viables, y en aumento en las células en reproducción. El uso de sales de tetrazolium provee de métodos alternos indirectos para medir actividad respiratoria asociada a una cadena de transporte de electrones. La reducción de una sal de tetrazolium causa la formación de un precipitado insoluble de coloración intensa, conocido con el nombre de formazán (Biovision, 2015).

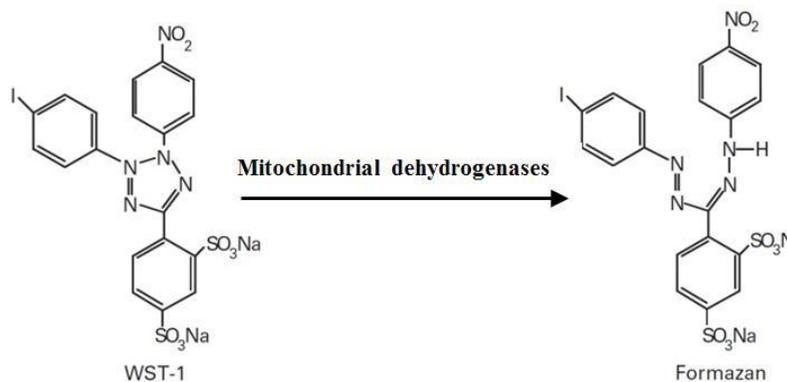


Figura 5. Mecanismo de acción de WST-1 Fuente: <http://www.biovision.com/ready-to-use-cell-proliferation-reagent-wst-1-5637.html>, 2015.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El endosulfán es un pesticida de amplio uso a nivel mundial que posee efectos adversos en el medio ambiente y en la salud. Estudios recientes muestran un incremento en enfermedades autoinmunes y de cáncer relacionados con el uso de este pesticida. En modelos animales existe evidencia de los efectos agudos de un rango de concentraciones sub-letales de endosulfán en las células del sistema inmune. En humanos, los efectos agudos de dosis sub-letales sobre los linfocitos aún no se han descrito. La información de los efectos de este pesticida se ha trabajado en eritrocitos humanos, pero no en células del sistema inmunológico.

4. HIPÓTESIS

Endosulfán es un pesticida organoclorado que altera la proliferación de los linfocitos de sangre periférica humana y disminuye su capacidad blastogénica frente a mitógenos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

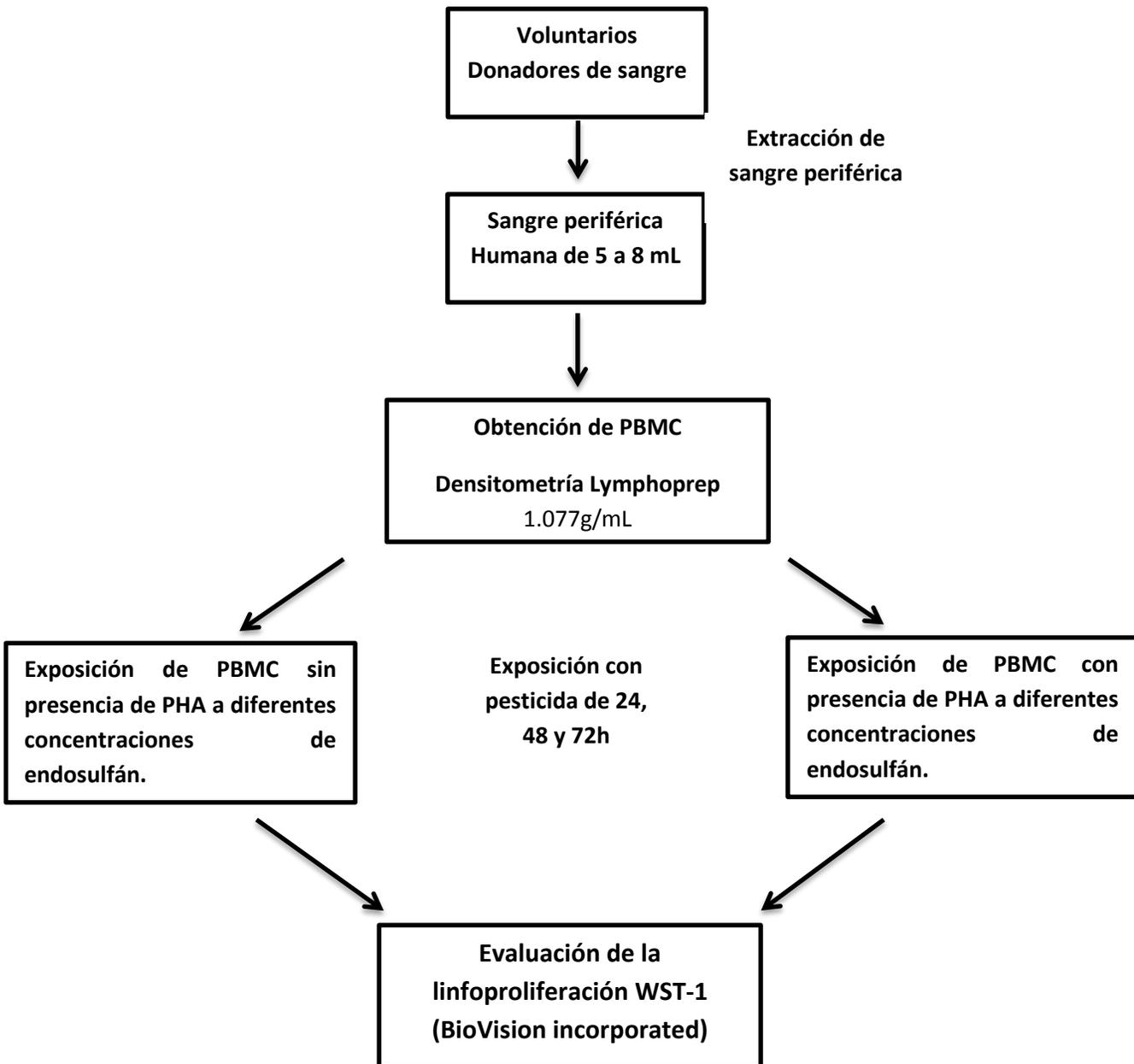
Evaluar el efecto de endosulfán *in vitro* sobre proliferación de linfocitos humanos de sangre periférica.

5.2 Objetivos particulares

1. Valorar la proliferación de linfocitos expuesto a diferentes concentraciones de endosulfán en diferentes tiempos de exposición.

2. Cuantificar los efectos agudos de endosulfán sobre linfocitos bajo estímulo mitogénico de fitohemaglutinina (PHA).
3. Determinar el dimorfismo sexual en la respuesta proliferativa de linfocitos de sangre periférica de hombre y mujer tratados con endosulfán.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



7. METODOLOGÍA

7.1 Tipo de estudio

Experimental

7.1.2 Universo de estudio

Sangre periférica humana de hombre y mujer en un rango de edades de 18 a 40 años de edad proporcionados por voluntarios. El tamaño de la muestra fue considerado a base de experimentos previos de LD₅₀ con este pesticida en un modelo de ratones hembras y machos. Si la proliferación celular tiene la misma relación, este estudio necesitaría muestras de 3 hombres y 3 mujeres por cada condición para mostrar una diferencia entre hombre y mujer. Este número está basado en:

$$n = f(\alpha, \beta) \cdot 2s^2 / \delta^2$$

Donde α es el nivel de significancia (0.05). $1 - \beta$ es el poder de la prueba (.8). $f(\alpha, \beta)$ es el valor calculado por α and β (7.9). δ es la diferencia de medianos reportado en estudios previos (35mg/kg -10mg/kg =25mg/kg). s es la desviación estándar reportada en estudios previos (+-10mg/kg). Este valor puede ser calculado en línea a <http://www.sealedenvelope.com/power/continuous-superiority/>

7.2 Cultivo celular

Se llevaron a cabo cultivos celulares de sangre periférica humana de hombre y mujer con medio RPMI-1640 Gibco® con L-Glutamina adicionado de un 10% de SFB, 1 % de estreptomina y medio AIM-V® (medio adicionado con L-glutamina, estreptomina, sulfato a 50 µg/ml, y gentamicina sulfatada al 10 µg/mL).

7.2.1 Extracción de PBMC

Se procesaron muestras de sangre periférica humana en volúmenes de 6 mL por sujeto diluidos 1:1 con PBS pH 7.4 Gibco™, después se llevó a cabo la técnica de separación por

centrifugación con la ayuda de 2mL de un líquido de densidad 1.077g/mL llamado lymphoprep con una fuerza de 3000 g (velocidad de 1500 rpm en centrífuga Heraeus Biofuge Stratos) por un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez obtenido el anillo celular (o interfase) se realizaron dos lavados con la ayuda de PBS nuevamente centrifugando a una velocidad de 1500 rpm a una temperatura de 19 °C. Finalmente se resuspendió el botón celular con 1 mL de medio AIM-V®.

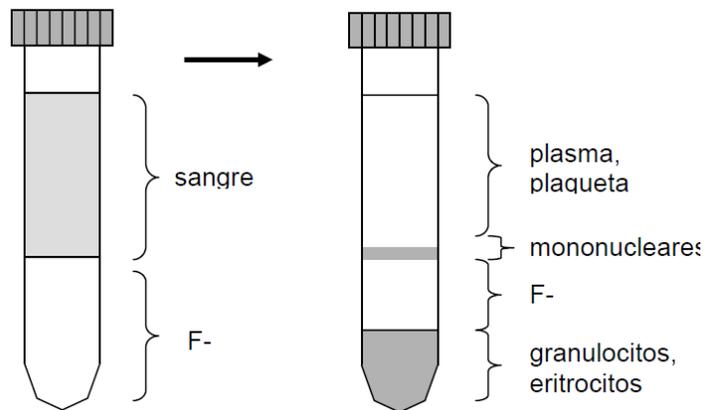


Figura 6. Distribución de los componentes sanguíneos antes y después de centrifugar con exposición de líquido de densidad. **Fuente:** (Lomonte, 2009)

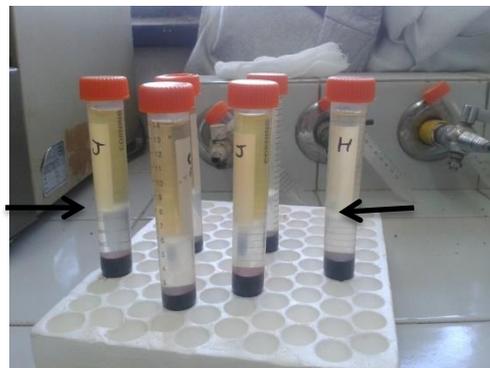


Figura 7. Separación de los componentes sanguíneos indicando la presencia de anillo celular.

7.2.2 Conteo y viabilidad celular

Se tomaron 10 μL de cada suspensión celular y se colocaron 1:1 en una cámara de Neubauer con azul tripano, se observó por microscopía y se llevó a cabo un conteo de las células viables (células blancas) haciendo una distinción de todas aquellas las cuales habían presentado daño o ya estaban muertas (células azules).

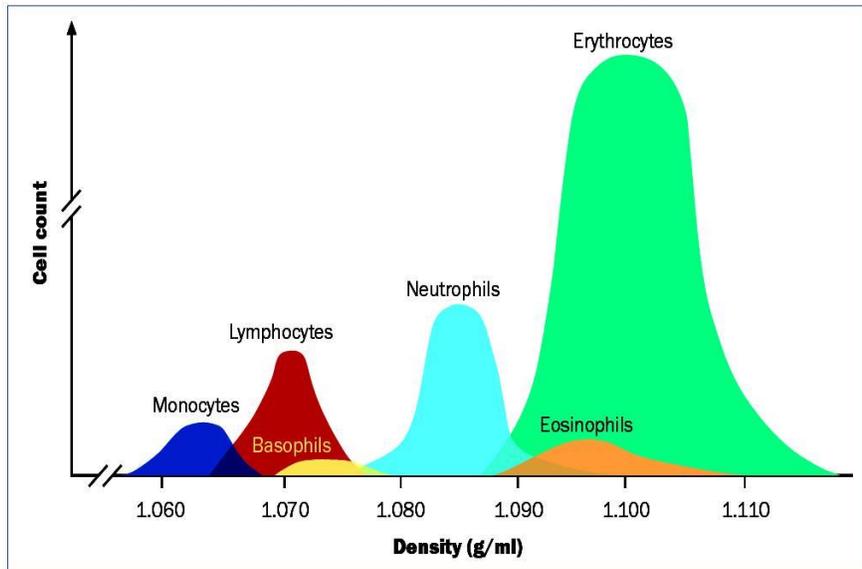


Figura 8. Distribución de la sangre en diferentes gradientes de densidad. **Fuente:** (Z-Cell, 2015)

Se llevó a cabo otro conteo mediante una dilución de la suspensión celular con líquido de Turk en una proporción 1:10 (10 μL de suspensión celular en 90 μL de solución de Turk) respectivamente. Se homogeneizó la mezcla y se colocó en una cámara de Neubauer para determinar el número de células por cuadrante y llevar a cabo los cálculos de concentración celular en la suspensión original tomando en cuenta las diluciones realizadas.

7.3 Preparación de endosulfán

El endosulfán tiene un peso molecular de 406.9g/mol posee dos isómeros, el alfa y beta que se pesan de manera individual, se diluyeron en 1mL de DMSO SIGMA[®], posteriormente se llevó a cabo una proporción 7:3 (700 μL de endosulfán α + 300 μL de endosulfán β)

respectivamente para obtener un stock de concentración de 1M, del cual se llevaron a cabo las diluciones correspondientes con medio RPMI-1640 para poder tener las concentraciones deseadas por pozo.

7.4 Ensayo de linfoproliferación

El ensayo de linfoproliferación se realizó con una concentración de 10^5 células/mL expuestos a diferentes concentraciones de endosulfán con 2 horas de pre-exposición en un rango de 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 17 μ M y 25 μ M. Los pozos se trabajaron por duplicado con y sin presencia de PHA forma M Gibco[®], en donde se tomó en cuenta como control positivo células con PHA y de control negativo células solas. PHA fue utilizado de acuerdo al proveedor en una concentración final de 2% v/v.

Se llevó a cabo la elaboración de 3 placas por individuo para poder llevar a cabo la lectura en 24h, 48h y 72h. La medida de proliferación de las células de estas placas se hizo por medio de la técnica colorimétrica WST-1 de BioVision, con una concentración de 10% del volumen final y leído 2H después por espectrofotometría a 450nm de absorbancia.

7.5 Análisis estadístico

Las medidas +/- DS se determinaron en cada grupo de estudio por experimento. Se aplicó la prueba de "t de Student" a una sola cola, utilizando el software Social Science statistics en línea disponible en: <http://www.socscistatistics.com/>. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

8. RESULTADOS

8.1 Linfoproliferación celular

Nuestro primer objetivo particular fue la valoración de la proliferación linfocitaria expuesto a diferentes concentraciones del pesticida. Nosotros trabajamos PBMC de hombre y mujer con pruebas en un rango de 0.1 μM a 50 μM , por tiempos de incubación de 24 hasta 72h.

Un gráfico representativo se llevó a cabo con cuatro donantes separados por géneros donde las células expuestas al pesticida en la concentración de 0.1 μM generó una proliferación más alta en las células PBMC. Las diferentes concentraciones de endosulfán arrojaron una curva de mayor a menor concentración donde en 17 μM se muestra un cambio o caída en la proliferación celular.

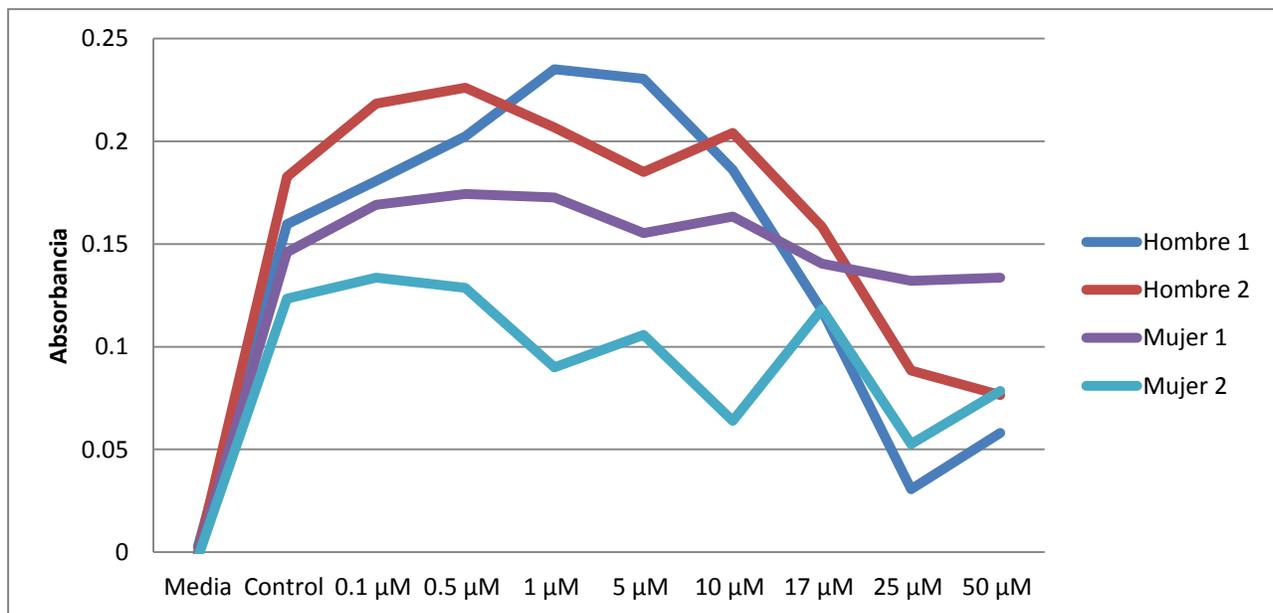


Figura 9. Efecto de dosis/respuesta del endosulfán. Representación 24h de incubación de PBMC en presencia de endosulfán con un rango de 0.1 a 50 μM sin estímulo del mitógeno (PHA). Absorbancia medida después de 2h de incubación por técnica WST-1

8.2 Efecto inhibitorio del endosulfán a concentración 17 μ M

Las células PBMC en presencia de endosulfán a una concentración de 17 μ M en un periodo de 24h mostraron una baja en la lectura de 31% +/-6% diferencia significativa de ($p=0.00001$). En un periodo de 48h se obtuvo una diferencia significativa de 19% +/-8% ($p=0.006$) respecto al crecimiento de células solas. En 72h el pesticida mostró un decremento de 53% +/-4% en la proliferación celular significativo ($p=0.0000001$) respecto al crecimiento de células solas sin presencia de mitógeno (**Figura 10 A**).

El crecimiento de las células PBMC separados por género expuestos al pesticida en una concentración de 17 μ M mostró una diferencia significativa de 43% +/- 8.6% en hombre y 20% +/- 10% en mujer ($p=0.019$) en un periodo de 24h. La exposición de las células en un periodo de 48h hombre 39% +/-18% respecto a las de mujer 32% +/- 24% denotó un cambio no significativo ($p=0.17$) al igual que las células PBMC expuestas durante 72h ($p=0.43$) (**Figura 10 B**).

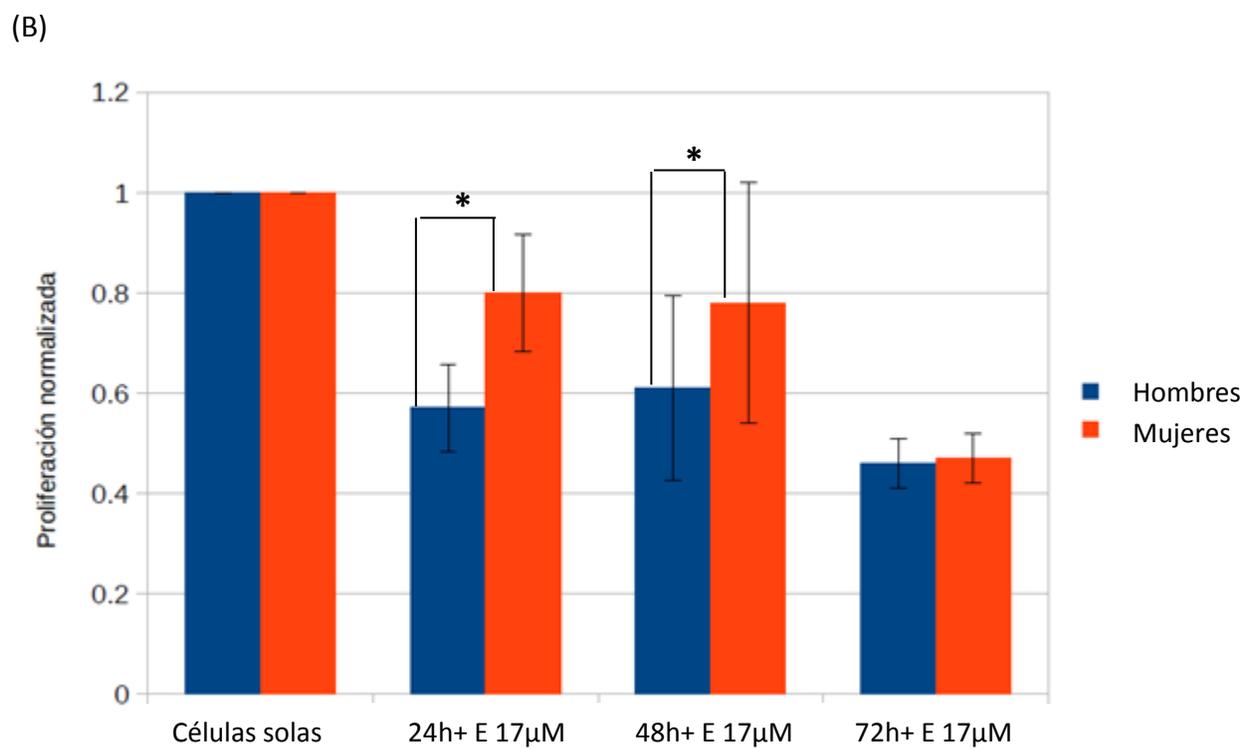
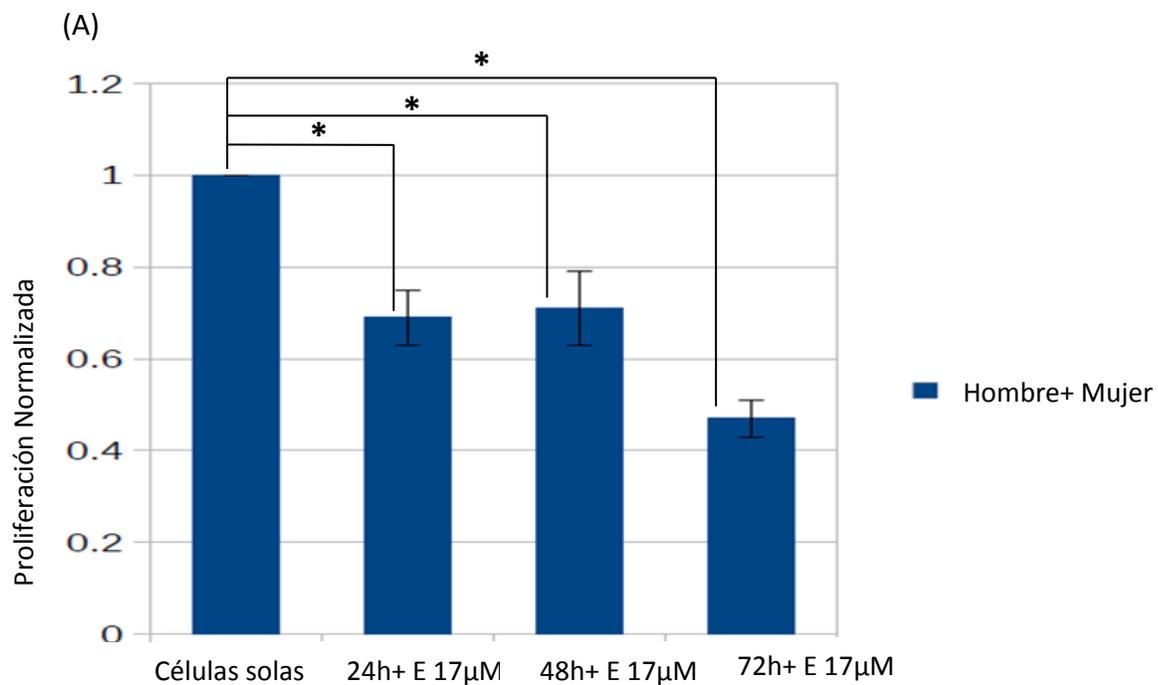


Figura 10. Efecto inhibitorio del endosulfán en concentración de 17 μ M. **A)** PBMC proliferando en un periodo de las 24 a 72H normalizada, en comparación con el crecimiento de células solas. 24h n= 20, 48h n=7, 72h n= 18. *p<0.05 **B)** PBMC separadas por género, ensayo de 24 a 72h, normalizada con el crecimiento de células solas. 24h n= 10 mujeres y n=10 hombres, 48h n= 3 hombres y n=4 mujeres, 72h n=10 mujeres y n=8 hombres *p<0.05. Resultados fueron expresados como promedios +/- error estándar.

8.3 Efecto linfoproliferativo endosulfán 0.1 μ M

La exposición del pesticida a una concentración de 0.1 μ M mostró un aumento en la proliferación celular de un 1% +/-6% en las primeras 24h respecto a las células en crecimiento sin presencia de endosulfán. En 48h las células presentaron una disminución de 3% +/- 6% en su proliferación, mientras que las células PBMC en contacto con endosulfán aumentaron un 10 +/-2% más que las células solas en un periodo de 72h. Estos resultados no fueron significativos (**Figura 11**).

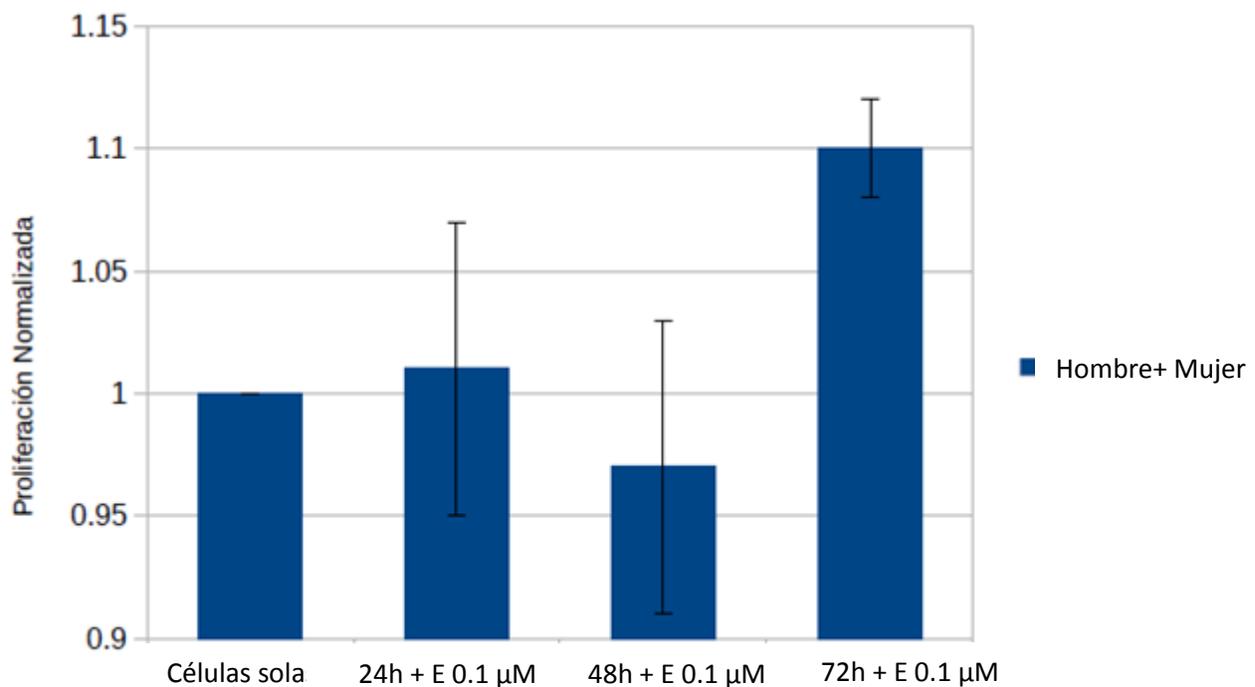


Figura 11. Efecto de la linfoproliferación en concentración 0.1 μ M de endosulfán, células PBMC proliferando en un rango de crecimiento de las 24 a 72 h normalizadas en comparación con el crecimiento de células solas. 24h n= 20, 48h n=7, 72h n= 20. Resultados fueron expresados como promedios +/- error estándar.

8.4 Efecto de endosulfán en presencia de PHA

Las células expuestas al mitógeno presentaron un incremento en su crecimiento respecto a las células solas, el índice de estimulación aumentó 2.09 +/- 0.39 veces en presencia de PHA. En estas células estimuladas nosotros observamos que los efectos de endosulfán eran similares a las células en los experimentos anteriores (no estimuladas). La pre-exposición de endosulfán 0.1 μ M incrementó el índice de estimulación con respecto a las células solas en presencia del mitógeno (2.55 +/-0.6 >2.09 +/-0.39, p=0.22). La pre-exposición de 17 μ M de endosulfán bajó el índice de estimulación a 1.05 +/-0.26, casi igual a las células solas no estimuladas. Esta última observación fue significativa con un p=0.00652 por células de hombres y mujeres, mostrando una diferencia significativa de p=0.022 por el efecto en células de hombres y p=0.0203 por el efecto en células de mujeres.

La respuesta proliferativa de las células expuestas a mitógeno (PHA) mostró una diferencia significativa (p=0.039) en hombre respecto a la mujer en 72h. La presencia de endosulfán a concentración de 0.1 μ M y el mitógeno presentó una mayor proliferación celular respecto a las células con PHA con una diferencia de género significativa (p=0.035). Las células expuestas a endosulfán 17 μ M con PHA demostraron un bajo índice de proliferación y una diferencia no significativa de género de p=0.09. La exposición del pesticida en concentración 17 μ M en 72h presentó un efecto inhibitorio en la proliferación. Las células de hombre presentaron un 46% de proliferación, mientras que las células de mujer fué de un 59% de crecimiento respecto al control en presencia de PHA (**Figura 12**).

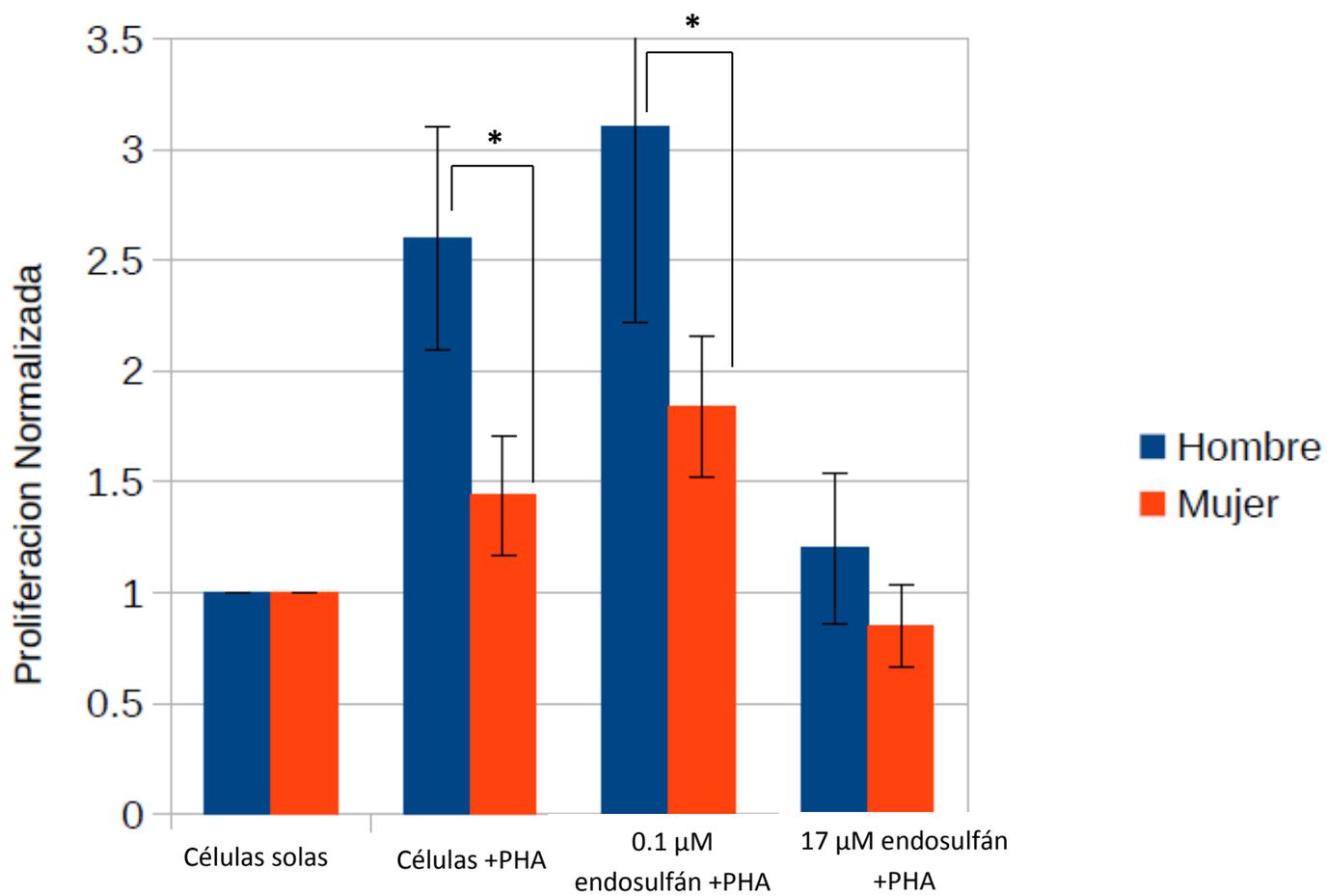


Figura 12. Efectos de endosulfán sobre proliferación inducido por PHA. Células expuestas a endosulfán y PHA por 72 H leídos por espectrofotometría. * $p < 0.05$. Resultados fueron expresados como promedios +/- error estándar.

9. DISCUSIÓN

Los efectos sobre células inmunocompetentes del plaguicida organoclorado endosulfán se han estudiado en diferentes modelos animales, aunque no siempre se puede extrapolar estos datos al humano, por lo cual en el presente estudio nosotros evaluamos los efectos de este insecticida sobre células del sistema inmune humano.

Con finalidad de determinar los efectos del plaguicida *in vitro*, primero realizamos una curva de concentraciones observando marcadas diferencias en las concentraciones de 0.1 μ M y 17 μ M en comparación con las otras ensayadas: un incremento con 0.1 μ M y disminución con 17 μ M en la proliferación celular con diferentes tiempos de exposición a endosulfán.

Nuestra hipótesis fue planteada con base en los estudios previos propios y de otros autores (Telléz-Bañuelos *et al.* 2010-2011, Wade *et al.*, 2002, Christin *et al.*, 2004, Aggrawal *et al.*, 2008) donde se menciona que el pesticida puede alterar la proliferación de linfocitos de sangre periférica humana y disminuir su capacidad blastogénica frente mitógenos.

Encontramos que el endosulfán en una baja concentración (0.1 μ M) tiene tendencia al incremento de linfoproliferación en exposición de cultivos a 24h y 72h, lo que coincide con un estudio previo de Téllez-Bañuelos *et al.*, (2011), en el incremento de proliferación de esplenocitos tratados *in vitro* con endosulfán en bajas concentración en *Tilapia nilótica*; así mismo es congruente con el hecho reportado recientemente por nuestro grupo de trabajo el cual observó leucemia linfoblástica y linfoma no Hodgkin en ratones bajo una exposición crónica a endosulfán (Zaitseva *et al.* 2014); de igual forma resultados del presente estudio dan soporte al estudio correlativo realizado en Canadá por Ross *et al.*, (2003), en trabajadores agrícolas con niveles elevados de plaguicidas organoclorados en su sangre periférica que fue asociado con el incremento de incidencia de enfermedad linfoproliferativa linfoma no Hodgkin.

Observamos que el plaguicida en concentración de 0.1 μ M mostró un aumento en la capacidad blastogénica linfocitaria frente a mitógeno PHA comparando con la proliferación

de las células estimuladas solo con PHA y no tratadas previamente con endosulfán, lo cual indica que este pesticida, a través de la activación inespecífica GABA-érgica y siendo un xenoestrógeno, a una baja concentración potencializa el efecto del mitógeno sobreestimulando las células en su proliferación suponiendo que en un momento dado se pierde el control del ciclo celular llevando a las patologías linfoproliferativas (Mendu *et al.*, 2012).

Además nosotros observamos que el endosulfán *per se* a una concentración mayor (17 μ M) inhibe la proliferación celular (valores de 46% y 47% en cultivos linfocitarios de hombre y mujer, respectivamente a las 72h de exposición) y de igual forma inhibe la respuesta proliferativa al estímulo mitogénico de PHA (valores de 46% en hombres y 59% en mujeres en el índice de estimulación), lo cual concuerda con los estudios de Aggrawal *et al.*, 2008 en esplenocitos de pollos expuestos a concentración alta de 30ppm de endosulfán. Con base en los trabajos de Han *et al.*, (2005) y Reyes García *et al.*, (2007), sugerimos que probablemente esto se debe a la alteración de flujo de calcio intracelular y consecuentemente de expresión del factor de transcripción NF- κ B.

Uno de nuestros objetivos fue evaluar el dimorfismo sexual en la respuesta proliferativa de linfocitos de sangre periférica tanto en hombres como mujeres tratados *in vitro* con endosulfán. Los resultados muestran el efecto inhibitorio del insecticida en concentración 17 μ M, a las 24 horas de incubación con el insecticida, evidenciando una diferencia significativa en la más baja proliferación en hombres comparado con mujeres. Sin embargo, en periodos más largos de exposición (72h) con este plaguicida la proliferación es afectada en ambos géneros por igual.

Esta reportado que la respuesta inmune humoral de la mujer puede ser mejor que la del hombre, esto está ligado a mayor incidencia de enfermedades autoinmunes como lupus en hembras (Fairweather *et al.*, 2008). Sin embargo, esta reportado que en algunas otras enfermedades donde se involucran las células tipo Th1, se aumenta la incidencia en hombres (Almeida *et al.*, 2010); la presencia de la hormona testosterona puede inducir una respuesta más fuerte en esclerosis múltiple (Van den Broek *et al.*, 2005) y testosterona

exógeno puede aumentar el porcentaje de células T CD8⁺ en pacientes con el síndrome de Klinefelter (Kocar *et al.*, 2000). Algunos estudios mencionan diferencias en respuestas de daño agudo, por ejemplo en inflamación del miocardio, donde las mujeres producen más citoquina IL-4 y los hombres INF- γ (Kher *et al.*, 2005).

Las mujeres presentan su propia fuente de agonistas de estrógeno y los hombres carecen de esta molécula; en tiempos como 24h los hombres tienen los receptores de estrógeno α disponibles en caso contrario de la mujer, esto puede explicar la diferencia entre la respuesta en 24h y 72h. Está reportado que la exposición de 17 β estradiol (ligando por el receptor de estrógeno) exógeno puede aumentar la actividad de células hepáticas, este resultado fue mayor en ratones machos en días 1-3 en comparación con ratones hembras, pero en días 4-6 mayor en hembras, indicando que a las 72h o más es un tiempo adecuado para estudiar el efecto del ligando del receptor de estrógeno en hombres y mujeres (Murakami *et al.*, 2004).

Otros de nuestros resultados muestran que los hombres presentan mayor índice de estimulación linfocitaria con mitógeno (PHA) en comparación con mujeres presentando una diferencia significativa tanto en el grupo control como en los grupos expuestos al pesticida organoclorado. Existe evidencia que los hombres tienen una mayor respuesta en el perfil Th1 y la mujer en el linaje Th2, estimulado con PHA (Girón-González *et al.*, 2000). Esto puede explicar la respuesta más fuerte en las células PBMC de los hombres que de mujeres tratados con este mitógeno conocido como activador de células T, sin embargo, sin saber qué tipo de respuesta Th1 o Th2 estamos estimulando con las células en cultivo no podemos hacer conclusiones definitivos con respecto a este punto.

El análisis de los resultados se demuestra la alteración de la capacidad proliferativa de células humanas de la respuesta inmune por la exposición a endosulfán, evidenciando el riesgo para la salud humana por este insecticida, lo que puede contribuir a la toma de decisiones de autoridades gubernamentales para restringir su uso en nuestro país.

10. CONCLUSIONES

El plaguicida endosulfán es inmunotóxico para el humano, debido a que en la exposición *in vitro* altera proliferación de las células de sangre periférica con el efecto bimodal dependiendo de su concentración:

- En concentración baja de $0.1\mu\text{M}$ *per se* potencializa la proliferación y significativamente incrementa los efectos del mitógeno PHA.
- En la concentración de $17\mu\text{M}$ o mayores disminuye significativamente la proliferación celular, *per se* a mayor tiempo de exposición será mayor la inhibición de proliferación; así mismo significativamente inhibe la proliferación celular en presencia del mitógeno PHA, afectando principalmente a los linfocitos de los hombres en periodos cortos de exposición.
- En los hombres los linfocitos se ven significativamente más afectados en periodo de 24h de exposición al endosulfán, en comparación con las células innumnocompetentes de las mujeres, sin embargo en periodos más largos de exposición la alteración de la proliferación es igual para ambos géneros.

11. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. Abbas AK., Andrew HL. (2002). Bazo, pp 29–30 en: *Inmunología celular y molecular*. 4ta edición. McGRAW-HILL Interamericana de España, S.A.U.
2. Aggarwal, M., Naraharisetti, S.B., Dandapat, S., Degen, G.H., Mallick, J.K. (2008). Perturbations in immune responses induced by concurrent subchronic exposure to arsenic and endosulfan. *Toxicology* 251(1–3): 51–60.
3. Almeida D., Brito B., Rodriguez M., González A., Díaz N., Cabrera A. (2010). Sex hormones and autoimmunity. *Immunology Letters* 133(2010) 6-13
4. ATSDR (2003). “Piretrinas y piretroides”. Pesticide Action Network North America, Pesticides Database.
5. ATSDR. 2000a. Toxicological Profile for Endosulfan. Update. PB/2000/108023. U.S. Dept. of Health and Human Services. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>
6. BCPC. (2003). Endosulfan. In a world compendium: The pesticide Manual 13th edition. Edited by C.D. S Tomlin, pp. 363-364. British Crop Protection Council. Alton Hampshire. U.K.
7. BioVision Incorporated. Ready-to-use Cell Proliferation Reagent, WST-1 Sensitive, Non-radioactive Assay. 2015. Disponible en: <http://www.biovision.com/ready-to-use-cell-proliferation-reagent-wst-1-5637.html>

8. Boletín de la Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM). (1998). Publicación trimestral. Suscripciones: Amado Nervo 22, Col. San Juanito, Texcoco, Estado de México. rapam@laneta.apc.org
9. Celso C., Galindo F., Galicia. S., Flores. A (2011). GABA ¿Dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Revista Neurología*; 52: 665-75.
10. Christin M.S. L. Ménard , A.D. Gendron , S. Ruby , D. Cyr , D.J. Marcogliese , L. Rollins-Smith, M. Fournier (2004). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquat. Toxicol.*, 67(1): 33-43.
11. Chambers A. D., Schauenstin, K. (2000). Mindful immunology: neuroimmunomodulation. *Immunology Today* 21(4): 168–170.
12. Chamorro L. L., Martínez, G. J., García, C. A., Busto, D. R., Albillos, M. A., Pastor, R. O., (2013). Análisis de la composición de ácido araquidónico y ácidos grasos omega-3 en plasma, membrana eritrocitaria y células inmunitarias de pacientes con cirrosis. *El Sevier* Enero-Marzo 13/ Vol. 06. Núm. 01. España. doi: 10.1016/j.labcli.2012.05.004
13. Cohen JHM., DanielL., Cordier G., Saez S., Revillard JP. (1983). Sex steroid receptors in peripheral T cells. *J.Immunology*. 131: 2767–71.
14. Comisión Europea (2005) Review Report for the active substance Endosulfan SANCO/4327/2000-rev. 2 Final 15 de febrero de 2005 y documentos que fundamentan los antecedentes (expediente, monografía e informe de expertos del Programa de Evaluación por Expertos)

http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2005/l_317/l_31720051203es00250028.pdf

http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/endosulfan_en.pdf

15. Convenio de Rotterdam. 2011. Aplicación del procedimiento de consentimiento fundamentado previo a productos químicos prohibidos o rigurosamente restringidos. Disponible en: http://www.pic.int/Portals/5/DGDs/DGD_Endosulfan_ES.pdf
16. Córdoba J., Martín. JC., Yélamos. F (2001). Intoxicación por organoclorados, carbamatos y herbicidas. Principios de urgencias, emergencias y cuidados críticos. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsapud/e/matedu/carbamato/carbamato.pdf>
17. Cutolo M., Sulli A., Serio B., Accardo S., Masi A.T. (1995). Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin and Exp Rheumatol* 13: 217–226.
18. Chighizola C, Meroni PL. (2012). The role of environmental estrogens and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2012 May;11(6-7):A493-501. doi: 10.1016/j.autrev.2011.11.027. Epub 2011 Dec 4.
19. De León-Nava Marco A, Morales-Montor J. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2?. *Rev. Invest. Clín.* [online]. 2006, vol.58, n.2, pp. 161-169. ISSN 0034-8376.
20. Delvie M. Africa A. Solomons A. (2009). Pesticide exposure and blood endosulfán levels after first season spray amongst farm workers in the Western Cape. South Africa. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food contaminants, and Agricultural wastes.* Volume 45, Issue 3, 2009.

21. Diario oficial de la federación 1991. Disponible en: www.cofepris.gob.mx/CAS/.../Catalogo%20de%20plaguicidas/INTRO.pdf
22. EPA (2002). Reregistration eligibility decision for endosulfan. November 2002. United States Environmental Protection Agency, Washington D.C..
23. Fairweather D., Frisancho-Kiss S., Rose N. (2008). Sex Differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective. *The American Journal of Pathology*, Vol. 173, No. 3, September 2008 American Society for Investigative Pathology DOI: 10.2353/ajpath.2008.071008
24. Galán-Huertos, E., J. L. Gómez-Ariza, N. Bellinfante Crocci, P. Aparicio-Fernández. (2003). Contaminación de suelos por compuestos orgánicos. Informe final. Sevilla, España. 185 p
25. García-Camberos J.P., F.Soler Rodríguez (2005). *Los plaguicidas organoclorados y sus implicaciones en el medio ambiente acuático*. Universidad de Extremadura. España. 65-73
26. Girón-González J., Moral F., Elvira J., García-Gil D., Guerrero F., Gavilán I., Escobar L. Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *European Journal of Endocrinology* (2000) 143 31±36
27. Greene GL., King WJ. (1984). Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307, 745-747 (23 February 1984) | doi:10.1038/307745a0;
28. Han, E. H., Hwang, Y.P., Kim, H.G., Jeong, H.G. (2007). Inflammatory effect of endosulfan via NF-kappa B activation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 355(4): 860–865

29. Harford A. J., K. O'Halloran, P. F. Wright (2005). The effects of in vitro pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aquat. Toxicol.*, 75(4): 330-42.
30. Hayes W.J., E. R. Laws (1991). Handbook of pesticide toxicology. Vol. 2. Academic Press, San Diego, CA.
31. Henao S. H. & Corey. G., 1986. Plaguicidas organofosforados y carbamicos. Centro panamericano de ecología humana y salud.
32. Infermera Virtual. Sistema inmune y la sangre. 2013. Barcelona. Disponible en: <https://www.infermeravirtual.com/files/media/file/102/Sangre.pdf?1358605574>
33. Instituto Nacional de Geografía (INEGI). 1992. Evaluación de contaminación de Residuos.
34. IPCS (1984), International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 40, Endosulfan. World Health Organization, Geneva, 1984. Puede consultarse en: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc40.htm>
35. Jaso-Friedmann L. J. H. Leary, 3rd D. L. Evans, Jaso-Friedmann, L., J. H. (2001). The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties. *Dev Comp Immunol.*, 25(8-9): 701-11.
36. Keele C., Erich Neil. (1965). *Los glóbulos rojos y blancos de la sangre*. En Fisiología aplicada Sexta edición. Barcelona, España: Editorial Marin.
37. Kher A., Wang M., Tsai BM., Pitcher JM., Greenbaum ES., Nagy RD., Patel KM., Waiurulo GM., Markel TA., Meldrum DR. (2005). Sex differences in the myocardial inflammatory response to acute injury. *Shock*. 2005 Jan;23(1):1-10.

38. Kocar H., Yesilova Z., Turan M., Sengül A., Ozdemir I. (2000). The effect of testosterone replacement treatment on immunological features of patients with Klinefelter's syndrome. *Clin Exp Immunol.* 2000 Sep;121(3):448-52.
39. Ledirac, N., S. Anth erieu, d'Uby, A.D., Caron, J.C., Rahma - ni, R. (2005). Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species. *Toxicol Sci* 86(2): 444–452.
40. Lemaire, G., W. Mnif, et al. (2006). "Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines." *Life Sci* **79**(12): 1160-9.
41. Lomonte B. (2009) Técnicas de Laboratorio en Inmunología Clínica, 122 pp. Universidad de Costa Rica. Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>
42. Masía G, Moltoni N. (2012). Innovaciones tecnológicas en la agricultura. Surgimiento y desarrollo de las técnicas de protección de cultivos. Tercer congreso latinoamericano de historia económica. Disponible en: http://inta.gob.ar/documentos/innovaciones-tecnologicas-en-la-agricultura.-surgimiento-y-desarrollo-de-las-tecnicas-de-proteccion-de-cultivos/at_multi_download/file/CLADHE%20Mesa%207%20MASIA%20MOLTONI%20Trabajo%20Completo.pdf
43. Mendu SK, Bhandage A, Jin Z, Birnir B. (2012). "Different subtypes of GABA-a receptors are expressed in human, mouse and rat T lymphocytes". *PLoS One*; 7: e42959. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042959>
44. Montalvo A. C., (2007). Tejido sanguíneo y hematopoyesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en:

http://histologiaunam.mx/descargas/ensenanza/portal_recursos_linea/apuntes/Tejido-sanguineo.pdf

45. Murakami T., Sato A., Inatani M., Sakurai H., Nagai J., Takano M. (2004). Effect of neonatal exposure of 17beta-estradiol and tamoxifen on hepatic CYP3A activity at developmental periods in rats. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004 Apr;19(2):96-102.
46. Nivia E (1993). "Endosulfán".Red de Acción en Plaguicidas. Palmira, Colombia
http://www.rapaluruguay.org/endosulfan/Endosulfan_Nivia.doc
47. Obiols J., (1999). NTP 512: Plaguicidas organofosforados (I) aspectos generals y toxicocinética. Centro nacional de condiciones de trabajo. Disponible en:
http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/501a600/ntp_512.pdf
48. Olsen N. J., Viselli S. M., Fan J. and Kovacs W. J. (1998). Androgens accelerate thymocyte apoptosis. *Endocrinology* 139: 748–752.
49. PESTICIDE RISKS. *Pesticide poses severe risks to humans and only minimal benefits to growers.* (Beyond Pesticides, July 25, 2008) San Francisco, California
http://www.ecochem.com/ENN_EPA_endosulfan.html
50. Praveen K., J. H. Leary, 3rd D. L. Evans, L. Jaso-Friedmann (2006). Molecular characterization and expression of a granzyme of an ectothermic vertebrate with chymase-like activity expressed in the cytotoxic cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Immunogenetics*, 58(1): 41-55.

51. Reyes-García M. G., F. Hernández-Hernández, B. Hernández-Tellez, F. García-Tamayo (2007). GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulates their IL-6/IL-12 production. *J. Neuroimmunol.*, 188(1-2): 64-8.
52. Roos, A., S. Zahm, K. Cantor., D. Weisenburger., F. Holmes., L. Burmeister., Blair A.. (2003). "Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men". *Occup Environ Med*; 60:e11.
53. Rubio-Chávez L (2014). "Efecto de la exposición crónica a dosis subletal de endosulfán sobre la expresión de citocinas IL-6, IL-10 y TNF- α y cambios histopatológicos en modelo murino de cáncer de colon". Tesis de licenciatura para obtener el título de Biólogo. Universidad de Guadalajara.
54. Ruíz A. V., Boffill, C. M. A., Gonzáles, G. L., Masjuan, P. M., Blanco, F. (2005). Efecto inmunomodulador de la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*. *Rev. Cubana Invest. Biomed* 24(1):5-13
55. Sánchez M. J. & Sánchez. M. (1984). Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo. Instituto de recursos naturales y agrobiología. Edición electrónica CersNet. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf>
56. Sajad A. Shukla Das. Vishnampettai G. Sambit N. Mustafa M. Basu B. Prashant V. (2013) Alterations in T-lymphocyte sub-set profiles and cytokine secretion by PBMC of systemic lupus erythematosus patients upon in vitro exposure to organochlorine pesticides. *Journal of Immunotoxicology* . 01/2012; 9(1):85-95. DOI: 10.3109/1547691X.2011.642103

57. Siddiqui M.K.J., Anand, M., Mehrotra, P.K., Sarangi, R. Y Mathur, N. (2005) "biomonitoring of organochlorines in women with benign and malignant breast disease en" *environmental research*, 98(2), 250-257.
58. Silva M. Beauvais L. (2010). Human health risk assessment of endosulfán, I: Toxicology and hazard identification. *Regulatory toxicology and Pharmacology* 56(2010) 4-17
59. Srikanth N. S., P. K. Seth (1990). Alterations in xenobiotic metabolizing enzymes in brain and liver of rats coexposed to endosulfan and malathion. *J Appl Toxicol* 10(3): 157-60.
60. Stimson WH. (1988). Oestrogen and Human T Lymphocytes: Presence of Specific Receptors in the T-Suppressor/Cytotoxic Subset. *Scandinavian Journal of Immunology* Volume 28, Issue 3, pages 345–350, September 1988
61. Téllez-Bañuelos M. Santerre, A. Casas S. Zaitseva, G. (2010a). Endosulfan increases seric interleukin-2 like (IL-2L) factor and immunoglobulin M (IgM) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Aeromona hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* 28 (2010) 401-428.
62. Téllez-Bañuelos, M. C., Santerre, A., Casas-Solís, J., Zaitseva, G. (2010b). Endosulfan increases seric interleukin- 2 like (IL-2L) factor and immunoglobulin M (IG M) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 27(2): 105–111.
63. Tellez-Bañuelos M. C., Ortiz-Lazareno P., Santerre A., Casas-Solis J., Bravo-Cuellar A., Zaitseva G. (2011). Effects of low concentration of endosulfan on proliferation, ERK1/2 pathway, apoptosis and senescence in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) splenocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 31 (2011) 1291e1296

64. UNEP (2009) "Endosulfan". Risk Profile. Adopted by the persistent Organic Pollutants Review Committee at its fifth meeting". October, 2009. Disponible en: <http://chm.pops.int/Convention/POPs%20Review%20Committee/Chemicals/tabid/781/language/en-GB/Default.aspx> UNEP/POPS/POPRC.5/10/Add.2
65. USEPA (2002) Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition October 2002. EPA-821-R-02-012
66. Van den Broek H., Demoiseaux J., De Baets M., Hupperts R. (2005). The influence of sex hormones on cytokines in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: a review. *Multiple Sclerosis* 2005; 11: 349/359
67. Wade MG, Foster WG, Younglai EV, McMahon A, Leingartner K, Yagminas A, Blakey D, Fournier M, Desaulniers D, Hughes CL. (2002). Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. *Toxicol Sci.* 2002 May;67(1):131-43.
68. Ware G. W. a. W., D. M (2004). *The Pesticide Book*, 6th ed. University of Minnesota, MeisterPro Information Resources.
69. Z-cell. (2015). Biocoll-Separating Solution. Thailand: Bangkok & Central. Disponible en: <http://www.x-zell.co.th/product.php?productid=39574>
70. Zaitseva GP, Rubio Chávez LA, Peregrina -Sandoval J , Tellez- Bañuelos MC. (2014). "The effect of chronic exposure to sublethal doses of endosulfan on the expression of IL-6, IL - 10 and TNF- α and histopathological changes in a mouse model of colon cancer." En 53rd Midwinter Conference of Immunologists. Enero 25-28 de 2014, Asilomar, California, EUA.

