

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**  
**ÁREA DE CIENCIAS AMBIENTALES**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

**EFFECTO DE DIAZINÓN SOBRE EL SISTEMA COLINÉRGICO NO  
NEURONAL EN LINFOCITOS DE TILAPIA NILÓTICA**  
**(*Oreochromis niloticus*)**

**TESIS**

**PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
EN EL ÁREA DE CIENCIAS AMBIENTALES**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. Gladys Alejandra Toledo Ibarra**

**DIRECTOR**

**Dr. Manuel Iván Girón Pérez**

**CO-DIRECTOR**

**Dr. Lenin Pavón Romero**

**Xalisco, Nayarit, septiembre de 2015**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Tepic, Nayarit a 1 de septiembre de 2015

DR. JUAN DIEGO GARCÍA PAREDES  
COORDINADOR DEL POSGRADO CBAP  
PRESENTE

Por este conducto nos permitimos comunicarle que la tesis de la estudiante de maestría Gladys Alejandra Toledo Ibarra titulada "Efecto de diazinón sobre el sistema colinérgico no neuronal en linfocitos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*)", ha sido revisada y aprobada en contenido y formato. Por lo que consideramos que la estudiante puede continuar con los trámites para solicitar fecha de examen de grado.

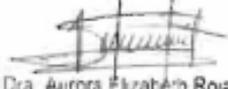
Sin más por el momento reciba un cordial saludo

ATENTAMENTE

  
Dr. Manuel Ivan Girón Pérez  
Director de tesis

  
Dra. Argelia E. Rojas Mayorquin  
Asesor

  
Dr. Leny Pavón Romero  
Co-director de tesis

  
Dra. Aurora Elizabeth Rojas García  
Asesor



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**

CBAP/187/15.

Xalisco, Nayarit; 09 de septiembre de 2015.

**ING. ALFREDO GONZÁLEZ JÁUREGUI**  
**DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**P R E S E N T E.**

Con base al oficio de fecha 01 de septiembre del presente, enviado por los CC. Dr. Manuel Iván Girón Pérez, Dr. Lenin Pavón Romero, Dra. Argelia E. Rojas Mayorquín y Dra. Aurora Elizabeth Rojas García, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que solicita el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias; dependiente de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza a la C. Gladys Alejandra Toledo Ibarra, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría en el Área de Ciencias Ambientales.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
"Por lo Nuestro a lo Universal"

Dr. J. Diego García Paredes  
Coordinador del Posgrado

C.c.p.- Expediente

Amfm

Este trabajo se realizó en el laboratorio de inmunotoxicología, de la Universidad Autónoma de Nayarit, bajo la tutoría del Dr. Manuel Iván Girón Pérez, a través del financiamiento otorgado por SEP-CONACyT (Ciencia básica 2012-179508).

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nayarit y al Laboratorio de Inmunotoxicología por el apoyo proporcionado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Manuel Iván Girón Pérez, por el gran apoyo, confianza y paciencia, por el tiempo invertido, por todos los consejos y orientación proporcionada a lo largo de este camino, por todas las oportunidades brindadas y sobre todo por la amistad ofrecida.

Al Dr. Lenin Pavón Romero, por su paciencia en clases, por sus consejos para el mejoramiento de este trabajo, por las oportunidades brindadas para la difusión de los resultados, pero sobre todo por compartirme su tiempo y conocimiento.

A mi comité revisor, la Dra. Argelia E. Rojas Mayorquín y Dra. Aurora Elizabeth Rojas García, por el tiempo dedicado en mis clases y en la revisión de este trabajo. Muchas gracias por sus acertados consejos para el mejoramiento de este trabajo.

A cada integrante de la familia inmunotox por la amistad brindada, apoyo y paciencia. A M. en C. Karina Resendiz por la amistad y consejos, por los logros que hemos alcanzado trabajando en equipo. A todos los estudiantes de prácticas, servicio y tesis, Neil Fonseca, Ramón Félix, Karina Corona, Paloma Altamirano, Betza Escalante, Guadalupe Girón y Kenia Lemus, que me apoyaron en el cuidado de los peces y en los ensayos *in vitro*, sin ustedes este trabajo hubiera sido muy difícil. Al equipo Biociencias, Lic. Brenda Romero, Lic. Orlanda, Lic. Paloma Becerril y Lic. Gaby de Pablos por el apoyo en el diseño de imágenes, traducciones y cuestiones técnicas, pero sobretodo por las charlas tan amenas. A los nuevos integrantes de la familia M. en C. Carlos Covantes, Q.F.B. Rocío Barcelos, Q.F.B. Herminia Ventura, I.B.Q. Sarahy Navidad, Andrés Trujillo y Angie Robles por sus palabras de aliento.

Al M. en C. Ernesto Rincones, por su grandísimo apoyo en la obtención de organismos de experimentación. A Oscar Fregoso, por el apoyo técnico para la lectura de mis muestras.

A mis compañeros de posgrado, en especial a Esteban Vega, Ernesto Rincones, Néstor Ponce, Mercedes Zambrano, José Pinzón y Oscar Martínez, por su amistad y compañerismo, por los recuerdos compartidos y porque llegamos a la meta.

A mis amigos de toda la vida, por la amistad y la paciencia en mis momentos de ausencia, pero sobre todo por los buenos y divertidos momentos que pasamos juntos.

A mi familia, por formar parte de mi vida, entenderme, quereme y compartir conmigo este logro, muchas gracias.

## DEDICATORIA

A mi mamá María Leticia Ibarra Martínez por apoyarme y ayudarme a cumplir mis metas, por creer en mí e impulsarme siempre. Por su infinito amor, consejos y comprensión brindada toda mi vida, muchísimas gracias.

## RESUMEN

Diazinón es un plaguicida organofosforado que ejerce efectos tóxicos sobre el sistema inmunológico. Sin embargo, el mecanismo de inmunotoxicidad aún no es claro. Se ha propuesto que la alteración en la respuesta inmunológica por diazinón podría atribuirse al sistema colinérgico no neuronal presente en las células del sistema inmunológico, sistema que hasta el momento ha sido descrito únicamente en modelos mamíferos y líneas celulares. Sin embargo, los peces al ser el primer grupo de vertebrados que desarrollaron mecanismos de inmunidad innata y adaptativa, representan un modelo potencial de estudio de los mecanismos de inmunoregulación y el daño potencial causado por contaminantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) la presencia del sistema colinérgico no neuronal en células del sistema inmunológico; así como el efecto de diazinón sobre el sistema colinérgico no neuronal linfocitario, como posible blanco en la inmunotoxicidad de diazinón. Para esto, se evaluó la concentración de acetilcolina y de los receptores nicotínicos y muscarínicos, así como la actividad de acetilcolinesterasa en células mononucleares de tilapia nilótica expuesta *in vivo* de forma aguda (6, 12 y 24 h) a concentraciones subletales (0.97, 1.95 y 3.91 mg/L) de diazinón. Los resultados obtenidos muestran que la exposición aguda a diazinón induce un incremento en la concentración de acetilcolina, una disminución en la concentración de los receptores nicotínicos y muscarínicos, así como disminución en la actividad de acetilcolinesterasa en las células mononucleares de tilapia. En el presente estudio se demuestra la presencia del sistema colinérgico no neuronal en células del sistema inmunológico de tilapia nilótica, sistema que es alterado significativamente por diazinón, lo que indica que este sistema es blanco en el mecanismo de inmunotoxicidad de diazinón. Este estudio aporta información concerniente a la neuroinmunomodulación en vertebrados inferiores como los peces y los mecanismos de inmunotoxicidad de plaguicidas organofosforados.

## ABSTRACT

Diazinon is an organophosphate pesticide that exerts toxic effects on the immune system. However, the mechanism of immunotoxicity is still unclear. It has been proposed that the alteration of the immune system by diazinon could be attributed to a non-neuronal cholinergic system present in immune cells, a system that has so far only been described in mammalian models and cells lines. However, fishes are the first group of vertebrates that developed innate and adaptive immune mechanisms, so those represent a potential study model for the mechanisms of immunity regulation and the potential damage caused by polluting. The aim of this study was to evaluate the presence of non-neuronal cholinergic systems in immune cells in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and the diazinon's effect on the non-neuronal cholinergic system of lymphocyte as a potential target in diazinon immunotoxicity. For this purpose, the concentration of acetylcholine and, nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors were evaluated, as well as acetylcholinesterase activity in mononuclear cells of Nile tilapia *in vitro* acutely exposed (6, 12 and 24 h) to sublethal concentrations (0.97, 1.95 and 3.91 mg/L) of diazinon. The results indicate that acute exposure to diazinon induces an increase in the concentration of acetylcholine, a decrease in the concentration of nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors, and a decrease in acetylcholinesterase activity in mononuclear cells. This study demonstrates the presence of non-neuronal cholinergic systems in the immune cells of Nile tilapia. The cholinergic system is significantly altered by diazinon, so it is a target in the diazinon immunotoxicity. This study provides information concerning neuromodulation in lower vertebrates such as fish and possible mechanisms of immunotoxicity of organophosphate pesticides

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Evolución del sistema inmunológico de peces, comparación de mecanismos de inmunidad entre los grupos de peces.	4
Figura 2.	Órganos del sistema inmunológico en peces óseos.	4
Figura 3.	Tilapia nilótica ( <i>Oreochromis niloticus</i> ).	10
Figura 4.	Estructura química de POF.	12
Figura 5.	Estructura química de diazinón.	13
Figura 6.	Esquema de distribución de POF en el ambiente.	18
Figura 7.	Mecanismo de biotransformación de diazinón en vertebrados.	19
Figura 8.	Mecanismo de acción enzima acetilcolinesterasa e inhibición inducida por diazoxón.	20
Figura 9.	Mecanismo de activación de receptores muscarínicos.	23
Figura 10.	Receptor nicotínico de acetilcolina.	24
Figura 11.	Sistema colinérgico neuronal.	25
Figura 12.	Vista sagital del cerebro de pez adulto que esquematiza todas las poblaciones neuronales nerviosos colinérgicos centrales.	26
Figura 13.	Peso relativo de bazo de peces expuestos <i>in vivo</i> a diazinón.	40
Figura 14.	Concentración de proteína en CMB de peces expuestos <i>in vivo</i> a diazinón.	42
Figura 15.	Estandarización de actividad colinesterásica.	44
Figura 16.	Actividad enzimática basal de ChEt y AChE.	
Figura 17.	Actividad de ChEt y AChE en CMB de peces expuestos <i>in vivo</i>	

	a diazinón.	48
<b>Figura 18.</b>	Curva estándar de ACh.	49
<b>Figura 19.</b>	Concentración de ACh en CMB de peces expuestos <i>in vivo</i> a diazinón.	51
<b>Figura 20.</b>	Curva estándar de nAChR y mAChR.	52
<b>Figura 21.</b>	Concentración de nAChR y mAChR en CMB de peces expuestos <i>in vivo</i> a diazinón.	53
<b>Figura 22.</b>	Mecanismos de inmunotoxicidad de POF.	57
<b>Figura 23.</b>	Sistema colinérgico no neuronal en linfocitos como blanco de diazinón en vertebrados.	65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Principales componentes de la respuesta inmunológica de peces.	3
<b>Tabla 2.</b>	Principales características fisicoquímicas de diazinón.	15
<b>Tabla 3.</b>	Receptores muscarínicos asociados a proteínas G y su señalización.	23
<b>Tabla 4.</b>	Efectos inmunotóxicos de diazinón en peces teleósteos.	31

## **ABREVIATURAS**

<b>ACH:</b>	Acetilcolina
<b>Acetil-CoA :</b>	Acetil-coenzima A
<b>ACHÉ:</b>	Acetilcolinesterasa
<b>ACHR:</b>	Receptores de acetilcolina
<b>ANOVA:</b>	Análisis de varianza
<b>ATC:</b>	Acetilcolina
<b>BChE:</b>	Butirilcolinesterasa
<b>BCR:</b>	Receptores de células B
<b>ChAT:</b>	Colina acetil transferasa
<b>ChEt:</b>	Colinesterasa total
<b>CMB:</b>	Células mononucleares de bazo
<b>CONAPESCA:</b>	Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca
<b>CYP450:</b>	Superfamilia de citocromo p450
<b>DEP:</b>	Dietilfosfato
<b>DETP:</b>	Dietiltiofosfato
<b>DTNB:</b>	Ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoico
<b>ELISA:</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>FAO:</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
<b>GST:</b>	Glutación-S-transferasa
<b>HRP:</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>IMPH:</b>	2-isopropil-4-metil-6-hidroxipirimidina

IP3:	Inositol trifosfato
iso-OMPA:	Tetraisopropil pirofosforamida
LRR:	Dominios repetidos ricos en leucina
mAChR:	Receptores muscarínicos de acetilcolina
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
nAChR:	Receptores nicotínicos de acetilcolina
NLR:	Receptores tipo NOD
NO:	Oxido nítrico
PAMPs:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PKA:	Proteína cinasa A
PKC:	Proteína cinasa C
PLC:	Fosfolipasa C
POF:	Plaguicidas organofosforados
PRR:	Receptores de reconocimiento de patógenos
RAG:	Gen activador de recombinación
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
TCR:	Receptor de células T
TLR:	Receptores tipo Toll
VLr:	Receptores variables de linfocitos
WHO:	Organización mundial de la salud

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	VIII
<b>Abstract</b>	IX
<b>Índice de figuras</b>	X
<b>Índice de tablas</b>	XII
<b>Abreviaturas</b>	XIII
<b>1. Introducción</b>	1
1.1. Sistema inmunológico	1
1.1.1. Sistema inmunológico de peces	2
1.1.1.1. Factores que modulan el sistema inmunológico de peces	8
1.1.2. Peces como modelo de estudio	9
1.1.2.1. Tilapia nilótica	9
1.2. Plaguicidas	11
1.2.1. Plaguicidas organofosforados	12
1.2.1.1. Diazinón	13
1.2.1.1.1. Características fisicoquímicas	13
1.2.1.1.2. Usos y aplicaciones	15
1.2.1.1.3. Contaminación acuática	15
1.2.1.1.4. Metabolismo de diazinón en peces	17
1.2.1.1.5. Efectos neurotóxicos	19
1.3. Interacciones neuro-inmunológicas	21
1.3.1. Sistema colinérgico neuronal	22
1.3.1.1. Sistema colinérgico neuronal en peces	26
1.3.2. Sistema colinérgico no neuronal	27
<b>2. Antecedentes</b>	29
<b>3. Planteamiento del problema</b>	32
<b>4. Justificación</b>	32
<b>5. Hipótesis</b>	33
<b>6. Objetivos</b>	33

6.1. Objetivo general	33
6.2. Objetivos específicos	33
<b>7. Diagrama experimental</b>	<b>34</b>
<b>8. Metodología</b>	<b>35</b>
8.1. Organismos de experimentación	35
8.2. Exposición <i>in vivo</i> a diazinón	35
8.3. Peso relativo de bazo	36
8.4. Preparación de la muestra	36
8.5. Evaluación de elementos del sistema colinérgico no neuronal	36
8.5.1. Actividad de colinesterasas	36
8.5.2. Determinación de ACh	37
8.5.3. Determinación de nAChR y mAChR	38
8.6. Análisis estadísticos	38
<b>9. Resultados</b>	<b>39</b>
9.1. Peso relativo del bazo	39
9.2. Concentración de proteína	41
9.3. Evaluación de elementos del sistema colinérgico no neuronal	43
9.3.1. Actividad de colinesterasas	43
9.3.2. Determinación de ACh	48
9.3.3. Determinación de nAChR y mAChR	51
<b>10. Discusión</b>	<b>54</b>
<b>11. Conclusiones</b>	<b>65</b>
<b>12. Perspectivas</b>	<b>66</b>
<b>13. Referencias</b>	<b>67</b>
<b>14. Anexos</b>	<b>85</b>

## 1. Introducción

### 1.1. Sistema inmunológico

Todos los organismos, a partir de los procariontes, han desarrollado mecanismos de defensa para protegerse de agentes extraños. En el caso de los vertebrados, han desarrollado un sistema capaz de discriminar entre lo "propio" y lo "no propio", a través de receptores para el reconocimiento de marcadores moleculares presentes en los patógenos, pero ausentes en el hospedero. Los mecanismos inmunológicos que permiten dicho reconocimiento están divididos en innatos y adaptativos. Los primeros están codificados en genes en línea germinal, las proteínas producto de estos genes reconocen patrones moleculares asociados y compartidos por patógenos. Por otro lado, los mecanismos de inmunidad adaptativa están codificados en elementos génicos que requieren reorganización somática para formar moléculas de unión a antígeno con alta especificidad (Chapli, 2010; Rauta *et al.*, 2012).

Las moléculas de reconocimiento de los mecanismos de inmunidad innata se expresan ampliamente en una gran cantidad de células, estos mecanismos están diseñados para responder inmediatamente después del contacto con el antígeno. Mientras que los mecanismos de inmunidad adaptativa están restringidos a un número menor de células pero con amplia especificidad, estas células después del contacto con el antígeno deben proliferar con el fin de generar una respuesta eficiente. Cabe resaltar que esta respuesta genera células de memoria, las cuales son capaces de persistir y recuperar sus funciones efectoras rápidamente después de un segundo contacto con el antígeno que indujo su proliferación, lo que permitirá generar una respuesta más eficiente (Chapli, 2010; Rauta *et al.*, 2012).

El sistema inmunológico presenta una gran variedad de mecanismos que se han desarrollado en diferentes momentos de la evolución. Los mecanismos de inmunidad innata se originaron con la aparición de los organismos multicelulares

hace cerca de 1 billón de años, mientras que los primeros indicios de mecanismos adaptativos dependiente de antígeno asociada con linfocitos T aparecieron en ciclostomos (lampreas) hace aproximadamente 540 millones de años (Koenderman *et al.*, 2014).

### 1.1.1. Sistema inmunológico de peces

Los peces óseos (osteictios) son el primer grupo de organismos vertebrados que presentan mecanismos de inmunidad innata y adaptativa (figura 1). Los primeros mecanismos reconocen de una manera "genérica" a los patógenos y previene su dispersión. Mientras que los segundos reconocen específicamente al antígeno, son capaces de producir anticuerpos así como de activar mecanismos citotóxicos para eliminarlo. La combinación de ambos mecanismos es un proceso regulado y debe limitarse una vez que es eliminado el patógeno, con el fin de prevenir un posible daño al hospedero (tabla 1) (Litman *et al.*, 2010; Verburg-van Kemenade *et al.*, 2013).

#### Órganos del sistema inmunológico

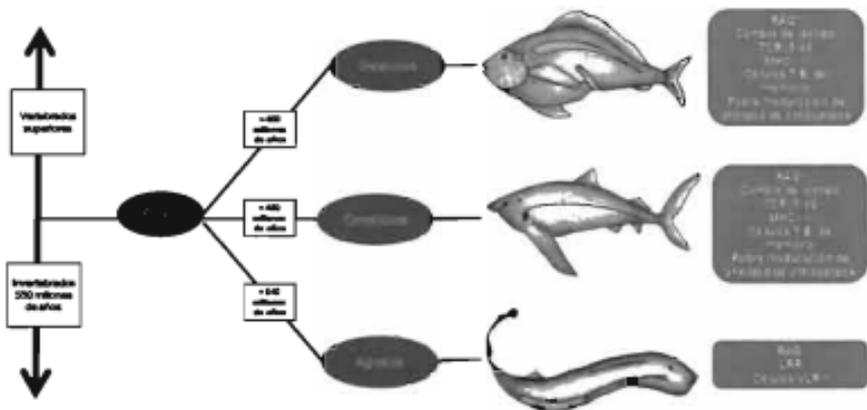
Los órganos linfoides primarios en peces son el timo y el pronefro (riñón anterior) (figura 2). El timo, al igual que en mamíferos, tiene un papel fundamental en la maduración de los linfocitos T. Por otra parte, es en el pronefro donde residen las funciones hematopoyéticas, produciendo células de estirpe tanto linfoide como mieloide, debido a que los peces no poseen médula ósea, el pronefro tiene funciones equivalentes a ésta, además se han demostrado similitudes morfológicas entre estos órganos. En el pronefro se expresan genes considerados específicos de líneas celulares linfoides como TdT, RAG 1 y 2 e Ikaros. El pronefro también participa en la eliminación de antígenos tanto solubles como particulados, además es el principal sitio de producción de anticuerpos. Por otro lado, el bazo es el principal órgano linfoide secundario. En peces teleósteos, se ha relacionado con la eliminación de antígenos y complejos inmunológicos, así como la iniciación de

la respuesta inmunológica adaptativa. En bazo y en pronefro se forman centros de melano-macrófagos, lo que ha sugerido que estos órganos podrían actuar como análogos de centros germinales. Por último, a diferencia de mamíferos, los peces carecen de nódulos linfoides (Zwollo *et al.*, 2005; Zapata *et al.*, 2006; Verburg-van Kemenade *et al.*, 2013).

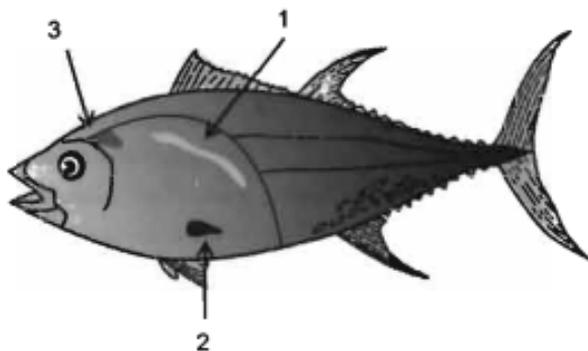
**Tabla 1. Principales componentes de la respuesta inmunológica de peces**

	<b>Innata</b>	<b>Adaptativa</b>
<b>Humoral</b>	Péptidos antimicrobianos:	Anticuerpos:
	Lectinas	IgM
	Lisozima	IgD
	Complemento (C3)	IgT/IgZ
	PRR: TLR, NLR	
<b>Celular</b>	Macrófagos	
	Neutrófilos	
	Eosinófilos	Linfocitos T
	Mastocitos	Linfocitos B
	Rodlet	
	NCC	

Adaptado de Toledo-Ibarra *et al.*, 2013



**Figura 1.** Evolución del sistema inmunológico de peces, comparación de mecanismos de inmunidad entre los grupos de peces. LRR: dominios repetidos ricos en leucina, MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, RAG: gen activador de recombinación, TCR: receptores de células T, VLR: receptores variables de linfocitos.



**Figura 2.** Órganos del sistema inmunológico en peces óseos: pronefro (1), bazo (2), timo (3) (Toledo-Ibarra *et al.*, 2013).

## Mecanismos de inmunidad Innata

La respuesta inmunológica innata es de primordial importancia en peces, los mecanismos de inmunidad innata son los primeros en responder frente a un antígeno, reconociéndolo de una forma "genérica" (Rauta *et al.*, 2012). El inicio de la respuesta inmunológica innata comienza con el reconocimiento de marcadores moleculares de virulencia que normalmente no se expresan en el hospedero, los cuales han sido llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), este reconocimiento lo realizan mediante receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), en peces los mejores caracterizados son los Receptores Tipo Toll (TLR) y tipo NOD (NLR). Una vez activados estos receptores, se inducen distintos mecanismos de respuesta, como la liberación de citocinas pro y anti inflamatorias, aumento de opsonización, fagocitosis y la subsecuente producción de ROS (especies reactivas de oxígeno). Así mismo, se activan elementos de respuesta inmunológica no específica, entre los que se encuentran factores humorales como péptidos antibacteriales, peroxidasa, lisozima, lectinas, proteínas de fase aguda y sistema complemento, los cuales actúan como primera línea de defensa contra antígenos y además tienen un papel instructor para los mecanismos de inmunidad adaptativa (Boshra *et al.*, 2006; Magnadottir, 2006; Álvarez-Pellitero, 2008; Saurabh y Sahoo, 2008; Rauta *et al.*, 2012).

Respecto a los mecanismos celulares de inmunidad innata, los diferentes tipos de leucocitos identificados en peces teleosteos, que son morfológica y funcionalmente equivalentes a los encontrados en mamíferos, son macrófagos, neutrófilos, monocitos y eosinófilos. Sin embargo, los leucocitos en peces están escasamente caracterizados hasta el momento (Rauta *et al.*, 2012). En este sentido, los neutrófilos en peces tienen similitudes morfológicas, histoquímicas y funcionales a los neutrófilos de mamíferos, poseen actividad fagocítica, quimiotáctica y bactericida con intenso estallido respiratorio y actividad peroxidasa (Palic' *et al.*, 2007). Al igual que los neutrófilos, los granulocitos acidófilos y monocitos/macrófagos tienen actividad fagocítica, estas células son capaces de

migrar al sitio de infección/inflamación y destruir a los microorganismos patógenos o células infectadas (Mulero *et al.*, 2008). Por otro lado, los eosinófilos se han asociado con la respuesta ante parásitos, estas células en su interior contienen gránulos con peroxidasa eosinófila, la cual es altamente tóxica para patógenos. Sin embargo, la terminología y naturaleza de las células eosinófilas de peces aún es controversial. Los mastocitos en su interior contienen gránulos con fosfatasa ácida y alcalina, arilsulfatasa, 5'-nucleotidasa, lisozima, peroxidasa, serotonina, histamina y péptidos antimicrobianos como piscidinas y pleurocidina. Los mastocitos se encuentran cerca de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas asociadas a tejido conectivo y son capaces de migrar al sitio de infección, especialmente en parasitosis. Por lo que debido a su ubicación y contenido granular se ha sugerido que los mastocitos en peces podrían ser análogos tanto en estructura como en funcionalidad a los encontrados en mamíferos (Sfacteria *et al.*, 2015). Por otro lado, se han descubierto única y exclusivamente en peces teleosteos las células rodlet, células granulares que se encuentran asociadas al tejido epitelial, mesotelial y endotelial. Son células que se incrementan frente a situaciones o agentes estresantes como daño a tejido o la presencia de virus, parásitos o toxinas, sin embargo, su función precisa aún es desconocida (Álvarez-Pellitero *et al.*, 2008; Cuesta *et al.*, 2011).

La citotoxicidad mediada por células es otro de los mecanismos de inmunidad innata más importante, principalmente frente a patógenos. Esta respuesta está mediada por granulocitos acidófilos, monocitos/macrófagos y células citotóxicas no específicas. Estas últimas son mediadores contra parásitos, células tumorales y células infectadas por virus. Posiblemente representan un precursor de las células NK en mamíferos (Álvarez-Pellitero, 2008; Cuesta *et al.*, 2011). Es así como tanto componentes humores y celulares en conjunto limitan la dispersión del patógeno e inician la reparación del tejido (Magnadottir, 2006; Álvarez-Pellitero, 2008; Nakanishi *et al.*, 2011).

## Mecanismos de inmunidad adaptativa

Los peces son los vertebrados más antiguos en términos evolutivos que poseen un sistema inmunológico adaptativo, estos mecanismos juegan un papel vital en la protección contra infecciones recurrentes, proveen la habilidad para reconocer y "recordar" antígenos específicos, produciendo una respuesta más intensa y rápida en encuentros posteriores con el antígeno. Los mecanismos de inmunidad adaptativa incluyen linfocitos, inmunoglobulinas, receptores de células T (TCR), receptores de células B (BCR), y complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), rearreglo genético en receptores de linfocitos, así como actividad de enzimas RAG, lo que permite la selección clonal de células B y T (Flajnik *et al.*, 1999; Hansen y Strassburger, 2000; Suetake *et al.*, 2004; Rauta *et al.*, 2012).

En peces teleósteos se ha demostrado la presencia de linfocitos T y B, por ejemplo, se han reportado marcadores de linfocitos T como CD3, CD4 y CD8a. Mientras que para la identificación de los linfocitos B en teleósteos, se han caracterizado factores de transcripción como Ikaros, E2A, EBF1, Pax5, Blimp1 y Xbp1, los cuales son esenciales en el desarrollo de células B (Zwollo *et al.*, 2005; Laing y Hansen, 2011; Rauta *et al.*, 2012). Los linfocitos son capaces de mediar la respuesta inmunológica mediante anticuerpos, los cuales son capaces de neutralizar virus, facilitar la fagocitosis mediante opsonización y activar la vía clásica del complemento. En peces teleósteos, el principal anticuerpo es IgM, la forma más común es tetramérica pero también es posible encontrarlo de forma monomérica o dimerica. Mientras que IgD es principalmente localizado en la membrana celular de los linfocitos B, posiblemente actuando como receptor de membrana. Otras clases de inmunoglobulinas descubiertas recientemente son IgT (tau; para teleósteos) e IgZ (en *Danio rerio*), las cuales se encuentran principalmente en mucosas como intestino, branquias y piel, al parecer están restringidas a peces óseos (Zhang *et al.*, 2011; Zwollo, 2011).

## Citocinas

Las citocinas actúan como moduladores de la respuesta inmunológica tanto de los mecanismos innatos como adaptativos (Kaiser *et al.*, 2004). Son principalmente las citocinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, comúnmente empleadas en la regulación en peces. Por ejemplo, IL-1 es producida principalmente por macrófagos, ha sido caracterizada en peces óseos, siendo un importante mediador de la inflamación. Además tiene un efecto directo sobre el eje hipotalámico-pituitario-interrenal, estimulando la secreción de cortisol. Otra importante citocina es TNF- $\alpha$ , la cual ha sido clonada y caracterizada en distintos tipos de peces. Se ha probado que la proteína tipo TNF induce apoptosis, aumenta la migración de neutrófilos y el estallido respiratorio de macrófagos. Así mismo, TNF- $\alpha$ , también tiene un papel importante en la respuesta neuro-inmunoendocrina en peces (Rauta *et al.*, 2012). Por otro lado, en estos organismos también han sido identificadas citocinas de la familia de interferón y quimiocinas, de ésta última se incluyen miembros de las subfamilias CXC y CC (Alejo y Tafalla, 2011; Zou y Secombes, 2011). Por lo anterior, es evidente que las citocinas están conservadas en los vertebrados inferiores y que se muestran funciones similares a las que se encuentran en otros organismos superiores (Laing *et al.*, 2001; Laing y Secombes, 2004; Secombes *et al.*, 2011; Rauta *et al.*, 2012).

### 1.1.1.1. Factores que modulan al sistema inmunológico de peces

Los mecanismos de comunicación entre los elementos del sistema inmunológico en peces son muy sensibles y están condicionados por su naturaleza poiquiloterma, así también pueden ser alterados por factores estresantes presentes en el ambiente (bióticos y abióticos) (Chen *et al.*, 2002; Tort, 2011; Al-Ghanim, 2012; Rauta *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013). Un ejemplo son los plaguicidas organofosforados (POF), sustancias que pueden causar alteraciones estructurales o funcionales en la respuesta inmunológica innata o adaptativa de los peces, lo

que conlleva entre otras cosas a un incremento en la susceptibilidad a infecciones, repercutiendo en el ecosistema acuático o bien en la producción pesquera (Blakley *et al.*, 1999).

### **1.1.2. Peces como modelo de estudio**

Los peces aparecieron en el planeta aproximadamente hace más de 500 millones de años, son el grupo de vertebrados más abundante y diverso con más de 27,000 especies, de las cuales 20,000 son peces teleósteos (peces óseos), por lo que representan más de la mitad de todos los vertebrados en el planeta. Estos organismos poseen un sistema inmunológico innato y adaptativo desarrollado, así como órganos inmunológicos homólogos a los que se encuentran en el sistema inmunológico de mamíferos (Rauta *et al.*, 2012), por lo que han sido utilizados como modelo de estudio útiles en los campos de biología celular, inmunología, toxicología, neurobiología, etc., emergiendo como una alternativa a los modelos de pequeños mamíferos en la investigación biomédica (Popescu *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2013). Así mismo, desde un punto de vista evolutivo, la investigación sobre vertebrados inferiores es imprescindible para una mejor comprensión de la filogenia de los organismos. Además, debido a que los peces están íntimamente relacionados con el ambiente, son modelos útiles en la evaluación del daño potencial causado por contaminantes sobre el ecosistema (Dogan y Can, 2011).

#### **1.1.2.1. Tilapia nilótica**

La tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (figura 3) es una especie de pez teleósteo, perteneciente a la familia *Cichlidae* en el orden de los Perciformes (FAO, 2015). Es un pez originario del continente africano que en las últimas décadas ha sido introducido de manera satisfactoria en prácticamente todas las regiones tropicales y subtropicales (Vega-Villasante *et al.*, 2010), según datos publicados por la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) en el año 2013, en México se produjeron 102,039 toneladas de tilapia, lo que representó

una derrama económica de 1.8 billones de pesos (CONAPESCA, 2013). Mientras que a nivel mundial, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el año 2012 reportó una producción de 3,197,330 toneladas, posicionando la producción de tilapia como el segundo grupo más importante de peces cultivados a nivel mundial (FAO, 2013).

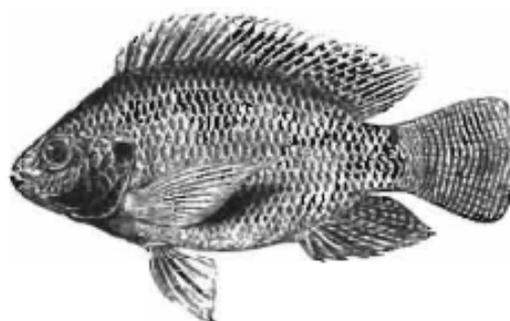


Figura 3. Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (FAO, 2013)

Entre las cualidades que han hecho a la tilapia una especie rentable en la acuicultura son su rápido crecimiento, buena conversión alimenticia, fácil reproducción y alta adaptabilidad a diferentes ambientes, así mismo son tolerantes a cambios en factores ambientales, tales como temperatura, salinidad, pH y variaciones en los niveles de oxígeno. Estos organismos poseen bajo costo de producción, soportan altas tasas de densidad de siembra y aceptan varios tipos de alimento. Todo lo anterior ha contribuido a que la producción de tilapia sea una actividad importante, cuya producción es una alternativa en la generación de empleos y la producción de alimento de alta calidad nutricional para la población (Fitzsimmons, 2000; Vega-Villasante *et al.*, 2010). Además de su evidente importancia económica, social y ecológica, la tilapia nilótica es una especie muy resistente, que sólo desarrolla infecciones cuando factores abióticos afectan el funcionamiento de su sistema inmune por lo que considera un buen modelo de estudio en inmunotoxicología (Zaitseva *et al.*, 2006; Casas-Solis *et al.*, 2007; Tellez-Bañuelos *et al.*, 2009).

## 1.2. Plaguicidas

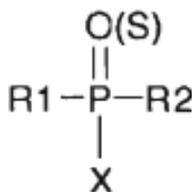
La ley General de Salud define a los plaguicidas como "cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destinen a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, así como las sustancias defoliantes y las desecantes" (Artículo 278, Ley general de salud 1992).

Estas sustancias se pueden clasificar en función de algunas de sus características principales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2004) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda. Mientras que, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) sugiere su clasificación por características como: concentración, organismo que controla, modo de acción, composición química, persistencia, uso al que se destina y familia química. De acuerdo a esta última categoría, los plaguicidas se subclasifican en diversas familias químicas, que incluyen compuestos organoclorados, organofosforados e inorgánicos (COFEPRIS, 2004).

En los últimos años se ha incrementado el uso de plaguicidas tanto a nivel agrícola como en campañas de salud pública, debido a que permiten el control de plagas y enfermedades en agricultura y ganadería, reduciendo las pérdidas en la producción de alimentos, además de un mayor control de vectores. No obstante, este incremento en el uso de plaguicidas se acompaña de una aplicación inadecuada e indiscriminada, además del desconocimiento de los posibles daños ocasionados a la salud y al ambiente (Hernández-González *et al.*, 2007; Al-Ghanim, 2012).

### 1.2.1. Plaguicidas Organofosforados

Los POF son ésteres del ácido fosfórico, en su estructura poseen un átomo de fósforo pentavalente y un característico enlace P=S ó P=O. En el primer caso, se denominan "tionos", los cuales son inhibidores pobres de la colinesterasa, no obstante, son capaces de penetrar las membranas biológicas más rápidamente que los oxones, los cuales se forman cuando el átomo que se une al fósforo con el doble enlace es el oxígeno, estos compuestos denominados oxones, son potentes inhibidores de la enzima colinesterasa y de otras esterasas. Los POF en su estructura poseen dos sustituyentes alquil (R1 y R2) que comúnmente son grupos alcoxi, además poseen un grupo saliente (X), el cual es más fácil de ser hidrolizado (figura 4) (Costa 2006; Gupta y Milatovic 2012).



**Figura 4.** Estructura química de POF. R1 y R2 pueden ser grupos alquilo, alcoxi o amino X puede ser flúor, cloro, fosfato, carbaxilato (Klaassen *et al.*, 2001).

Entre sus propiedades fisicoquímicas debe destacarse que son compuestos poco volátiles, con baja persistencia, muchos de ellos presentan fotólisis directa e indirecta, son poco solubles en agua, liposolubles y estables a pH neutro, casi todos son hidrolizados a pH básicos. Son biodegradables tanto por reducción como por oxidación. En humanos no son bioacumulables, sin embargo, sus características fisicoquímicas favorecen la absorción por piel, pulmones y aparato gastrointestinal (Klaassen *et al.*, 2001; Moreno-Grau 2003). Aunque los POF tienen limitada persistencia en el ambiente, son altamente tóxicos para los seres vivos y son responsables de la mayoría de las intoxicaciones accidentales, por lo

que su uso es considerado un problema de salud pública mundial (Vittozzi *et al.*, 2001; Terry, 2012).

### 1.2.1.1. Diazinón

El plaguicida diazinón (CAS 333-41-5) (O,O-Dietil-O-(2-isopropil-6-metil-pirimidin-4-il) fosforotioato) (figura 5) es un POF utilizado ampliamente como insecticida para el control de plagas del hogar, industria, campo y granjas, así como antiparasitario en la acuicultura, por lo cual existe una evidente preocupación del riesgo potencial a la salud humana así como del daño ecológico causado por diazinón. La presencia de este tipo de contaminantes en ecosistemas acuáticos tiene diversos efectos adversos, entre ellos la alteración en la respuesta inmunológica de los peces, resultando en susceptibilidad a infecciones (NRA 2002; Khoshbavar-Rostami *et al.*, 2006).

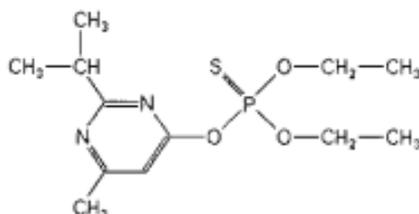


Figura 5. Estructura química de diazinón (Poet *et al.*, 2004)

#### 1.2.1.1.1. Características fisicoquímicas de diazinón

Es primordial conocer las propiedades fisicoquímicas de diazinón (tabla 2) para comprender su destino en el ambiente, transporte e interacción con los organismos. Diazinón tiene una presión de vapor de  $9.01 \times 10^{-5}$  mm Hg (25 °C), una constante de la ley de Henry de  $1.17 \times 10^{-7}$  atm m<sup>3</sup>/mol (23 °C) y una baja

volatilidad, lo que indica que tiene potencial para lixiviarse, ya que la volatilización desde el suelo es un destino ambiental poco importante para este plaguicida, además al tener una presión de vapor baja, puede solubilizarse en agua o ser retenido en el suelo. La solubilidad en agua es de 40 mg/L (25 °C), lo que indica que es soluble en agua, pero también lo es en éter de petróleo, éter, ciclohexano, benceno e hidrocarburos similares. Por otro lado, el coeficiente de partición octanol-agua (Kow) proporciona un valor de la polaridad del plaguicida y es frecuentemente utilizado para determinar cómo se distribuye en tejido graso. Diazinón tiene un log Kow de 3.81, que indica que tiene un valor intermedio alto, es decir, que tiene afinidad por tejido graso y por lo tanto tiene capacidad de bioacumulación (Durmaz *et al.*, 2006; INECC, 2015)

En lo que respecta a la estabilidad de diazinón, en medios neutros es estable, pero se hidroliza lentamente en medios alcalinos y más rápidamente en medios ácidos, además se descompone al calentarse por encima de los 120 °C, produciendo gases tóxicos incluyendo los óxidos de nitrógeno, óxidos de fósforo y óxidos de azufre. Otra característica importante es la persistencia en el ambiente, la cual se relaciona con la capacidad que tiene el plaguicida para retener sus características físicas, químicas y funcionales en el medio durante un período de tiempo después de su emisión. Diazinón está clasificado como poco persistente en el ambiente, con una vida media menor a 6 semanas, es importante tomar en cuenta este factor ya que los plaguicidas que persisten más tiempo, tienen mayor probabilidad de interactuar con el ecosistema (Durmaz *et al.*, 2006; INECC, 2015).

En lo que respecta a la toxicidad, la OMS (2004) coloca a diazinón en la categoría II, como moderadamente peligroso; por lo que las propiedades de diazinón implican cierto nivel de riesgo agudo tanto al ambiente como a la salud humana.

**Tabla 2. Principales características fisicoquímicas de diazinón**

Características	
Forma	Líquido
Color	Pardo
Olor	Ligeramente a éster
Peso molecular	304.4 g/mol
Punto de ebullición	83 – 84 °C (0.002 mmHg)
Densidad	1.008 – 1.022 (20 °C)
Presión de vapor	$9.01 \times 10^{-5}$ mm Hg ( 25 °C)
Solubilidad	40 ppm
Kow	3.81
Ley de Henry	$1.17 \times 10^{-7}$ atm m <sup>3</sup> /mol (23 °C)
Persistencia	No persistente
Toxicidad	Moderadamente peligroso (II)

Tomado de INECC, 2015

#### 1.2.1.1.2. Usos y aplicaciones

Diazinón es ampliamente utilizado en la agricultura y horticultura para el control de insectos en cultivos, plantas ornamentales, césped, frutas y verduras, además en algunos países es utilizado en diversas formulaciones contra parásitos en ganado y como plaguicida en actividades domésticas y urbanas (Cox, 2000; NRA, 2002). En México, la Comisión Intersecretarial Para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) restringió el uso de diazinón a las aéreas agrícola, pecuaria, domestica, jardinería, urbana e industrial (CICOPLAFEST, 2004).

#### 1.2.1.1.3. Contaminación acuática

La expansión y optimización en las actividades agrícolas y producción industrial ha llevado a un aumento en el uso indiscriminado de POF, lo que resulta en un aumento en la contaminación de ecosistemas acuáticos (Banaee *et al.*, 2011).

Debido a sus características químicas, amplia distribución y diversidad de uso, diazinón es frecuentemente detectado en fuentes puntuales como plantas de tratamiento, así como en fuentes no puntuales en zonas urbanas y agrícolas (Durmaz *et al.*, 2006).

Cuando diazinón es emitido o liberado en la atmósfera, viaja distancias relativamente grandes antes de depositarse o ser degradado, su vida media en el aire (tropósfera) es de 1.5 horas. En el suelo persiste poco tiempo y su movilidad es moderada, la cual depende del contenido de materia orgánica y carbonato de calcio. La biodegradación es el principal mecanismo de eliminación en suelos, este proceso puede ocurrir rápidamente (vida media de 2 a 4 semanas) en condiciones favorables de temperatura (20°C), humedad y pH (ácido). Además, debido a que no se une fuertemente a las partículas, puede entrar a los cuerpos de agua (ríos, lagos o estanques) como resultado de lixiviación y escurrimiento de los suelos dedicados a la agricultura. Una vez en los cuerpos de agua, es eliminado por reacciones químicas y biológicas (fotólisis, hidrólisis y biodegradación), llegando incluso a mineralizarse en pocas semanas. Posee una vida media en agua de 5 a 15 días, lo que está fuertemente influenciado por el pH. Por último, los organismos acuáticos pueden ingerir o absorber este compuesto, bioacumulándolo debido a su capacidad lipofílica (figura 6) (Aydin y Köprücü, 2005; ATSDR, 2008; Li *et al.*, 2013; INECC, 2015).

En los organismos acuáticos como los peces (especies no blanco), diazinón ocasiona efectos tóxicos ya que estos organismos son particularmente sensibles a contaminantes presentes en el agua debido a que al entrar en el organismo dañan procesos fisiológicos y bioquímicos esenciales (Durmaz *et al.*, 2006), provocando alteraciones en diversos parámetros como la respuesta inmunológica y por lo tanto, se vuelven más susceptibles a enfermedades (Galloway y Handy, 2003). En algunos países se han reportado incidencias en mortalidad en peces debido a intoxicación por POF (Banaee *et al.*, 2011), por lo que el estudio de los efectos de

este tipo de contaminantes sobre el sistema inmunológico podría ayudar a reducir pérdidas económicas en la industria acuícola (Girón-Pérez *et al.*, 2009).

#### 1.2.1.1.4. Metabolismo de diazinón en peces

Actualmente la información sobre el metabolismo de diazinón en peces es escasa. En lo que respecta a su absorción, los peces pueden absorberlo por tres distintas rutas: oral, branquial y dérmica. La primera vía de absorción es a través de la dieta, mientras que para la absorción branquial dependerán de sus propiedades fisicoquímicas y la persistencia en el ambiente. Por otro lado, para la absorción dérmica, influirá la polaridad y solubilidad del plaguicida. Una vez absorbido, el compuesto se distribuye en el organismo y posteriormente es biotransformado a metabolitos más hidrofílicos con el objetivo de aumentar la polaridad y facilitar la eliminación. El principal órgano donde se lleva a cabo la biotransformación en peces es el hígado, aunque también se ha observado actividad en riñón, intestino y branquias, sin embargo, el mecanismo de biotransformación aún no está del todo descrito (Fanta *et al.*, 2003; Schienk, 2005).

En vertebrados, la biotransformación de diazinón es un proceso que se lleva a cabo en distintas etapas que implican su bioactivación y detoxificación (figura 7). Diazinón al ser un fosforotato (P=S), es menos electronegativo y necesita de biotransformación, la familia CYP450 cataliza la desulfuración oxidativa para formar diazoxón (P=O) o 2-isopropil-4-metil-6-hidroxipirimidina (IMHP) y dietilfosfato (DETP). Posteriormente, diazoxón es detoxificado por las enzimas hepáticas y extra-hepáticas A y B esterasas, formando IMHP y dietilfosfato (DEP) (Kappers *et al.*, 2001; Poet *et al.*, 2004; Assis *et al.*, 2012).

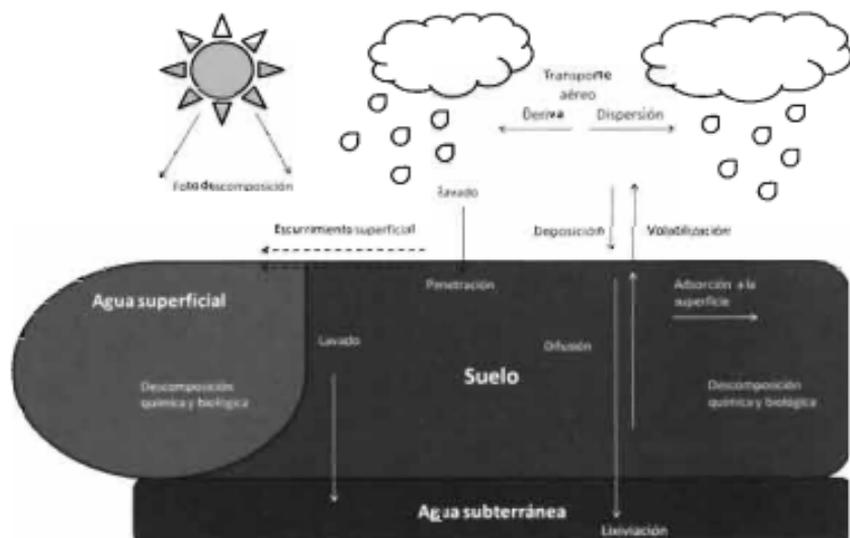


Figura 6. Esquema de distribución de POF en el ambiente (Adaptado de INECC, 2015)

Aunque el mecanismo de biotransformación de diazinón no está bien descrito en peces, existen diversos estudios que evidencian la capacidad de diversos peces (trucha, carpa, guppy, pez zebra, tilapia, entre otros) para convertir el diazinón en diazoxón mediante desulfuración oxidativa por citocromo P450 y la posterior hidrólisis del oxón en microsomas hepáticos por A-esterasas. Por otra parte, también se ha reportado que en estos organismos, tanto los compuestos padres como los oxones, pueden ser desactivados por conjugación con glutatión (Schlenk, 2005).

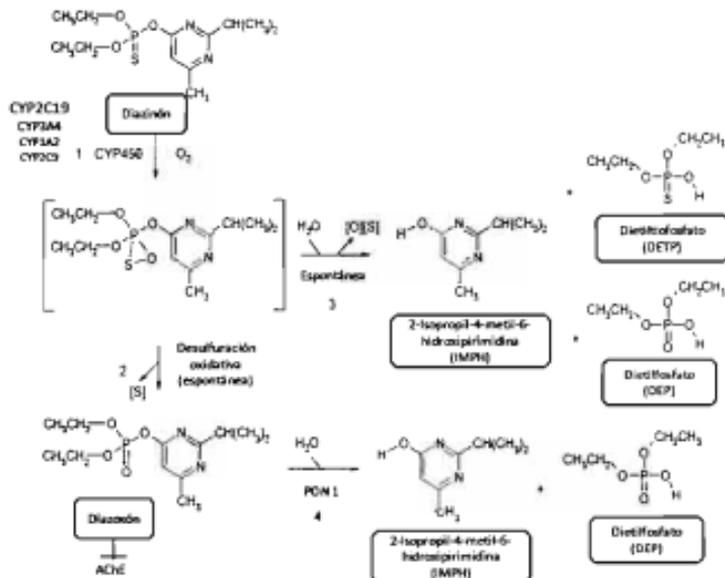


Figura 7. Mecanismo de biotransformación de diazinón en vertebrados (Kappers et al., 2001).

### 1.2.1.1.5. Efectos neurotóxicos

El principal efecto tóxico de los POF es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Aunque diazinón es capaz de inhibir la actividad enzimática, su análogo oxón posee un mayor potencial de inhibición. Este efecto inhibitorio es llevado a cabo debido a que diazoxón compite con el neurotransmisor acetilcolina (ACh) por el sitio activo de la enzima AChE (figura 8). Debido a que el átomo central de fósforo del diazoxón muestra una deficiencia de electrones, provoca una configuración electrónica favorable para la atracción hacia el sitio estereico de la enzima AChE, la cual posee un excedente de electrones. Así el fósforo forma una unión covalente con grupo hidroxil de la serina presente en el sitio activo de la enzima, formándose un complejo enzimático con poca o nula actividad, lo que impide la hidrólisis de ACh y produce su acumulación en

cantidades excesivas. Después de la liberación del grupo saliente de diazoxón, la AChE fosforilada solo puede recobrar su actividad usando oximas u otros agentes de reactivación (Poet *et al.*, 2004; Durmaz, *et al.*, 2006; Assis *et al.*, 2012).

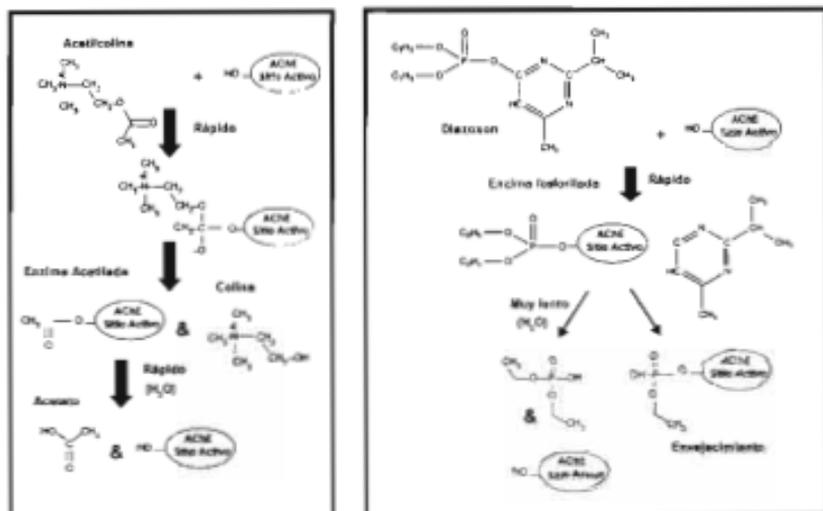


Figura 8. Mecanismo de acción de la enzima AChE e inhibición inducida por diazoxón. a) Actividad de la enzima AChE normal. b) Mecanismo de inhibición de la enzima AChE inducida por diazoxón (Adaptado de Klaassen *et al.*, 2001).

La acumulación de ACh y la subsecuente sobre-estimulación de los receptores muscarínicos (mAChR) y nicotínicos (nAChR), provoca efectos tóxicos en el sistema nervioso central y periférico (ATSDR, 2008). En los peces, la intoxicación por diazoxón provoca alteración en el nado, espasmos, hiperactividad, convulsiones y aumento de secreciones en branquias, afectando la fisiología de los organismos. Además altera el índice de supervivencia, ya que disminuye la capacidad para alimentarse y de escape, lo que finalmente puede ocasionar la muerte del organismo (Banaee *et al.*, 2011).

### 1.3. Interacciones neuro-inmunológicas

En mamíferos se ha demostrado la existencia de "interacciones neuro-inmunológicas", que consisten en una comunicación constante y bidireccional entre el sistema inmunológico y el sistema nervioso, esta relación es esencial para el mantenimiento de la homeostasis (Pavón Romero *et al.*, 2004), debido a que crea un adecuado funcionamiento de la respuesta inmunológica, que es útil para eliminar eficientemente a los agentes estresantes y de este modo minimizar el daño en el organismo (Kepka *et al.*, 2013; Verburg-van Kemenade *et al.*, 2013).

Diversos estudios muestran como elementos del sistema nervioso regulan al sistema inmunológico y viceversa, lo cual depende de una pluralidad de moléculas como son citocinas y neurotransmisores, producidas tanto por las células del sistema inmunológico como por las terminales nerviosas; estas moléculas influyen en el sistema inmunológico mediante receptores específicos expresados en leucocitos que comúnmente se encuentran acoplados a proteínas G (Verburg-van Kemenade *et al.*, 2013). Diversas funciones de la respuesta inmunológica como la quimiotaxis, proliferación celular, secreción de citocinas y anticuerpos, son moduladas por interacciones neuro-inmunológicas (Yang y Glaser, 2000).

Existe evidencia que demuestra que esta comunicación neuro-inmunológica es un fenómeno filogenéticamente conservado desde los peces teleósteos (Small y Bilodeau, 2005). Estos organismos son aptos para el estudio de la cooperación entre el sistema inmunológico y nervioso, debido a que poseen órganos donde se combinan funciones tanto inmunológicas como neuroendocrinas. Por lo que en los últimos años, el estudio de las interacciones neuro-inmunológicas en estos organismos han cobrado mayor atención (Verburg-van Kemenade *et al.*, 2013).

### 1.3.1. Sistema colinérgico neuronal

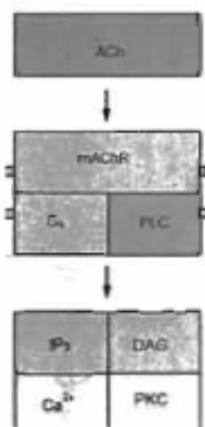
Acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y periférico. Algunas funciones fisiológicas con las que ha sido relacionado este neurotransmisor son: respuesta visual, respuesta motora, memoria, mecanismos olfatorios y neuro-inmuno modulación (Levin *et al.*, 2007; Rico *et al.*, 2011).

Este neurotransmisor es sintetizado a partir de colina y acetil-coenzima A (acetil-CoA) por la enzima colina acetil transferasa (ChAT). Posteriormente, es almacenado en vesículas presinápticas hasta que las neuronas son activadas. Una vez liberada, ACh activa la neurona postsináptica a través de receptores nicotínicos (nAChR) y/o muscarínicos (mAChR). La transmisión colinérgica que activa a los mAChR ocurre principalmente en los ganglios autónomos, órganos inervados por la división parasimpática del sistema nervioso autónomo y en el sistema nervioso central. En mamíferos, se han identificado cinco subclases de mAChR: M1, M2, M3, M4 y M5. Las subclases M1, M3 y M5 están relacionadas con respuesta del sistema nervioso central más complejas como memoria, atención y analgesia. La subclase M2 se encuentra en músculo liso y tejido cardíaco, modulando su frecuencia. Mientras que la subclase M3 se encuentra en músculo liso como bronquios y vejiga. La activación de estos receptores causa una hiperpolarización mediada por la acción directa de las proteínas G que abren los canales de calcio (tabla 3); al ser receptores metabotrópicos, están acoplados a proteínas G (Gq), las cuales activan a la enzima fosfolipasa C (PLC). Esta enzima produce un par de segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). A su vez, IP3 moviliza  $Ca^{2+}$ , y DAG activa a la proteína quinasa C (PKC) (figura 9) (Kandel *et al.*, 2001; Abreu-Villaca *et al.*, 2011).

**Tabla 3. Receptores muscarínicos asociados a proteínas G y su señalización**

mAChR (subclase)	Proteína G	Señalización
M1	Gq/11	Estimula fosfolipasa C $\beta$
M2	Gi	Inhibe adenil ciclasa
M3	Gq/11	Estimula fosfolipasa C $\beta$
M4	Gi	Inhibe adenil ciclasa
M5	Gq/11	Estimula fosfolipasa C $\beta$

Tomado de Kandel *et al.*, 2001.

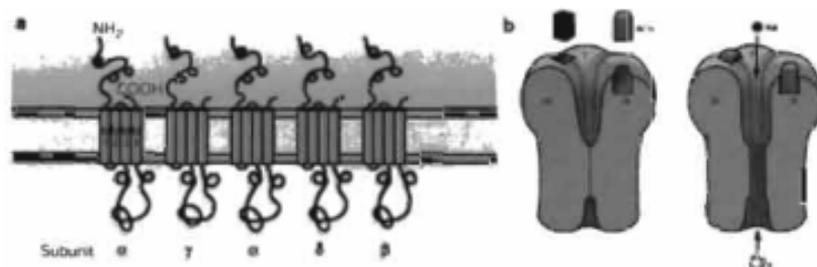


**Figura 9.** Mecanismo de activación de receptores muscarínicos. ACh: acetilcolina, Gq: proteína G, PLC: fosfolipasa C, DAG: diacilglicerol, IP3: inositol 1,4,5-trisfosfato (Kandel *et al.*, 2001).

Por otro lado, los nAChR son receptores ionotrópicos que se encuentran preferentemente en la placa neuromuscular. Estos receptores son proteínas de membrana formadas por 5 subunidades (dos  $\alpha$ , una  $\beta$ , una  $\gamma$  y una  $\delta$ ). constituyen una macro molécula con dominios extracelulares con regiones amino terminal que forma el receptor de alta afinidad para ACh, y un dominio que atraviesa la membrana formando un canal iónico (figura 10a). Para la transmisión colinérgica, dos moléculas de ACh se unen a la porción amino terminal de la subunidad  $\alpha$ , el

receptor sufre un cambio conformacional que resulta en la apertura del canal, así los iones  $K^+$  y  $Na^+$  fluyen a través de un gradiente electroquímico (figura 10b) que finalmente resulta en la despolarización de la célula efectora (Kandel *et al.*, 2001).

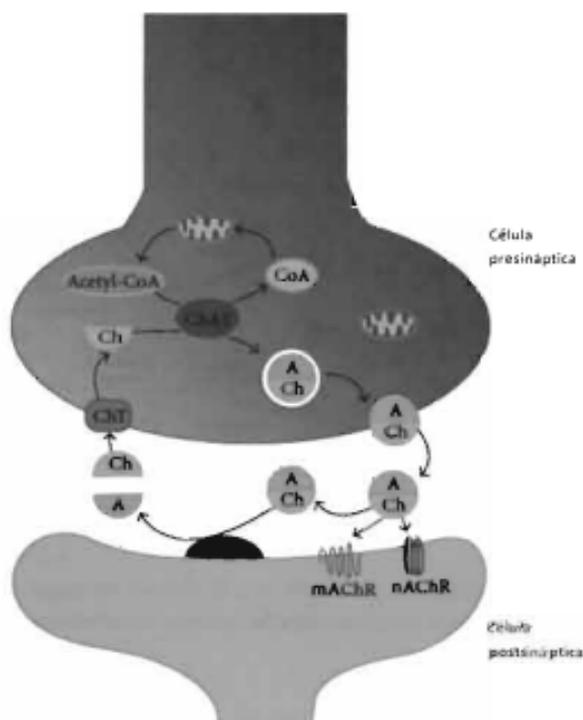
Finalmente, el estímulo inducido por el neurotransmisor es frenado cuando la ACh es degradada en acetato y colina por enzimas esterasas como AChE (figura 11) (Abreu-Villaca *et al.*, 2011; Acker *et al.*, 2011). La enzima AChE se localiza en la hendidura sináptica anclada a la membrana basal, compuesta por fibrillas de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular. Esta disposición anatómica permite que después de la disociación del neurotransmisor de su receptor, la ACh sea hidrolizada en mayor medida, además que favorece la recuperación de colina para que no se pierda por difusión fuera de la hendidura sináptica (Kandel *et al.*, 2001).



**Figura 10.** Receptor nicotínico de acetilcolina. a) Estructura de nAChR, formado por cinco subunidades con cuatro regiones transmembranales cada una. b) Modelo tridimensional del nAChR para formar un canal de iones (Kandel *et al.*, 2001).

La enzima AChE (E.C.3.1.1.8) o "colinesterasa verdadera" se encuentra principalmente en cerebro, músculo, eritrocitos y neuronas colinérgicas (Schetinger *et al.*, 2000). Sin embargo, también existe la enzima butirilcolinesterasa (BChE; E.C.3.1.1.8), denominada "pseudocolinesterasa", la

cual está presente en diferentes tejidos como intestino, hígado, riñón, corazón, pulmón y suero (Dave *et al.*, 2000; Bodur y Layer, 2011; Scacchi *et al.*, 2011). No obstante que también tiene la capacidad de hidrolizar ACh, su función fisiológica no es clara, se ha reportado que puede hidrolizar compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos que contienen ácidos carboxílicos o fosfóricos, actuando así como un posible "scavenger" endógeno de compuestos anti colinérgicos (Chuiko, 2000).



**Figura 11.** Sistema colinérgico neuronal (Toledo-Ibarra *et al.*, 2013). A: acetil, Acetyl-CoA: acetil coenzima A; AChE: acetilcolinesterasa, Ch: colina, ChAT: colina acetil transferasa, ChT: transportador de colina, CoA: coenzima A, mAChR: receptores muscarínicos de acetilcolina, nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina.

### 1.3.1.1. Sistema colinérgico neuronal en peces

El neurotransmisor ACh posee importancia evolutiva y filogenética, se ha descrito que muchos de los componentes del sistema colinérgico están presentes desde organismos unicelulares hasta mamíferos (Wessler *et al.*, 1999). En este sentido, se han caracterizado elementos del sistema colinérgico en distintas especies de peces (Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008; Fico *et al.*, 2011), por ejemplo en pez zebra (*Danio rerio*) se han detectado neuronas colinérgicas en prácticamente todas las regiones del cerebro (Mueller *et al.*, 2004; Arenzana *et al.*, 2005) (figura 12).

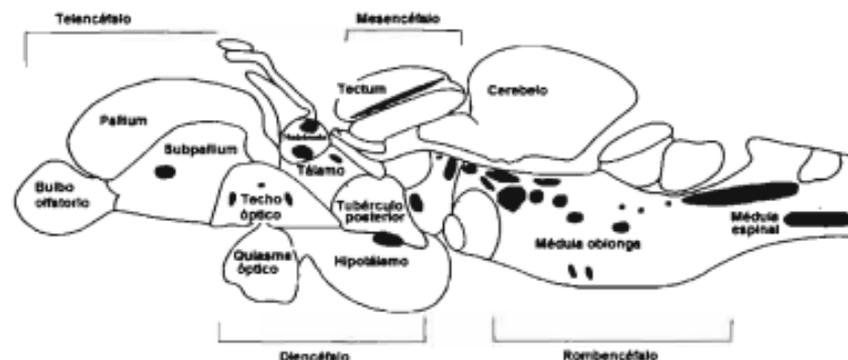


Figura 12. Vista sagital del cerebro de pez adulto que esquematiza todas las poblaciones neuronales nerviosas colinérgicas centrales (adaptado de Mueller *et al.*, 2004)

La información obtenida de este sistema en peces sugiere diversas funciones de los distintos tipos de mAChR al ser estimulados; el mAChR M2 se asocia en la regulación de la frecuencia cardiaca en estados de hipoxia en la larva del pez zebra, induciendo la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular que dirige una señalización nuclear y sobre regula la expresión de algunos genes. Mientras que, los mAChR

M1, M3 y M5 están acoplados a PLC, que ayuda a la síntesis de NO, cGMP e induce citotoxicidad; sin embargo, M5 también está regulado por estímulos inmunológicos, además se ha mencionado que la estimulación de TCR/CD3 activa el sistema colinérgico aumentando la expresión de ChAT y M5 (Steele *et al.*, 2007). En lo que respecta a los nAChR, en el pez zebra se expresan los receptores nicotínicos funcionales  $\beta 3$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 7$ , estos receptores muestran un alto grado de similitud con los receptores presentes en mamíferos (Zirger *et al.*, 2003; Bencan y Levin, 2008). Por otro lado, la enzima AChE se ha caracterizado en tejido cerebral de diferentes peces tropicales, como pirarucu (*Arapaima gigas*), cobia (*Rachycentron canadum*) y tilapia nilótica (*O. niloticus*) (Assis *et al.*, 2012).

### 1.3.2. Sistema colinérgico no neuronal

Se ha demostrado recientemente en modelos mamíferos que las células del sistema inmunológico poseen toda la maquinaria bioquímica y molecular necesaria para generar *de novo* ACh, es decir, los leucocitos expresan los componentes colinérgicos expresados en neuronas pero de forma independiente del sistema colinérgico neuronal, constituyendo un sistema colinérgico no neuronal, el cual podría tener un papel importante en la regulación de la respuesta inmunológica (Wessler *et al.*, 1999; Kawashima y Fujii 2000; Abreu-Villaca *et al.*, 2011).

Esta información fue evidenciada gracias a numerosos estudios publicados por Kawashima *et al.* (1997, 2000, 2003, 2012), en los cuales primeramente demostraron que la presencia de ACh en sangre se originaba preferentemente de la fracción de leucocitos mononucleares sobre la fracción roja o de polimorfonucleares. Posteriormente, se evidenció la síntesis de ACh catalizada por ChAT principalmente en células T CD4<sup>+</sup> y en menor medida en células CD8<sup>+</sup>, células dendríticas, granulocitos, macrófagos o mastocitos. Así mismo, se demostró que la síntesis de ACh es un proceso regulado, en el cual es necesaria la activación de células T mediante la presentación de antígeno vía receptor TCR/CD3 con la interacción con células presentadoras de antígeno; sistema que pudiese ser regulado por PKC, PKA (proteína cinasa A) así como cambios en el

flujo de  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, la información sobre la liberación de ACh por los linfocitos T aun no es completamente clara, ya que los mecanismos de almacenamiento y liberación difieren de los del sistema nervioso, se ha propuesto que la ACh es sintetizada cuando es necesaria y liberada directamente sin almacenarse.

Una vez liberada, la ACh actúa como factor autócrino o parácrino, dirigiendo la señalización vía receptores de ACh (AChRs) presentes en las células propias del sistema inmunológico. Las células del sistema inmunológico, incluyendo linfocitos, células dendríticas, monocitos y macrófagos expresan en diferente medida los cinco subtipos de mAChR (M1-M5) y nAChR (varias subunidades). Su estimulación causa cambios funcionales y bioquímicos en dichas células como aumento de citotoxicidad, proliferación celular, acumulación de IP3 e incremento de  $Ca^{2+}$ , sobrerregulación de c-fos, aumento de NO e inducción en la transducción de señales de IL-2. Resultados obtenidos con organismos *knockout* demostraron el papel regulatorio de estos receptores sobre el sistema inmunológico, M1/M5 sobrerregulan la producción de citocinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6, lo que facilita la síntesis de IgG, probablemente por la polarización de los linfocitos T a una respuesta Th2. En contraste, los nAChR se han relacionado con una disminución de la producción de anticuerpos y de las citocinas proinflamatorias (Fujii *et al.*, 2008; Roshchina, 2010; Kawashima *et al.*, 2012).

Además, se ha detectado actividad de AChE en células T, expresión de mRNAs en leucocitos mononucleares, así como la expresión de esta proteína tanto en células B como T. Se ha observado una modulación en la actividad de la enzima vía receptores M1/M5 pero de forma independiente con los nAChR. Lo que indica que la activación de las células T mediante estímulo antigénico sobrerregula la síntesis de ACh, la expresión de los mAChR y la degradación de ACh. Por lo anterior, se puede sugerir una regulación recíproca entre el sistema inmunológico y los elementos del sistema colinérgico no neuronal presente en células del sistema inmune (Kawashima *et al.*, 2012).

## 2. Antecedentes

En años recientes, se ha reportado que diversos POF, como clorpirifos, malatión, diazinón, entre otros, poseen un efecto inmunotóxico sobre diversos organismos, incluyendo los peces, pudiendo afectar al sistema inmunológico a diversos niveles, desde barreras físicas hasta mecanismos de respuesta innata y adaptativa (Soltani y Pourgholam, 2007; Girón-Pérez *et al.*, 2009; Banaee *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Kaya *et al.*, 2014; Díaz-Resendiz *et al.*, 2015).

En el caso específico de los efectos inmunotóxicos de diazinón, se ha evidenciado que este plaguicida puede alterar parámetros humorales y celulares (tabla 4). En el primer caso, se ha reportado que en beluga (*Huso huso*) expuesta de forma aguda a diazinón (1.5 mg/L), la actividad de lisozima incrementó significativamente en hígado y bazo (Khoshbavar-Rostami *et al.*, 2006). Sin embargo, en carpa (*Ctenopharingodon idella*) expuesta de forma aguda a diazinón (2 y 5 mg/L), la actividad enzimática de lisozima disminuyó significativamente en pronefro y en plasma (Soltani y Pourgholam, 2007). Así mismo, existen reportes que mencionan que en tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuesta a diazinón (1.96 mg/L), los niveles plasmáticos de IgM incrementan significativamente en plasma (Girón-Pérez *et al.*, 2008).

Por otra parte, se ha reportado que diazinón también puede alterar parámetros de la respuesta celular, existe evidencia que demuestra que la exposición en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) y en carpa (*Cyprinus carpio*) provoca una disminución en leucocitos, mostrando una mayor disminución en el porcentaje de linfocitos, monocitos y basófilos (Banaee *et al.*, 2008; Ahmadi *et al.*, 2014). Sin embargo, diazinón además de alterar el número de células, también afecta la morfología y funcionalidad, Dutta *et al.* (1997) mencionan que en el pez *Lepomis macrochirus* posterior a la exposición a diazinón (15, 30, 45, 60 y 75 µg/L) se observan cambios en el tamaño de macrófagos presentes en riñón y bazo; en lo que respecta a la funcionalidad celular, Girón-Pérez *et al.*, (2009) señalan que

diazinón afecta el Índice de fagocitosis en esplenocitos de tilapia nilótica expuesta *in vivo* a concentraciones de 3.91 y 7.83 mg/L. Respecto al efecto sobre la capacidad proliferativa de los linfocitos, se ha reportado que ésta disminuye significativamente tras la exposición *in vivo* a diazinón (1.95, 3.91 y 7.83 mg/L) durante 96 h en tilapia nilótica (Girón-Pérez *et al.*, 2007; Girón-Pérez *et al.*, 2008; Girón-Pérez *et al.*, 2009).

No obstante que existe evidencia que diazinón posee propiedades inmunotóxicas, el mecanismo por el cual modula el sistema inmunológico aún es desconocido (Li, 2007). Girón-Pérez *et al.* (2008) sugieren que este plaguicida no tiene efecto inmunotóxico directo, debido a que en estudios *in vitro*, la exposición a diazinón (1, 2, 5 y 10 ppm) o su metabolito diazoxón (5, 10 y 20 ppm) no altera la proliferación de linfocitos de tilapia. Sin embargo, al evaluar *in vitro* la proliferación de linfocitos después de exponerlos a 40 y 80  $\mu$ M de ACh (concentraciones similares a las alcanzadas en exposiciones *in vivo* a diazinón), se observó que la alta concentración de este neurotransmisor disminuye significativamente la proliferación de linfocitos. Debido a que diazinón tiene como molécula blanco la enzima AChE y provoca un incremento de los niveles de ACh, la existencia de un sistema colinérgico no neuronal en linfocitos, los hace susceptibles a la perturbación por POF (Charoenying *et al.*, 2011). Lo que sugiere la participación del sistema colinérgico no neuronal de linfocitos en las propiedades inmunotóxicas de diazinón.

**Tabla 4. Efectos inmunotóxicos de diazión en peces teleosteos**

Concentración	Tiempo	Efecto	Tejido	Especie	Referencia
<b>Inmunidad humoral</b>					
1.5 mg/L	1-7 días	Lisozima ↑	Bazo	Beluga	Khashbavar et al. 2006
	21-63 días	Lisozima ↓		<i>Husa huso</i>	
2 y 5 mg/L	35-63 días	Lisozima ↓	Plasma	Carpa <i>Ctenopharyngodon idella</i>	Soltani y Pourgholam, 2007.
	63 días	Lisozima ↓	Pronefro		
	7 días	Lisozima ↑	Bazo		
	1 día	Lisozima ↓	Plasma		
0.1 y 0.2 mg/L	7 días	Lisozima ↑	Pronefro	Trucha arcoiris	Ahmadi K. et al. 2014
	30 días	Lisozima ↓	Plasma	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	
0.1 y 0.2 mg/L	7-20 días	Globulinas ↓	Plasma	Trucha arcoiris <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ahmadi K. et al. 2014
1.98 mg/L	4 días	IgM ↑	Plasma	Tilapia nilótica <i>Oreochromis niloticus</i>	Girón-Pérez et al. 2009
<b>Inmunidad celular</b>					
1.95, 3.91 y 7.83 mg/L	4 días	Linfoproliferación ↓	Linfocitos	Tilapia nilótica <i>Oreochromis niloticus</i>	Girón-Pérez et al. 2007
60 y 120 µg/L	10-30 días	WBC ↓	Sangre	Trucha arcoiris <i>Cyprinus carpio</i>	Banaee et al. 2008
		Linfocitos ↓			
		Monocitos ↓			
		Neutrófilos ↑			
		Eosinófilos ↑			
Basófilos ↓					
3.91 y 7,83 mg/L	4 días	Índice fagocítico ↓	Sangre	Tilapia nilótica <i>Oreochromis niloticus</i>	Girón-Pérez et al. 2009
1.98 mg/L	4 días	Estallido respiratorio ↓	linfocitos	Tilapia nilótica <i>Oreochromis niloticus</i>	Girón-Pérez et al. 2009

### **3. Planteamiento del Problema**

Diazinón es un plaguicida comúnmente utilizado en México y en el mundo en diversas actividades para el control de plagas y vectores de enfermedades. Se ha demostrado el efecto supresor de diazinón sobre el sistema inmunológico de tilapia nilótica, organismos distribuidos ampliamente en regiones tropicales y que poseen importancia ecológica y económica. Además en años recientes se han utilizado como organismos bioindicadores en el área de inmunotoxicología.

En la actualidad no existen reportes que expliquen los posibles mecanismos de inmunotoxicidad de diazinón en peces. Por lo que es necesario realizar investigaciones que coadyuven a conocer el efecto de diazinón en linfocitos de tilapia nilótica y así poder elucidar posibles mecanismos de inmunotoxicidad.

### **4. Justificación**

En los últimos años se ha incrementado de manera significativa el nivel de contaminación acuática a causa del uso indiscriminado de sustancias tóxicas, como los plaguicidas organofosforados, los cuales pueden afectar procesos fisiológicos, como la respuesta inmunológica de organismos acuáticos.

Aunque se sabe que el diazinón tiene propiedades inmunotóxicas, la información actual no es suficiente para proponer un mecanismo de inmunoregulación de este compuesto. Por lo que en el presente trabajo, se evaluará la participación del sistema colinérgico no neuronal presente en células mononucleares, probablemente involucrado en el mecanismo de inmunotoxicidad de diazinón. Con lo cual, por un lado se obtendrán datos para proponer un mecanismo por medio del cual este tipo de plaguicidas inducen inmunosupresión en peces, y por otro, comprender más sobre la comunicación neuro-inmunológica en vertebrados.

## 5. Hipótesis

Los linfocitos de tilapia nilótica (*O. niloticus*) poseen un sistema colinérgico no neuronal, el cual es alterado por la exposición a diazinón y puede estar involucrado en el mecanismo de inmunotoxicidad de este plaguicida.

## 6. Objetivos

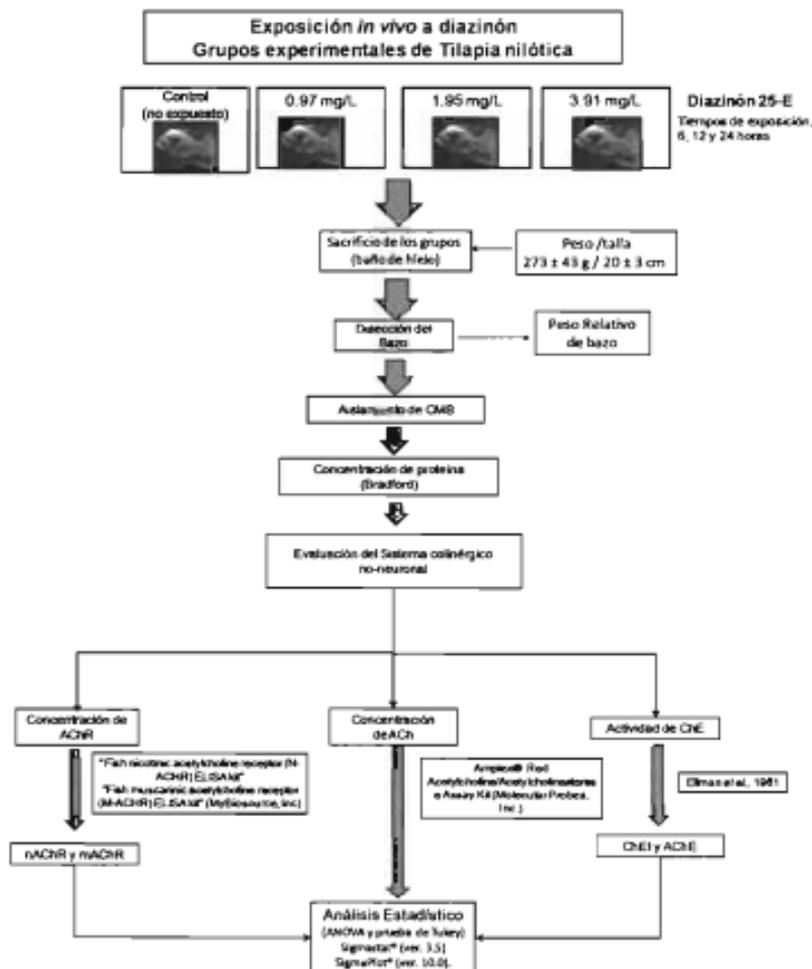
### 6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del diazinón sobre el sistema colinérgico no neuronal en linfocitos de tilapia nilótica.

### 6.2. Objetivos específicos

- Determinar el peso relativo del bazo, así como la concentración de proteína en linfocitos de tilapia nilótica expuestos *in vivo* a diazinón.
- Determinar la actividad de acetilcolinesterasa en linfocitos de tilapia nilótica expuestos *in vivo* a diazinón.
- Determinar la concentración de acetilcolina en linfocitos de tilapia nilótica expuestos *in vivo* a diazinón.
- Determinar la concentración de receptores nicotínicos y muscarínicos en linfocitos de tilapia nilótica expuesta *in vivo* a diazinón.

## 7. Diagrama experimental



## 8. Metodología

### 8.1. Organismos de experimentación

Tilapia nilótica (*O. niloticus*) macho adultos fueron obtenidos de una granja local, aclimatados en pilas de 400 L a temperatura ( $28 \pm 2$  °C) y aireación (oxígeno 6.0 mg/L) constante. Los peces fueron alimentados con alimento comercial Winfish®, correspondiendo al 3% de su peso.

### 8.2. Exposición *in vivo* a diazinón

Previo a los bioensayos de exposición, para disminuir el estrés por manipulación, los peces con pesos y tallas homogéneos ( $273 \pm 43$  g y  $20 \pm 3$  cm) fueron aclimatados en peceras de 30 L durante 24 h (1 pez por pecera), la temperatura y aireación se mantuvieron constantes ( $28 \pm 2$  °C y oxígeno 6.0 mg/L), además durante este periodo los organismos no se alimentaron, esto para evitar efectos pandriales y prevenir deposición de heces durante el bioensayo.

Los bioensayos de exposición al plaguicida se realizaron de forma estática (sin recambio de agua), donde se utilizó una formulación comercial de diazinón marca agro delta®, la cual contiene 25 % de ingrediente activo. Pasado el periodo de aclimatación (24 h), los peces ( $n=7$ ) se expusieron a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de diazinón, concentraciones correspondientes a  $1/6$ ,  $1/4$  y  $1/2$  del valor de  $CL_{50}$  (Girón-Pérez *et al.*, 2007).

Transcurrido los tiempos de exposición evaluados (6, 12 y 24 h), los peces fueron sacrificados mediante baño de hielo; inmediatamente fueron medidos, pesados y diseccionados para obtener el bazo de cada organismo, el cual fue pesado y procesado inmediatamente. Como grupo control se utilizaron organismos mantenidos en las mismas condiciones pero en ausencia de plaguicida.

### **8.3. Peso relativo de bazo**

El peso relativo del bazo es una relación entre el peso del bazo y el peso del pez completo, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Peso relativo del bazo} = (\text{peso del bazo}) / (\text{peso total del pez}) \times 100$$

### **8.4. Preparación de la muestra**

El análisis de los elementos colinérgicos se realizó a partir de células mononucleares de bazo (CMB); para lo cual, una vez obtenido el bazo de los organismos expuestos *in vivo* a diazinón, así como del grupo control, fueron disgregados mecánicamente en PBS (pH 7.2). Las CMB fueron separadas por gradiente de densidad usando Histopaque-1077, inmediatamente fueron colectadas y lavadas (3,500 rpm/ 30 min), el botón celular fue suspendido en 500  $\mu$ L de PBS y homogeneizado a 5,000 rpm/ 30 seg. Una vez homogeneizadas las CMB, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como estándar.

### **8.5. Evaluación de elementos del sistema colinérgico no neuronal**

#### **8.5.1. Actividad de colinesterasas**

La actividad colinesterasa total (ChEt) y AChE se evaluó en CMB de acuerdo al método descrito por Ellman (1961), en el que se utilizó yoduro de acetiltiocolina (ATC) como sustrato y ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) como indicador. Para evaluar las condiciones óptimas de la cuantificación de actividad colinesterásica, inicialmente, se evaluó la actividad ChEt ajustando el homogenado de CMB a diferentes concentraciones de proteínas (0.1, 0.2 y 0.3 mg/mL de proteína). Posteriormente, se determinó la actividad de ChEt en CMB

ajustada a 0.1 mg/mL proteína, usando diferentes concentraciones de ATC (0.5 – 2 mM).

Una vez estandarizadas las condiciones del ensayo enzimático, el homogenado de CMB (0.1 mg/mL de proteína) se mezcló con ATC (1 mM) y DTNB (10 nM). La absorbancia fue determinada a 405 nm. La actividad enzimática fue calculada a partir de la diferencia de absorbancia ( $Abs_{t2} - Abs_{t1}$ ), donde  $t1$  = absorbancia al inicio de la reacción, mientras que  $t2$  = absorbancia obtenida a los 20 min. La actividad enzimática se ajustó 0.1 mg/mL de proteína y se expresó como mM/min/mg de proteína.

Para calcular únicamente la actividad de AChE, previo a la adición de ATC y DTNB, las muestras de CMB fueron tratadas con 1 mM de tetraisopropil pirofosforamida (iso-OMPA) e incubadas a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se calculó la actividad de AChE como se describió previamente.

### 8.5.2. Determinación de ACh

La determinación de la concentración de ACh en CMB se realizó con un kit comercial "Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit" (Molecular Probes, Inc). Para cada determinación se utilizaron controles positivos y negativos de acuerdo a las instrucciones del kit. Para la determinación de ACh, se agregó en una microplaca de 96 pozos para fluorescencia un volumen de CMB (ajustado 0.1 mg/mL de proteína) más 100  $\mu$ L de solución de trabajo (peroxidasa de rábano (HRP) 2 U/mL; colina oxidasa 0.2 U/mL; AChE 1 U/mL). La mezcla (200  $\mu$ L) se incubó por 60 min a temperatura ambiente y protegida de la luz. La fluorescencia de la muestra se determinó a 530 nm de excitación y 590 nm de emisión en un lector de microplaca Synergy HT™. La fluorescencia de fondo fue eliminada restando los valores de los controles negativos. La concentración de ACh en la muestra se calculó utilizando una curva estándar de ACh (0.5-100  $\mu$ M) realizada siguiendo las instrucciones del kit.

### **8.5.3. Determinación de nAChR y mAChR**

La cuantificación de nAChR y mAChR en las CMB se realizó con los "Fish nicotinic acetylcholine receptor (N-AChR) ELISA kit" y "Fish muscarinic acetylcholine receptor (M-AChR) ELISA kit" (MyBiosource, Inc), respectivamente. La cuantificación de receptores se realizó en muestras tomadas aleatoriamente de peces expuestos a 6, 12 y 24 h a cada concentración del plaguicida ( $n = 7$ /por grupo). Para la cuantificación, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  del homogenizado de CMB, se colocaron en pozos con revestimiento de anticuerpo anti-nAChR o anti-mAChR. Posteriormente, se agregó 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo conjugado a HRP. La mezcla se incubó 60 min a 37°C. Posteriormente, la placa de ELISA se lavó 4 veces y se agregaron las soluciones cromógenas de acuerdo a las instrucciones del kit. La placa de ELISA se incubó durante 15 min a 37°C en oscuridad. Finalmente, se agregó la solución de paro y la densidad óptica se determinó a 450 nm. La concentración de nAChR y mAChR se calculó a través de una curva estándar de concentración de receptores (62.5 – 2,000 pg/mL).

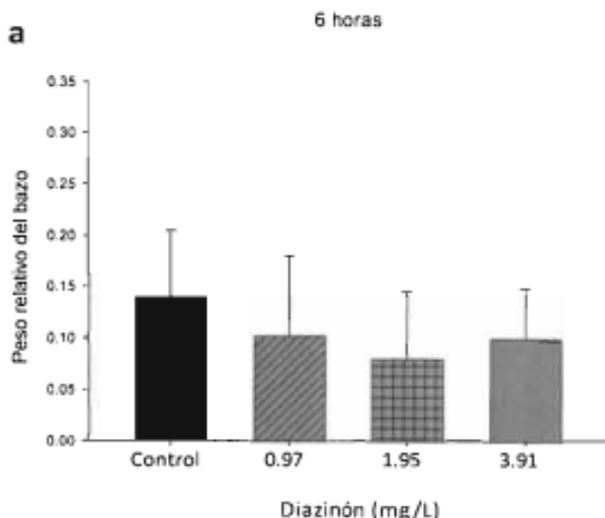
### **8.6. Análisis estadísticos**

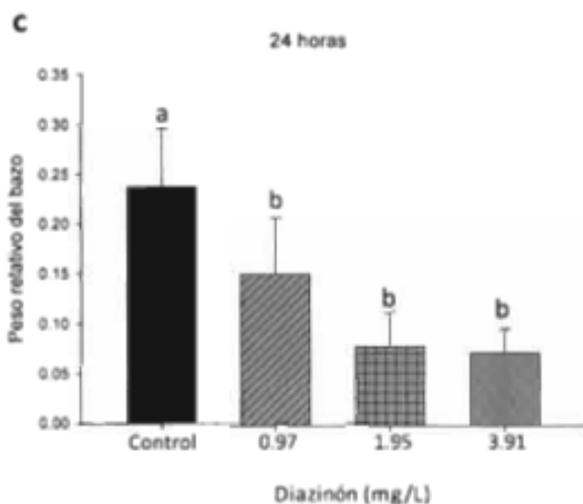
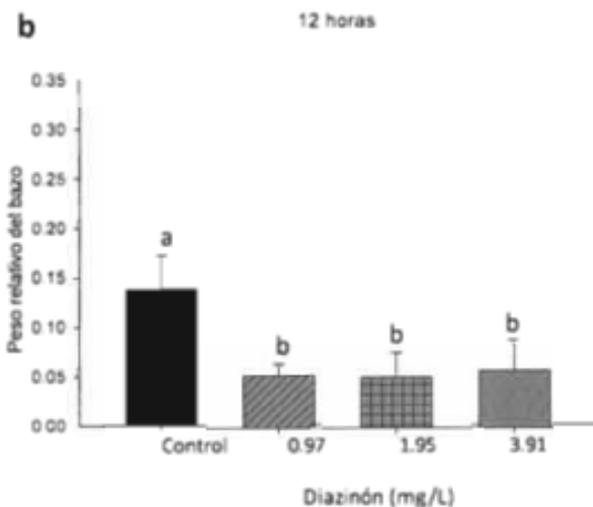
Para determinar diferencias significativas entre las variables evaluadas, los datos paramétricos fueron analizados con ANOVA y prueba de Tukey. Se tomaron como valor límite de significancia  $p < 0.05$ . Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Sigmastat® (ver. 3.5) y los gráficos se realizaron con el programa SigmaPlot® (ver. 10.0).

## 9. Resultados

### 9.1. Peso relativo del bazo

El peso relativo del bazo no se alteró en los peces expuestos a diazinón por 6 h a las distintas concentraciones evaluadas (figura 13 a). Sin embargo, en los peces expuestos durante 12 y 24 h (figura 13 b-c) a las diferentes concentraciones (0.97, 1.95 y 3.91 mg/L) del plaguicida, el peso relativo disminuyó significativamente respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).

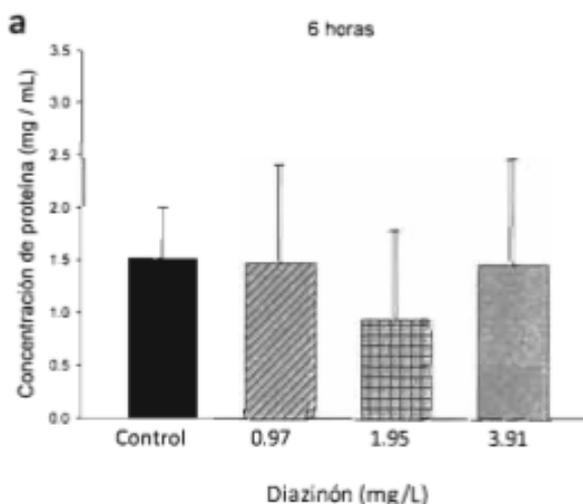


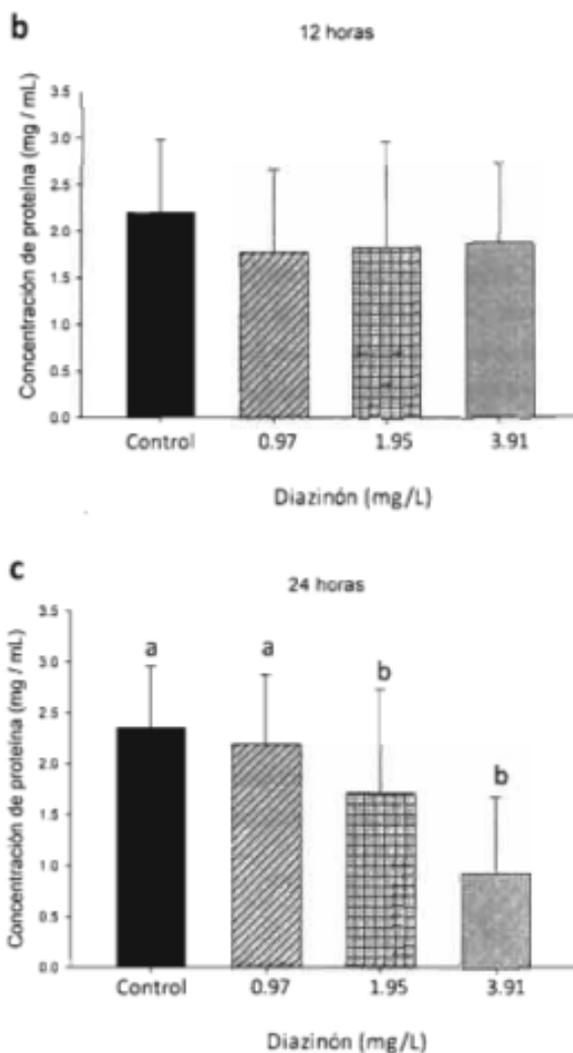


**Figura 13.** Peso relativo de bazo de peces ( $n=7$ ) expuestos *in vivo* a diazinón durante 6 h (a), 12 h (b) y 24 h (c). Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.D.; se realizó ANOVA y prueba de Tukey con 95% de confianza. Las barras con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) entre los grupos.

## 9.2. Concentración de proteína

La concentración de proteína en el homogenado de CMB no se alteró en los organismos expuestos durante 6 y 12 h a las concentraciones de 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de diazinón (figura 14 a-b). Sin embargo, este parámetro disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en los organismos expuestos durante 24 h a 1.95 y 3.91 mg/L ( $1.70 \pm 1.03$  y  $0.92 \pm 0.73$  mg/mL de proteína, respectivamente) de diazinón respecto al grupo control no expuesto ( $2.34 \pm 0.60$  mg/mL proteína) (figura 14 c).





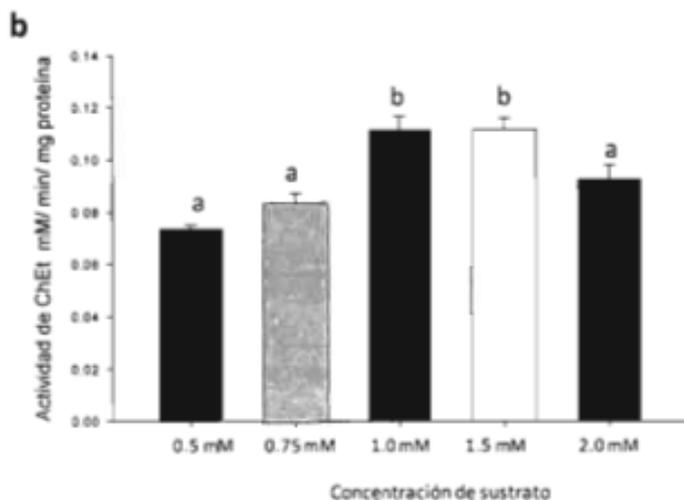
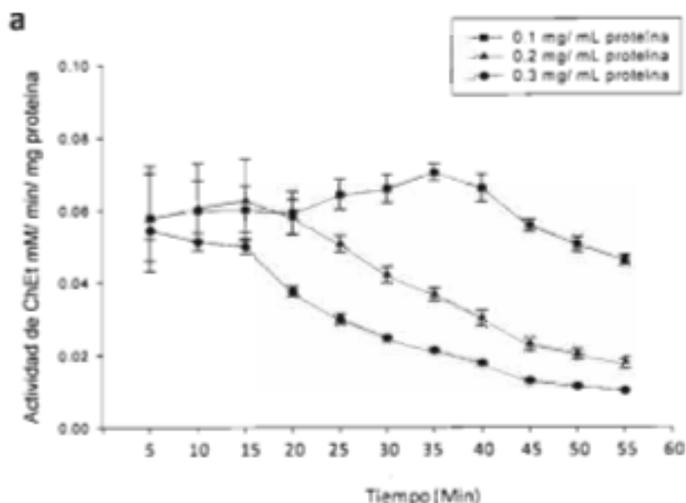
**Figura 14.** Concentración de proteína en CMB de peces ( $n=7$ ) expuestos *in vivo* a diazinón durante 6 h (a), 12 h (b) y 24 h (c). Los resultados son expresados como media + S.D.; se realizó ANOVA y prueba de Tukey con 95% de confianza. Las barras con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos.

### 9.3. Evaluación de elementos del sistema colinérgico no neuronal

#### 9.3.1. Actividad de colinesterasas

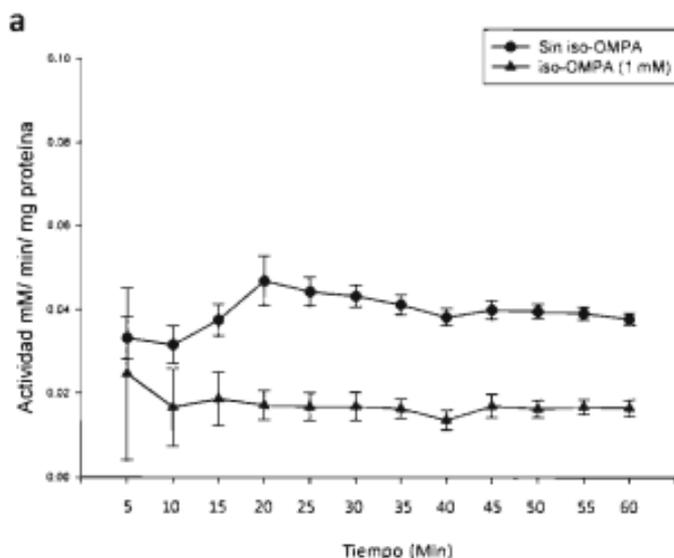
Para evaluar las condiciones óptimas de la cuantificación de la actividad colinesterásica, primeramente se realizó la estandarización de la técnica, para lo cual se evaluó la actividad enzimática ajustando el homogenado de CMB a diferentes concentraciones de proteínas (0.1, 0.2 y 0.3 mg/mL proteína) (figura 15 a). Se detectó una actividad mayor al utilizar 0.1 mg/mL proteína, con un pico máximo de actividad entre los 20 - 35 min posterior al inicio de la reacción ( $0.064 \pm 0.004$  mM/min/mg proteína). Mientras que, al utilizar 0.2 y 0.3 mg/mL de proteína, la actividad fue de  $0.051 \pm 0.002$  mM/min/mg proteína y  $0.030 \pm 0.001$  mM/min/mg proteína, respectivamente. La actividad enzimática se evaluó durante 60 min, detectando un pico máximo de actividad a los 20 min, con una disminución de la actividad ( $p < 0.001$ ) a partir de los 25 min.

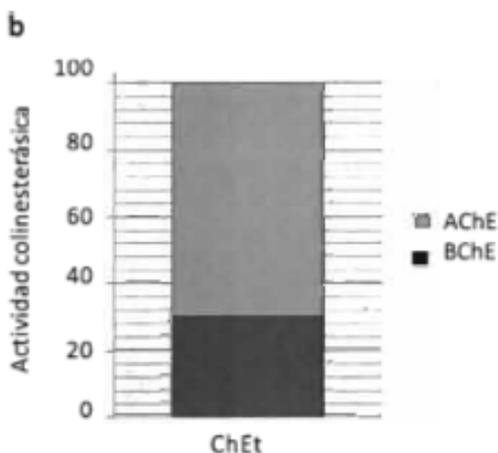
Posteriormente, se determinó la actividad de ChEt en CMB ajustada a 0.1 mg/mL proteína, usando diferentes concentraciones de sustrato (ATC) 0.5 – 2 mM (figura 15 b). Los resultados indicaron que la mayor actividad se detectó en el minuto 20, posterior al inicio de la reacción, utilizando una concentración de sustrato de 1 y 1.5 mM. En todos los casos la actividad de ChEt disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) después de 30 min de incubación de la reacción.



**Figura 15** Estandarización de actividad colinesterásica. Actividad de ChEt en CMB ajustado a diferentes concentraciones de proteína (0.1, 0.2 y 0.3 mg/mL proteína). Cada punto representa la media  $\pm$  D.S. (a) Actividad de ChEt en CMB ajustado a 0.1 mg/mL de proteína, utilizando diferentes concentraciones de sustrato (0.5 – 2 mM ATC). Las barras representan la media  $\pm$  D.S. de tres replicados. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) (b).

Para diferencia de la actividad ChEt de la actividad de AChE y excluir actividad de pseudocolinesterasa, a la muestra se adicionó un inhibidor de BChE (figura 16 a). La actividad enzimática se determinó ajustado la concentración de proteínas de la muestra a 0.1 mg/mL de proteína, utilizando 1 mM de sustrato e iso-OMPA (1mM). Los resultados indicaron que de la actividad total de ChEt (0.028 mM/min/mg proteína), el 68.6 % (0.019 mM/min/mg proteína) corresponde a AChE, mientras que el 31.4 % (0.008 mM/min/mg proteína) corresponde a BChE (figura 16 b).

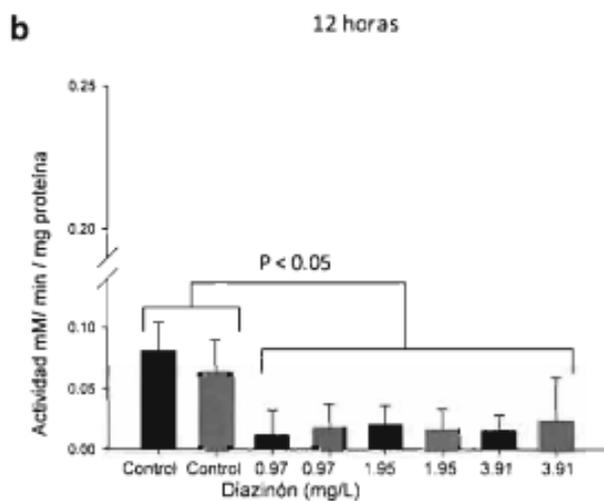
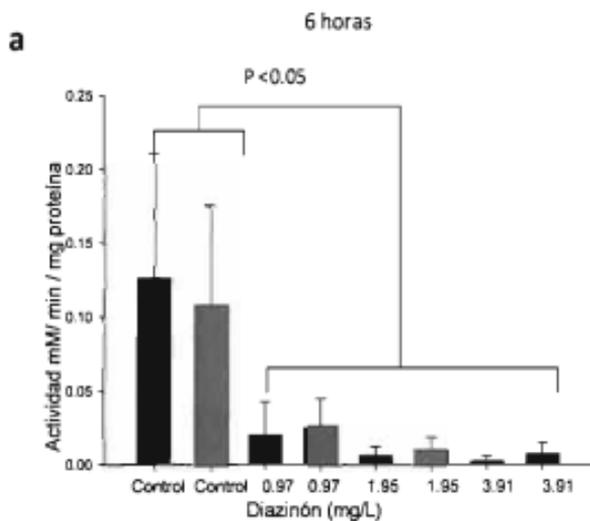


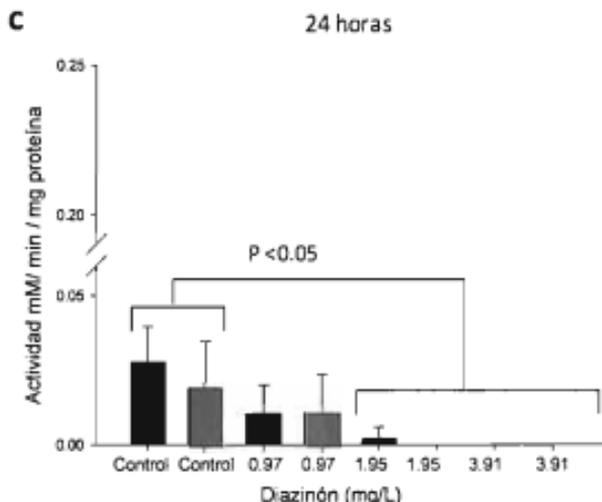


**Figura 16.** Actividad enzimática basal de ChEt y AChE. Actividad enzimática de ChEt en CMB (0.1 mg/mL proteína) tratadas con/ sin iso-OMPA (1 mM). Cada punto representa la media  $\pm$  D.S. (a). Porcentaje de actividad de AChE y BChE en CMB (n=6) (b).

#### *Actividad de ChEt y AChE en CMB de peces expuestos a diazinón*

Una vez establecidas las condiciones óptimas para evaluar la actividad enzimática, se realizó la evaluación de ChEt y AChE en las CMB del grupo control así como de los organismos expuestos *in vivo* a diazinón durante 6, 12 y 24 h. Los resultados indican que la exposición a diazinón disminuye la actividad de estas enzimas (figura 17). La exposición a las tres concentraciones de plaguicida por 6 y 12 h, provocó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la actividad de ChEt, así como la de AChE (Figura 17 a-b). Mientras que a 24 h de exposición, la actividad ChEt disminuyó significativamente en los grupos expuestos a 1.95 y 3.91 mg/L de diazinón, la actividad de AChE no se detectó en CMB de peces expuestos a estas concentraciones (Figura 17 c).





**Figura 17.** Actividad de ChEt (■) y AChE (■) en CMB de peces (n=7) expuestos *in vivo* a diazinón durante 6 h (a), 12 h (b) y 24 h (c). Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.D.; se realizó ANOVA y prueba de Tukey con 95% de confianza.

### 9.3.2. Determinación de ACh

Inicialmente, para calcular la concentración de ACh en las muestras de CMB, se realizó una curva estándar de ACh (5 – 100  $\mu$ M) de acuerdo a las instrucciones del kit, mediante la cual se interpolaron los resultados y se calculó la concentración de ACh en las CMB (figura 18).

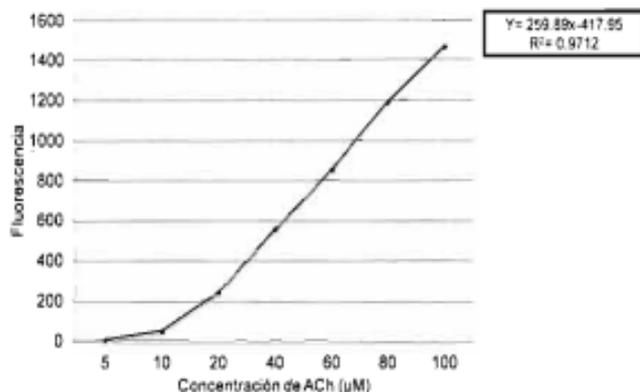
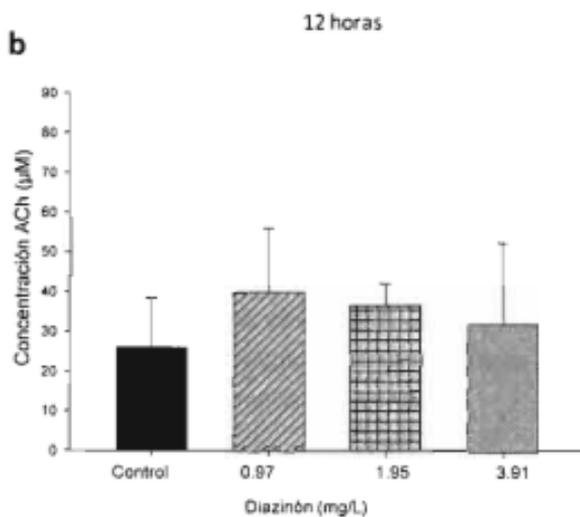
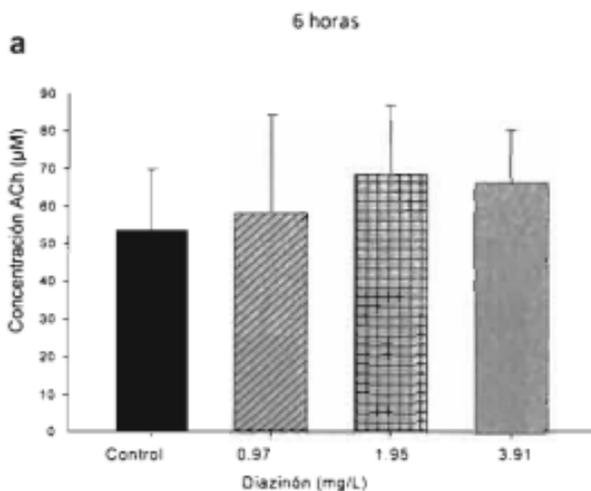
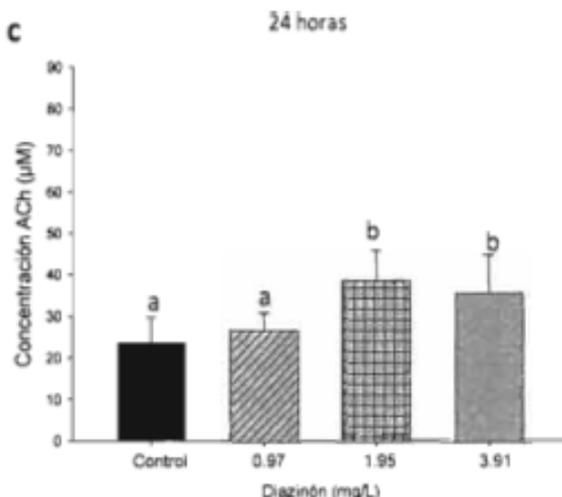


Figura 18. Curva estándar de ACh (5 – 100 µM).

Posteriormente, se determinó la concentración de ACh presente en las CMB de los peces expuestos a diazinón durante 6, 12 y 24 h, así como del grupo control (figura 19). En los peces expuestos a diazinón durante 6 y 12 h, la concentración de ACh incrementó ligeramente respecto al grupo control; sin embargo no se observó diferencia significativa en la concentración del neurotransmisor entre los grupos de peces expuestos al plaguicida y el grupo control (figura 19 a-b). Por otra parte, la concentración de ACh en CMB de peces expuestos durante 24 h a 1.95 y 3.91 mg/L de diazinón, incrementó significativamente ( $38.47 \pm 7.33 \mu\text{M}$  y  $35.52 \pm 9.03 \mu\text{M}$ , respectivamente) respecto al grupo control ( $23.55 \pm 6.03 \mu\text{M}$ ) ( $p < 0.05$ ) (figura 19 c).





**Figura 19** Concentración de ACh en CMB de peces ( $n=7$ ) expuestos *in vivo* a diazinón durante 6 h (a), 12 h (b) y 24 h (c). Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.D.; se realizó ANOVA y prueba de Tukey con 95% de confianza. Las barras con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) entre los grupos

### 9.3.3. Determinación de nAChR y mAChR

Primeramente, se realizó una curva estándar (60 – 2000 pg/mL) de los receptores de acuerdo a las instrucciones del kit comercial (figura 20). Una vez realizada la curva estándar, los resultados de los grupos experimentales se interpolaron para cuantificar la presencia de nAChR y mAChR en las CMB.

En lo que respecta a la cuantificación de los receptores nAChR y mAChR en las CMB de bazo de peces expuestos *in vivo* a diazinón, los resultados mostraron que la concentración de nAChR disminuyó significativamente ( $p<0.05$ ) en CMB de peces expuestos a 3.91 mg/L de diazinón ( $352.6 \pm 55.5$  pg/mL), comparada con el grupo control ( $568.5 \pm 116.6$  pg/mL) (figura 21 a). Este mismo efecto se observó al

evaluar la concentración de nAChR, la cual disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en CMB de los peces expuestos a 3.91 mg/L ( $480.0 \pm 404.9$  pg/mL), comparada con el grupo control ( $1590 \pm 711.5$  pg/mL) (figura 21 b).

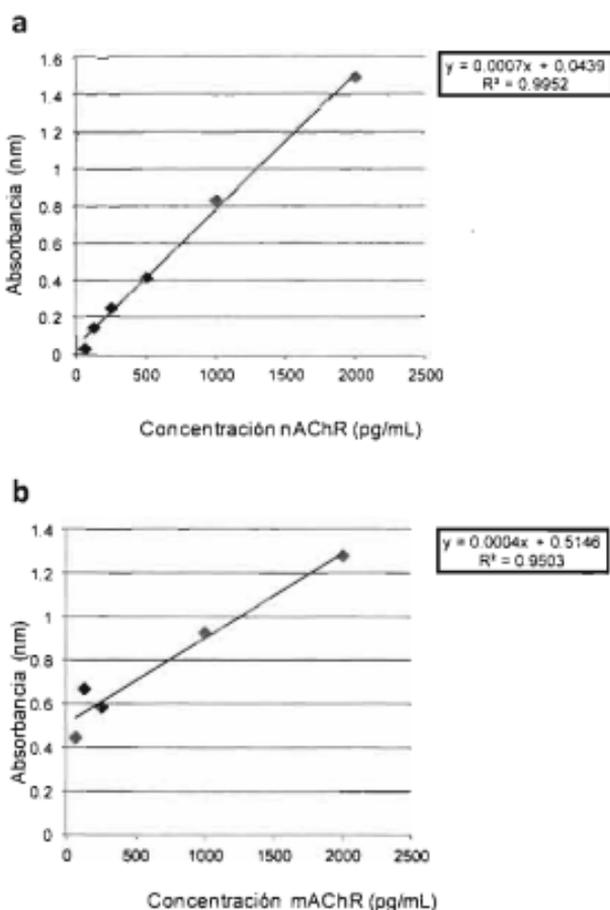
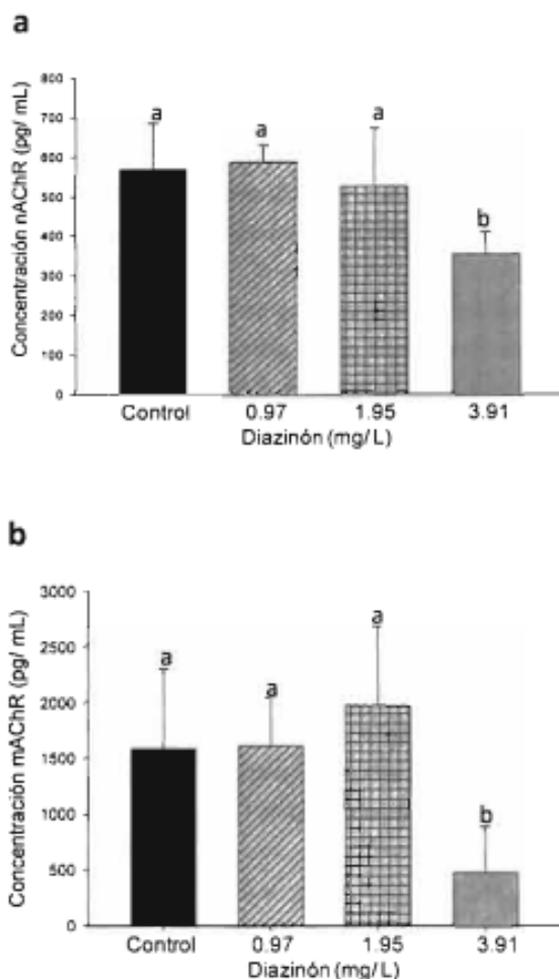


Figura 20 Curva estándar de nAChR (a) y mAChR (b).



**Figura 21.** Concentración de nAChR (a) y mAChR (b) en CMB de peces expuestos *in vivo* a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de diazinón. Cada barra representa la concentración de receptores en muestras tomadas de forma aleatoria ( $n = 7$ ) de organismos expuestos al plaguicida durante 6, 12 y 24 h. Los resultados son expresados como media  $\pm$  S.D.; se realizó ANOVA y prueba de Tukey con 95% de confianza. Las barras con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con el grupo control.

## 10. Discusión

En el presente estudio, se evaluó el efecto de diazinón sobre el sistema colinérgico no neuronal presente en los linfocitos de tilapia nilótica, con lo cual se podrá dilucidar el mecanismo de regulación de este sistema sobre la respuesta inmunológica, así como explicar cómo diazinón induce inmunotoxicidad a través de la modulación del sistema colinérgico no neuronal.

El incremento en la demanda global de proteína animal con fines de alimentación humana ha provocado el desarrollado de cultivos acuícolas intensivos. Sin embargo, el crecimiento explosivo de la acuicultura se puede ver limitado debido al aumento en la susceptibilidad de los organismos a enfermedades inducidas en gran medida por la presencia en el ambiente de contaminantes como los POF, sustancias utilizadas de manera indiscriminada en actividades agropecuarias (Nardocci *et al.*, 2014). Un ejemplo es diazinón, un POF utilizado ampliamente alrededor del mundo. Entre los efectos tóxicos inducidos por diazinón en peces, se ha reportado por Durmaz *et al.* (2006) que tilapia nilótica expuesta a diazinón presenta nado errático, hiperactividad y convulsiones. Además signos de parálisis, especialmente en sistema respiratorio, así como fallos en la producción y liberación de energía metabólica almacenada, lo que produce un estrés severo, ocasionando la muerte. Aunque existen reportes del efecto tóxico de este compuesto, la información acerca del efecto tóxico sobre el sistema inmunológico es escasa.

En este sentido, en lo que respecta a los efectos inmunotóxicos ocasionados por diazinón, en este estudio se evaluó el peso relativo del bazo. La pérdida de peso de órganos inmunológicos es utilizado comúnmente como un criterio en la evaluación de la inmunotoxicidad en animales (Téllez-Bañuelos *et al.*, 2009). Existen numerosos estudios en distintos vertebrados como peces, aves, ratas y conejos, en los que tras la exposición a xenobióticos se altera el bazo, provocando cambios estructurales y funcionales, como necrosis o hiperplasia (Garg *et al.*,

2004). En este estudio, los resultados coinciden con lo reportado en la literatura, ya que al evaluar el efecto de diazinón sobre el peso relativo del bazo, se observó una disminución significativa en este parámetro en los organismos expuestos durante 12 y 24 h a las concentraciones de 1.95 y 3.91 mg/L de diazinón. En este sentido, estudios publicados por Neishabouri *et al.* (2004) muestran el efecto tóxico sobre órganos inmunológicos tras la administración intraperitoneal en ratones C57bl/6 a diazinón (25, 2, y 0.2 mg/kg durante 28 días), provocando daños histopatológicos en bazo, observando a altas dosis una atrofia de la pulpa blanca con daño capsular y trabecular, así como una disminución en la celularidad. Además se ha reportado que este tipo de contaminantes en exposiciones agudas provoca una pérdida en el número de centros germinales. De igual forma, en ratones expuestos de manera oral a 300 mg/kg durante 45 días a diazinón, se observó hiperplasia de la pulpa roja y blanca, daño en la cápsula, hemorragias en vénulas endoteliales y necrosis de la trabécula, lo que sugiere que el contacto entre la pulpa roja y las células residentes está perdido, lo cual es indispensable para que el bazo filtre la sangre normalmente (Handy *et al.*, 2002).

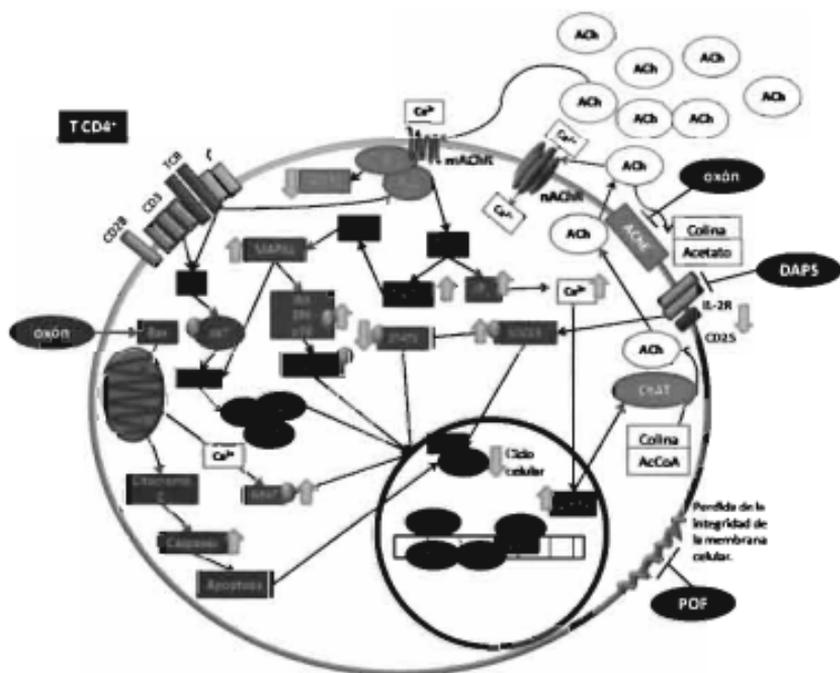
Otro parámetro de importancia en la evaluación de los efectos inmunotóxicos es la concentración de proteína total, la medición de estas moléculas es indispensable para monitorear el curso de la respuesta inmunológica ante una infección. Se ha sugerido que de manera natural una disminución en la concentración de proteína total puede deberse a inanición, desnutrición o a enfermedades crónicas del hígado. Sin embargo, algunos estudios demuestran que peces expuestos a POF presentan daño en tejido hepático y apoptosis de hepatocitos, al ser el hígado el órgano responsable de la síntesis de proteína, ésta puede afectarse debido a la exposición, provocando una disminución en este parámetro (Durmaz *et al.*, 2006; Banaee *et al.*, 2011). En este sentido, estudios publicados por Durmaz *et al.* (2006) reportaron que en *O. niloticus* se observó una disminución dosis dependiente en la concentración de proteína en músculo y riñón tras la exposición a diazinón (0.1, 1 y 2 mg/L) después de 7, 15 y 30 días de exposición. Así mismo, estudios publicados por Banaee *et al.* (2011) mencionan que en *Oncorhynchus*

*mykiss* los niveles de proteína total, así como de albumina y globulinas en plasma, disminuyeron significativamente en peces expuestos a diazinón (0.1 y 0.2 mg/L). De igual forma en este estudio, se observó una disminución en la concentración de proteína de las CMB de los peces expuestos a 1.95 y 3.91 mg/L de diazinón durante 24 h.

Aunque existen diversas publicaciones en las que se evalúan los efectos tóxicos que ocasionan los POF sobre la respuesta inmunológica, los mecanismos de inmunotoxicidad aún no son claros. Se ha propuesto mediante la información publicada en distintos modelos de estudio, que los POF pueden ocasionar efectos inmunotóxicos directos e indirectos (figura 22). En lo que respecta a los efectos directos, ejemplos de ello es la inhibición de enzimas serín hidrolasas (sistema complemento y trombina), aumento de la síntesis de ROS e inducción de estrés oxidativo, alteración en la secuencia e intensidad de fosforilación y desfosforilación de proteínas quinasas, lo que se relaciona con la alteración de vías de transducción de señales, proliferación y diferenciación (Galloway y Handy, 2003; Li, 2007; Díaz-Resendiz *et al.*, 2015). Así mismo, algunos estudios han sugerido la participación de los POF en procesos apoptóticos (Saleh *et al.*, 2003). En este sentido, se ha reportado que diazinón en concentraciones subletales induce en la tilapia nilótica (*O. niloticus*) disminución en la capacidad proliferativa de linfocitos, actividad fagocítica, disminución en el peso relativo del bazo, así como incremento en el estallido respiratorio de fagocitos y concentración de IgM plasmática (Girón-Pérez *et al.*, 2007; Díaz-Resendiz *et al.*, 2015).

Sin embargo, también se ha propuesto la presencia de un mecanismo de inmunotoxicidad indirecto debido a la alteración de la respuesta colinérgica de las células del sistema inmunológico (Galloway y Handy, 2003; Charoenying *et al.*, 2011). Debido a que recientemente se ha demostrado en modelos mamíferos que no sólo las células neuronales expresan ACh, sino que este neurotransmisor puede ser producido por células de otro tipo de tejidos, lo que se ha denominado sistema colinérgico no neuronal. Al respecto, se ha demostrado que las células del

sistema inmunológico de mamíferos poseen todos los componentes bioquímicos y moleculares para generar de *ново* ACh, molécula que tiene una participación significativa en la regulación de la respuesta inmunológica (Kawashima y Fujii, 2003). De esta manera, el sistema colinérgico linfocitario podría ser el blanco de los POF en el fenómeno de inmunotoxicidad (Charoenying *et al.*, 2011).



**Figura 22.** Mecanismos de inmunotoxicidad de POF. AcCoA: acetil-coenzima A; ACh: acetilcolina; AChE: acetilcolinesterasa; ChAT: colina acetil transferasa; DAPS: dialquilfosfatos; mAChR: receptor muscarínico de acetilcolina; nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina; oxón: metabolito oxidado de POF; POF: plaguicidas organofosforados.

La actividad colinérgica no neuronal ha sido demostrada tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo* de humanos y otros mamíferos. Sin embargo, en vertebrados inferiores como los peces, la información sobre este sistema es escasa, por lo que en el presente trabajo se evaluó la presencia de componentes colinérgicos (AChE, ACh y AChR) en células mononucleares de tilapia nilótica (*O. niloticus*). Constituyendo así, el primer reporte de caracterización de elementos colinérgicos en células del sistema inmunológico en peces. Estos componentes, al igual que en mamíferos, pueden constituir un sistema colinérgico no neuronal propio de las células del sistema inmunológico, implicado en mecanismos de neuro-inmunomodulación.

En lo que se refiere al sistema colinérgico no neuronal presente en leucocitos, se han publicado estudios en los que se evalúa en mamíferos el neurotransmisor ACh en células u órganos del sistema inmunológico. Kawashima *et al.* (1997) determinaron el contenido de ACh en tres líneas celulares de humanos, mostrando niveles de  $251.5 \pm 34.9$ ,  $36.2 \pm 3.5$  y  $12.6 \pm 0.6$  pmol/ $10^6$  células para MOLT-3, HSB-2 y CEM, respectivamente. Así mismo Rinner *et al.* (1998) determinaron los niveles de ACh en linfocitos de timo ( $1521 \pm 270$  pg/ $10^6$  células), bazo ( $1340 \pm 311$  pg/ $10^6$  células) y linfocitos de sangre periférica ( $1148 \pm 182$  pg/ $10^6$  células) de rata. Aunque existen diferentes estudios en los que se ha determinado la concentración de ACh en sangre total y plasma de diferentes especies animales a lo largo de la línea evolutiva (Fujii *et al.*, 1995), no hay información referente a los niveles basales de ACh en células del sistema inmunológico de peces. Los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que la concentración de ACh en células mononucleares de bazo de tilapia nilótica (*O. niloticus*) es de  $23 \pm 6.03$   $\mu$ M/ mg proteína.

Este neurotransmisor está implicado en diferentes funciones celulares como mantenimiento de la homeostasis celular, mitosis, organización del citoesqueleto e interacciones celulares (Wessler *et al.*, 1999; Abreu-Villaca *et al.*, 2011). En lo que respecta a su papel en la modulación del sistema inmunológico, estudios

realizados para comparar los niveles de ACh presentes en diferentes tipos de leucocitos indican que en linfocitos T se expresa de manera constitutiva la enzima ChAT, mientras que en líneas de células B y monocitos se detectan bajos niveles de expresión de ChAT, por lo que al parecer los linfocitos T son las principales células del sistema inmunológico encargadas de la síntesis de este neurotransmisor (Kawashima y Fujii 2000; Fujii y Kawashima, 2001). Existe evidencia que sugiere que los cambios en la actividad colinérgica en los linfocitos están relacionados con la alteración de la respuesta inmunológica, estudios *in vitro* muestran que la ACh (o agonistas) en los linfocitos induce vía M1/M5 mAChR, señalización de  $Ca^{2+}$ , aumento en la expresión de c-fos, síntesis de NO por la nNOS/iNOS vía PLC, lo que se relaciona con el aumento de citotoxicidad y el contenido de cGMP. Así mismo, mediante vía nAChR, ACh puede modular la maduración de los timocitos y proliferación de células T. Por lo que se puede sugerir que ACh actúa como un factor autocrino, modulado positivamente por señalización de IL-2 (Kawashima y Fujii, 2003).



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Este efecto inmunomodulatorio de ACh también ha sido descrito en peces. Estudios realizados en trucha arcoíris (*O. mykiss*) han demostrado que carbacol (agonista colinérgico de mAChR) incrementa significativamente el número de células productoras de anticuerpos, así como la concentración de ROS en leucocitos (Flory, 1990; Flory y Bayne, 1991). Resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación, demostraron que la exposición *in vitro* de linfocitos de tilapia nilótica (*O. niloticus*) a 40-80  $\mu$ M de ACh, reduce significativamente la capacidad mitótica de estas células (Girón-Pérez *et al.*, 2008). Por otra parte, en tenca (*Tinca tinca*) y bacalao (*Gadus morhua*), ACh (1 nM) induce reducción significativa de tejido esplénico, mientras que el tratamiento con atropina (antagonista colinérgico de mAChR) invierte el efecto (Fänge y Nilsson, 1985).

La información hasta el momento demuestra que ACh puede actuar sobre los nAChR y mAChR presentes en los linfocitos y su estimulación producirá cambios bioquímicos y funcionales sobre la célula en la que se encuentran. Sin embargo, la

expresión de los subtipos para ambos tipos de receptores y sus funciones específicas varían de acuerdo a la especie animal así como su estado físico o la situación del sistema inmunológico. Por lo cual, otro parámetro determinado en el presente trabajo fue la concentración de AChRs en células CMB de tilapia nilótica, los resultados muestran que los valores basales para mAChR y nAChR son  $1590 \pm 318$  pg/mL y  $568 \pm 44$  pg/mL, respectivamente. Sin embargo, hasta el momento no hay información referente a los niveles basales de AChR en células del sistema inmunológico de peces por lo que no es posible comparar los resultados obtenidos en este estudio.

En lo que respecta a la señalización intracelular de estos receptores, se ha descrito en modelos mamíferos y en líneas celulares que los mAChR, M1, M3 y M5 están unidos a Gq/11, por lo que después de su estimulación se activa la PLC, aumentando los niveles de  $Ca^{2+}$ . Por otro lado, M2 y M4 están acopladas a Gi $\alpha$ , tras su estimulación se inhibe la adenil ciclasa y disminuye la síntesis de cAMP. Aunque las células expresan los cinco subtipos, la intensidad de expresión dependerá del estado del sistema inmunológico. Una vez activados los linfocitos, se facilita la transmisión colinérgica mediante el incremento en la expresión de mAChR y la síntesis de ACh. La señalización de estos receptores (mAChRs M1/M5) está relacionada con la producción de citocinas proinflamatorias, lo que conduce a la producción de anticuerpos. Mientras que, los nAChR se encuentran en forma heteropentamérica compuesta de las subunidades  $\alpha 2$ -  $\alpha 6$  y  $\beta 2$ -4,  $\alpha 9$ /  $\alpha 10$  o en forma homopentamérica compuesta por la subunidad  $\alpha 7$ , formando un canal de iones activado por ligandos, que al ser activado causa un rápido flujo de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  (Kawashima y Fujii, 2003). Se ha sugerido que la subunidad  $\alpha 7$  está relacionada con la regulación en la producción de citocinas proinflamatorias mediante la producción de anticuerpos, así como el desarrollo y activación de linfocitos B (Kawashima *et al.*, 2012).

El siguiente elemento del sistema colinérgico evaluado fue la colinesterasa, la cual se encarga de degradar al neurotransmisor ACh. Los vertebrados tienen dos tipos

de colinesterasas, AChE y BChE, las cuales difieren en su especificidad por el sustrato. La primera puede hidrolizar más rápidamente ACh comparada con otros ésteres de colina, en contraste, la segunda es más eficiente para hidrolizar butirilcolina. Aunque el papel fisiológico de AChE ha sido ampliamente descrito, el papel de BChE aún no es claro (Chuiko, 2000), se ha sugerido que podría relacionarse con vías de detoxificación, para proteger la inhibición de AChE por POF (Poet *et al.*, 2004).

En peces, AChE se encuentra predominantemente en cerebro y músculo, mientras que BChE se encuentra en hígado y plasma (Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008; Hick *et al.*, 2013). En lo que respecta a la presencia de actividad colinesterásica en células del sistema inmunológico, en mamíferos se ha reportado la expresión de AChE en linfocitos y al parecer esta actividad incrementa significativamente tras infecciones agudas (Da Silva *et al.*, 2011). Al comparar la expresión y actividad de esta enzima entre linfocitos, se ha reportado que tanto en linfocitos T y B se expresa AChE, sin embargo, la mayor actividad reside en linfocitos T (Szelényi *et al.*, 1982).

En este estudio se determinó la actividad colinesterásica en CMB de tilapia nilótica. Los resultados obtenidos indican que de la actividad ChEt, el 68.6% fue debido a AChE y el 31.4% podría atribuirse a actividad de BChE. Estos resultados difieren de los reportados en plasma de peces ciprinidos, donde se encontró que de la actividad ChEt, el 83–96% correspondió a BChE, mientras que el 4–17 % a AChE. Esta discrepancia podría deberse al tejido evaluado (Chuiko, 2000).

Las B-esterasas son un grupo de enzimas inhibidas por POF, siendo la inhibición de ChE la más frecuentemente usada como biomarcador para evaluar la exposición a POF. En este sentido, existen diversos estudios donde demuestran en peces la inhibición de la enzima AChE tras la exposición POF (Galgani y Bocquene, 2000; Poet *et al.*, 2004; Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008). Guimarães *et al.* (2007) reportaron un decremento significativo en la actividad de

AChE en músculo de tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuesta a 0.25 ppm de triclorfón desde 8 hasta 96 h. Así mismo, Durmaz *et al.* (2006) reportaron una inhibición dosis dependiente de AChE en diversos tejidos como branquias, músculo, riñón y tracto alimentario de *O. niloticus* expuesta a concentraciones subletales de diazinón (0.1, 1 y 2 ppm). Del mismo modo, en tilapia nilótica expuesta *in vivo* a 3.915 y 7.830 ppm de diazinón durante 96 horas, se redujo significativamente la actividad de AChE en bazo comparada con el grupo no expuesto (Girón-Pérez *et al.*, 2008). Lo que demuestra que incluso a bajas dosis de este plaguicida, la actividad enzimática es sensible a la contaminación por POF. El grado de inhibición por exposición a POF se puede deber a diversos factores, como peso, resistencia entre especies, porcentaje de absorción y la relación entre activación/detoxificación del POF (Barbieri y Alves Ferreira, 2011).

Los POF al tener como molécula blanco la enzima AChE, bloquean la actividad de ésta a través de la unión irreversible al sitio activo, lo que provoca un incremento de los niveles del neurotransmisor ACh tanto neuronal como no neuronal (Bialock, 1994), de esta manera, la existencia de un sistema colinérgico en leucocitos, los hace susceptibles a la perturbación por POF. Como se comentaba, se ha sugerido que los POF pueden modular a los leucocitos de una forma indirecta principalmente a través de los receptores colinérgicos, evocando una señalización intracelular inmediata de diversas moléculas, entre ellas c-Fos, regulando por consecuencia los niveles de segundos mensajeros (Charoenying *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2012; Toledo-Ibarra *et al.*, 2013).

Actualmente existen pocos estudios en los que se evalúa el efecto inmunotóxico de POF y su relación con el sistema colinérgico de los linfocitos. Los primeros reportes publicados por Girón-Pérez *et al.* (2008) mostraron que la exposición *in vitro* a diazinón y diazoxón, no altera la capacidad proliferativa de linfocitos de peces, no obstante, estas sustancias inducen un incremento en la concentración de ACh, la cual provoca una disminución significativa de la linfoproliferación. Por lo que se sugiere que el efecto inmunotóxico no es directo, sino a través del sistema

colinérgico no neuronal. Así mismo, Charoenying *et al.* (2011) evaluó el efecto de paraoxón (metabolito de paratión) sobre el sistema colinérgico tanto en líneas celulares neuronales como de linfocitos. En lo que respecta a la AChE, mostraron que en la línea celular MOLT3 expuesta durante 48 h a 100, 500 y 1000  $\mu\text{M}$  paraoxón, provoca un aumento en la expresión de N-AChE, lo que refleja una alteración en el sistema.

En el presente estudio se reporta una disminución significativa en la actividad de AChE en CMB de peces expuestos a 1.95 y 3.91 mg/L de diazinón, así mismo se indica que la concentración de ACh en CMB de tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuesta 24 h a 1.95 mg/L y 3.91 mg/L de diazinón aumentó significativamente los niveles de ACh ( $38.47 \pm 7.33 \mu\text{M}$  y  $35.52 \pm 9.03 \mu\text{M}$ , respectivamente) respecto al grupo no tratado con diazinón ( $23 \pm 6.03 \mu\text{M}$ ). Estos reportes coinciden con los resultados reportados previamente por Girón-Pérez *et al.* (2008), en los que la concentración de ACh incrementó significativamente en bazo de peces expuestos a 7.830 ppm y 3.915 ppm de diazinón, comparada con el grupo no expuesto.

Se ha sugerido que el fenómeno tóxico observado en neuronas sea lo que también sucede en linfocitos, ocasionado por un exceso de ACh resultante de la inhibición de AChE, que conllevaría a la alteración en la expresión y funcionalidad de AChRs, provocando una disrupción en la cascada de señalización intracelular, modulando los niveles de segundos mensajeros y en consecuencia la funcionalidad de la célula (Charoenying *et al.*, 2011).

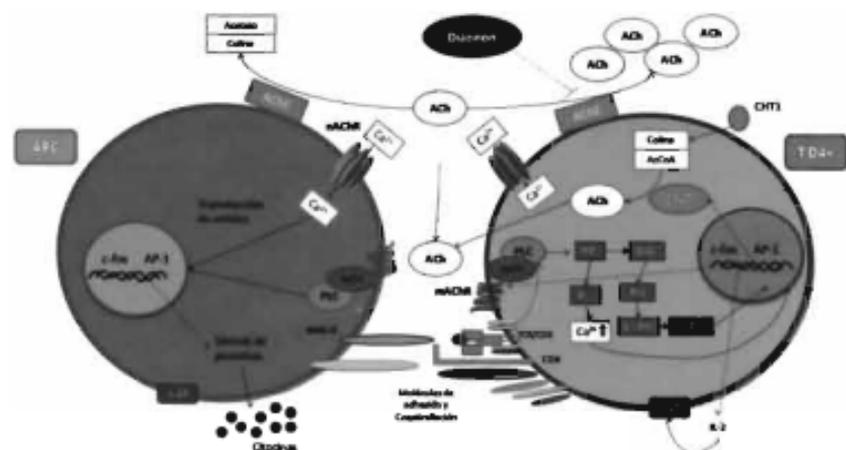
Por lo cual, en este estudio también se evaluó los niveles de AChRs en las CMB de peces expuestos a diazinón, encontrando una disminución significativa en la concentración de mAChR y nAChR de los peces expuestos a 3.91 mg/L de diazinón ( $480 \pm 160 \text{ pg/mL}$ ,  $352 \pm 20 \text{ pg/mL}$ , respectivamente) respecto al grupo control no tratado con plaguicida ( $1590 \pm 318 \text{ pg/mL}$ ,  $568 \pm 44 \text{ pg/mL}$ , respectivamente). Estudios publicados por Charoenying *et al.*, (2011) muestran que la expresión de mAChR en células MOLT-3 es modulada por la exposición a

paraoxón. La sobre estimulación de mAChR y nAChR causa cambios funcionales y bioquímicos en dichas células (Kawashima *et al.*, 2012).

Es así como se evidencia que los POF no solo tienen efecto tóxico directamente sobre las células del sistema inmunológico, sino que además pueden provocar una alteración de la comunicación neuro-inmunológica, proceso indispensable para mantener la homeostasis durante situaciones de estrés e infecciones, evocando una respuesta balanceada para eliminar los patógenos y minimizar el daño a tejidos (Verburg-van Kemenade *et al.*, 2013).

## 11. Conclusiones

Los resultados derivados de este trabajo sugieren que la actividad inmunotóxica de diazinón sobre los linfocitos de tilapia nilótica, es un evento indirecto, en cuyo proceso esta involucrado el sistema colinérgico no neuronal propio de los linfocitos. De esta manera, la existencia de un sistema colinérgico no neuronal en linfocitos, los hace susceptibles a la alteración por POF (figura 23). Este es el primer reporte en el que se evalúa el sistema colinérgico de los linfocitos como blanco del efecto inmunotóxico de diazinón en organismos acuáticos. Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar el efecto de estos contaminantes sobre el sistema colinérgico de linfocitos y detallar de una forma más clara el mecanismo de acción.



**Figura 23.** Sistema colinérgico no neuronal en linfocitos como blanco de diazinón en vertebrados (Toledo Ibarra et al., 2013). AcCoA: acetil-coenzima A; ACh: acetilcolina; AChE: acetilcolinesterasa; APC: célula presentadora de antígeno, CHT1: transportador de colina; ChAT: colina acetil transferasa; mAChR: receptor muscarínico de acetilcolina; nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina

## 12. Perspectivas

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se recomienda evaluar *in vitro* los efectos de la exposición aguda y crónica a diazinón en monocitos/macrófagos y linfocitos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) sobre el sistema colinérgico no neuronal. Además se sugiere evaluar la expresión de los elementos del sistema colinérgico no neuronal, como son ChAT, ACh, AChE y AChR. En lo que respecta al último elemento, identificar los subtipos y las subunidades predominantes en cada estirpe celular.

Por otro lado, para evaluar los efectos de diazinón sobre la fisiología de los linfocitos, sería conveniente evaluar la expresión de citocinas anti y pro-inflamatorias, moléculas de coestimulación, segundos mensajeros y factores de transcripción (patrón de fosforilación y desfosforilación).

Además, para evaluar el grado de susceptibilidad a infecciones en organismos expuestos a este plaguicida, sería importante evaluar los parámetros antes mencionados en organismos expuestos a diferentes agentes patógenos.

### 13. Referencias

1. Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Manhães AC. Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav Brain Res.* 2011; 221(2): 367-378.
2. Acker CI, Guerra Souza AC, Pinton S, Trevisanda Rocha J, Amaral, Friggi C, Zanelia R, Wayne Nogueira C. Repeated malathion exposure induces behavioral impairment and AChE activity inhibition in brains of ratpups. *Ecotox Environ Safe.* 2011; 74: 2310–2315.
3. Ahmadi K, Mirvaghefi A, Banaee M, Vosoghei A. Effects of long-term diazinon exposure on some immunological and haematological parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Toxicol Environ Health Sci.* 2014; 6:1-7.
4. Al-Ghanim KA. Acute toxicity and effects of sub-lethal malathion exposure on biochemical and haematological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Sci Res Essays.* 2012; 7 (6): 1674-1680.
5. Alejo A, Tafalla C. Chemokines in teleost fish species. *Dev Compl Immunol.* 2011; 35: 1215–1222.
6. Alpuche-Gual L, Gold-Bouchot G. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieris*. *Ecotox Environ Safe.* 2008; 71: 787–797.
7. Alvarez-Pellitero P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008; 123 (3-4): 171-178.

8. Arenzana FJ, Clemente D, Sánchez-González R, Porteros A, Aijón J, Arévalo R. Development of the cholinergic system in the brain and retina of the zebrafish. *Brain Res Bull.* 2005; 66 (4–6): 421–425.
9. Assis CRD, Linhares AG, Oliveira VM, França RCP, Carvalho EVM, Bezerra RS, Carvalho Jr LB. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. *Sci Total Environ.* 2012; 441: 141-150.
10. ATSDR, 2008. Toxicological profile for diazinon. Agency for toxic substances and disease registry. [Consultado 2012 noviembre 8] Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=512&tid=90>
11. Aydın R, Köprüçü K. Acute toxicity of diazinon on the common carp (*Cyprinus carpio L.*) embryos and larvae Pesticide. *Biochem Physiol.* 2005; 82: 220-22.
12. Banaee M, Mirvaghefi AR, Rafei GR, Majazi Amiri B. Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. *Int J Environ Res.* 2008; 2: 189-98.
13. Banaee M, Sureda A, Mirvaghefi A, Ahmadi K. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pestic Biochem Physiol.* 2011; 99: 1-6.
14. Barbieri E, Alves Ferreira LA. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600 on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pestic Biochem Phys.* 2011; 99: 209–214.
15. Bencan Z, Levin ED. The role of  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors in the nicotine-induced anxiolytic effect in zebrafish. *Physiol Behav.* 2008, 95 (3):408–412.

16. Blakley B, Brousseau P, Fournier M, Voccia I. Immunotoxicity of pesticides: a review. *Toxicol Ind Health*. 1999; 15: 119–132.
17. Bialock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today*. 1994; 15: 504-511.
18. Bodur E, Layer PG. Counter-regulation of cholinesterases: Differential activation of PKC and ERK signaling in retinal cells through BChE knockdown. *Biochimie*. 2011; 93: 469-476.
19. Boshra H, Li J, Sunyer JO. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol*. 2006; 20 (2): 239-262.
20. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–54.
21. Casas-Solis J, Santerre A, Girón-Pérez MI, Reynoso-Orozco R, Zaitseva G. A comparative study of phagocytic activity and lymphoproliferative response in five varieties of tilapia *Oreochromis spp*. *J Fish Biol*. 2007; 71:1541–5.
22. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125 (2): S3-S25.
23. Charoenying T, Suriyo T, Thiantanawat A, Chaiyaroj SC, Parkpian P, Satayavivad J. Effects of paraoxon on neuronal and lymphocytic cholinergic systems. *Environ Toxicol Phar*. 2011; 31: 119-128.

24. Chen WH, Sun LT, Tsai CL, Song YL, Chang CF. Cold-Stress Induced the Modulation of Catecholamines, Cortisol, Immunoglobulin M, and Leukocyte Phagocytosis in Tilapia. *Gen Comp Endocrinol.* 2002; 126: 90–100.
25. Chuiko GM. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2000; 127 (3): 233-242.
26. CICOPLAFEST, Catalogo de plaguicidas. Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias toxicas – Secretaria de salud; Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación; Secretaria del medio ambiente y recursos naturales; Secretaria de economía. 2004. Consultado [Octubre 2013]. Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>
27. COFEPRIS. Introducción catalogo oficial de plaguicidas. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. 2004. Consultado [21 Julio 2015]. Disponible en: [www.cofepris.gob.mx/CAS/.../Catalogo%20de%20plaguicidas/INTRO.pdf](http://www.cofepris.gob.mx/CAS/.../Catalogo%20de%20plaguicidas/INTRO.pdf)
28. CONAPESCA. Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2013. Comisión Nacional de Acuacultura y pesca. 2013. [Consultado mayo 2015]. Disponible en: [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona\\_anuario\\_estadistico\\_de\\_pesca](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca)
29. Costa L. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta.* 2006; 366: 1 – 13

30. Cox C. Insecticide fact sheet, Diazinon; toxicology. J. Pestic. Refor. 2000; 20:15–20.
31. Cuesta A, Meseguer J, Esteban MA. Immunotoxicological Effects of Environmental Contaminants in Teleost Fish Reared for Aquaculture. In: Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits. Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.). InTech; Rijeka, Croatia, 2011; pp. 241–266. ISBN: 978-953-307-458-0, Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-risks-and-benefits/immunotoxicologicaleffects-of-environmental-contaminants-in-teleost-fish-reared-for-aquaculture>
32. Da Silva AS, Monteiro SG, Gonçalves JF, Spanevello R, Schmatz R, Oliveira CB, Costa MM, França RT, Jaques JA, Schetinger MR, Mazzanti CM, Lopes ST. *Trypanosoma evansi*: Immune response and acetylcholinesterase activity in lymphocytes from infected rats. Exp Parasitol. 2011; 127 (2): 475–480.
33. Dave KR, Syal AR, Katyare SS. Tissue cholinesterases, a comparative study of their kinetic properties. Z Naturforsch.2000; 55:10.
34. Diaz-Resendiz KJG, Toledo-Ibarra GA, Girón-Pérez MI. Modulation of Immune Response by Organophosphorus Pesticides: Fishes as a Potential Model in Immunotoxicology. J Immunol Res [Internet]. 2015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/213836>
35. Dogan D, Can C. Endocrine disruption and altered biochemical indices in male *Oncorhynchus mykiss* in response to dimethoate. Pestic Biochem Physiol. 2011; 99: 157–161.

36. Durmaz H, Sevgiler H, Üner N. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. Pestic Biochem Phys. 2006; 84: 215–226.
37. Dutta HM, Qadri N, Ojha J, Singh NK, Adhikari S, Datta JS, Roy PK. Effect of Diazinon on Macrophages of Bluegill Sunfish, *Lepomis macrochirus*: A Cytochemical Evaluation. Bull Environ Contam Toxicol. 1997; 58: 135-141.
38. Ellman GL, Courtney D, Andres Jr. V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 1961; 7: 88–95.
39. Fänge R, Nilsson S. The fish spleen: structure and function. Experientia. 1985; 41 (2): 152-158.
40. Fanta E, Sant'Anna-Rios F, Romão S, Vianna ACA, Freiburger S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotox Environ Safe. 2003; 54: 119–130.
41. FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. [Consultado 27 Octubre 2014]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s00.htm>
42. FAO. Programa de información de especies acuáticas. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015- Consultado [Marzo 2015]. Disponible en: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es)

43. Fitzsimmons K. Tilapia aquaculture in Mexico. In *Tilapia Aquaculture in the Americas*. Volume 2. Edited by Costa-Pierce B, Rakocy J. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, Louisiana: 2000:171-183.
44. Flajnik MF, Ohta Y, Namikawa-Yamada C, Nonaka M. Insight into the primordial MHC from studies in ectothermic vertebrates. *Immunological Reviews*. 1999; 167: 59-67.
45. Flory CM. Phylogeny of neuroimmunoregulation: effects of adrenergic and cholinergic agents on the *in vitro* antibody response of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol*. 1990; 14 (3): 283-294.
46. Flory MC, Bayne CJ. The influence of adrenergic and cholinergic agents on the chemiluminescent and mitogenic responses of leukocytes from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev Comp Immunol*. 1991; 15 (3): 135-142.
47. Fujii T, Yamada S, Yamaguchi N, Fujimoto K, Suzuki T, Kawashima K. Species differences in the concentration of acetylcholine, a neurotransmitter, in whole blood and plasma. *Neurosci Lett*. 1995; 20: 207-210.
48. Fujii T, Kawashima K. The Non-neuronal Cholinergic System An Independent Non-neuronal Cholinergic System in Lymphocytes. *Jpn J Pharmacol*. 2001; 85: 11-15.
49. Fujii T, Takada-Takatori Y, Kawashima K. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: expression of an independent, non-neuronal cholinergic system in lymphocytes and its clinical significance in immunotherapy. *J Pharmacol Sci*. 2008; 106: 186-192.

50. Galgani F, Bocquené G. Molecular biomarkers of exposure of marine organisms to organophosphorus pesticides and carbamates. In: Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment. Lagadic L, Caquet Th, Amiard JC, Ramade F (eds). USA: Science Publ, Inc. 2000; 113-137.
51. Galloway T, Handy R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*. 2003; 12: 345-363.
52. Garg UK, Pal AK, Jha GJ, Jadhao SB. Haemato-biochemical and immunopathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides in broiler chicks. *Int Immunopharmacol*. 2004; 4: 1709–1722.
53. Girón-Pérez MI, Santerre A, González-Jaime F, Casas-Solis J, Hernández-Coronado M, Peregrina-Sandoval J, Takemura A, Zaitseva G. Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinón. *Fish Shellfish Immunol*. 2007; 23: 760-769.
54. Girón-Pérez MI, Zaitseva G, Casas-Solis J, Santerre A. Effects of diazinon and diazoxon on the lymphoproliferation rate of splenocytes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): The immunosuppressive effect could involve an increase in acetylcholine levels. *Fish Shellfish Immunol*. 2008; 25: 517-521.
55. Girón-Pérez MI, Velázquez-Fernández J, Díaz-Resendiz K, Díaz-Salas F, Canto-Montero C, Medina-Díaz I, Robledo-Marengo M, Rojas-García A, Zaitseva G. Immunologic parameters evaluations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentrations of diazinon. *Fish Shellfish Immunol*. 2009; 27: 383-385.

56. Guimarães ATB, Silva de Áassis HC, Boeger W. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotox Environ Safety*. 2007; 68: 57–62.
57. Gupta RC, Milatovic D. Chapter 45 - Organophosphates and carbamates. In: Gupta RC, editor. *Veterinary Toxicology (Second Edition)*. Boston: Academic Press; 2012. p. 573-585. ISBN 9780123859266 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385926-6.00045-4>
58. Handy RD, Abd-El Samei HA, Bayomy MFF, Mahran AM, Abdeen AM, El-Elaimy EA. Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. *Toxicology*. 2002; 172: 13–34.
59. Hansen JD, Strassburger P. Description of an ectothermic TCR coreceptor, CD8 $\alpha$ , in rainbow trout. *J. Immunol*. 2000; 164: 3132-313.
60. Hernandez González MM, Jiménez Garcés C, Jiménez Albarán FR, Arceo Guzmán ME. Caracterización de las intoxicaciones agudas por plaguicidas: perfil ocupacional y conductas de uso de agroquímicos en una zona agrícola del estado de México, México. *Int Contam Ambient*. 2007; 23 (4): 159-167.
61. Hicks DA, Makova NZ, Nalivaeva NN, Turner AJ. Characterisation of acetylcholinesterase release from neuronal cells. *Chem Biol Interact*. 2013; 203: 302–308.
62. INECC. Los plaguicidas y su transporte en el ambiente. Instituto Nacional de Ecología y cambio climático. Sistema de Consultas de Investigadores en Plaguicidas. 2015. Consultado [21 Julio 2015]. Disponible <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/index.html>

63. Jokanović M. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*. 2001; 166: 139-160.
64. Kaiser P, Rothwell L, Avery S, Balu S. Evolution of the interleukins. *Dev Comp Immunol*. 2004; 28: 375-394.
65. Kandel ER, Schwartz JM, Jessell T.M: *Principios de Neurociencia*. 4a ed. México: Mc Graw Hill; 2001. p. 472-491.
66. Kappers WA, Edwards RJ, Murray S, Boobis AR. Diazinon Is Activated by CYP2C19 in Human Liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2001; 177: 68-76.
67. Kawashima K, Fujii T, Misawa H, Yamada S, Tajima S, Suzuki T, Fujimoto K, Kasahara T. Presence of acetylcholine in the blood and its production by choline acetyltransferase in lymphocytes. In *Neurochemistry: Cellular, Molecular, and Clinical Aspects*. A. Teelken & J. Korf (Eds.). New York and London: Plenum. 1997; pp. 813-819.
68. Kawashima K, Fujii T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther*. 2000; 86(1): 29-48.
69. Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci*. 2003; 74 (6): 675-696.
70. Kawashima K, Fujii T, Moriwaki Y, Misawa H. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life Sci*. 2012; 91: 1027-1032.

71. Kaya H, Çelik EŞ, Yılmaz S, Tulgar A, Akbulut M, Demir N. Hematological, serum biochemical, and immunological responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to phosalone. *Comp Clin Path*. 2014. Disponible en: DOI 10.1007/s00580-014-1930-x
72. Kepka M, Verburg-van Kemenade BML, Chadzinska M. Neuroendocrine modulation of the inflammatory response in common carp: Adrenaline regulates leukocyte profile and activity. *Gen Comp Endocrinol*. 2013; 188: 102–109.
73. Khoshbavar-Rostami HA, Soltani M, Hassan HMD. Immune response of great sturgeon (*Huso huso*) subjected to long-term exposure to sublethal concentration of the organophosphate, diazinon. *Aquaculture*. 2006; 256: 88–94.
74. Klaassen C, Casarett L, Doull J. *Toxicology: The basic science of poisons*. Internacional. 6a ed. The McGraw-Hill; 2001. p. 981.
75. Koenderman L, Buurman W, Daha MR. The innate immune response. *Immunol Lett*. 2014; 162: 95–102.
76. Laing KJ, Wang T, Zou J, Holland J, Hong S, Bols N. Cloning and expression analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* tumour necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* 2001; 268:1315–22.
77. Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines. *Dev Comp Immunol* 2004; 28:443–60.
78. Laing K, Hansen J. Fish T cells: recent advances through genomics. *Dev Comp Immunol*. 2011; 35 (12): 1282-1295.

79. Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav.* 2007; 90 (1): 54–58.
80. Ley general de salud, Título decimosegundo, Control Sanitario de Productos y Servicios y de su Importación y Exportación. Capítulo XII Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias Tóxicas o Peligrosas. Artículo 278. Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación. 14 de junio de 1992.
81. Li Q. New Mechanism of Organophosphorus Pesticide-induced Immunotoxicity. *J Nippon Med Sch.* 2007; 74: 92-105.
82. Li X, Liu L, Zhang Y, Fang Q, Li Y, Li Y. Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Chemosphere.* 2013; 93:428–433.
83. Litman GW, Rast JP, and Fugmann SD. The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(8): 543–553.
84. Magnadóttir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 20:137-151.
85. Moreno-Grau MD. Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana. Madrid: Mc Graw Hill; 2003. p.370.
86. Mueller T, Vernier P, Wullimann MF. The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. *Brain Res.* 2004; 1011 (2) 156–169.
87. Mulero I, Sepulcre MP, Roca FJ, Meseguer J, García-Ayala A, Mulero V. Characterization of macrophages from the bony fish gilthead seabream

- using an antibody against the macrophage colony-stimulating factor receptor. *Dev Comp Immunol.* 2008; 32: 1151–1159.
88. Nakanishi T, Toda H, Shibasaki Y, Somamoto T. Cytotoxic T cells in teleost fish. *Dev Comp Immunol.* 2011; 12 (35): 1317-1323.
89. Nardocci G, Navarro C, Cortés PP, Imarai M, Montoya M, Valenzuela B, Jara P, Acuña-Castillo C, Fernández R. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2014; 40: 531-538.
90. Neishabouri EZ, Hassan ZM, Azizi E, Ostad SN. Evaluation of immunotoxicity induced by diazinon in C57bl/6 mice. *Toxicology.* 2004; 196: 173–9.
91. NRA. The NRA review of Diazinon. National Registration Authority for Agricultural and Veterinary chemicals. National Registration Authority. 2002. Canberra, Australia. Disponible en: <http://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14961-diazinon-chemistry.pdf>
92. OMS. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000–2002. International Programme on Chemical Safety, Interorganization Programme for the Sound Management of Chemicals, Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 2004; p. 60.
93. Palic´ D, Ostojic J, Andreasen CB, Roth CA. Fish cast NETs: Neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Dev Comp Immunol.* 2007; 31:805–816.

94. Pavón Romero L, Hernández ME, Loria Salinas F, Sandoval López G. Interacciones neuroendocrinoinmunológicas. *Salud Ment.* 2004; 27:19-25.
95. Poet TS, Kousba AA, Dennison SL, Timchalk C. Physiologically Based Pharmacokinetic/ Pharmacodynamic Model for the Organophosphorus Pesticide Diazinon. *NeuroToxicology.* 2004; 25: 1013–1030.
96. Popesku JT, Martyniuk CJ, Mennigen J, Xiong H, Zhang D, Xia X, Cossins AR, Trudeau VL. The goldfish (*Carassius auratus*) as a model for neuroendocrine signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 293 43–56.
97. Rauta PR, Nayak B, Das S. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunol Lett.* 2012; 148: 23– 33.
98. Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol.* 2011; 33: 608–617.
99. Rinner I, Kawashima K, Schauenstein K. Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation. *J Neuroimmunol.* , 1998; 81(1-2): 31-37.
100. Roshchina VV. Evolutionary considerations of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells. In: Lyte M, Freestone PPE. *Microbial endocrinology: Interkingdom signaling in infectious disease and health.* New York: Springer; 2010; 17-52.
101. Saleh AM, Vijayasarathy C, Fernandez-Cabezudo M, Taleb M, Petroianu G. Influence of Paraoxon (POX) and Parathion (PAT) on Apoptosis: a

Possible Mechanism for Toxicity in Low-dose Exposure. J Appl Toxicol. 2003; 23: 23–29. DOI:10.1002/jat.880

102. Saurabh S, Sahoo PK. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquac Res. 2008; 39 (3): 223-239.
103. Scacchi R, Ruggeri M, Corbo RM. Variation of the butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE) genes in coronary artery disease. Clinica Chimica Acta.2011; 412: 1341–1344.
104. Schetinger MRC, Porto NM, Moretto MB, Morsch VM, Rocha JBT, Vieira V, Moro F, Neis RT, Bittencourt S, Bonacorso HG, Zanatta N. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPase activities. Neurochem Res. 2000; 25: 949–955.
105. Schlenk D. Pesticide biotransformation in fish. In: Mommsen T, Moon T. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Amsterdam: Elsevier B.V. 2005. Chapter 6, p.171-190.
106. Secombes CJ, Wang T, Bird S. The interleukins of fish. Dev Comp Immunol. 2011; 35: 1336–1345.
107. Sfacteria A, Brines M, Blank U. The mast cell plays a central role in the immune system of teleost fish. Mol Immunol. 2015; 63: 3–8.
108. Small BC, Bilodeau AL. Effects of cortisol and stress on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) pathogen susceptibility and lysozyme activity following exposure to *Edwardsiella ictaluri*. Gen Comp Endocrinol. 2005; 142: 256–262.

109. Soltani M, Pourgholam R. Lysozyme activity of grass carp (*Ctenopharingodon idella*) following exposure to sublethal concentrations of organophosphate, diazinón. *Vet Res.* 2007, 62: 50-52.
110. Steele S, Perry S, Li V, Lo A., Cheng H. The role of the M2 muscarinic receptor in the development of hypoxic bradycardia in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007; 146 (4): 182.
111. Suetake H, Araki K, Suzuki Y. Cloning, expression, and characterization of fugu CD4, the first ectothermic animal CD4. *Immunogenetics* 2004; 56:368-374.
112. Szelényi JG, Bartha E, Hollán SR. Acetylcholinesterase activity of lymphocytes: an enzyme characteristic of T-cells. *B J Haematol.* 1982; 50 (2): 241-245.
113. Tellez-Bañuelos MC, Santerre A, Casas-Solis J, Bravo-Cuellar A, Zaitseva G. Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. *Fish Shellfish Immunol.* 2009; 27:105-111.
114. Terry Jr AV. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: Potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacol Ther.* 2012; 134: 355–365.
115. Toledo-Ibarra GA, Rojas-Mayorquín AE, Girón-Pérez MI. Influence of the cholinergic system on the immune response of teleost fishes: potential model in biomedical research. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 1-9.

116. Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol*. 2011; 35:1366–1375.
117. Vega-Villasante F, Cortés-Lara MC, Zúñiga-Medina LM, Jaime-Ceballos B, Galindo-López J, Basto-Rosales MER, Nolasco-Soria H. Cultivo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) a pequeña escala ¿alternativa alimentaria para familias rurales y periurbanas de México?. *Redvet*. 2010; 11(03): 1695-7504.
118. Verburg-van Kemenade BML, Van der Ab LM, Chadzinska M. Neuroendocrine-immune interaction: Regulation of inflammation via G-protein coupled receptors. *Gen Comp Endocrinol*. 2013; 188: 94–101.
119. Vittozzi L, Fabrizi L., Di Consiglio E., Testai E. Mechanistic aspects of organophosphorothionate toxicity in fish and humans. *Environ Int*. 2001; 26: 125-129.
120. Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K. The cholinergic 'pitfall': Acetylcholine, a universal cell molecule in biological system, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999; 26(3): 198-205.
121. Yang EV, Glaser R. Stress-induced immunomodulation: impact on immune defenses against infectious disease. *Biomed Pharmacother*. 2000; 54: 245–250.
122. Zaitseva GP, Santerre-Lucas A, Casas-Solís J, Peregrina-Sandoval J, León-Sánchez R. En: *Tilapia: Aspectos Biológicos y Productivos*. 1ª ed. Editado por Universidad de Guadalajara, Coordinación Editorial, México: 2006.

123. Zapata A, Diez B, Cejalvo T, Gutiérrez-de Frías C, Cortés A. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 2006; 20: 126-136.
124. Zhang YA, Salinas I, Sunyer JO. Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish Shellfish Immunol.* 2011. 5(31): 627-634.
125. Zhu LY, Nie L, Zhu G, Xiang LX, Shao JZ. Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev Comp Immunol.* 2013; 39: 39-62.
126. Zirger JM, Beattie CE, McKay DB, Boyd RT. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Gene Expr Patterns* 2003; 3: 747-754.
127. Zou J, Secombes CJ. Teleost fish interferons and their role in immunity. *Dev Comp Immunol.* 2011; 35: 1376-1387.
128. Zwollo P, Cole S, Bromage E, Kaattari S. B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *J Immunol.* 2005; 174 (11): 6608-6616.
129. Zwollo P. Dissecting teleost B cell differentiation using transcription factors. *Dev Comp Immunol.* 2011; 35 (9): 898-905.

# ANEXOS

## Difusión de resultados

### Artículos científicos

- **Toledo-Ibarra GA**, Rojas-Mayorquín AE, Girón-Pérez MI. Influence of the cholinergic system on the immune response of teleost fishes: potential model in biomedical research. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 1-9.
- **Toledo-Ibarra GA**, Díaz-Resendiz KJG, Pavón L, Girón-Pérez MI. Cholinergic activity in mononuclear cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish. *Adv Neuroimmun Biol.* 2014; 5(4).
- Díaz-Resendiz KJG, **Toledo-Ibarra GA**, Girón-Pérez MI. Modulation of immune response by organophosphorus pesticides: Fishes as a potential model in immunotoxicology. *J Immunol Res.* 2015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/213836>
- **Toledo-Ibarra GA**, Díaz-Resendiz KJG, Pavón-Romero L, Rojas-García AE, Medina-Díaz IM, Robledo-Marengo ML, Girón-Pérez MI. Effects of diazinon on lymphocytic cholinergic system of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish.  
Aceptado en: *Veterinary Immunology and Immunopathology*

### Congresos

- IV Iberoamerican Congress on Neuroimmunomodulation y I Congreso de neuroinmunomodulación. Puebla, Octubre 2013.
  - Presentación en cartel: "Cholinergic activity in mononuclear cells from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)". **Toledo-Ibarra GA**, Pavón-Romero L, Rojas-García AE, Romero-Bañuelos CA, Medina-Díaz IM, Robledo-Marengo ML, Girón-Pérez MI.

- XXI Congreso de Inmunología. Querétaro, Mayo de 2014.
  - Presentación oral y cartel: "Evaluación del sistema colinérgico en células mononucleares de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) expuestos a diazinón. Toledo-Ibarra GA, Pavón-Romero L, Fonseca-Torres NX, Rojas-García AE, Romero-Bañuelos CA, Medina-Díaz IM, Robledo-Marengo ML, Girón-Pérez MI.
  
- International Society of Developmental & Comparative Immunology. Murcia, España. Junio 2015
  - Presentación en cartel: "Evidence of the extra-neuronal cholinergic system in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) lymphocytes and their role in the immunotoxic effect of organophosphate pesticides". Toledo-Ibarra GA, Pavón-Romero L, Rojas-García AE, Romero-Bañuelos CA, Medina-Díaz IM, Robledo-Marengo ML, Girón-Pérez MI.

### Capítulos de libros

- Díaz-Resendiz K.J.G; Toledo-Ibarra GA; Girón-Pérez M.I. Plaguicidas organofosforados en el ambiente y su efecto en el sistema inmune de peces. En: Inmunidad y ambiente. Galina Zaitseva (Ed). 2ª edición. Guadalajara 2014.
  
- Girón-Pérez MI, Toledo-Ibarra GA, Lanz H. Filogenia del Sistema Inmunológico. En: Inmunología Molecular, Celular y Traslacional. Editorial Wolters Kluwer. Estatus: en edición.