ISBN: 978-607-00-2083-4

Activación inespecífica de celulas inmunocompetentes de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus)* por exposición a pesticida

Martha Cecilia Téllez-Bañuelos, Anne Santerre- Lucas, Josefina Casas-Solís, Edgardo Flores- Torales, Galina Petrovna Zaitseva

Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jal., 45101, México
Correo-e: tbm10976@cucba.udg.mx

Introducción

Dentro de los agentes contaminantes más comúnmente encontrados en los cuerpos de agua están los pesticidas. Son químicos específicamente desarrollados y producidos para el uso en el control de plagas agrícolas y de organismos dañinos a la salud pública. Se emplean para incrementar la producción de alimentos y facilitar los métodos de agricultura moderna (Stenersen 2004).

El endosulfán es un insecticida órganoclorado ciclodieno. Se aplica en cultivos de vegetales, frutas, arroz, algodón, nueces de la India, té, café, tabaco y árboles para madera. También se usa como preservante de la madera y para controlar la mosca tsé-tsé y las termitas (Harikrishnan et al. 2005).
Se han reportado a nivel fauna silvestre que es de extrema toxicidad para peces de agua dulce por ejemplo: la CL_{50} es de 1.2 µg/L en trucha arcoíris y 1.5 µg/L en bagre (García-Cambero et al. 2005). En tilapia se ha reportado CL_{50} de 1.42 µg/L para alevines de peso 3.2-11.0 g (Kegley et al. 2008) y de 12.795 µg/L para juveniles de peso 150-200g (Téllez-Bañuelos et al. 2008).

La tilapia nilótica es un pez dulceacuícola de las principales especies comestibles cultivadas en México y en el mundo, debido a su resistencia a las infecciones y capacidad de adaptación a diferentes condiciones medioambientales, además de su elevada productividad (Fitzsimmons 2000).

El sistema inmune de estos organismos es en términos generales muy similar al de los vertebrados superiores. Cuentan con una respuesta inmune innata como adaptativa (Olabuenaga 2000).

En el presente trabajo evaluamos bajo una exposición subletal de 7 µg/L a endosulfán por 96h la actividad fagocítica de tilapia nilótica. Para su realización se utilizaron dos técnicas: el método de Cunningham (clásica) y la citometría de flujo (moderna). Además se cuantificó las especies reactivas de oxígeno (ERO) por el método

de quimioluminiscencia dependiente de luminol. Respecto a la respuesta inmune específica se midieron los niveles séricos de IgM específica para *Aeromona hydrophila* y linfoproliferación por ELISA.

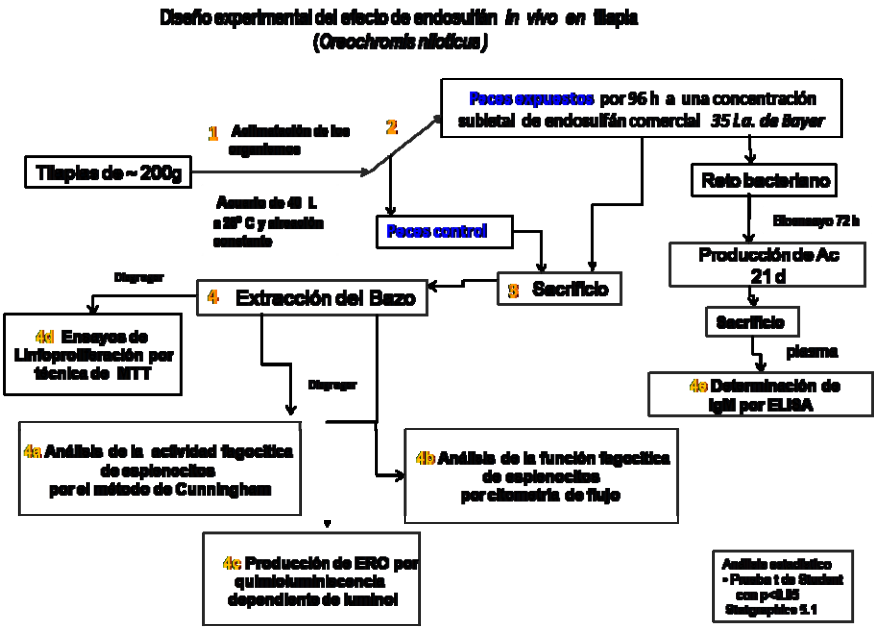
Objetivo

Evidenciar la activación inespecífica de células inmunocompetentes de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus)* expuesta a pesticida.

Objetivos específicos

1. Evaluar actividad fagocítica
   - índice de fagocitosis;
   - porcentaje de fagocitos activos;
     - esplenocitos FITC^{+};
   - intensidad media de fluorescencia.
2. Cuantificar la producción de las ERO
3. Medir los niveles séricos de IgM
4. Determinar linfoproliferación de esplenocitos

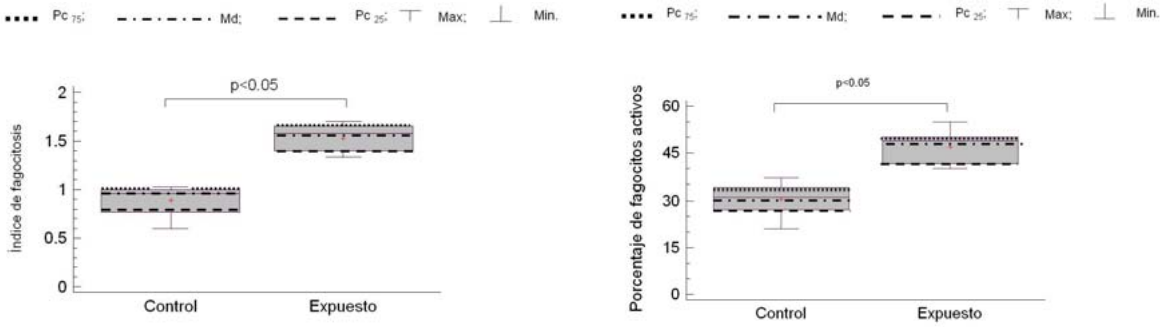
Materiales y Métodos



Resultados

La actividad fagocítica se midió por el método de Cunningham en macrófagos aislados de bazo de peces expuestos a concentración subletal de 7 µg/L de endosulfán y peces control (n=10).

Determinamos dos parámetros**:** índice de fagocitosis (Figura 1a) y porcentaje de fagocitos activos (Figura 1b).



(a) (b)

Figura 1. Efecto del endosulfán sobre la actividad fagocítica. (1a) se produce un incremento significativo en el índice de fagocitosis (1.531 ± 0.040) en comparación con el grupo control (0.894 ± 0.059). (1b) se incrementó esta actividad significativamente (46.916 ± 1.45) comparado con el grupo control (30.285 ± 1.94). Se aplicó la prueba *t* de Student para la comparación de las medias ± ES entre grupos.

Para validar el resultado observado por el método de Cunningham que es un método clásico, evaluamos parámetros como el porcentaje de células FITC⁺ (Figura 3 y Cuadro 1) e Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) (Figura 4 y Cuadro 2) por citometría de flujo se utilizó perlas de látex fluorescentes como sustrato a fagocitar.

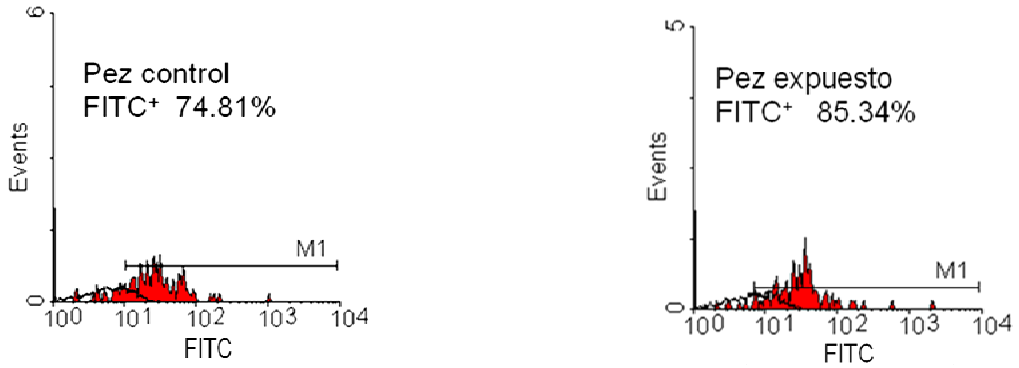


Figura 3. Histogramas representativos de la actividad fagocítica.
Control negativo; Células positivas a fagocitosis

Cuadro 1. Efecto del endosulfán sobre el porcentaje de células FITC+.

Esplenocitos FITC+	***Media ± ES***
Control	73.09 ± 1.18
Expuesto	84.86 ± 1.61

Se presentó un porcentaje significativo de células FITC+ (n=10) comparado con el grupo control. Se aplicó la prueba *t* de Student para la comparación de las medias entre grupos**.** El resultado puede ser equiparable al porcentaje de fagocitos activos por el método de Cunningham.

Los esplenocitos de peces expuestos a una concentración subletal de endosulfán por 96 h expresaron mayor IMF (Figura 4) comparado con el grupo control (n=10) con diferencia significativa entre grupos (Cuadro 2).

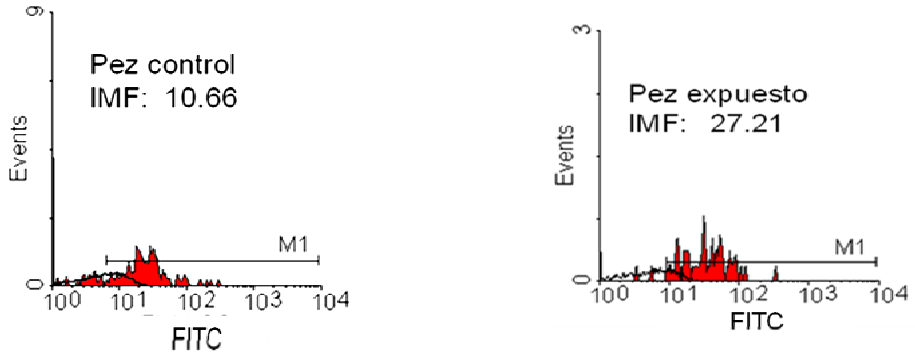


Figura 4. Histogramas representativos de la intensidad media de fluorescencia.
Control negativo; IMF de esplenocitos.

Cuadro 2. Efecto del endosulfán en la intensidad media de fluorescencia de esplenocitos de tilapia nilótica juvenil.

IMF	***Media ± ES***
Control	13.31 ± 1.19
Expuesto	20.40 ± 1.43

El resultado IMF puede ser equiparable al índice de fagocitosis por el método de Cunningham. Se aplicó la prueba *t* de Student ± ES para la comparación de medias entre grupos.

Para una cinética en la producción de las ERO entre grupos (n=10) cuantificamos por el método de quimioluminiscencia dependiente de luminol. Observamos que en los peces expuestos producen un 10% más ERO que en el grupo control.

La concentración de inmunoglobulina M (IgM) presente en el plasma de tilapia nilótica fue evaluada mediante ELISA (Figura 6)

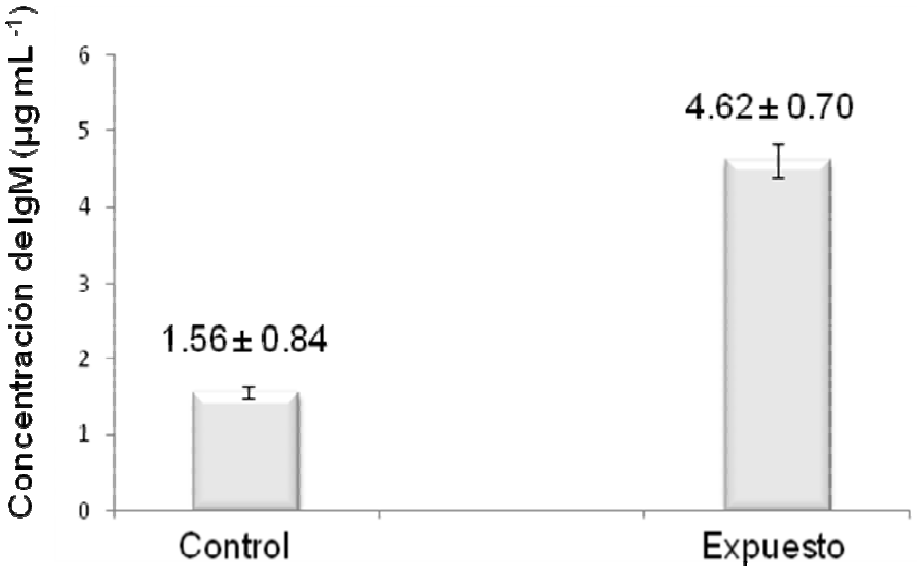


Figura 6. Efecto del endosulfan sobre la concentración de IgM**.** Se muestra que en tilapia nilótica expuesta (n=10) se incrementaron los niveles de inmunoglobulina de manera significativa. Se aplicó la prueba *t* de Student ± DS para la comparación de medias entre grupos.

La capacidad linfoproliferativa en respuesta a phorbol myristate acetate (PMA) más ionomicina de los linfocitos de tilapia expuesta *in vivo* a endosulfán fue comparada con los peces control (Figura 7)

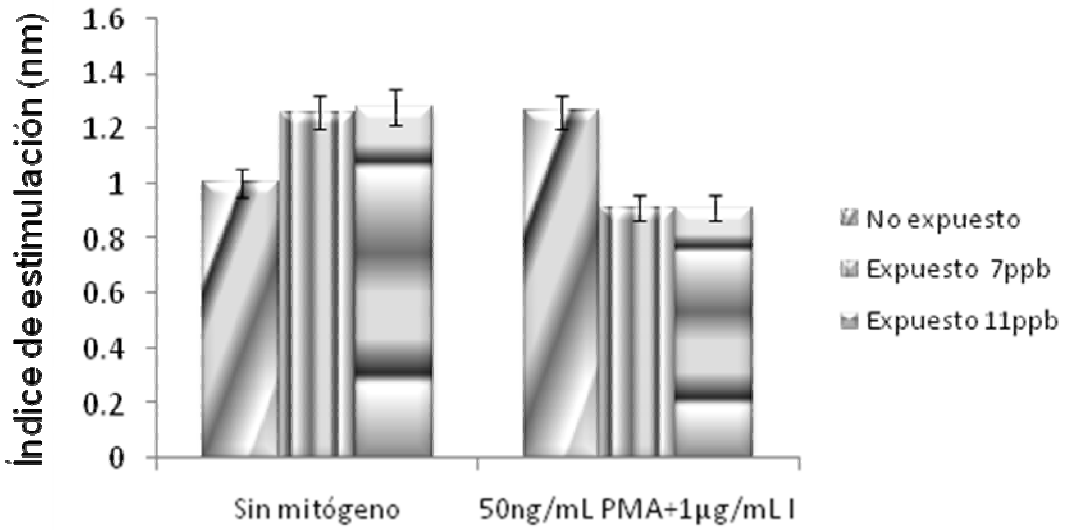


Figura 7. Índice de estimulación de linfocitos de tilapia nilótica expuesta *in vivo* a endosulfán**.** Los resultados indican que la exposición *in vivo* a endosulfán de tilapia nilótica (n=5) activa inespecíficamente a los linfocitos en ausencia de mitógeno. En contraste, con la adición de PMA+ Ionomicina se induce una disminución en la linfoproliferación.

Discusión

El endosulfan ha causado matanzas masivas en países como Alemania, Canadá, EEUU (Quijano 2000). En nuestros experimentos mostramos un incremento en la actividad fagocítica, en la producción de las ERO, en los niveles séricos de IgM, en la proliferación de linfocitos, resultado de una activación inespecífica en las células inmunocompetentes; lo que indica un factor de riesgo a la salud e integridad del sistema inmune en tilapia. Estos desajustes en la respuesta inmune llevan alateraciones como estrés oxidativo, reacciones autoinmunes, hiperplasia y neoplasias (Dorsal et al. 2003; Hernández-Flores et al. 2005; Antherieu et al. 2007). Hacen falta más estudios que permitan entender el mecanismo de acción inmunotóxico del endosulfán. En aras de su mejor comprensión, en nuestro laboratorio está en curso estudios de citotoxicidad por citometría de flujo y la valoración del gen de la granzima *(TLGR-1)* en células citotóxicas no específicas donde utilizamos herramientas de la biología molecular.

Conclusión

El endosulfán es un pesticida de extrema toxicidad para tilapia nilótica, induce inmunotoxicidad por una activación inespecífica en células inmunocompetentes.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Departamento de Biología Celular y Molecular en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente (CIBO). Gracias al Dr. Eduardo Juárez Carrillo por permitirnos aclimatar a las tilapia en el laboratorio húmedo. La investigación fue financiada por el fondo sectorial CONACYT-SEMARNAT-2004-C01-35.

Bibliografía

Antherieu, S., N.Ledirac, A.P. Luzy, P. Lenormand, J.C. Caron y R. Rahmani. 2007. Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. J. Cell Physiol. **213**:177-86.

Dorval, J., V. S. Leblond y A. Hontela. 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. Aquat. Toxicol. **63**: 229-41.

Fitzsimmons, K. 2000.Tilapia aquaculture in México en: B.A. Costa Pierce y J.E. Rakocy (Eds.). Tilapia Aquaculture in the Americas. Baton Rouge. The World Aquaculture Society **2** :171-173.

García-Camberos, J.P., R.F. Soler. 2005. Los plaguicidas organoclorados y sus implicaciones en el medio ambiente acuático. 1st ed. Servicio de Publicaciones Universidad de Extremadura, España. 73-79 pp.

Harikrishnan, V. R., S. Usha. Endosulfan - Fact sheet and Answers to Common Questions. IPEN Pesticide Working Group Secretariat, C/o Thanal, L-14, Jawahar Nagar, Kowdiar, Thiruvananthapuram – 695 003 Kerala, India [cited 2005] email: ipenpwg@thanal.org, website : www.thanal.org

Hernández-Flores, G., P.C. Gómez-Contreras, J.R., Domínguez-Rodríguez, J.M., Lerma-Díaz, P.C., Ortiz-Lazareno, R., Cervantes-Munguía y et al. 2005. Gamma-irradiation induced apoptosis in peritoneal macrophages by

oxidative stress. Implications of antioxidants in caspase mitochondrial pathway. Anticancer Res. **6B**:4091-100.

Kegley, S.E., B.R. Hill, S. Orme y A.H. Choi. Pesticide Database 2000-2008, Pesticide Action Network, North America, 2008, available from URL: http://www.pesticideinfo.org.

Olabuenaga, S. E. 2000. Sistema Inmune en Peces. Gayana (Concepc.) **64**:205-215.

Quijano, R.F. 2000.Risk assessment in a third-world reality: an endosulfan case history. Int. J. Occup. Environ. Health **6**:12-7.

Stenersen, J. 2004. Chemical Pesticides Mode of action and toxicology. CRC Press. 10 pp.

Tellez-Bañuelos, M.C., A. Santerre, J. Casas-Solis, A. Bravo-Cuellar y G. Zaitseva. Oxidative stress in macrophages from spleen of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. Fish & Shellfish Immunology. En prensa