

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS
ÁREA DE CIENCIAS AMBIENTALES



**EXPRESIÓN DE RECEPTORES COLINÉRGICOS
EXTRANEURONALES Y EVALUACIÓN DE MECANISMOS DE
INMUNIDAD INNATA CELULAR EN TILAPIA (*Oreochromis
niloticus*) EXPUESTA DE FORMA AGUDA A DIAZINÓN**

PRESENTA

M. en C. Carlos Eduardo Covantes Rosales

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del Grado de Doctor
en Ciencias Biológico-Agropecuarias en el Área de Ciencias Ambientales

DIRECTOR:

Dr. Manuel Iván Girón Pérez

Xalisco, Nayarit, agosto del 2019

Tepic, Nayarit, 15 de agosto de 2019.

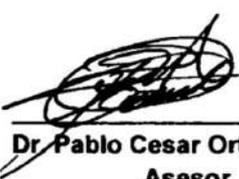
DR. JUAN DIEGO GARCÍA PAREDES
COORDINADOR DEL POSGRADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
PRESENTE

Los suscritos integrantes del Cuerpo Tutorial para asesorar la tesis titulada: **'EXPRESIÓN DE RECEPTORES COLINÉRGICOS EXTRANEURONALES Y EVALUACIÓN DE MECANISMOS DE INMUNIDAD INNATA CELULAR EN TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) EXPUESTA DE FORMA AGUDA A DIAZINÓN** que presenta el **M en C. Carlos Eduardo Covantes Rosales** para obtener el Grado de Doctor en Ciencias con opción terminal en Ciencias Ambientales damos nuestra aprobación para que continúe con los trámites correspondientes para la obtención de su grado

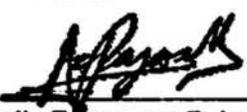
Sin otro asunto a tratar reciba un cordial saludo

ATENTAMENTE


Dr. Manuel Iván Girón Pérez
Director


Dr. Pablo Cesar Ortiz Lazareno
Asesor


Dra. Karina Janice Guadalupe Díaz Resendiz
Asesor


Dra. Argelia Esperanza Rojas Mayorquín
Asesor


Dr. Juan Manuel Agraz Cibrian
Asesor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/128/19.

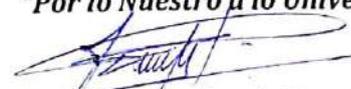
Xalisco, Nayarit; 20 de agosto de 2019.

M.C. GLORIA MACHAIN IBARRA
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
NIVEL SUPERIOR Y POSGRADO
P R E S E N T E.

Con base al oficio de fecha 15 de agosto del presente, enviado por los **CC. Dr. Manuel Iván Girón Pérez, Dr. Pablo César Ortiz Lazareno, Dra. Karina Janice Guadalupe Díaz Resendiz, Dra. Argelia Esperanza Rojas Mayorquín y Dr. Juan Manuel Agraz Cibrian**, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza al **M. en C. Carlos Eduardo Covantes Rosales**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias 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

&mefm

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunotoxicología de la Unidad Especializada I+D+I LANIIA-Unidad Nayarit de la Universidad Autónoma de Nayarit, bajo la dirección del Dr. Manuel Iván Girón Pérez. El proyecto fue financiado por el fondo de SEP-CONACyT (Ciencia Básica-CB2012/179508).

Durante los estudios de Doctorado el autor del trabajo de investigación recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Numero de becario 425359.

DEDICATORIAS:

A mi familia, novia y amigos.

AGRADECIMIENTOS:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A la Universidad Autónoma de Nayarit y al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias.

A mi Comité Tutorial: Dr. Manuel Iván Girón Pérez, Dr. Pablo Cesar Ortiz Lazareno, Dra. Karina Janice Guadalupe Díaz Resendiz, Dra. Argelia Esperanza Rojas Mayorquín y al Dr. Juan Manuel Agraz Cibrián por sus valiosas aportaciones en la preparación de esta tesis.

Nuevamente a mi director de tesis Dr. Manuel Iván Girón Pérez, por transmitirme su sabiduría, por toda su paciencia, las enseñanzas, consejos, por el tiempo que me dedicó y sobre todo por su entera disposición, además por apoyarme en uno de los momentos más difíciles de mi vida, por ello tiene mi gratitud.

Al Dr. Juan Diego García Paredes coordinador de posgrado, gracias por su ayuda durante todo el tiempo del posgrado.

A mis profesores, gracias por compartir su conocimiento y enseñanzas.

Al Centro Nayarita de Innovación y Transferencia de Tecnología A.C (CENITT) y al Laboratorio Nacional para Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA), por permitirme el acceso a sus instalaciones, equipos y capacitaciones.

A la cDra. Gladys Alejandra Toledo Ibarra, a la Dra. Karina Janice Guadalupe Díaz Resendiz y a la M. en C. Herminia Guadalupe Ventura Ramón muchas gracias por todo, tienen mi gratitud y mi amistad.

A todos los estudiantes de laboratorio (Neil, Ramón, Andrés, Carlos Parra, Jesús Antonio, Erika Janeth, Érica Vázquez, Regina, Reyna, Tenoch, Manuel, Edgardy, Alois, Ivonne, Karime, Dayreni, Ulises y Noemí) y la sra. Vicky por toda su amistad y apoyo.

Al personal de la revista Bio Ciencias (Brenda, Orlanda, Karina y Francisco) les agradezco su ayuda y todos los buenos momentos.

Al personal de LANIIA (Rocio, Mercedes, Gladys, Sarahí, Herminia, Dra. Adela), por sus consejos, ayuda en todo, y por su apoyo en México, jamás lo olvidare gracias.

A la red temática de toxicología de plaguicidas por su apoyo en la divulgación y enriquecimiento de esta tesis.

A mi abuela, tíos y primos, por su apoyo y recibirme en sus casas con los brazos abiertos.

A mi familia (Francisco Covantes Camacho, Irene rosales Campos, Francisco Covantes Rosales y Rodolfo Covantes Rosales) por su apoyo incondicional en todo momento.

A mi novia por su apoyo incondicional en todo momento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN	¡Error! Marcador no definido.
1.1 Plaguicidas organofosforados.....	¡Error! Marcador no definido.
1.1.1 Diazinón.....	¡Error! Marcador no definido.
1.2 Sistema colinérgico neuronal: Blanco principal de los OPS.....	¡Error! Marcador no definido.
1.2.1 Receptores colinérgicos.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3 Sistema inmune	¡Error! Marcador no definido.
1.3.1 Sistema inmune de peces teleósteos ..	¡Error! Marcador no definido.
1.3.2 Mecanismos de inmunidad innata celular	¡Error! Marcador no definido.
1.3.3 Inmunotoxicidad de OPs.....	¡Error! Marcador no definido.
1.3.4 Sistema colinérgico extraneuronal en células del sistema inmune	¡Error! Marcador no definido.
1.4 Peces como modelo de estudio en la investigación biomédica	¡Error! Marcador no definido.
1.4.1 Tilapia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>)	¡Error! Marcador no definido.
2. JUSTIFICACIÓN.....	¡Error! Marcador no definido.
3. HIPÓTESIS	¡Error! Marcador no definido.
4. OBJETIVOS.....	¡Error! Marcador no definido.
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	¡Error! Marcador no definido.
4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	¡Error! Marcador no definido.
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	¡Error! Marcador no definido.
5.1 Organismos.....	¡Error! Marcador no definido.
5.2 Exposición <i>in vivo</i> a DZN	¡Error! Marcador no definido.
5.3 Obtención de muestras	¡Error! Marcador no definido.
5.3.1 Aislado de leucocitos totales.....	¡Error! Marcador no definido.
5.3.2 Aislado de neutrófilos.....	¡Error! Marcador no definido.
5.3.3 Aislado de células mononucleares de bazo	¡Error! Marcador no definido.

5.4	Expresión de receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR).....	¡Error! Marcador no definido.
5.4.1	Extracción de RNA total.....	¡Error! Marcador no definido.
5.4.2	Síntesis de cDNA.....	¡Error! Marcador no definido.
5.4.3	Cuantificación de la expresión relativa por PCR en tiempo real (q-PCR).....	¡Error! Marcador no definido.
5.5	Análisis mediante citometría de flujo.....	¡Error! Marcador no definido.
5.5.1	Capacidad fagocítica	¡Error! Marcador no definido.
5.5.2	Estallido respiratorio	¡Error! Marcador no definido.
5.6	Formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)	¡Error! Marcador no definido.
5.7	Análisis estadístico.....	¡Error! Marcador no definido.
6.	RESULTADOS	¡Error! Marcador no definido.
6.1	Expresión de mAChR.....	¡Error! Marcador no definido.
6.1.1	Expresión basal de mAChR en cerebro y CMB	¡Error! Marcador no definido.
6.1.2	Expresión de mAChR en cerebro y CMB de peces expuestos <i>in vivo</i> a DZN.....	¡Error! Marcador no definido.
6.1.2.1	Expresión del subtipo mAChR-M2....	¡Error! Marcador no definido.
6.2.1.2	Expresión del subtipo mAChR-M3....	¡Error! Marcador no definido.
6.2.1.3	Expresión del subtipo mAChR-M4....	¡Error! Marcador no definido.
6.2.1.4	Expresión del subtipo mAChR-M5A..	¡Error! Marcador no definido.
6.2	Parámetros fagocíticos	¡Error! Marcador no definido.
6.2.1	Fagocitosis.....	¡Error! Marcador no definido.
6.2.2	Estallido respiratorio	¡Error! Marcador no definido.
6.2.3	Formación de NETs	¡Error! Marcador no definido.
7.	DISCUSIÓN	¡Error! Marcador no definido.
8.	CONCLUSIONES	¡Error! Marcador no definido.
9.	PERSPECTIVAS	¡Error! Marcador no definido.
10.	BIBLIOGRAFÍA	¡Error! Marcador no definido.
11.	ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.

ABREVIATURAS

AcCoA:	Acetil coenzima A
ACh:	Acetilcolina
AChE:	Acetilcolinesterasa
ASTDR:	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
Ca ⁺² :	Calcio
Ch:	Colina
ChAT:	Colina acetiltransferasa
CHT1:	Transportador de colina de alta afinidad
CICOPLAFEST:	Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso Y Uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas
CL ₅₀ :	Concentración letal 50
CMB:	Células mononucleares de bazo
CoA:	Coenzima A
COFEPRIS:	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CYP 450:	Citocromo P450
DAG:	Diacilglicerol
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEP:	Dietilfosfato
DEPT	Dietiltiofosfato
DHE:	Dihidroetidio
DHR ₁₂₃	123-Dihidrorodamina
DZN:	Diazinón
EFL-1a:	Factor de elongación 1 alfa (elongation factor-like -1alpha)
ER:	Retículo endoplásmico
h:	Horas
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
ICAM-1:	Molécula de adhesión intracelular-1
IL:	Interleucina
IMHP:	2-isopropil-4 metil-6 hidroxipirimidina
INECC:	Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático
IP ₃ :	Inositol-1,4,5-trifosfato
mAChR:	Receptor muscarínico de acetilcolina
MAPK:	Proteína cinasa activada por mitógenos
MAPKK:	Proteína cinasa cinasa activada por mitógenos

MFI:	Intensidad media de fluorescencia
MHCII:	Complejo principal de histocompatibilidad
MNC:	Células mononucleares
MOLT-3:	Línea celular de linfoma T
nAChR:	Receptor nicotínico de acetilcolina
NETs:	Trampas extracelulares de neutrófilos
O.D:	Oxígeno disuelto
OMS:	Organización mundial de la salud
OPs:	Plaguicidas organofosforados
PBS:	Solución salina amortiguada de fosfatos
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
pH:	Potencial de hidrógeno
PLC:	Fosfolipasa C
PMA:	Forbol-12-Miristratro-13-Acetato
PMNC:	Células polimorfonucleares
PON1:	Paraoxonasa 1
ROS:	Especies reactivas del oxígeno
T _{1/2} :	Tiempo de vida media
TCR:	Receptor de linfocito T

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura química de los plaguicidas organofosforados.
- Figura 2.** Estructura química del plaguicida organofosforado DZN.
- Figura 3.** Biotransformación del plaguicida organofosforado DZN.
- Figura 4.** Dispersión ambiental de plaguicidas.
- Figura 5.** Sistema colinérgico neuronal.
- Figura 6.** Estructura del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).
- Figura 7.** Estructura de los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR).
- Figura 8.** Órganos linfoides de los peces teleósteos.
- Figura 9.** Imagen representativa de la fagocitosis y la producción de especies reactivas del oxígeno.
- Figura 10.** Mecanismos microbicidas de neutrófilos.
- Figura 11.** Estructura y principales componentes de las NETs.
- Figura 12.** Regulación colinérgica de células del sistema inmune.
- Figura 13.** Ejemplar de la especie *O. niloticus*.
- Figura 14.** Expresión de los subtipos mAChR en tejidos de *O. niloticus*.
- Figura 15.** Efecto de DZN en la expresión de mAChR-M2 en cerebro y CMB.
- Figura 16.** Efecto de DZN en la expresión de mAChR-M3 en cerebro y CMB.
- Figura 17.** Efecto de DZN en la expresión de mAChR-M4 en cerebro y CMB.
- Figura 18.** Efecto de DZN en la expresión de mAChR-M5A en cerebro y CMB.
- Figura 19.** Histogramas de fluorescencia FL1 en leucocitos totales de tilapia nilótica.
- Figura 20.** Porcentaje de células fagocíticas de leucocitos totales aislados de *O. niloticus* expuestas *in vivo* durante 6 horas a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN.
- Figura 21.** Porcentaje de células fagocíticas de leucocitos totales aislados de *O. niloticus* expuestas *in vivo* durante 24 horas a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN.
- Figura 22.** Histogramas representativos de la fluorescencia basal de las células así como la producción basal de H₂O₂ (DHR) y O₂⁻ (DHE) en peces control y expuestos.
- Figura 23.** Producción de H₂O₂ en leucocitos aislados de sangre de tilapia nilótica expuesta *in vivo* durante 6 h a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN.
- Figura 24.** Producción de H₂O₂ en leucocitos aislados de sangre de tilapia nilótica expuesta *in vivo* durante 24 h a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN.

Figura 25. Producción de O_2^- en leucocitos aislados de sangre de tilapia nilótica expuesta *in vivo* durante 6 h a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN.

Figura 26. Producción de O_2^- en leucocitos aislados de sangre de tilapia nilótica expuesta *in vivo* durante 24 h a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN.

Figura 27. Formación de NETs en tilapia nilótica observadas con microscopio de fluorescencia a 20x.

Figura 28. Formación de NETs en peces expuestos *in vivo* a DZN.

Figura 29. Producción basal e inducidas de trampas extracelulares de neutrófilos en peces expuestos *in vivo* a 0.97, 1.95 y 3.97 mg/L de DZN a durante 6 h.

Figura 30. Producción basal e inducidas de trampas extracelulares de neutrófilos en peces expuestos *in vivo* a 0.97, 1.95 y 3.97 mg/L de DZN a durante 24 h.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del plaguicida organofosforado diazinón.

Tabla 2. Componentes reportados en las trampas extracelulares de neutrófilos.

Tabla 3. Efectos tóxicos de los OPs en la respuesta inmune humoral y celular en peces.

Tabla 4. Características de los oligonucleótidos utilizados para la expresión relativa de receptores colinérgicos y gen constitutivo.

RESUMEN

Los plaguicidas organofosforados (OPs) son insecticidas de amplio espectro que ejercen su efecto neurotóxico inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Sin embargo, esta enzima no sólo está presente en sistema nervioso, también se ha demostrado actividad colinérgica en leucocitos, por lo que los OPs pueden modificar la comunicación neuroinmunológica. El objetivo de este estudio fue determinar la alteración colinérgica y parámetros de inmunidad innata, provocada por diazinón (DZN) en células del sistema inmune, utilizando como modelo al pez tilapia (*Oreochromis niloticus*). Para este propósito, los peces fueron expuestos *in vivo* durante 6 o 24 h a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN. Inmediatamente, se evaluó en leucocitos, la expresión de los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR) (subtipos M2-M5), a través de RT-qPCR, así como parámetros de la respuesta innata, como capacidad fagocítica, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), mediante técnicas fluorescentes, como citometría de flujo y microscopía. Los resultados obtenidos indican que DZN induce disminución de la capacidad fagocítica e incrementó la producción de ROS y formación de NETs; alteraciones que podrían estar relacionadas a una disrupción colinérgica, ya que se observó la disminución en la expresión de todos los subtipos de mAChR evaluados (M2-M5). Los resultados obtenidos, pueden ayudar a la comprensión de fenómenos biológicos importantes, debido a que el sistema colinérgico leucocitario es esencial en procesos fisiológicos básicos, como la inducción de la respuesta inmune, así como en aspectos conductuales-cognitivos, por lo que su alteración pone en riesgo la supervivencia del organismo.

ABSTRACT

Organophosphorus pesticides (OPs) are broad-spectrum insecticides that exert their neurotoxic effect by inhibiting the enzyme acetylcholinesterase (AChE). However, this enzyme is not only present in the nervous system; cholinergic activity has also been demonstrated in leukocytes, so OPs can modify neuroimmunological communication. The objective of this study was to determine the cholinergic alteration and parameters of innate immunity, caused by diazinon (DZN) in cells of the immune system, using the tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) as a model. For this purpose, the fish were exposed *in vivo* for 6 or 24 h at 0.97, 1.95 and 3.91 mg/L of DZN. Immediately, the expression of acetylcholine muscarinic receptors (mAChR) (M2-M5 subtypes) was evaluated through leukocytes, through RT-qPCR, as well as parameters of the innate response, such as phagocytic capacity, production of reactive oxygen species (ROS) and formation of extracellular neutrophil traps (NETs), using fluorescent techniques, such as flow cytometry and microscopy. The results obtained indicate that DZN induces a decrease in phagocytic capacity and increased ROS production and NETs formation; alterations that could be related to a cholinergic disruption, since the decrease in the expression of all subtypes of mAChR evaluated (M2-M5) were observed. The results obtained can help the understanding of important biological phenomena, because the leukocyte cholinergic system is essential in basic physiological processes, as immune response induction, as well as behavioral-cognitive aspects, so that its alteration puts survival at risk of organism.

1. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son sustancias o mezclas de sustancias empleadas para prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales (FAO, 2006). Se estima que aproximadamente en un tercio de los productos agropecuarios se emplean plaguicidas (Liu *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2011). Datos de la FAO, indican que a nivel mundial se emplean 4,116,832.41 toneladas de ingrediente activo de plaguicidas, mientras que en México son usadas 57,110.63 toneladas de estas sustancias (FAO, 2016).

Actualmente existen diferentes formas de clasificar a los plaguicidas. En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), así como el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), recomiendan la clasificación de plaguicidas de acuerdo a criterios como: organismo blanco, modo de acción, origen, persistencia, peligrosidad y grupo químico. Respecto a esta última clasificación, los plaguicidas se pueden clasificar en diferentes familias como organoclorados, organofosforados, carbamatos, tiocarbamatos, piretroides, entre otros.

1.1 Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados (OPs) son un grupo de insecticidas de amplio espectro extensamente utilizados en las actividades agrícolas para el control de plagas (Heano y Corey, 1986; Ogasawara *et al.*, 2017). Los OPs son ésteres, amidas o tioles derivados del ácido fosfórico. Su estructura química está compuesta por un átomo central de fósforo pentavalente unido a un átomo de azufre u oxígeno (P=S o P=O), dos radicales alquilo, alcoxi o amino generalmente denominados R1 y R2 y un tercer grupo más lábil a una hidrólisis

denominado grupo saliente (X), el cual puede ser flúor, cloro, fosfato, carboxilato (Figura 1) (Fukuto, 1990). Los OPs representan aproximadamente el 50% del uso mundial de plaguicidas (Casida y Quistad, 2004), siendo paratión, clorpirifos, diazinón, diclorvos, fosmet, fenitrotión, tetraclorvinfos, azametifos, Azinfos-metil, malatión y metil-paratión los OPs de mayor uso (Adeyinka y Pierre, 2018).

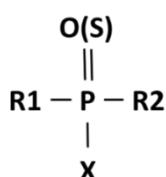


Figura 1. Estructura química de los plaguicidas organofosforados: Un átomo central de fósforo enlazado a un átomo de oxígeno o azufre; R1 y R2 pueden ser grupos alquilo, alcoxi o amino; X puede ser flúor, cloro, fosfato o carboxilato. Tomado de Costa, 2006.

1.1.1 Diazinón

Diazinón (DZN), es un OPs insecticida/acaricida usado comúnmente en varios países, incluyendo México (González-Arias *et al.*, 2010; Leyva-Morales *et al.*, 2014; Ccancapa *et al.*, 2016; Ibigbami *et al.*, 2016). El DZN (Figura 2) (O,O-dietil-O-[2-isopropil-6-metilpirimidin-4-il] fosforotioato), es de textura oleosa, incolora e inodora, soluble en solventes orgánicos como el éter de petróleo, alcohol, benzina y otros hidrocarburos (ASTDR, 2008), sus propiedades fisicoquímicas pueden verse en la tabla 1.

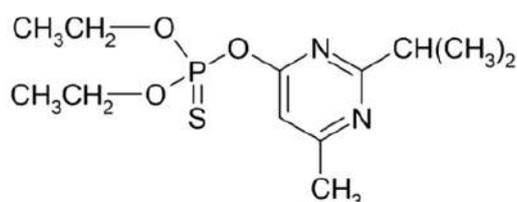


Figura 2. Estructura química del plaguicida organofosforado DZN. En la figura se puede observar el átomo central de P unido con un doble enlace a un átomo de S, además 2 radicales isotrópico y una piramidita unidos a átomos de O. Tomado de Kappers *et al.*, 2001.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del plaguicida organofosforado DZN (Adaptado de ASTDR, 2008).

Característica	Información	Referencia
Nombre químico	O,O-dietil O-2-isopropil-6-metilpirimidin-4-il fosforotioato	ASTDR, 2008
Nombres comerciales	Diazinón; Alfa-tox; Basudin; Diazol; Knox-Out; Spectracide, Diazinón 600 EC; Diazinón 25 E	ASTDR, 2008
PM	304.35 g/mol	ASTDR, 2008
PKa	2.4-2.6	Ku <i>et al.</i> , 1998
LogK _{ow}	3.3-3.81	ASTDR, 2008
Presión de vapor	6.60 X10 ⁻⁵ mmHg (20°C)	ASTDR, 2008
Constante de Henry	1.17x10 ⁻⁷ atm-m ³ /mol	ASTDR, 2008
Peligrosidad	Clase II: Moderadamente peligroso	Heano y Corey, y Corey, 1986
Vida media en agua	70 h-138 días	ASTDR, 2008
Vida media en suelo	21-103 días	Heano y Corey, y Corey, 1986

En los Estados Unidos, el uso de DZN está restringido desde el año 2004, sin embargo, anualmente se aplican 2,722 toneladas (USEPA, 2018). En México, la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST) autorizó el uso DZN en las áreas agropecuaria, doméstica, jardinería, urbana e industrial (CICOPLAFEST, 2004). Este compuesto es clasificado por la Organización Mundial de la Salud como moderadamente peligroso de clase II, es decir posible carcinogénico (ASTDR, 2008).

1.1.1.1 Toxicocinética del DZN en mamíferos

La absorción del plaguicida DZN puede ser a través de las vías respiratoria, dérmica y digestiva. El coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) del DZN es de 3.81 (ATSDR, 2008), por lo tanto, este compuesto es capaz de atravesar las barreras biológicas. Una vez absorbido el DZN será distribuido en el organismo. Aunque existe información limitada acerca de los mecanismos de

distribución, algunos reportes indican que se une fuertemente a proteínas plasmáticas y puede ser transportado con relativa facilidad (ASTDR, 2008).

La biotransformación del DZN es un proceso que ocurre mediante la acción de enzimas microsomales hepáticas. En primer lugar, el DZN (compuesto padre), sufrirá una oxidación desulfurativa catalizada por el citocromo P450 (CYP450) (Figura 3-1), donde se genera un compuesto intermedio (*fosfooxitireno*), compuesto que puede ser desactivado a través de hidrólisis espontánea, desulfuración, y desoxigenación para formar los metabolitos 2-isopropyl4-metil-6-hidroxipirimidina (IMHP), dietiltiofosfato (DETP), y dietilfosfato (DEP) (Figura 3-2). Por otra parte, el fosfooxitireno puede tener una desulfuración espontánea y formar diazoxón (Figura 3-3). La evidencia científica indica que en mamíferos el CYP2C19 participa en la biotransformación de DZN a diazoxón, sin embargo, se han reportado que los CYP450 como: CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6, pueden metabolizar OPs (Ellison *et al.*, 2012). La desintoxicación de diazoxón se da a través de hidrólisis esterases de hepáticas como la paraoxonasa (PON1) y extra-hepáticas como las carboxilesterasas (Figura 3-4), para finalmente eliminar los metabolitos de DZN mediante la orina y heces (ASTDR, 2008).

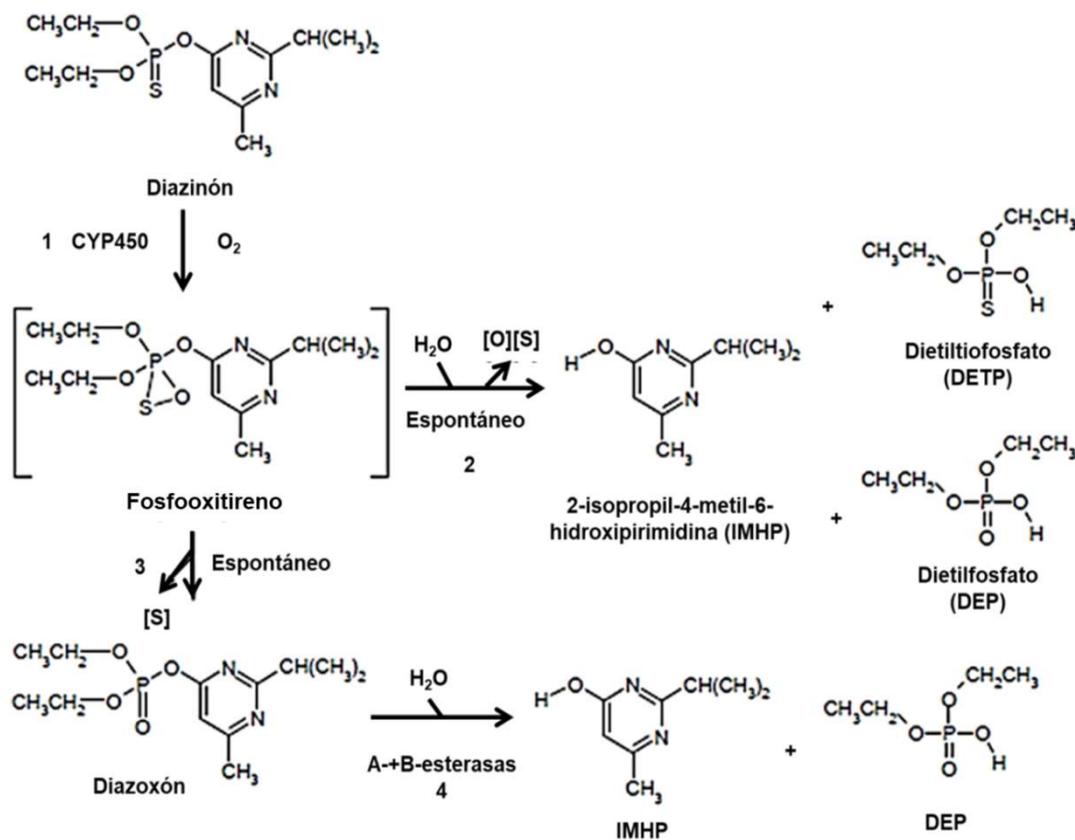


Figura 3. Biotransformación del plaguicida organofosforado DZN; La información corresponde a observaciones reportadas en mamíferos, tomado de **ASTDR, 2008**.

1.1.1.2 Mecanismo de acción

Dentro de los OPs, los fosfatos ($P=O$) *per se* son compuestos bioactivos, mientras que los fosforotioatos ($P=S$) como el caso del DZN, necesitan ser biotransformados para su activación, es decir generar el metabolito oxón y así poder ejercer su efecto tóxico (Vale, 1998). Los OPs son agentes neurotóxicos que actúan inhibiendo mediante la fosforilación del grupo hidroxilo en el aminoácido serina del sitio activo de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE). Esta inhibición de AChE ocasiona una excesiva acumulación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en el espacio sináptico. En consecuencia, la ACh sobreestimula a los receptores colinérgicos de las células postsinápticas,

ocasionando una estimulación nerviosa descontrolada que puede conducir a muerte (Fukuto, 1990; Vale, 1998; Elersek y Filipic, 2011).

1.1.1.3 OPs y ecosistemas acuáticos

Durante la aplicación de los plaguicidas, se estima que el 99.9% termina en matrices ambientales y solamente el 0.1% alcanza al organismo blanco (Pimentel, 1995). En este contexto, estas sustancias tóxicas pueden alcanzar de forma directa o indirectamente los cuerpos de agua (Arias-Esteves *et al.*, 2008), afectando a organismos no blancos (mamíferos, reptiles, invertebrados, aves y peces) esto conduce a un desequilibrio de las interacciones tróficas de los ecosistemas (Figura 4). Específicamente DZN, tiene un tiempo de vida media en suelo de 21-103 días y 12-138 días en agua (ASTDR, 2018).

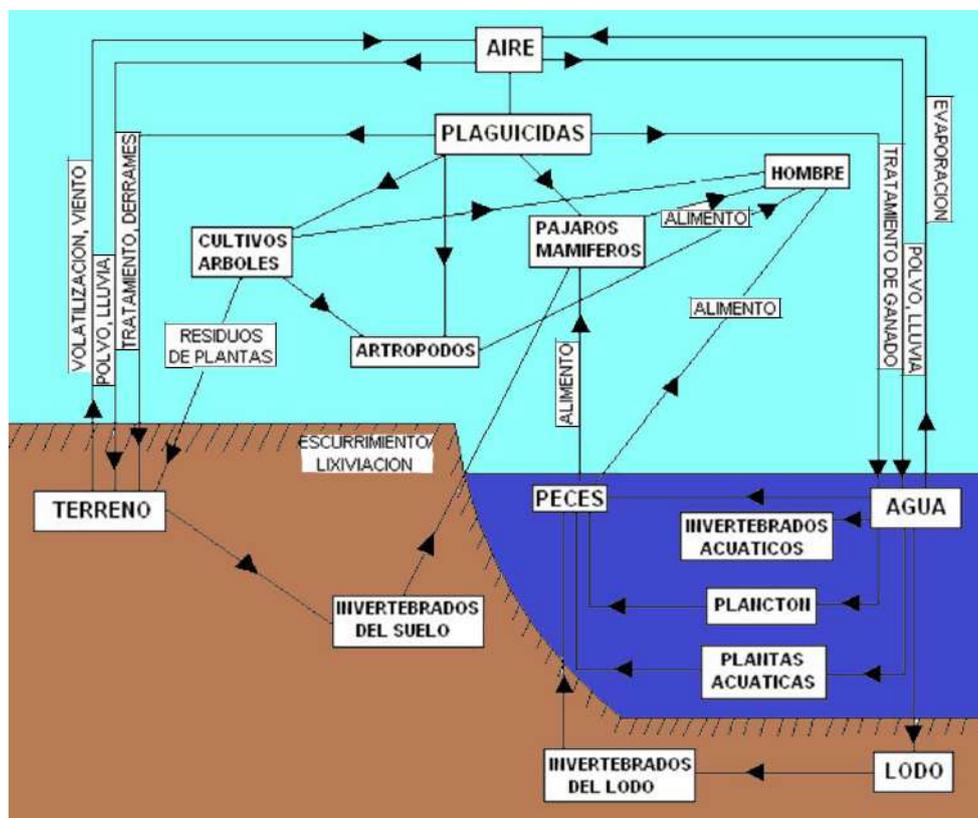


Figura 4. Dispersión ambiental de plaguicidas. Mecanismos de transporte de plaguicidas para alcanzar las distintas matrices ambientales. Adaptado de Lans-Ceballos *et al.*, 2018.

1.1.1.3 Toxicidad de DZN en peces

Los organismos acuáticos son particularmente sensibles a los plaguicidas (DeLorenzo *et al.*, 2001), debido a que están en contacto directo con los plaguicidas diluidos en el agua, por lo tanto, están expuestos por contacto dérmico, branquial u oral (Sabra y Mehana, 2015). En este sentido, los peces teleósteos son de gran interés para los estudios sobre ecotoxicología, ya que son el grupo de vertebrados más abundante en el planeta (Ravi y Venkatesh, 2018). Además, los peces son organismos ideales para la evaluación de contaminantes en cuerpos acuáticos (Wester *et al.*, 1994; Bacolod *et al.*, 2017). DZN al igual que otros OPs, provoca la inhibición de AChE y una acumulación de ACh ejerciendo el efecto neurotóxico (Sabra y Mehana, 2015). Además de los efectos neurotóxicos clásicos de los OPs, estas sustancias también afectan a otros órganos y sistemas, siendo reportadas en peces alteraciones conductuales (atacar/huir alimentación y reproductivos), hematológicas, histopatológicas, enzimáticas y bioquímicas (Ullah y Zorriehzahra, 2015).

1.2 Sistema colinérgico neuronal: Blanco principal de los OPS

El sistema colinérgico neuronal (Figura 5) ha sido estudiado y caracterizado principalmente en modelos mamíferos, está formado por diversos componentes como la colina acetiltransferasa (ChAT) y carnitina-acetiltransferasa (CarAT) (enzimas indispensables para sintetizar *de novo* el neurotransmisor ACh), el transportador vesicular de ACh (VAChT), el cual almacena la ACh en vesículas sinápticas. Para su posterior uso durante el impulso nervioso, la neurona presináptica libera, en el espacio sináptico mediante exocitosis, la ACh almacenada. La liberación de ACh estimula las neuronas postsinápticas a través de receptores colinérgicos, de los cuales se conocen dos tipos: receptores ionotrópicos nicotínicos (nAChR) y receptores metabotrópicos muscarínicos (mAChR) (Fujii *et al.*, 2017).

La función biológica de ACh termina mediante su degradación, para lo cual, entran en juego las enzimas conocidas como acetilcolinesterasas (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE), enzimas encargadas de hidrolizar ACh en colina y acetato. La AChE se encuentra en neuronas, uniones musculares y eritrocitos (Balali-Mood y Balali-Mood, 2008), mientras que BChE se localiza en hígado, riñón y plasma (Balali-Mood y Balali-Mood, 2008). Una vez escindida la ACh, existe una recuperación parcial de colina mediante el transportador presináptico de alta afinidad de colina (CHT1) (Fujii *et al.*, 2017).

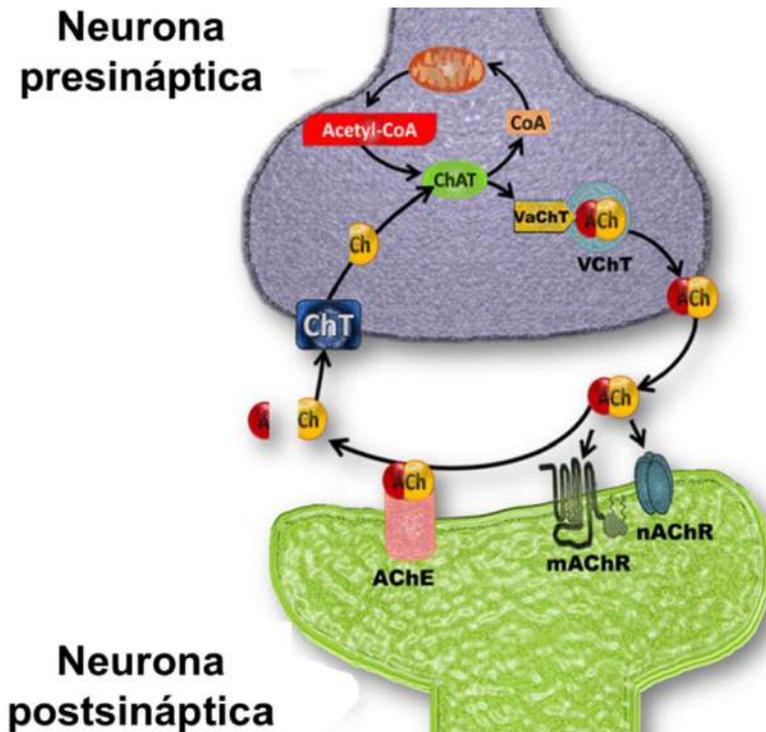


Figura 5. Sistema colinérgico neuronal; ACh: Acetilcolina; AChE: Acetilcolinesterasa; A: Acetato; Ch: Colina; ChT: Transportador de colina; ChAT: colina acetiltransferasa; CoA: coenzima A; Acetil-CoA: acetil coenzima-A; mAChR; Receptor muscarínico de acetilcolina; nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina.

1.2.1 Receptores colinérgicos

1.2.1.1 Receptores nicotínicos para acetilcolina (nAChR)

Los nAChR (Figura 6), de los cuales se han descrito diferentes subunidades (α , β , γ , δ y ϵ), siendo cuatro subtipos musculares ($\alpha 1$, $\beta 1$, y la cual es remplazada por ϵ en miocitos maduros y δ) y el resto de tipo neuronal ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$) (Kawashima y Fujii, 2003). Independientemente de su conformación, la activación de los nAChR con agonistas (ACh, nicotina) permite la entrada de iones a la célula (Ca^{+2} , K^{+} , Na^{+}). Mediante la modulación de los niveles de Ca^{+2} , los nAChRs pueden regular eventos biológicos, tal como la activación de segundos mensajeros y la inducción de expresión de

genes, debido a que permite la fosforilación del factor de transcripción CREB (Kawashima y Fujii, 2003; Fujii *et al.*, 2017).

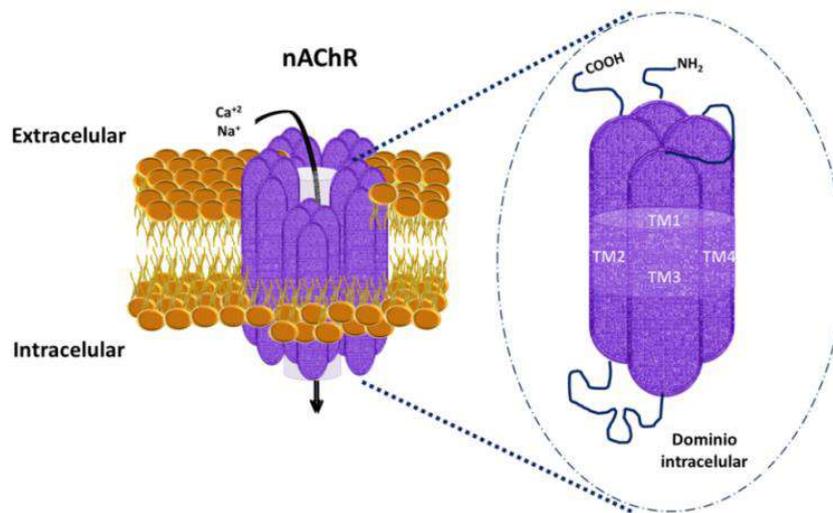


Figura 6. Estructura del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR). Se muestran los dominios transmembranales (TM) y extracelulares de los nAChR anclado en la membrana lipídica celular.

1.2.1.2 Receptores muscarínicos para acetilcolina (mAChR)

Los mAChR (Figura 7) pertenecen a los receptores acoplados a proteínas tipo G, existen 5 subtipos denominados M1, M2, M3, M4 y M5 (Sato *et al.*, 1999). Estos receptores también se conocen como receptores serpentina o receptores transmembranales de 7 dominios, ya que atraviesan siete veces la membrana celular, el tercer dominio transmembranal se ubica en la zona intracelular y es el que le da la funcionalidad característica a cada subtipo de receptor al interactuar con la proteína G.

Diferentes vías de señalización se activan dependiendo del subtipo de mAChR estimulado, esto se rige de acuerdo a los tipos de proteína-G a la que el receptor está acoplado, de esta manera, la activación de mAChR puede inducir

respuestas tanto excitatorias o inhibitorias. Cuando se estimulan subtipos M1, M3 y M5, los cuales están acoplados a $G_{q/11}$ se induce la activación de la fosfolipasa-C (PLC), activando a segundos mensajeros como el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y al diacilglicerol (DAG) que pueden modular el flujo de calcio intracelular (Ca^{+2}) y activar a la proteína cinasa C (PKC) y el factor transcripcional NF- κ B. En contraste, los subtipos M2 y M4 están acoplados a $G_{i/o}$, en consecuencia, su activación inhibe la actividad de la adenilatoclasa, provocando un decremento del AMP cíclico (cAMP) (Fujii *et al.*, 2017).

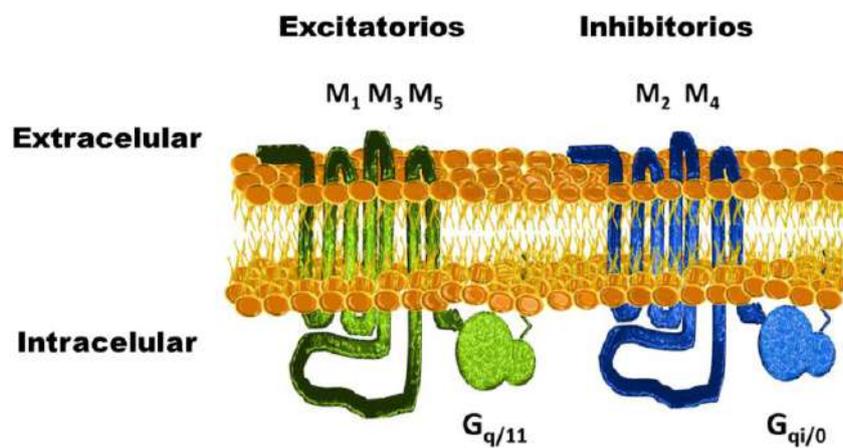


Figura 7. Estructura de los receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR); Clasificación de los subtipos de mAChR acoplados a sus respectivas proteínas tipo: $G_{q/11}$ (receptores excitatorios) y $G_{i/o}$ (receptores inhibitorios).

1.3 Sistema inmune

Con el surgimiento, especialización y diversificación de los organismos surgió la necesidad de desarrollar mecanismos de defensa. Para ello, estos mecanismos deben ser capaces de discriminar los componentes moleculares propios, no propios e inclusive aquellos potencialmente peligrosos (Matzigner, 2012). El sistema inmunológico está constituido por componentes celulares y factores humorales solubles organizados en tejidos y órganos, estos componentes se encuentran en constante comunicación celular para actuar de manera coordinada con el objetivo de mantener la homeostasis y combatir la intrusión de agentes patógenos al organismo (Zapata y Cooper, 1990).

Los mecanismos de defensa siempre se han englobado en mecanismos de defensa: innatos y adaptativos. Los mecanismos innatos de reconocimiento de patógenos están codificados en línea germinal y codifican para receptores conocidos como receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs, por sus siglas en inglés), los cuales identifican moléculas genéricas que conforman a los patógenos, pero no a los hospederos y se les conoce como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) (Medzhitov y Janeway, 2002). Por otro lado, los mecanismos de inmunidad adaptativa se basan en la producción de anticuerpos, las regiones de los anticuerpos que reconocen el antígeno se encuentran codificadas en segmentos específicos en el DNA que requieren re-arreglos génicos para sintetizar anticuerpos de alta especificidad y diversidad. No obstante, el tiempo para desarrollar los componentes celulares y humorales de la respuesta adaptativa es mayor ya que requiere de activación de los componentes celulares y su posterior expansión clonal (Chaplin, 2010; Rauta *et al.*, 2012).

1.3.1 Sistema inmune de peces teleósteos

Los peces teleósteos (peces con esqueleto óseo), son el grupo de vertebrados más antiguo y diverso del planeta (>27,000 especies descritas) (Nelson, 2006). Estos organismos son un grupo de gran interés en la inmunología, ya que fueron los primeros organismos en poseer mecanismos de inmunidad innatos y adaptativos, ambos con mecanismos humorales y celulares en una respuesta integral y desarrollada, que en términos generales es muy similar al que se encuentra en vertebrados superiores (Warr *et al.*, 1995).

Los peces teleósteos poseen elementos del sistema inmune innato como las barreras protectoras físicas (escamas) y químicas (mucus). Además de elementos presentes en vertebrados superiores como los mamíferos, tales como péptidos antimicrobianos, lisozima, lectinas, especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, proteínas de fase aguda y moléculas del sistema complemento (Rauta *et al.*, 2012). Las células de inmunidad innata mayormente caracterizadas en estos organismos son neutrófilos, monocitos/macrófagos, células citotóxicas no específicas y células dendríticas (Magnadóttir, 2006; Rauta *et al.*, 2012; Álvarez-Pellitero, 2008; Saurabh y Sahoo, 2008; Estévez *et al.*, 2018).

Por otra parte, componentes celulares y humorales de la respuesta inmune adaptativa descritas en mamíferos están presentes en los peces. En este sentido, se han descrito subpoblaciones celulares T y linfocitos B (Rauta *et al.*, 2012; Sunyer, 2013), así como inmunoglobulinas (IgM e IgD), siendo el isotipo IgM (tetrámerica) la principal inmunoglobulina en teleósteos, así como el isotipo

IgD, el cual está anclado a linfocitos B (Sunyer, 2013). Sumado a lo anterior, se han descrito inmunoglobulinas exclusivas de peces óseos (IgT/IgZ), las cuales están asociadas a inmunidad de mucosas (branquial e intestinal) (Zhang *et al.*, 2011b; Sunyer, 2013; Du *et al.*, 2016).

Los peces óseos, al igual que vertebrados superiores como los mamíferos poseen órganos y tejidos linfoides (Figura 8), los cuales son sitios de producción, diferenciación y maduración de las células del sistema inmune. Los órganos linfoides primarios en los peces teleósteos son el riñón anterior o pronefros y el timo. Mientras que los órganos linfoides secundarios son el riñón, el bazo, el tejido linfoide asociado a mucosas e intestino, y los centros de melanomacrófagos (Soulliere y Dixon, 2017). Para comunicar y coordinar la respuesta inmune, las células del sistema inmune utilizan moléculas llamadas citocinas, en peces se han descrito interleucina 1 β (IL-1 β), IL-2, IL-4/13, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19/20, IL-21, IL-22, IL-26, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e interferón γ (INF- γ) (Savan y Sakai, 2006; Zou y Secombes, 2016).

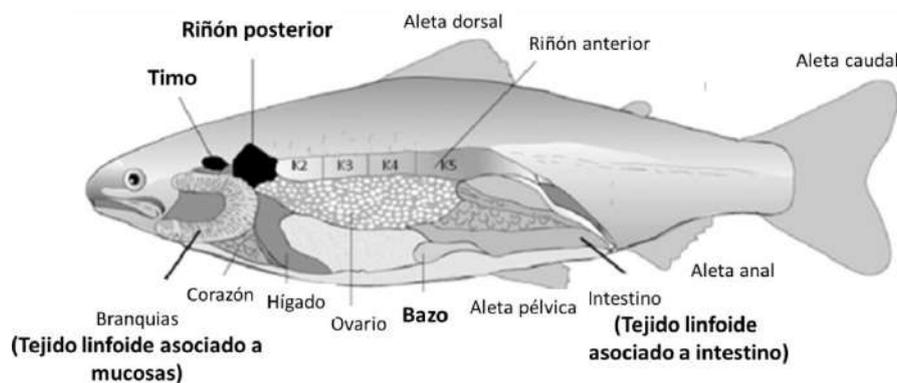


Figura 8. Órganos linfoides de los peces teleósteos (Adaptado de Basic Animal Handling, 2018).

1.3.2 Mecanismos de inmunidad innata celular

Los peces están continuamente expuestos a un ambiente con abundantes microorganismos (Zhang *et al.*, 2011b). Las células del sistema inmune poseen mecanismos de defensa celular innatos capaces de responder rápidamente ante estos estímulos antigénicos de manera genérica, entre ellos la secreción de sustancias líticas, degranulación, fagocitosis, producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), así como la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Brinkmann *et al.*, 2004; Rauta *et al.*, 2012).

1.3.2.1 Fagocitosis

La fagocitosis es un mecanismo de defensa primordial en respuesta inmune innata contra patógenos, la homeostasis y la remodelación tisular (Flannagan *et al.*, 2012). La fagocitosis (figura 9) se define como la ingestión celular de material particulado, la cual consiste en una serie de pasos donde partículas/patógenos son detectados, capturados, internalizados y degradados por parte de células del sistema inmune (Esteban *et al.*, 2015). En peces, los monocitos/macrófagos, granulocitos, células dendríticas, células B y los trombocitos poseen capacidad fagocítica, siendo los macrófagos y neutrófilos las principales células fagocíticas en peces teleósteos (Zhang *et al.*, 2010, Nagasawa *et al.*, 2014).

1.3.2.2 Estallido respiratorio

El estallido respiratorio (figura 9) es un mecanismo de defensa celular microbicida inespecífico dependiente del oxígeno presente en células

fagocíticas como monocitos/macrófagos y neutrófilos (Haugland *et al.*, 2012). Durante el fenómeno conocido como estallido respiratorio, las células inmunes producen ROS, los cuales son compuestos citotóxicos de vida media corta, tales como anión superóxido (O_2^-), oxígeno singlete (1O_2), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales oxidrilo (OH^\cdot) (Girón-Pérez *et al.* 2009). Las ROS son producidas por un conjunto de enzimas intracelulares (xantina oxidasa, NADPH oxidasa, nítrico oxido sintetasa y citocromo P450). Aunque las ROS pueden funcionar como agentes microbicidas, una liberación excesiva de estos compuestos puede afectar a las células de tejidos adyacentes e inducir lo que se conoce como daño oxidativo (Masroor *et al.*, 2000).

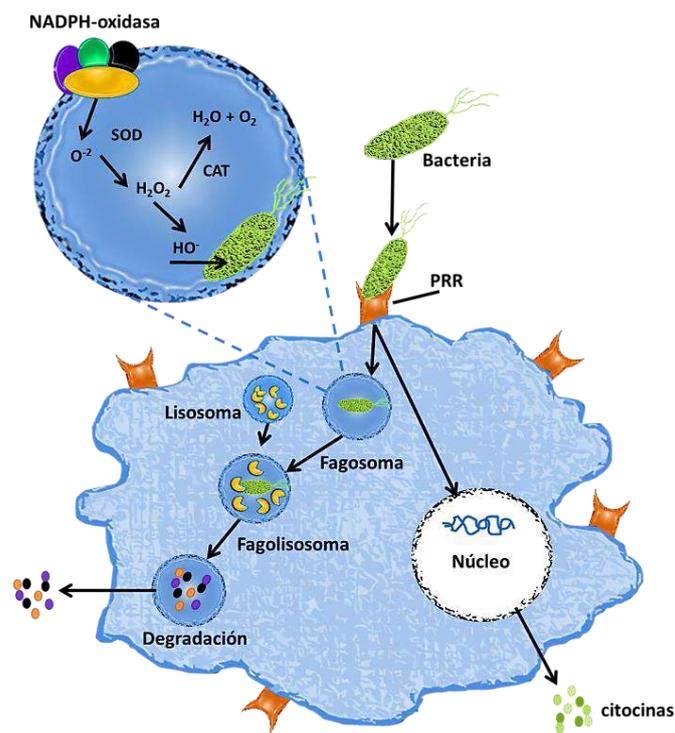


Figura 9. Imagen representativa de la fagocitosis y la producción de especies reactivas del oxígeno.

1.3.2.3 Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Los neutrófilos son células inmunes innatas muy importantes para la defensa contra agentes patógenos invasores y se caracterizan por ser las primeras células en llegar a los sitios de infección, para ello estas células poseen diversos mecanismos microbicidas (Figura 10). Durante mucho tiempo se consideró que los neutrófilos combatían los agentes patógenos mediante la ingesta y degradación (fagocitosis), la liberación al medio extracelular de sustancias citotóxicas mediante la degranulación, así como la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (Dale *et al.*, 2008). Sumado a estos mecanismos microbicidas, Brinkmann *et al.*, 2004 describieron un mecanismo de defensa extracelular conocido como NETs (Medina, 2009).

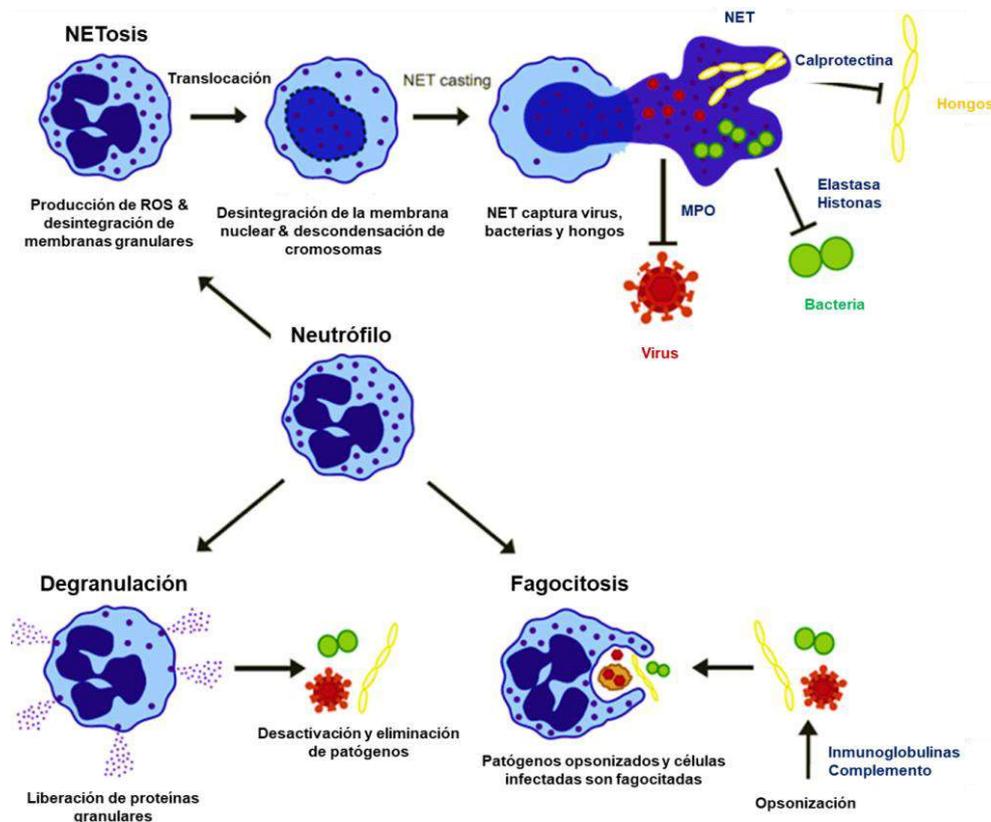


Figura 10. Mecanismos microbicidas de neutrófilos; Representación de fagocitosis, degranulación y liberación de ROS, así como de la formación de NETs (Cortjens *et al.*, 2017).

Los NETs (Figura 11), son redes de ADN envuelto en proteínas estabilizantes como histonas. La estructura fibrosa de las NETs pueden formar una barrera física que evita la diseminación de microorganismos y favorece la concentración local de péptidos antimicrobianos (Tabla 2) minimizando el daño en tejidos adyacentes (Brinkmann *et al.*, 2004; Pijanowski *et al.*, 2013).

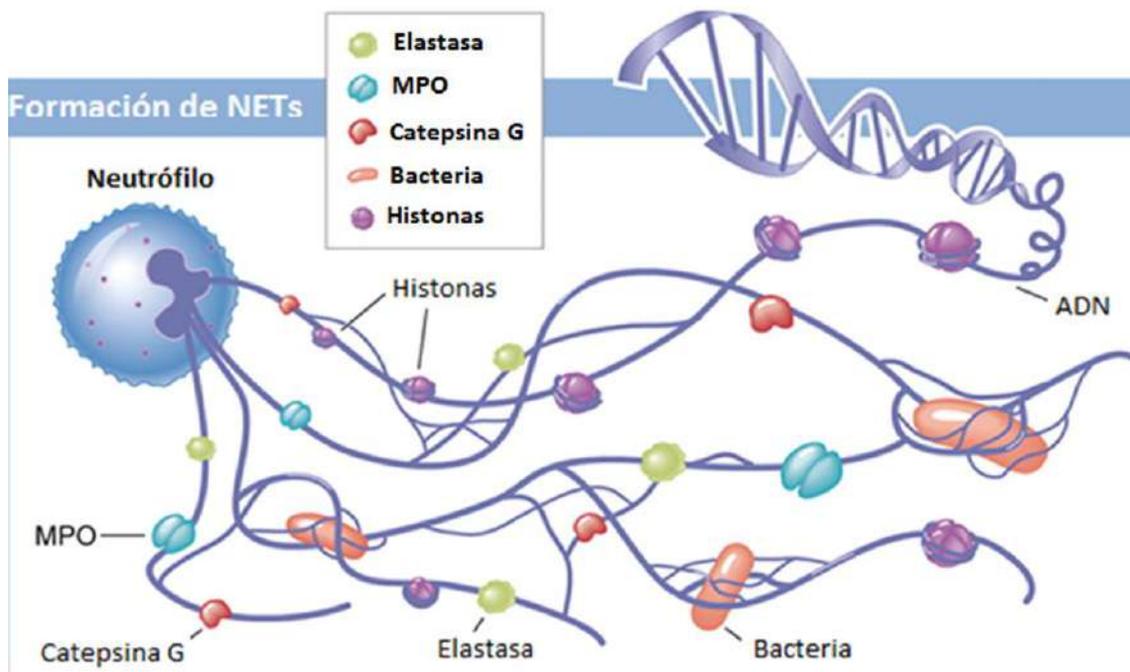


Figura 11. Estructura y principales componentes de las NETs; imagen representativa de la estructura de los NETs así como los péptidos antimicrobianos. Adaptado de Miyata y Fan, 2012.

Tabla 2. Componentes reportados en NETs. Tomado de Yam-Puc *et al.*, 2012.

Componente	Localización celular	Referencia
Elastasa	Gránulos	Brinkmann <i>et al.</i> , 2004
Mieloperoxidasa	Gránulos	Brinkmann <i>et al.</i> , 2004
Catepsina G	Gránulos	Brinkmann <i>et al.</i> , 2004
BPI	Gránulos	Brinkmann <i>et al.</i> , 2004
Lactoferrina	Gránulos	Brinkmann <i>et al.</i> , 2004
Gelatinasa	Gránulos	Brinkmann <i>et al.</i> , 2004
ADN	Núcleo	Brinkmann <i>et al.</i> , 2004
Histona H1, H2A, H2B, H3 y H4	Núcleo	Brinkmann <i>et al.</i> , 2004
Actina	Citoesqueleto	Urban <i>et al.</i> , 2009
Miosina-9	Citoesqueleto	Urban <i>et al.</i> , 2009
Calprotectina	Citoplasma	Urban <i>et al.</i> , 2009
Lisozima C	Gránulos	Urban <i>et al.</i> , 2009
Azurocidina	Gránulos	Urban <i>et al.</i> , 2009
Catalasa	Peroxisoma	Urban <i>et al.</i> , 2009
ADN	Mitocondria	Yousefi <i>et al.</i> , 2009
LL37	Gránulos	Papayannopoulos <i>et al.</i> , 2010

BPI: Proteína bactericida/que aumenta la permeabilidad (BPI); LL37: Péptido antimicrobiano de catelicidina.

1.3.3 Inmunotoxicidad de OPs

Los OPs como DZN ejercen efectos inmunotóxicos en los peces (Tabla 3), ya que causan efectos sobre, linfoproliferación, actividad de lisozima, así como en la síntesis de citocinas (TNF- α IL-1 β , IL-6, y IL-18), lo que altera la capacidad de respuesta de los organismos ante infecciones, provocando un deterioro en la salud (Girón Pérez *et al.*, 2009; Al-Ghanim, 2014; Ahmadi *et al.*, 2014; El-Bouhy *et al.*, 2016; Ogasawara *et al.*, 2017; Covantes-Rosales *et al.*, 2019).

No obstante, los mecanismos a través de los cuales los OPs ejercen sus efectos inmunotóxicos no están detalladamente descritos, aunque se ha

propuesto alteraciones en el sistema colinérgico extraneuronal de las células del sistema inmune podrían contribuir en el mecanismo de inmunotoxicidad (Girón-Pérez *et al.*, 2008; Charoenying *et al.*, 2011; Díaz-Resendiz *et al.*, 2015).

Tabla 3. Efectos tóxicos de los OPs en la respuesta inmune humoral y celular en peces. Adaptado de Díaz-Resendiz *et al.*, 2015

Parámetro	OP	Efecto	Tejido/línea celular	Tiempo de exposición	Concentración	Especie	
Respuesta inmune humoral							
Actividad de lisozima	Diazinón	↑	Bazo	1, 7 d	1.5 mg/L	Beluga (<i>Huso huso</i>)	
		↓	Plasma	21-63 d			
		↓	Riñón	35-63 d			
		↑	Bazo	63 d			
		↑	Plasma	7 d	2.0, 4.0 mg/L		
		↓	Riñón	1 d			
	↑	Plasma	7 d	0.1, 0.2 mg/L	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)		
	↓	Plasma	15, 30 d				
	Clorpirifos	Clorpirifos	↑	Bazo	3 d	15 µg/L	Carpa común(<i>Cyprinus carpio</i>)
			↓	Bazo	7 d	75 µg/L	
↑			Plasma	3 d	15 µg/L		
↓			Plasma	3, 5, 7 d	75 µg/L		
↑			Riñón	3, 5 d	15-75 µg/L		
Fosalone	Fosalone	↑	Plasma	4 d	0.102, 0.255 mg/mL	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	
Proteína C reactiva	Metrifonato	↓	Plasma	7, 14 d	0.15, 0.30, 0.60 mg/L	Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	
		↑	Plasma	3 d	0.4 ppm	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	
Globulina	Diazinón	↓	Plasma	7, 14, 28 d	0.1, 0.2 mg/L	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	
		↓	Plasma	7, 15, 30 d			
		↓	Plasma	14 d			0.15, 0.30, 0.60 mg/L
IgM	Diazinón	→	Plasma	4 d	3.915, 7.830 ppm	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	
		↑	Plasma	4 d	1.96 mg/L	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	
		↓	Bazo	1, 3, 5, 7 d	15 µg/L	Carpa común(<i>Cyprinus carpio</i>)	
		↓	Bazo	3, 5 d	75 µg/L		
		↑	Riñón	1, 3, 5 d	15, 75 µg/L		
		↓	Plasma	1 d	75 µg/L	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	
↓	Plasma	4 d	0.051 mg/mL				
Componente de complemento C3	Clorpirifos	—	Bazo	1, 3,5, 7 d	15, 75 µg/L	Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	
		↑	Plasma	1 d	75 µg/L		
		↑	Riñón	1 d	15 µg/L		

Complemento C3 (mRNA)	Clorpirifos	↓	Bazo	7 d	75 µg/L	Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)
		↑		1 d	75 µg/L	
		↓		7 d	15, 75 µg/L	
		↑		3 d	15 µg/L	
		↓		5 d	15, 75 µg/L	
<hr/>						
IL-1β (mRNA)		↓	Bazo		1.16, 11.6, 116 µg/L	
IL-1R (mRNA)	Clorpirifos	↑	Bazo		11.6, 116 µg/L	Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)
		↓	Riñón	40 d	1.16 µg/L	
		↑	Riñón		11.6 µg/L	
IFN-γ (mRNA)		↑	Bazo		11.6 µg/L	
		↓	Riñón		1.16, 11.6 µg/L	
		↑	Riñón		116 µg/L	
<hr/>						
Respuesta inmune celular						
Proliferación celular	Diazinón	↓	Linfocitos	4 d	7.83, 3.91, 1.95 mg/L	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
	Clorpirifos	→	Linfocitos	4 d	0.051, 0.102, 0.255 mg/L	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
<hr/>						
WBC		↓			60, 120 µg/L	
Lin	Diazinón	↓	Sangre	10, 20, 30 d	120 µg/L	Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)
Mon		↓				
Neu		↑				
Eos		↑				
Bas		↓				
<hr/>						
WBC	Malatión	↓	Sangre	1, 28, 42 d	0.023, 0.46 mg/L	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
	Clorpirifos	↑	Sangre	14 d	0.040, 0.080 mg/L	Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)
<hr/>						
WBC	Diazinón	↓	Sangre	7, 15, 30 d	0.1, 0.2 mg/mL	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
Lin		↓				
Neu		↑				
<hr/>						
WBC	Fosalone	↓	Sangre	7, 14 d	0.15, 0.30, 0.60 mg/L	Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)
Lin		↑				
Neu		↑				
<hr/>						
WBC	Diazinón	↑	Sangre	7 d	0.5, 1 ppm	Pez gato irisdicente (<i>Pangasius hypophthalmus</i>)
Lin		→				

Mon		—				
Eos		—				
Neu		↑				
Estallido respiratorio	Diazinón	↑	Esplenocitos	4 d	1.96 mg/L	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Índice fagocítico	Diazinón	↓	Sangre	4 d	7.83, 3.91 mg/L	Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)
Gran						Trucha arcoíris (<i>Melanotaenia fluviatilis</i>)
Lin		→			0.1, 1, 10 mg/L	Perca plateada (<i>Bidyanus bidyanus</i>)
Gran	Clorpirifos		Riñón			Perca dorada (<i>Macquaria ambigua</i>)
Lin		↓			10 mg/L	Bacalao de Murray (<i>Maccullochella pealii</i>)

↑: incremento/activación; ↓: inhibición/decremento; →: sin efecto; —: no detectable; WBC: células blancas; Lin: Linfocitos; Mon: monocitos; Gra: granulocitos; Eos: eosinófilos; Bas: basófilos; Neu: neutrófilos; d: días.

1.3.4 Sistema colinérgico extraneuronal en células del sistema inmune

Se ha demostrado que la existencia de interacciones neuroinmunológicas en mamíferos consiste en una comunicación constante y bidireccional entre el sistema inmune y el sistema nervioso: una relación esencial para el mantenimiento de la homeostasis (Romero *et al.*, 2004). Esta comunicación es importante ya que crea un funcionamiento adecuado de la respuesta inmune, beneficiosa para eliminar de manera eficiente los factores de estrés y, por lo tanto, minimizar la lesión al cuerpo (Kepka *et al.*, 2013; Verburg-van Kemenade *et al.*, 2013).

Varios estudios muestran cómo los elementos del sistema nervioso regulan el sistema inmunológico y viceversa, dependiendo de una pluralidad de moléculas, como citocinas y neurotransmisores. Neuronas y leucocitos poseen la maquinaria bioquímica necesaria para sintetizar *de novo* ACh, (Wessler y Kirkpatrick 2008). Donde independientemente de la innervación neuronal, la ACh, puede modular al sistema inmunológico de manera autócrina y parácrina, a través de vías de señalización colinérgicas y a través de receptores específicos expresados en leucocitos (Figura 12) (Gwilt *et al.*, 2007; Kawashima *et al.*, 2012; Verburg-van Kemenade *et al.*, 2013).

Los peces teleósteos son los primeros vertebrados inferiores en desarrollar mecanismos de inmunidad innata y adaptativa (Rauta *et al.*, 2012). En consecuencia, estudiar los elementos de la comunicación neuroendocrina en peces es importante para conocer la evolución de este eje. Por otro lado, el estudio del sistema colinérgico leucocitario podría estar vinculado a enfermedades inflamatorias e inmunocompetentes (autoinmunidad,

hipersensibilidad y mayor susceptibilidad a la infección) (Kawashima *et al.*, 2012; Díaz-Resendiz *et al.*, 2015).

Resultados reportados previamente por nuestro grupo de investigación muestran que los leucocitos de peces de tilapia nilótica poseen componentes esenciales de un sistema colinérgico no neuronal, como ACh y AChE (Toledo-Ibarra *et al.*, 2014), que podrían estar relacionados con la funcionalidad de leucocitos y por lo tanto regulan la inmunocompetencia del organismo (Kawashima *et al.*, 2012).

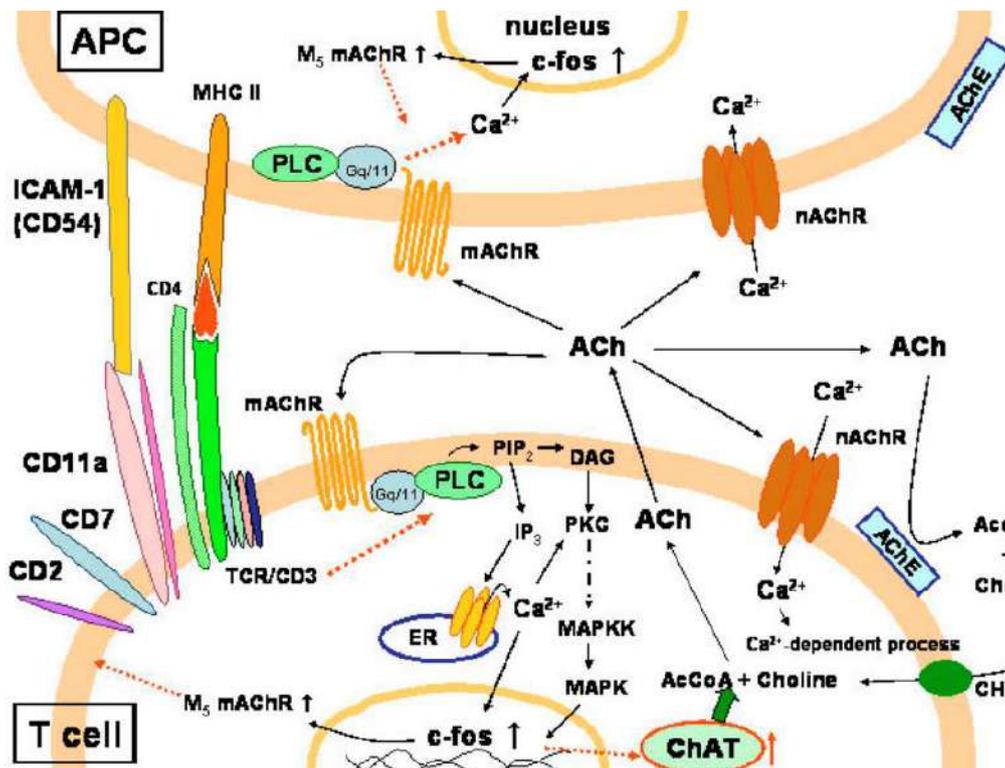


Figura 12. Regulación colinérgica de células del sistema inmune. Se observa la regulación colinérgica en la presentación antigénica entre una célula T y una célula presentadora de antígeno (APC), basados en modelos mamíferos. ACh, acetilcolina; AChE, acetilcolinesterasa; AcCoA, acetil coenzima A; ChAT, colina acetiltransferasa; CHT1: transportador de acetilcolina de alta afinidad; mAChR, receptores muscarínicos de acetilcolina; nAChR, receptores nicotínicos de acetilcolina; DAG, diacilglicerol; PLC, fosfolipasa C; ER retículo endoplasmático; IP3, inositol-1,4,5-trifosfato; ICAM-1 molécula de adhesión intercelular-1; MAPKK, proteína cinasa cinasa activada por mitógenos; MAPK, proteína cinasa activada por mitógenos; MHC II, complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, TCR, receptor de células T. Adaptado de Kawashima y Fujii, 2004.

1.4 Peces como modelo de estudio en la investigación biomédica

Los peces aparecieron en el silúrico hace aproximadamente 450 millones de años, son el grupo de vertebrados más abundante y diverso del planeta con más de 27,000 especies, lo que representa más de la mitad de todos los vertebrados en el planeta. (Nelson, 2006). Este grupo de organismos fueron los primeros organismos en presentar respuestas inmunológicas innatas y adaptativas, mecanismos filogenéticamente conservados en vertebrados superiores como los mamíferos (Rauta *et al.*, 2012), características que convierten a este grupo de organismos en modelos de estudio para las ciencias biomédicas (Sarasamma *et al.*, 2017), y para la evaluación del daño causado por contaminantes en cuerpos de agua (Planchart *et al.*, 2016). Sumado a lo anterior, desde un punto de vista evolutivo, la investigación en vertebrados inferiores es indispensable para un mejor conocimiento de la filogenia de los organismos.

1.4.1 Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

La tilapia nilótica (Figura 13), es un pez teleósteo de aguas tropicales originario de África, con características fisiológicas que permiten el desarrollo de la acuicultura, por lo tanto su cultivo se ha popularizado. La tilapia nilótica es una especie de crecimiento rápido, facilidad de reproducción, requerimientos bajos de proteína y resistentes a condiciones ambientales estresantes. Siendo esta especie propagada para su cultivo en las aguas tropicales en diversos países, entre ellos México (Vega-Villasante *et al.*, 2010).



Figura 13. Ejemplar de la especie *O. niloticus*.

La producción a nivel mundial coloca a la tilapia como la segunda especie de pez dulceacuícola cultivado, solo detrás de la carpa común. En el año 2014 la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) reportó una producción de 3,670,259 toneladas métricas de pez tilapia (FAO; FishStats 2015). Particularmente en México la producción tilapia se da en todos los estados del país, según la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA), en el año 2013 se cosecharon 99,746 toneladas, con un ingreso de \$1,766,060,000, mientras que para el año 2015 la producción fue de 156,146 toneladas (CONAPESCA, 2016).

En el presente trabajo se utilizó como modelo de estudio a tilapia nilótica (*O. niloticus*), un pez dulceacuícola con importancia ecológica y económica a nivel mundial (FAO; FishStats 2015) los resultados de esta investigación aportaran información importante a la ciencia básica, particularmente a la fisiología e inmunología comparada. Por otra parte, los parámetros de inmunidad innata evaluados, así como la actividad colinérgica están estrechamente relacionados con procesos inflamatorios, por lo que esta investigación tiene potenciales implicaciones biomédicas.

2. JUSTIFICACIÓN

El sistema inmune innato es esencial para la defensa ante antígenos presentes en el ambiente, los cuales, en caso de no ser controlados, pueden provocar enfermedad y hasta la muerte de los organismos. Sin embargo, este sistema puede ser alterado por factores bióticos y abióticos presentes en el ambiente, modificando así la inmunocompetencia del organismo. Un tipo de sustancias presentes en el ambiente son los plaguicidas organofosforados (OPs), la evidencia científica indica que los OPs además de ejercer efectos neurotóxicos pueden alterar la respuesta inmune, sin embargo, el mecanismo de inmunotoxicidad no es claro.

En este sentido, sobre la base de los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación se propone que dichos mecanismos están involucrados con la alteración del sistema colinérgico leucocitario (potencial blanco de los OPs), por lo que, en este trabajo, evaluó el efecto del DZN sobre algunos parámetros de la respuesta inmune (fagocitosis, producción de ROS y NETs) y expresión de receptores colinérgicos en células de la respuesta inmune innata. Utilizando como modelo de estudio al pez tilapia nilótica (*O. niloticus*), especie con gran importancia ecológica, económica y con un potencial uso en investigaciones biomédicas.

3. HIPÓTESIS

La exposición aguda de *O. niloticus* a concentraciones subletales de diazinón modula la expresión de receptores colinérgicos extraneuronales y disminuye la capacidad de los mecanismos microbicidas (fagocitosis, producción de ROS y NETs) de la inmunidad innata.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la exposición aguda de tilapia nilótica (*O. niloticus*) a concentraciones subletales de diazinón sobre la expresión de receptores colinérgicos y los mecanismos de inmunidad innata celular de leucocitos.

4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar la expresión relativa de mAChR (M2, M3, M4 y M5) en células mononucleares de bazo de *O. niloticus* expuesta *in vivo* a diazinón.
2. Determinar el estallido respiratorio en leucocitos totales de *O. niloticus* expuesta *in vivo* a diazinón.
3. Determinar la capacidad fagocítica en leucocitos totales de *O. niloticus* expuesta *in vivo* a diazinón.
4. Evaluar la formación de NETs en *O. niloticus* expuesta *in vivo* a diazinón.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Organismos

Los peces tilapia nilótica (♂; 273±43 g y 20±3 cm), fueron adquiridos en una granja acuícola local. Los peces se mantuvieron durante un periodo de 4 semanas bajo condiciones óptimas (28 ± 2°C, pH: 8.0 y O.D: 6.0 mg/L) para su aclimatación en tanques de 400 L. Los organismos fueron alimentados diariamente con alimento formulado comercial Nutripec, Purina®, al 3% de su peso.

5.2 Exposición *in vivo* a DZN

Antes de los bioensayos de exposición, los peces se aclimataron en un acuario de vidrio de 30 L durante 24 h (1 pez/pecera). Para disminuir el estrés, la temperatura y la aireación se mantuvieron constantes. Además, los organismos no fueron alimentados durante este período para evitar efectos pandriales y para evitar la deposición de heces durante el bioensayo. Después del período de aclimatación, los peces (n = 10) fueron expuestos *in vivo* a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L (concentraciones correspondientes a 1/8, 1/4 y 1/2 del valor de CL₅₀ reportado por Girón-Pérez *et al.*, 2007), de una formula comercial de DZN (25% de ingrediente activo), durante 6 o 24 h. Los bioensayos se realizaron de forma estática (sin reemplazo de agua). Se estableció un grupo de control con organismos que se mantuvieron en las mismas condiciones, pero sin plaguicida.

5.3 Obtención de muestras

5.3.1 Aislado de leucocitos totales

Se aislaron los leucocitos totales de la sangre, para ello mediante punción cardíaca se obtuvo la sangre (3 mL), posteriormente se colocó en Histopaque-1077 y se dejó sedimentar por gravedad (40 min). Después de la sedimentación, se colectaron los leucocitos totales de la fase superior y se lavaron con Solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) (pH 7,3). En seguida las células se recuperaron por centrifugación (3,500 rpm; 5 min; 4°C) y se resuspendieron en PBS (1 mL). La viabilidad se evaluó utilizando el método de exclusión del 0.4% de azul de tripano.

5.3.2 Aislado de neutrófilos

La sangre obtenida por punción cardíaca (3 mL) se utilizó para aislar los neutrófilos; para lo cual, la sangre se colocó sobre Histopaque-1119 (3 mL) y se centrifugó (2,500 rpm/40 min). Una vez finalizada la centrifugación, los leucocitos totales se colectaron de la fase media y se procedió a lavarlos con PBS y centrifugación (3,500 rpm/15 min). Posteriormente, el botón celular obtenido se homogenizó en PBS (1 mL) y se colocó sobre Histopaque-1077 (2 mL) centrifugándose (2,500 rpm/20 min). Posteriormente, se recuperó el anillo inferior y se lavó con PBS (3,500 rpm/15 min). El paquete celular se resuspendió en PBS (1 mL) y se evaluó la viabilidad usando el método de exclusión de azul tripano al 0.4%.

5.3.3 Aislado de células mononucleares de bazo

El bazo de peces se disgregó manualmente con movimientos suaves usando un émbolo de jeringa y una red fina de nylon estéril en 10 mL de PBS

sobre una caja de Petri. Las células mononucleares de bazo (CMB) se obtuvieron mediante un gradiente de densidad a (2,500 rpm, 20 min) usando Histopaque-1077. Posteriormente, se recolectaron las CMB, las cuales se ubican en la fase superior y se lavaron mediante centrifugación a 3,500 rpm durante 15 minutos. El botón celular obtenido se reconstituyó en 1 mL de TRIzol.

5.4 Expresión de receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChR)

La expresión de los mAChR se determinó en leucocitos, además de tejido cerebral total. Este último se utilizó como tejido control.

5.4.1 Extracción de RNA total

Para el aislamiento del RNA total, los tejidos de interés (cerebro y CMB) fueron aislados y colocados en 1 mL de TRIzol (4°C). Posteriormente, cada muestra se trató con cloroformo (200 µL), isopropanol (500 µL) y metanol (75%, 1 mL) para separar, precipitar y lavar el RNA total.

Una vez obtenido el RNA total, se cuantificó usando un espectrofotómetro de microvolumen Quawell-Q-3000 y se analizó la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5%), el cual se tiñó con bromuro de etidio (1 µg/mL) y se visualizaron las bandas con luz ultravioleta.

5.4.2 Síntesis de cDNA

Se llevó a cabo la síntesis de cDNA utilizando el kit de retrotranscripción Taqman Reverse Transcription (Applied Biosystem®), para ello 1,000 ng de RNA total fueron incubados con oligos (dt) 1 µL (1 µL), MgCl₂ (1.4 µL), dNTPs (4 µL), Buffer 10x (2 µL), H₂O DEPC, RNA inhibidor (0.5 µL) y la enzima RT

(0.5 μ L), el volumen final de reacción es de 20 μ L, para terminar con una concentración de 25 ng de cDNA/ μ L.

5.4.3 Cuantificación de la expresión relativa por PCR en tiempo real (q-PCR)

Una vez sintetizado el cDNA, se usaron 50 ng de cDNA para las reacciones de PCR. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el kit comercial Fast SYBR Green Master Mix® de ThermoFisher. Usando un termociclador de tiempo real 7500 Fast Real-Time PCR de Applied-biosystem. Llegando a un volumen de reacción final de 20 μ L. Los reactivos se agregaron en las cantidades señaladas según el fabricante. Los oligonucleótidos específicos para las secuencias de los genes de interés están listados en la tabla 4. El q-PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 4 minutos (1 ciclo); 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos (30 ciclos); y 72°C durante 10 minutos (1 ciclo).

Tabla 4. Características de los oligonucleótidos utilizados para la expresión relativa de receptores colinérgicos y gen constitutivo.

Nombre	Secuencia	Longitud	T.M.	%GC	Producto (pb)	Fuente:
Mus2-real-F	GGCAGATCTCCAGAGCAAGCAAG	23	63.64	56.52	100	Seo et al., 2009
Mus2-real-R	TTGTTTCTCCTCTGGCCTGGTG	22	62.47	54.55		
Mus3-real-F	CTGGCGCATTTACAAGGAGACCC	23	63,88	56,52	200	
Mus3-real-R	CTACCAGTCCCGACATGTGCTC	23	63,07	56,52		
Mus4-real-F	TTTCTACCTACCTGTGGCCATCATG	25	62,38	48,00	100	
Mus4-real-R	AGTGCCTGAGGTCTTCTGCTG	22	64,23	59,09		
Mus5-real-F	CCAGGAGCAACGCGGTCAAATC	22	64.52	59.09	130	
Mus5-real-R	TGGAAGCCTCCTGGAGACACTG	22	63.66	59.09		
EFL-1a-real-F	CAAGGAAATCCGTCGTGGATAC	22	59.14	50.00	327	
EFL-1a-real-R	ACGGCGAAACGACCGAGGGG	20	67.27	70.00		

%GC: porcentaje de guanina-citosina; T.M: Temperatura de alineación.

Para el cálculo de la expresión relativa se aplicó el método doble delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$) propuesto por Livak y Schmittgen (2001), utilizando el factor de elongación 1- α (EFL-1 α) como gen constitutivo para la normalización de la expresión.

5.5 Análisis mediante citometría de flujo

5.5.1 Capacidad fagocítica

La fagocitosis se estudió utilizando perlas de látex fluorescentes y citometría de flujo como se describe Haugland *et al.*, 2012 con algunas modificaciones. Las suspensiones celulares (2×10^6 leucocitos) se mezclaron con 200 μ L de medio RPMI con microesferas Fluoresbrite®YG (Polysciences Inc., Warrington, EE. UU.), 1 μ m de diámetro, en una proporción de células/perlas de 1:20 y se incubaron durante 24 h a 28°C (aire/CO₂:95/5%). Se usaron como controles negativos suspensiones celulares sin perlas, lo anterior en placas de 96 pocillos. Una vez transcurrido el periodo de incubación, para la remoción de las perlas no fagocitadas, se colocaron 40 μ L de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich) por pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos con agitación suave. Posteriormente, las células suspendidas se colocaron en 1.5 mL de PBS a pH 7.3 suplementado con 3%(v/w) de BSA (Sigma-Aldrich) y 4.5 % (w/v) D-Glucosa (Fermont) y se centrifugó (100 rpm/10 minutos), inmediatamente se removió el sobrenadante. El precipitado se reconstituyó en 500 μ L de PBS para proseguir con el análisis por citometría. La detección de las perlas verdes fluorescentes fagocitadas se realizó mediante un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, USA) usando el filtro FL1 (530/30 nm filtro *bandpass*). Las células no viables se detectaron añadiendo 1-2 μ L de yoduro de propidio (PI) de (Sigma Aldrich) 2-3 minutos

previo del análisis, la fluorescencia del PI se analizó usando el filtro FL2 (585/42 nm filtro *bandpass*), finalmente se analizó 10,000 eventos por muestra, mientras que las células muertas se excluyeron del análisis mediante la realización de gates. Los resultados obtenidos se representaron como un porcentaje de células fagocíticas en leucocitos de sangre total, células mononucleares (MNC) y células polimorfonucleares (PMNC).

5.5.2 Estallido respiratorio

Se utilizaron dos sondas fluorescentes para determinar el estallido respiratorio: dihidrorodamina 123 (DHR₁₂₃), que se oxida con H₂O₂ a rodamina fluorescente (RHO) (Henderson y Chappel, 1993) y dihydroethidium (DHE), que reacciona con O₂⁻, para formar un producto rojo fluorescente (etidio) (Burnaugh *et al.*, 2007). En breve, los leucocitos aislados de la sangre (2x10⁶) se suspendieron en 200 µL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, por sus siglas en inglés) y se transfirieron a tubos de poliestireno de 1,5 mL para su incubación a temperatura ambiente (10 min). Después de la incubación, se agregó DHR (5 µM) o DHE (5 µM) para determinar los niveles de H₂O₂ y O₂⁻, respectivamente. Las muestras se mezclaron y se incubaron inclinadas suavemente durante 15 min en oscuridad.

Antes de los análisis de citometría de flujo, las células se suspendieron en 500 µL de PBS frío. La fluorescencia de RHO se detectó con el filtro FL1 (filtro de paso de banda 530/30 nm), mientras que la fluorescencia de etidio se detectó con el filtro FL2 (filtro de paso de banda 610/20 nm). Se registraron 10,000 eventos para cada muestra. Los datos obtenidos se representaron en intensidad media de fluorescencia (MFI) para ambas sondas en todos los

tratamientos. Se calculó la producción de ROS en leucocitos de sangre total, células mononucleares y células polimorfonucleares.

5.6 Formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Los neutrófilos fueron incubados sobre cubreobjetos (2.5×10^5 células en 1 mL de medio RPMI), y sometidos a una preincubación (37°C, 5% de CO₂, 1h) en placas de 6 pozos. Posteriormente las células fueron estimuladas con éster de forbol (PMA) (200 ng/mL), e incubadas (37°C, 5% de CO₂, 3h). Para las condiciones basales de formación de NETs, las células se incubaron sin PMA. Después de la incubación, se realizó la tinción de los NETs. Para realizar la inmunotinción, las células se fijaron con paraformaldehído (4%, 20 min) y fueron permeabilizadas con Tritón X-100 (0.5%, 1 min), posteriormente las células se lavaron con PBS. Después las células adheridas fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo primario monoclonal Anti-Histona H1/DNA (Merckmillipor MAB 3864) diluido (1:5000) en solución salina. Transcurrido esto, la muestra se lavó con PBS, después se incubó 1 h a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad con el anticuerpo secundario conjugado a Alexa fluor-488 (490/525 nm) (Ab172324, Abcam), diluido 1:1000 en PBS. Finalmente, para teñir el DNA, la muestra se incubó toda la noche con 500 µL de DAPI (350/470 nm) (P36931, Molecular Probes). Los NETs se observaron en un microscopio de fluorescencia (OPTIKA B-1000FL-HBO). Posteriormente, se capturaron imágenes de fluorescencia de al menos 5 campos al azar a 20X. Posteriormente las imágenes obtenidas fueron procesadas en el programa *Image J* (Versión 1.47), donde se determinó el área de DNA y se comparó entre los peces de cada tratamiento de DZN.

5.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa SigmaPlot® (ver. 10.0). Los datos paramétricos se les realizó la prueba ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post-hoc* de Dunn, mientras que para los datos no paramétricos se les realizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de una comparación múltiple tipo-Tukey. La diferencia estadística se determinó con nivel de significancia $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Expresión de mAChR

Se realizaron las extracciones del RNA total de los tejidos de interés (cerebro y CMB), dicho RNA total fue sometido a la síntesis de cDNA para su posterior amplificación por qPCR. En el Anexo 1 se pueden consultar los resultados de las extracciones de RNA total, las corroboraciones de tamaño de los oligonucleótidos utilizados, así como la especificidad de amplificación por qPCR de los genes para los mAChR. Finalmente se muestra la expresión génica del gen EFL-1a, el cual se utilizó como gen constitutivo.

6.1.1 Expresión basal de mAChR en cerebro y CMB

Los resultados muestran que tanto en el tejido cerebral, como las CMB de peces tilapia nilótica, se expresan de manera basal los cuatro subtipos de mAChR: (M2-M5A). Comparando la expresión entre los tejidos, en este estudio observamos mayor cantidad de mRNA de los subtipos de mAChR en las CMB que en cerebro (Figura 14).

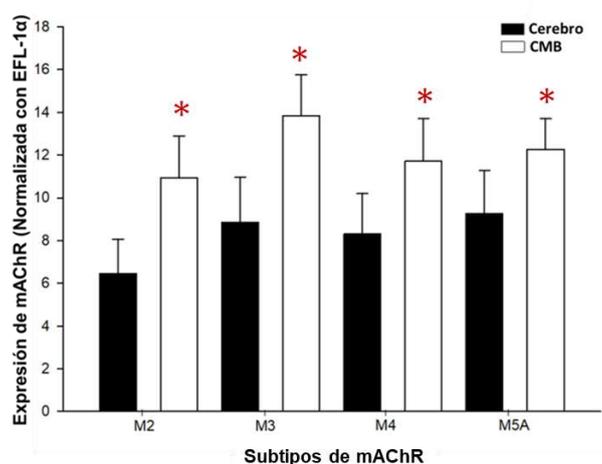


Figura 14. Expresión de los subtipos mAChR en tejidos de *O. niloticus*; Expresión de mAChR (M2, M3, M4 y M5A) en el cerebro (barras negras) y CMB (barras blancas) (n = 7). *: Diferencia estadísticamente significativa en la expresión de los subtipos de mAChR entre los tejidos analizados ($p < 0.05$).

6.1.2 Expresión de mAChR en cerebro y CMB de peces expuestos *in vivo* a DZN

6.1.2.1 Expresión del subtipo mAChR-M2

Los resultados muestran que no existe modificación significativa en la expresión de mAChR-M2 en el cerebro de peces expuestos durante 6 h. Contrario a esto, después de 24 h de exposición existe una depleción casi total de la expresión de mAChR-M2 en el cerebro. En lo que concierne a las CMB de peces expuestos a DZN durante 6 h, se observó disminución de este subtipo en las concentraciones de 1.95 y 3.91 mg/L. Por otro lado, a las 24 h de exposición la expresión se redujo significativamente a 0.97 y 1.95 pero no a 3.91 mg/L (Figura 15).

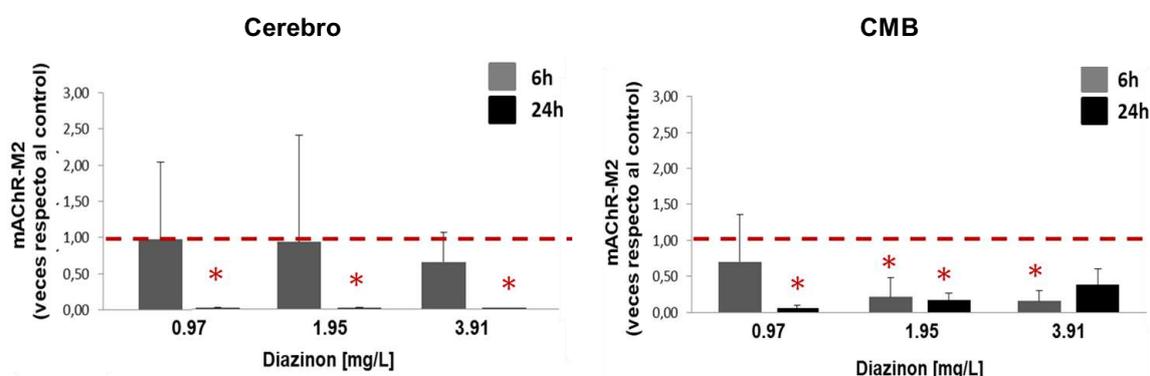


Figura 15. Efecto de DZN en la expresión de mAChR-M2 en cerebro y CMB. Los peces (n=8), fueron expuestos *in vivo* a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L a DZN durante 6 o 24 h. Los niveles de expresión están normalizados con EFL-1a y están expresados con respecto al control (línea punteada). *: Diferencia estadísticamente significativa en el nivel de expresión del subtipo mAChR-M2 de los peces expuestos en comparación con el grupo control ($p < 0.05$).

6.2.1.2 Expresión del subtipo mAChR-M3

En el cerebro peces expuestos durante 6 h a 0.97 mg/L, la expresión del mAChR-M3 disminuyó, mientras que en peces expuestos a 1.95 mg/L incrementó significativamente. Sin embargo, en la concentración de 3.91 mg/L, no se observó efecto. Por otro lado, la expresión de este subtipo decayó en el cerebro de peces expuestos a DZN después de 24 h.

En lo que respecta a la expresión de este subtipo en las CMB, la exposición de DZN induce disminución a 6 y 24 horas, excepto en CMB de peces expuestos a 3.91 mg/L durante 24 h (Figura 16).

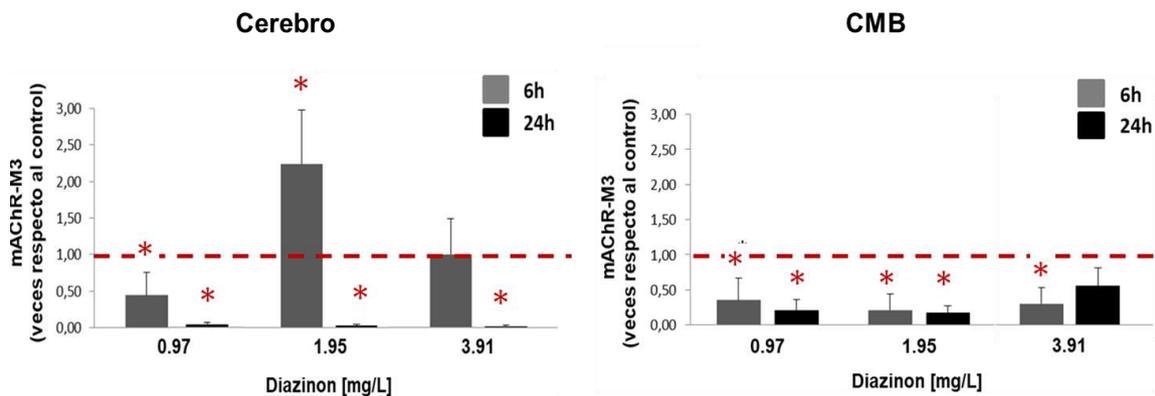


Figura 16. Efecto de DZN en la expresión de mAChR-M3 en cerebro y CMB. Los peces ($n=8$), fueron expuestos *in vivo* a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L a DZN durante 6 o 24 h. Los niveles de expresión están normalizados con EFL-1a y están expresados con respecto al control (línea punteada). *: Diferencia estadísticamente significativa en el nivel de expresión del subtipo mAChR-M3 de los peces expuestos en comparación con el grupo control ($p<0.05$).

6.2.1.3 Expresión del subtipo mAChR-M4

La exposición *in vivo* a DZN durante 6 h no alteró significativamente la expresión de mAChR-M4 en el cerebro, contrario a esto, la expresión decayó en el cerebro de peces expuestos durante 24 h. Por otra parte, los niveles de este receptor disminuyeron su expresión en las CMB de peces expuestos durante 6 y 24 h, excepto en peces expuestos a 0.97 mg/L durante 6 h (Figura 17).

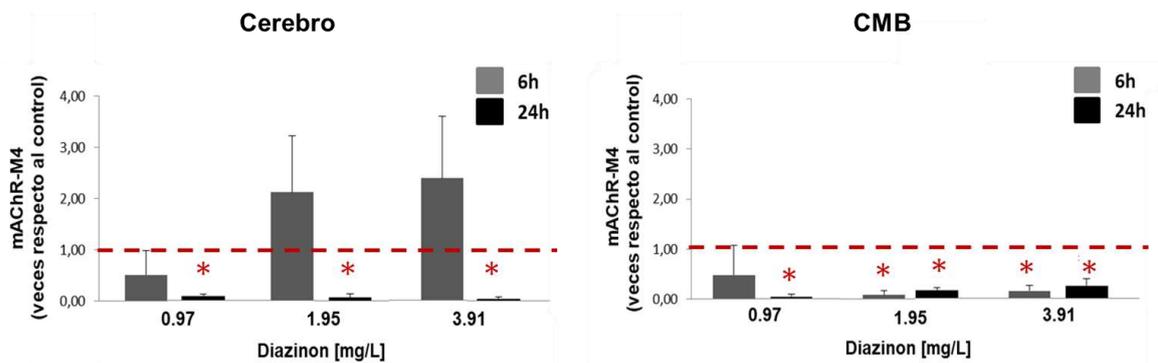


Figura 17. Efecto de DZN en la expresión de mAChR-M4 en cerebro y CMB. Los peces (n=8), fueron expuestos *in vivo* a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L a DZN durante 6 o 24 h. Los niveles de expresión están normalizados con EFL-1a y están expresados con respecto al control (línea punteada). *: Diferencia estadísticamente significativa en el nivel de expresión del subtipo mAChR-M4 de los peces expuestos en comparación con el grupo control ($p < 0.05$).

6.2.1.4 Expresión del subtipo mAChR-M5A

Los datos muestran que la exposición *in vivo* a DZN durante 6 h no modifica de manera significativa la expresión del subtipo mAChR-M5A en cerebro, contrario a lo anterior, la expresión disminuyó significativamente en los cerebros de peces expuestos después de 24 h. Por otro lado, los resultados mostraron disminución de este receptor en las CMB de peces expuestos durante 6 y 24 h, excepto en el grupo de peces expuestos durante 6 h a 0.97 m/L de DZN (Figura 18).

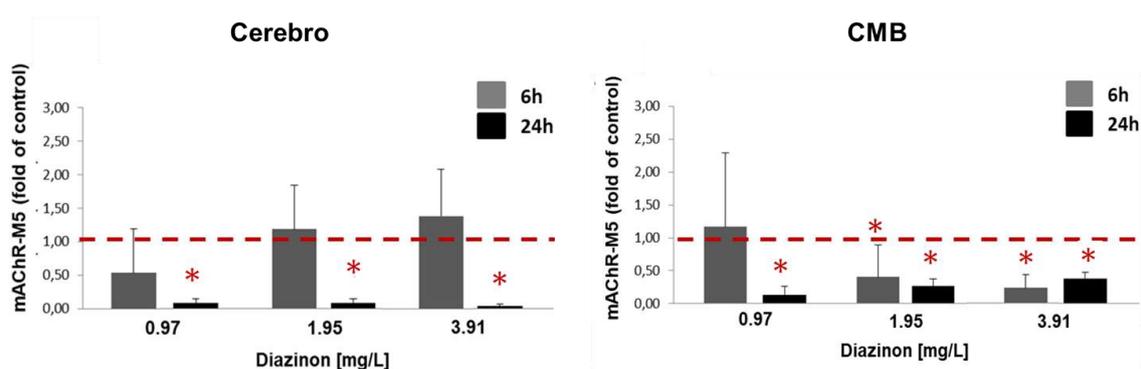


Figura 18. Efecto de DZN en la expresión de mAChR-M5A en cerebro y CMB. Los peces (n=8), fueron expuestos *in vivo* a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L a DZN durante 6 o 24 h. Los niveles de expresión están normalizados con EFL-1a y están expresados con respecto al control (línea punteada). *: Diferencia estadísticamente significativa en el nivel de expresión del subtipo mAChR-M5A de los peces expuestos en comparación con el grupo control ($p < 0.05$).

6.2 Parámetros fagocíticos

6.2.1 Fagocitosis

Usando citometría de flujo se observó la actividad fagocítica en los leucocitos totales de sangre de tilapia nilótica (ver Anexo 2; Figura 19).

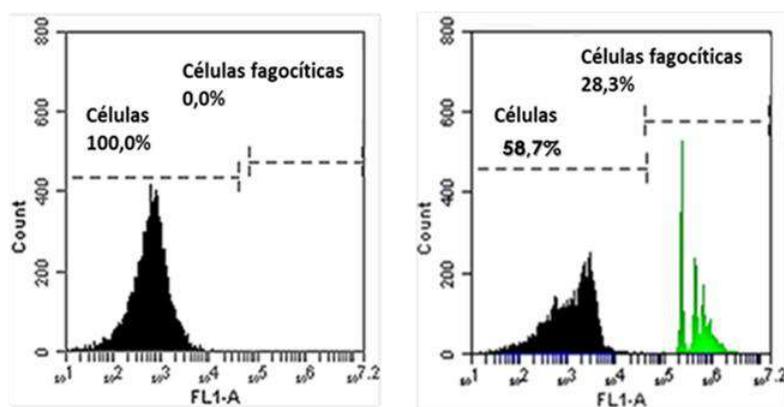


Figura 19. Histogramas de fluorescencia (FL1) en leucocitos totales de tilapia nilótica. Izquierda: histograma de fluorescencia perteneciente a una muestra control (sin perlas). Derecha se muestran los picos de fluorescencia en una muestra incubada 24 h con perlas fluorescentes.

Los resultados indican que la exposición *in vivo* a DZN a 0.97 y 1.95 mg/L durante 6 h reduce la capacidad fagocítica de los leucocitos totales. Cuando los datos se analizaron por población celular, fue evidente que la capacidad fagocítica se redujo significativamente en la MNC después de la exposición a 1.95 mg/L de DZN. En la población de PMNC, la exposición a 1.95 y 0.97 mg/L también disminuyó la capacidad fagocítica, sin embargo en a la concentración de 3.95 mg/L de DZN, la capacidad fagocítica se incrementó (Figura 20). Cuando se analizó el efecto de DZN en los leucocitos totales de los peces expuestos durante 24 h, observamos que la capacidad fagocítica disminuyó en todos los grupos experimentales en comparación con los controles. Se obtuvieron resultados similares cuando se analizó el efecto de DZN en las

diferentes poblaciones, excepto en PMNC de peces expuestos a 3.91 mg/L (Figura 21).

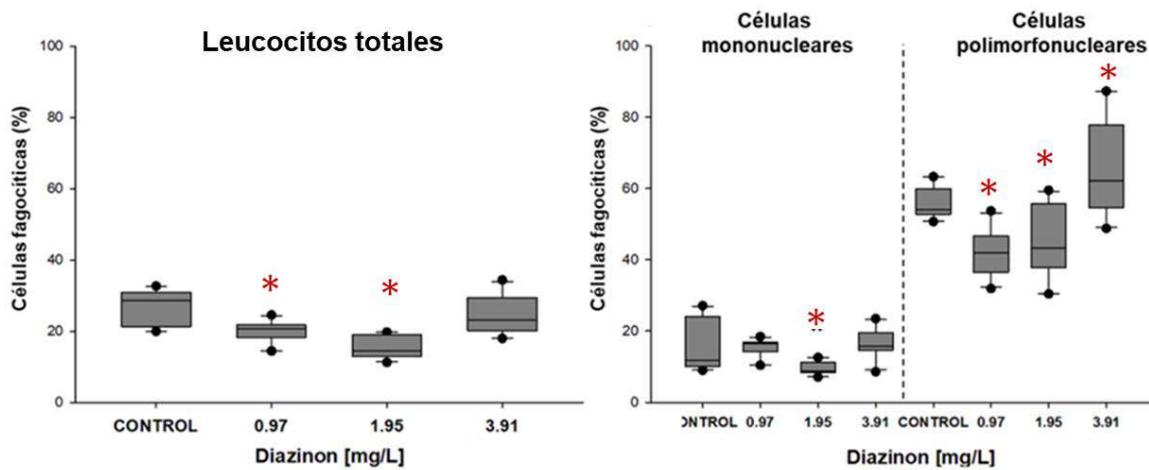


Figura 20. Porcentaje de células fagocíticas de leucocitos totales aislados de *O. niloticus* expuestas *in vivo* durante 6 horas a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN. La prueba de Kruskal-Wallis, con Dunn *post-hoc*, se utilizó para el análisis estadístico de los grupos control y expuestos. *: Diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células fagocíticas de grupos de peces expuestos respecto al grupo control ($p < 0.05$).

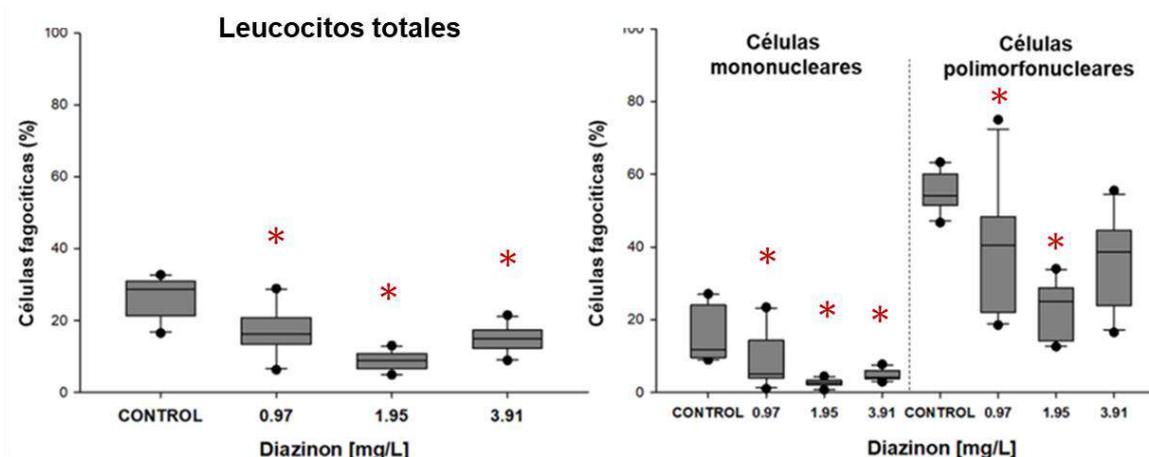


Figura 21. Porcentaje de células fagocíticas de leucocitos totales aislados de *O. niloticus* expuestas *in vivo* durante 24 horas a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN. La prueba de Kruskal-Wallis, con Dunn *post-hoc*, se utilizó para el análisis estadístico de los grupos control y expuestos. *: Diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células fagocíticas de grupos de peces expuestos respecto al grupo control ($p < 0.05$).

6.2.2 Estallido respiratorio

Se analizó la producción de moléculas oxidantes, mediante el uso de las sondas fluorescentes DHR y DHE, las cuales son específicas para peróxido de hidrógeno y anión superóxido. (Figura 22).

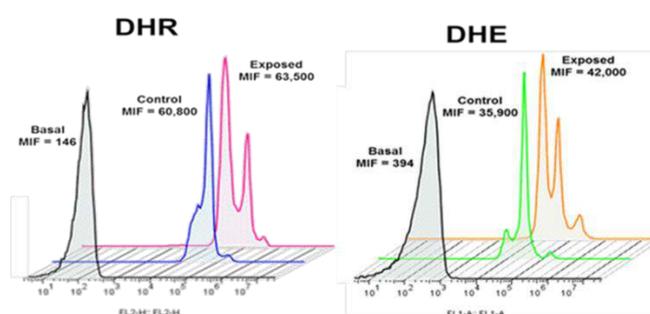


Figura 22. Histogramas representativos de la fluorescencia basal de las células así como la producción basal de H_2O_2 (DHR) y O_2^- (DHE) en peces control y expuestos.

6.2.2.1 Producción de H_2O_2

Los resultados indican que la exposición *in vivo* a DZN (1.95 mg/L) durante 6 h aumentó significativamente los niveles de H_2O_2 en comparación con el grupo de control. Además, la producción de H_2O_2 se analizó en dos poblaciones de células diferentes (MNC y PMNC). La concentración de 1.95 mg/L de DZN induce un aumento significativo en ambos tipos de poblaciones celulares; además, la concentración de 0.97 mg/L también aumentó la producción de H_2O_2 en MNC (Figura 23). Cuando los peces se expusieron a 1.95 y 0.97 mg/L de DZN durante 24 h, la producción de H_2O_2 también aumentó en los leucocitos totales aislados de los peces expuestos. Una vez que las poblaciones de leucocitos se analizaron por separado, solo la concentración de 1.95 mg/L causó un aumento en los niveles de H_2O_2 en MNC, mientras que 0.97 y 1.95 mg/L indujeron el incremento de la producción de H_2O_2 en PMNC (Figura 24).

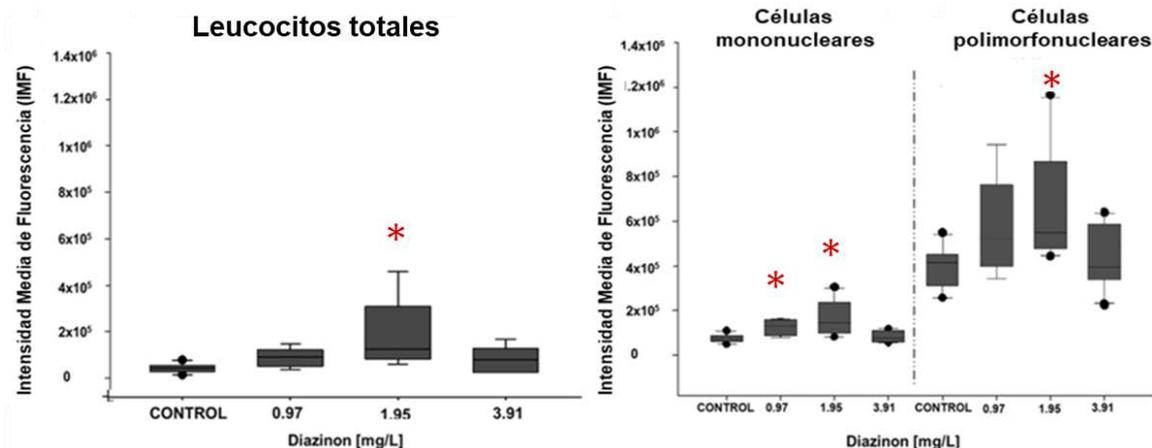


Figura 23. Producción de H_2O_2 en leucocitos aislados de sangre de tilapia nilótica expuesta *in vivo* durante 6 h a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN. Los análisis estadísticos para todos los grupos experimentales se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post-hoc de Dunn. *: Diferencia estadísticamente significativa en la producción de H_2O_2 de grupos de peces expuestos respecto al grupo control ($p < 0.05$).

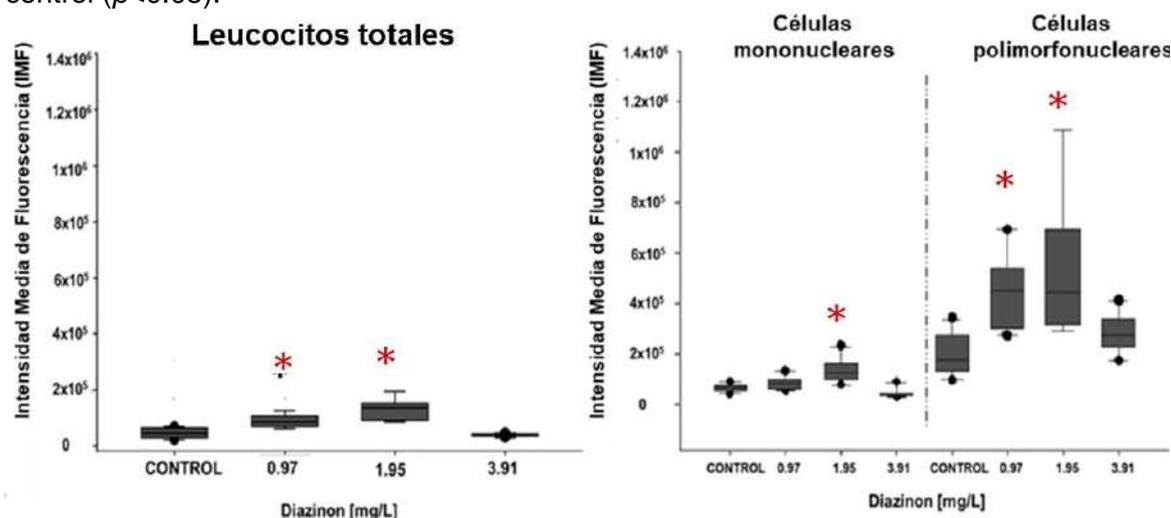


Figura 24. Producción de H_2O_2 en leucocitos aislados de sangre de tilapia nilótica expuesta *in vivo* durante 24 h a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN. Los análisis estadísticos para todos los grupos experimentales se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba post-hoc de Dunn. *: Diferencia estadísticamente significativa en la producción de H_2O_2 de grupos de peces expuestos respecto al grupo control ($p < 0.05$).

6.2.2.2 Producción de O_2^-

Los resultados indican que la exposición *in vivo* a 1.95 mg/L de DZN, durante 6 h, indujo un aumento significativo la producción de este radical en los leucocitos totales, MNC y PMNC (Figura 25). Por otro lado, en grupos de peces expuestos durante 24 h a DZN, la concentración de 1.95 mg/L incrementó

significativamente la producción de O_2^- en leucocitos totales, sin embargo cuando se analizó la producción de este radical en las poblaciones de MNC y PMNC no encontraron diferencias significativas respecto al grupo control (Figura 26).

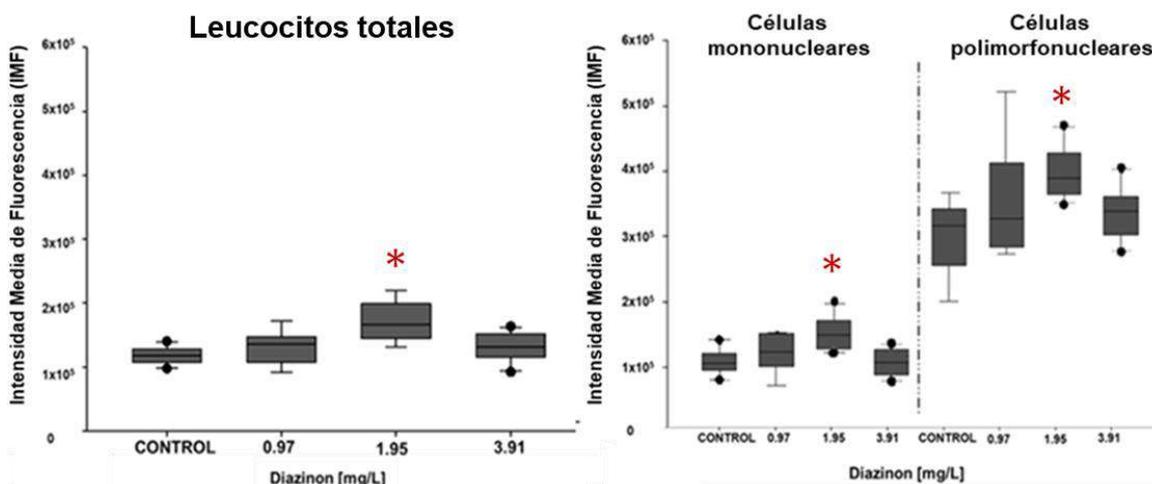


Figura 25. Producción de O_2^- en leucocitos aislados de sangre de tilapia nilótica expuesta *in vivo* durante 6 h a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN. Los análisis estadísticos para todos los grupos experimentales se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *post-hoc* de Dunn. *: Diferencia estadísticamente significativa en la producción de O_2^- de grupos de peces expuestos respecto al grupo control ($p < 0.05$).

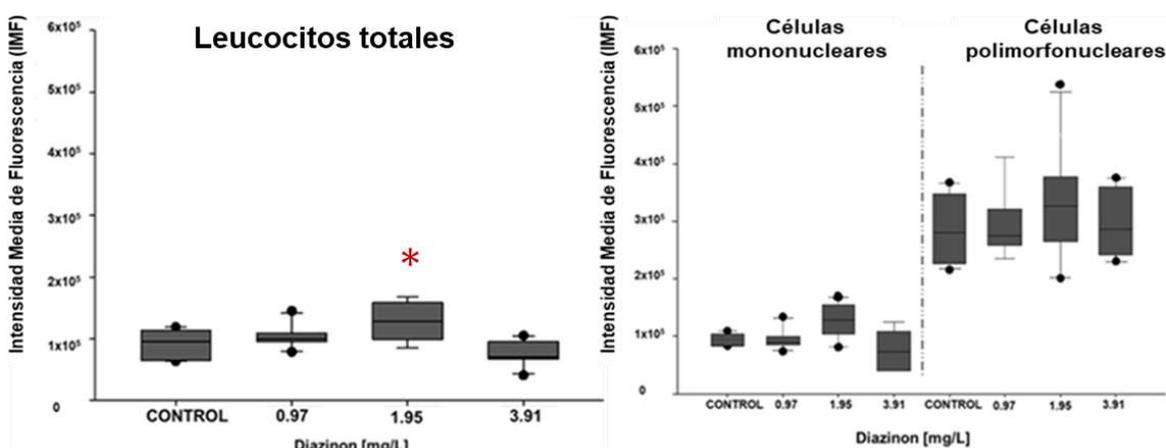


Figura 26. Producción de O_2^- en leucocitos aislados de sangre de tilapia nilótica expuesta *in vivo* durante 24 h a 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN. Los análisis estadísticos para todos los grupos experimentales se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba *post-hoc* de Dunn. *: Diferencia estadísticamente significativa en la producción de O_2^- de grupos de peces expuestos respecto al grupo control ($p < 0.05$).

6.2.3 Formación de NETs

Para evaluar la formación de NETs, se utilizaron las sondas fluorescentes DAPI para teñir el DNA y anticuerpos conjugados con Alexa fluor 488 para teñir la histona-H1 (Figura 27).

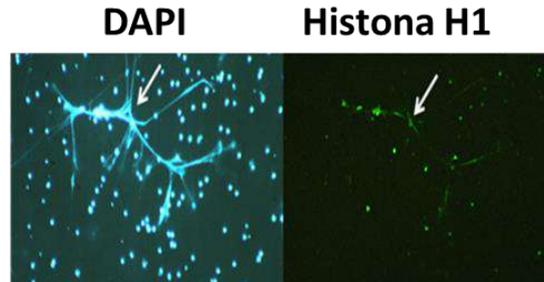


Figura 27. Formación de NETs en tilapia nilótica observadas con microscopio de fluorescencia a 20x. Neutrófilos de un pez control estimulado con PMA (200 ng) y teñidos con DAPI y con anticuerpos anti-HistonaH1 (conjugadas con Alexa fluor 488).

6.2.3.1 Formación de NETs en peces expuestos *in vivo* a DZN

Para el análisis de este parámetro se realizó una curva con PMA (agente inductor de NETs), encontrándose que el estímulo de 200 ng/mL de PMA es suficiente para inducir significativamente la formación de NETs (Anexo 3). Como se puede observar en las imágenes, la exposición a DZN induce la formación basal de NETs en *O. niloticus* (Figura 28). Los análisis estadísticos indican que se incrementa significativamente la formación basal de NETs en peces expuestos las concentraciones evaluadas de DZN durante 6 h. En lo que respecta a los neutrófilos aislados de peces expuestos a DZN e incubados posteriormente con un estímulo de PMA (200 ng/mL, 3 h), se observó que grupos de peces expuestos a 0.97 y 1.95 mg/L de DZN durante 6 h disminuyó la inducción de NETs (Figura 29). Por otra parte, se incrementó significativamente la formación basal de NETs en peces expuestos a DZN durante 24 h, mientras que en peces expuestos a DZN durante 24 h y

estimuladas con PMA, no se observaron diferencias significativas entre células de los peces control respecto a las de los peces expuestos (Figura 30).

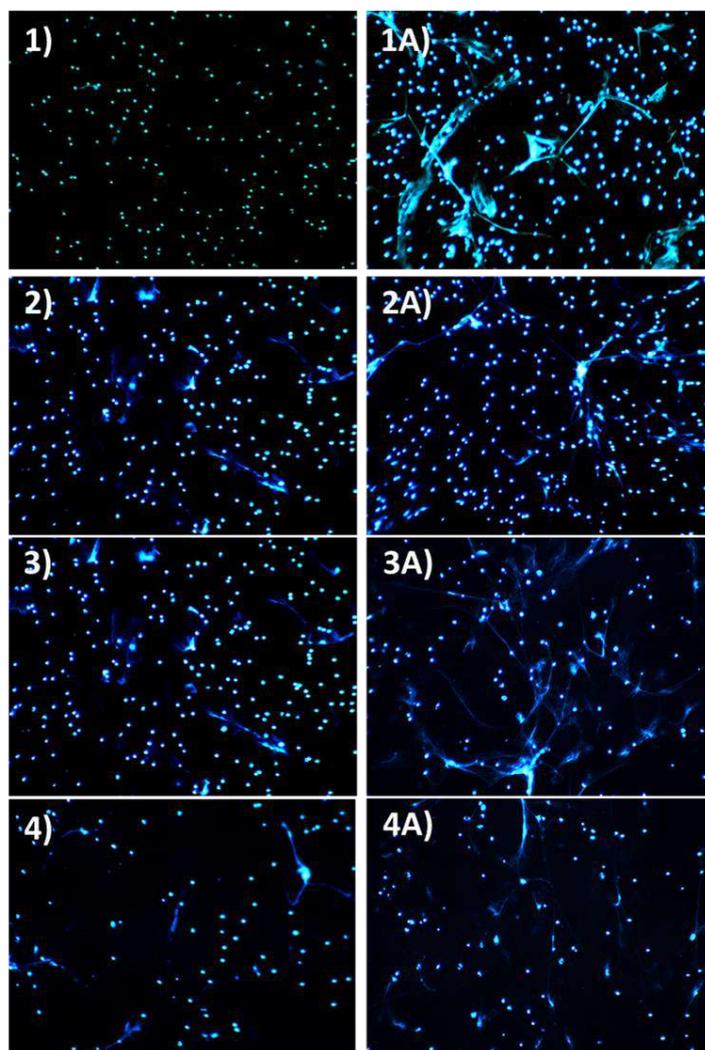


Figura 28. Formación de NETs en peces expuestos *in vivo* a DZN (6 h). Imágenes representativas de la formación de NETs en peces expuestos a 0, 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN (1, 2, 3 y 4, respectivamente) y en peces expuestos a 0, 0.97, 1.95 y 3.91 mg/L de DZN estimulados y 200 ng/mL de PMA (1A, 2A, 3A y 4A, respectivamente).

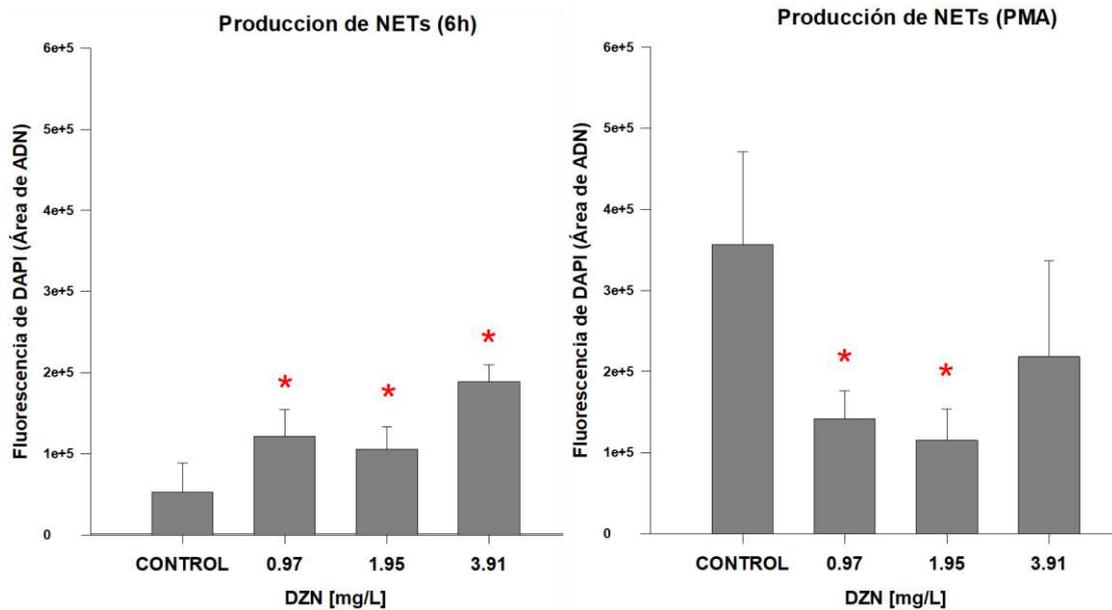


Figura 29. Producción basal e inducidas de trampas extracelulares de neutrófilos en peces expuestos *in vivo* a 0.97, 1.95 y 3.97 mg/L de DZN a durante 6 h. ANOVA de una vía. *: Diferencia estadísticamente significativa en la producción de NETs de grupos de peces expuestos respecto al grupo control ($p < 0.05$).

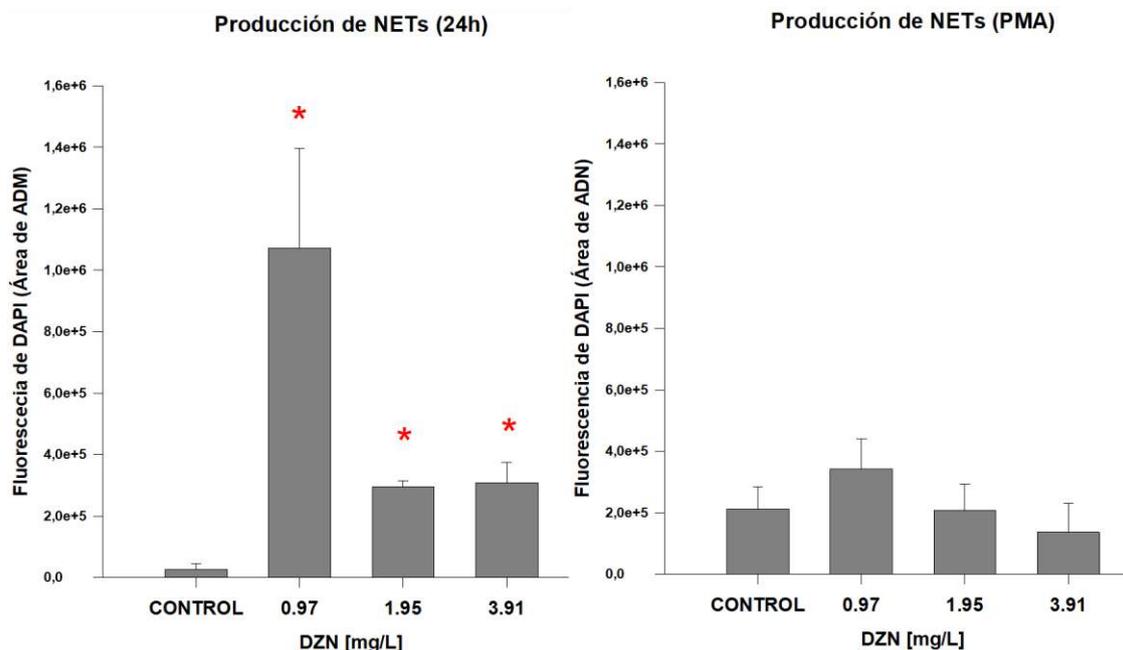


Figura 30. Producción basal e inducidas de trampas extracelulares de neutrófilos en peces expuestos *in vivo* a 0.97, 1.95 y 3.97 mg/L de DZN a durante 24 h. ANOVA de una vía. *: Diferencia estadísticamente significativa en la producción de NETs de grupos de peces expuestos respecto al grupo control ($p < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

Los OPs constituyen aproximadamente el 50% del uso global de plaguicidas (Casida y Quistad, 2004), estos compuestos y sus metabolitos ejercen sus efectos neurotóxicos inhibiendo la actividad de la enzima AChE (Flaskos, 2012). Además, estos compuestos poseen propiedades inmunosupresoras (Galloway y Handy, 2003; Díaz-Resendiz *et al.*, 2015). Particularmente el plaguicida DZN puede causar efectos inmunosupresores alterando a leucocitos, bazo, timo y nódulos linfáticos (Handy *et al.*, 2002). Sin embargo, los mecanismos de la inmunotoxicidad inducida por OPs como DZN aún no están completamente elucidados, aunque se han propuesto que el sistema colinérgico extraneuronal podría estar relacionado con dicho mecanismo de inmunotoxicidad (Girón-Pérez *et al.*, 2008; Charoenying *et al.*, 2011).

La presencia neuronal de mAChR está bien caracterizada en los mamíferos; no obstante, existen pocos estudios donde se profundice sobre la presencia de estos receptores en vertebrados inferiores como los peces (Williams y Messer, 2004). Si bien la presencia de mAChR ya se ha informado en el tejido cerebral de los peces (Beauvais *et al.*, 2001; Williams y Messer, 2004; Arenzana *et al.*, 2005; Seo *et al.*, 2009; Toscano-Márquez *et al.*, 2013), en la presente investigación detectamos la expresión de los subtipos mAChR M2, M3, M4 y M5A en cerebro y CMB.

Los mAChR neuronales tienen funciones importantes asociadas con la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células del sistema nervioso (Carruthers *et al.*, 2015). En el sistema nervioso central, los mAChR están involucrados en una variedad de funciones vegetativas, sensoriales,

conductuales, cognitivas y motoras (Eglen, 2005). Además, los mAChR regulan una amplia gama de actividades fisiológicas como la frecuencia cardíaca, la contracción del músculo liso y las secreciones glandulares (Eglen, 2005; Wess *et al.*, 2007). Por otra parte, la expresión de mAChR se ha confirmado en monocitos y macrófagos, así como en linfocitos aislados de sangre, ganglios linfáticos, bazo y timo de modelos de mamíferos y líneas de células inmunitarias (Kawashima y Fujii, 2003; de la Torre *et al.*, 2005; Razani-Borojerdi *et al.*, 2008; Kawashima *et al.*, 2012; Koarai *et al.*, 2012). Particularmente en la tilapia nilótica, la presencia de mAChR se ha informado en órganos linfoides (bazo y riñón) (Seo *et al.*, 2009). Además, nuestro grupo de investigación ha demostrado la presencia de componentes del sistema colinérgico (ACh, AChE y receptores colinérgicos) en células inmunes aisladas de esta especie (Toledo-Ibarra *et al.*, 2014, 2016). No obstante, este es el primer informe de la expresión génica de los subtipos de mAChR (M2, M3, M4 y M5A) en CMB aisladas de un pez teleosteo. Esta evidencia refuerza la noción de una comunicación estrecha entre las células del sistema inmune y el sistema nervioso central (Romero *et al.*, 2004).

En vertebrados, la modulación de la respuesta inmune por vías colinérgicas está bien establecida (Pavolov *et al.*, 2003; Kawashima *et al.*, 2012; Fujii *et al.*, 2017; Torrealba *et al.*, 2018). El desarrollo, la proliferación, la diferenciación y la activación de las células inmunitarias han sido relacionados con los mAChR (de la Torre *et al.*, 2005; Zimring *et al.*, 2005; Jinno *et al.*, 2017). La estimulación de los mAChR aumenta el flujo de Ca^{2+} intracelular, regula la expresión de *c-fos* y afecta la proliferación celular (Kawashima *et al.*, 2004). Además, los mAChR están relacionados con la defensa inmunológica, dado que modulan procesos

inflamatorios y el cambio de isotipo de anticuerpos (Pavlov *et al.*, 2003; Fujii *et al.*, 2007). Además los estímulos antigénicos inducen la expresión de componentes colinérgicas en leucocitos (Kawashima y Fuji, 2004). Además, se ha descrito que los mAChR, y específicamente el subtipo M3, desempeñan un papel fundamental en la defensa inmunitaria contra las infecciones parasitarias y bacterianas (Darby *et al.*, 2015; McLean *et al.*, 2016). Estos estudios han establecido la importancia de la señalización de mAChR durante las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Los altos niveles de expresión de los mAChR en los leucocitos son indicativos de la relevancia fisiológica de estos receptores en estas células.

Los OPs pueden ejercer efectos neurotóxicos mediante mecanismos no relacionados con la inhibición de AChE, ya que estos compuestos pueden unirse a receptores colinérgicos (Eldefrawi *et al.*, 1992). En este sentido, tanto los agentes nerviosos Somán y XV, así como los metabolitos oxones de OPs (paraoxón, malaoxón y diazoxón) pueden interactuar directamente con los receptores del sistema colinérgico y modular el nivel de expresión del receptor (Trailović *et al.*, 2017). En concordancia, estas alteraciones del sistema colinérgico neuronal han sido reportadas en el sistema colinérgico leucocitario ya que se ha reportado que DZN *in vivo* (3.91 mg/L) puede decrecer la concentración de proteína de receptores nicotínicos y muscarínicos en CMB de tilapia nilótica (Toledo-Ibarra *et al.*, 2016). En esta investigación, los niveles de mAChR en cerebro y CMB sufrieron modificaciones en presencia del plaguicida DZN, observándose dichas modificaciones en un menor tiempo y concentración en las CMB que en cerebro. Resultados similares fueron obtenidos por Charoenying *et al.*, 2011, quienes evidenciaron que paraoxón provoca

desregulación colinérgica en líneas celulares de linfoma (MOLT-3) y neuroblastoma (SH-SY5Y), encontrando que el sistema colinérgico extraneuronal linfocitario tiene mayor susceptibilidad a OPs que su contraparte neuronal, lo anterior podría estar relacionado con mecanismos de inmunotoxicidad.

Además de los efectos inducidos por OPs en componentes del sistema colinérgico neuronal y extraneuronal, estos compuestos alteran mecanismos de defensa como los innatos (Díaz-Reséndiz *et al.*, 2015). Los peces que habitan aguas contaminadas pueden estar inmunológicamente comprometidos (Holladay *et al.*, 1996). Por lo tanto en el presente trabajo, además de evidenciar las modificaciones colinérgicas, se evaluaron la capacidad fagocítica, la producción de ROS y la formación de NETs.

Entre los mecanismos de defensa innatos se encuentra la fagocitosis, la cual es un mecanismo innato primordial contra patógenos altamente conservado y este puede ser utilizado como indicador del estado de salud de los peces (Harford *et al.*, 2005). En este estudio, la exposición aguda a DZN *in vivo* en los peces disminuyó en términos generales, la capacidad fagocítica de los leucocitos totales, MNC y PMNC. No obstante, el efecto de DZN no fue dependiente de la dosis, ni del tiempo.

Los resultados observados de esta investigación concuerdan con efectos descritos en diversas investigaciones realizadas con OPs en especies de peces. Específicamente, en tilapia nilótica la exposición aguda y crónica a clorpirifos afecta la capacidad fagocítica de los leucocitos (Holladay *et al.*, 1996; Girón-Pérez *et al.*, 2007; El-Bouhy *et al.*, 2017). Existen otros estudios que

muestran resultados similares utilizando otras especies de peces como bioindicadores. Por ejemplo, en la carpa común (*Cyprinus carpio carpio*), se demostró que la exposición al malatión (0.5 y 1.0 mg/L) reduce significativamente la capacidad fagocítica (Yonar *et al.*, 2014). En concordancia, el malatión (10 mg/L) reduce la capacidad fagocítica del bacalao de Murray (*Maccullochella peelii*) en un 15% (Harford *et al.*, 2005). Por lo tanto, estos estudios demuestran que los OPs modifican la capacidad fagocítica en peces. De manera directa los OPs en células fagocíticas reducen la capacidad fagocítica y metabólica mediante la inhibición de esteradas en el citoplasma (Zabrodskii *et al.*, 2013). Por otra parte, las células inmunes expresan receptores colinérgicos y DZN *per se* modula su expresión (Trailović *et al.*, 2017), lo que repercute en la fisiología celular. Lo anterior apoya la idea de que este parámetro se puede utilizar como un biomarcador de susceptibilidad a OPs.

Existen otros biomarcadores importantes para la evaluación de los efectos tóxicos de los OPs, como la concentración de ROS. Aunque las ROS pueden actuar como agente microbicida, su sobreproducción puede alterar las biomoléculas, incluidos los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, generando daño oxidativo y estrés oxidativo (Lukaszewicz-Hussain, 2010; Lushchak, 2011; Zorov *et al.*, 2014). En el presente estudio, fue evidente el aumento en los niveles de H₂O₂ y O₂ en los leucocitos totales, MNC y PMNC de peces expuestos a *in vivo* DZN. En particular, el efecto de DZN no fue dependiente de la dosis ni del tiempo; específicamente, la mayor producción de H₂O₂ y O₂ se detectó en peces expuestos a 1.95 mg/L de DZN. Estos resultados podrían estar relacionados con el daño oxidativo detectado en el bazo, el hígado y las

branquias de la tilapia nilótica *in vivo* a DZN, en un estudio previo de nuestro grupo de investigación (Toledo-Ibarra *et al.*, 2016).

En condiciones normales, la producción/desintoxicación de ROS es un proceso regulado enzimáticamente y no enzimáticamente. Los OPs como DZN han demostrado la capacidad de alterar las enzimas antioxidantes y aumentar el daño a las biomoléculas (Altuntas *et al.*, 2004), como se ha informado en peces teleósteos como el pez mosquito (*Gambusia affinis*) (Kavitha y Rao, 2007), y la carpa común (*Cyprinus carpio*) (Oruç y Usta, 2007). Además, cuando se metabolizan plaguicidas organofosforados como el DZN, se pueden producir ROS mediante la activación del CYP-450 (Lukaszewicz-Hussain, 2010). Además, el procesamiento metabólico de DZN produce metabolitos que podrían conjugarse con GSH y otras enzimas de fase II (Fujioka y Casida, 2007; Girón-Pérez *et al.*, 2009). Esto es importante dado que intoxicaciones con altas dosis de plaguicidas pueden agotar el GSH (Giordano *et al.*, 2007) y causar estrés oxidativo, aunque el compuesto tóxico no induce un aumento de ROS (Della *et al.*, 1994). Por lo anterior, también se deben considerar el costo energético y enzimático de la biotransformación del compuesto original. No obstante, se ha informado de que la exposición a OPs induce estrés oxidativo como mecanismo de inmunotoxicidad directa (Lukaszewicz-Hussain, 2010; Díaz-Resendiz *et al.*, 2015; Ogasawara *et al.*, 2017).

La producción de ROS en las células inmunitarias está regulada por la familia de enzimas NADPH-oxidasa o Nox, específicamente la isoforma Nox-2, que se encuentra en la membrana celular de las células fagocíticas y en la membrana del fagosoma. Algunos estudios han demostrado que los OPs pueden aumentar la presencia de estas moléculas oxidantes mediante la alteración de

la cadena de transporte de electrones (como las presentes en la familia de enzimas Nox), lo que resulta en un aumento de O_2^- que conduce a la generación de otros radicales libres (Halliwell y Gutteridge, 2005). La familia de enzimas Nox son un posible blanco molecular de plaguicidas, por lo tanto, las poblaciones de células fagocíticas pueden verse afectadas por estos xenobióticos. Sin embargo, la expresión de esta familia de enzimas no está restringida a las células fagocíticas profesionales, ya que otras isoformas (Nox 1, 3, 4 y 5) han sido detectadas aunque en menor medida en células inmunes no fagocíticas y otros tipos de células. Esto explica la marcada diferencia en la producción de ROS entre MNC y PMNC, en los grupos expuestos y el control (Cross y Jones, 1991; Bánfi *et al.*, 2001; Bedard y Krause, 2007).

En lo que respecta a la evaluación de las NETs, se ha reportado que neutrófilos de mamíferos forman y liberan NETs, un mecanismo de defensa efectivo contra agentes patógenos bacterianos y fúngicos (Brinkmann *et al.*, 2004). En este sentido, la formación de NETs ha sido reportada en peces teleósteos como el pez zebra (*Danio reiro*) (Palic *et al.*, 2007) y la carpa común (*Cyprinus carpio*) (Brogden *et al.*, 2014). El presente trabajo, es el primero que reporta la formación de NETs en la tilapia nilótica.

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes, estas células son la primera línea de defensa y poseen un rol central en la inmunidad innata (Hosseinzadeh *et al.*, 2016). Los neutrófilos de peces teleósteos tienen morfología, histoquímica y funciones similares a su contraparte celular en mamíferos (Rowley *et al.*, 1990). La principal función de los NETs es atrapar, restringir y degradar a agentes patógenos, principalmente aquellos demasiado grandes

para ser fagocitados como algunas bacterias, hongos y protozoarios (Brinkmann *et al.*, 2004; Urban *et al.*, 2006; Guimaraes-Costa *et al.*, 2009).

Se ha observado que la capacidad microbicida (fagocitosis y ROS) de neutrófilos de tilapia nilótica se ve alterada en presencia del plaguicida DZN (Covantes-Rosales *et al.*, 2019). En lo que respecta a las NETs, este es el primer reporte de las modificaciones inducidas por OPs en este mecanismo de defensa. En este estudio observamos que DZN indujo la formación de NETs en todas las concentraciones de DZN tanto a 6 como a las 24 h.

Los NETs son liberados mediante la estimulación de señales proinflamatorias o mediante reconocimiento de PAMPs mediante receptores PRRs (Remijsen *et al.*, 2011). Se han reportado que diversos estímulos de origen químico (PMA, IL-8, H₂O₂, PAF y NO, INF- α/γ , C5a, MMP-9 y GM-CS) y biológico (bacterias, hongos, parásitos y virus) inducen la liberación de NETs (Brinkmann *et al.*, 2004; Yam-Puc *et al.*, 2012). Lo que sugiere que se requieren múltiples vías de señalización para lograr la producción óptima de NETs (Medina, 2009). En este sentido, el PMA estimula las funciones de los leucocitos al activar la Proteína Cinasa C (PKC), e induce la producción de NETS en humanos y peces (Brinkmann *et al.*, 2004; Paladic *et al.*, 2007). En este estudio la presencia de PMA (200-600 ng/mL) incrementó la formación y liberación de NETs en la sangre de tilapia nilótica (Anexo 3), lo que concuerda con la investigación realizada en neutrófilos del riñón de la carpita cabezona (*Pimephales promelas*), donde los neutrófilos liberaron NETs en presencia de estímulos (Palić *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando se analizó el efecto combinado de DZN y PMA (200 ng/mL) no se incrementó significativamente la producción de las NETs respecto al grupo control, incluso disminuyó significativamente la

efectividad de este agente inductor en peces expuestos durante 6 h a DZN (0.97 y 1.95 mg/L), con ello se sugiere que DZN puede interferir la liberación de NETs, lo que podría repercutir directamente en la capacidad de defensa de organismos expuestos a OPs.

De manera indirecta los OPs pueden inducir inmunotoxicidad, específicamente por la alteración del sistema colinérgico no neuronal presente en los leucocitos tanto de mamíferos como de peces (Girón-Pérez *et al.*, 2008; Díaz-Resendiz *et al.*, 2015; Toledo-Ibarra *et al.*, 2016). Específicamente, se ha demostrado que la exposición *in vivo* a DZN induce la inhibición de la AChE y un aumento posterior de las concentraciones de ACh en el tejido linfoide (bazo) de la tilapia nilótica; esto puede conducir a la sobreactivación de los receptores colinérgicos leucocitarios (Girón-Pérez *et al.*, 2008; Toledo-Ibarra *et al.*, 2016).

La sobreactivación de los nAChR y los mAChR produce un aumento del flujo de calcio (Fujii *et al.*, 2017; Díaz-Resendiz *et al.*, 2019), que a su vez induce el aumento de la producción de ROS, dado que ambos procesos están altamente coordinados en estos tipos de células (Görlach *et al.*, 2015). El aumento del calcio intracelular genera un estrés mitocondrial que promueve la producción de ROS en este orgánulo (Adam-Vizi y Starkov, 2010). Aunado a esto, la sobreactivación de los receptores colinérgicos en los leucocitos tiene un impacto directo en la función celular como la fagocitosis, lo que se demostró mediante el uso de agonistas y antagonistas selectivos de receptores de acetilcolina (Seow *et al.*, 2007; Kawashima *et al.*, 2012).

En cuanto a alteraciones inducidas por agentes colinérgicos de los mecanismos defensivos de neutrófilos, se ha reportado que la estimulación de

receptores colinérgicos suprime la capacidad fagocítica, potencia la degranulación e incrementa el daño asociado a ROS, sumado a lo anterior inducen la formación de NETs (Carmona-Rivera *et al.*, 2017; Hosseinzadeh *et al.*, 2017). Lo último, puede deberse a que la estimulación de receptores colinérgicos que produce incremento de flujo de calcio intracelular, induciendo a la formación de ROS mitocondrial, proceso que ha sido relacionado con la liberación de los NETs (Hosseinzadeh *et al.*, 2017).

La información publicada hasta ahora indica que los OPs tienen efectos potenciales en procesos antimicrobianos como la migración, la fagocitosis, la producción de ROS y causan alteraciones en la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α IL-1 β , IL-6 e IL-18) (Ogasawara *et al.*, 2017). Por lo tanto, las alteraciones inmunológicas causadas por OPs, como el DZN, reducen la capacidad microbicida y aumentan la susceptibilidad a los patógenos (Reynaud y Deschaux, 2006). Este estudio apoya la idea de que DZN interfiere con los mecanismos de defensa primordiales en peces teleósteos, parámetros que pueden utilizarse como biomarcadores de inmunotoxicidad en la exposición a OPs.

8. CONCLUSIONES

1. DZN modificó el patrón de expresión de mAChR en cerebro y CMB.
2. DZN disminuyó el porcentaje de células fagocíticas de los leucocitos totales, células mononucleares y células polimorfonucleares.
3. DZN incrementó la producción de las especies reactivas del oxígeno (H_2O_2 y O_2^-) en leucocitos totales, células mononucleares y células polimorfonucleares.
4. DZN induce la formación de NETs de manera basal e interfiere en la formación de NETs en neutrófilos estimulados con PMA.

9. PERSPECTIVAS

Este estudio se debe complementar para determinar los mecanismos moleculares relacionados con la inmunotoxicidad inducida por OPs. Por lo tanto, se sugieren las siguientes líneas de investigación:

- Identificar los componentes colinérgicos expresados en las diversas poblaciones de células inmunes de peces.
- Evaluar el patrón de citocinas pro y anti-inflamatorias en peces expuestos a diazinón y en peces estimulados con agonistas y antagonistas colinérgicos.
- Determinar el tipo de muerte celular predominante en neutrófilos de peces expuestos a diazinón.
- Evaluar la capacidad quimotáctica de leucocitos en peces expuestos a diazinón.
- Determinar el efecto de la exposición *in vitro* de DZN y su metabolito diazoxón sobre mecanismos de inmunidad innata celular.

10. BIBLIOGRAFÍA

Adam-Vizi, V., Starkov, A. A. (2010). Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *Journal of Alzheimer's disease*, 20(s2), S413-S426.

Adeyinka, A., Pierre, L. (2018). Organophosphates. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL) 2018.

Al-Ghanim, K. A. (2014). Effect of an Organophosphate Insecticide Diazinon on the Activity of Acetylcholinesterase and Lipid Peroxidation of a Common Carp, *Cyprinus Carpio* L. *Pakistan J. Zool*, 46(1), 161-166.

Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet Immunol Immunopathol*, 126(3-4), 171-198.

Ahmadi, K., Mirvaghefi, A. R., Banaee, M., & Vosoghei, A. R. (2014). Effects of long-term diazinon exposure on some immunological and haematological parameters in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *J Toxicol Environ Health Sci*, 6(1), 1-7.

Arenzana, F. J., Clemente, D., Sánchez-González, R., Porteros, Á., Aijón, J., & Arévalo, R. (2005). Development of the cholinergic system in the brain and retina of the zebrafish. *Brain Res Bull*, 66(4-6), 421-425.

Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J. C., & García-Río, L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agric Ecosyst Environ*, 123(4), 247-260

ASTDR: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (2008). Toxicological profile for diazinon. Accesado a la red el 22 de febrero del 2016 en: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp86.pdf>

Altuntas, I., Kilinc, I., Orhan, H., Demirel, R., Koylu, H., & Delibas, N. (2004). The effects of diazinon on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in erythrocytes *in vitro*. *Hum Exp Toxicol*, 23(1), 9-13.

Bacolod, E. T., Uno, S., Villamor, S. S., & Koyama, J. (2017). Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to environmental concentration of 1-nitropyrene. *Mar Pollut Bull*, 124(2), 786-791.

Balali-Mood, M., & Balali-Mood, K. (2008). Neurotoxic disorders of organophosphorus compounds and their managements. *Arch Iran Med*, 11(1), 65-89.

Bánfi, B., Molnár, G., Maturana, A., Steger, K., Hegedûs, B., Demaux, N., & Krause, K. H. (2001). A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem*, 276(40), 37594-37601.

Basical Animal Handling, (2018); accesado a la red el 22 de noviembre del 2017 en <http://basicanimalhandling.com/internal-and-external-examination/>

Beauvais, S. L., Jones, S. B., Parris, J. T., Brewer, S. K., & Little, E. E. (2001). Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol Environ Saf*, 49(1), 84-90.

Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *science*, 303(5663), 1532-1535.

Brogden, G., Krimmling, T., Adamek, M., Naim, H. Y., Steinhagen, D., & von Köckritz-Blickwede, M. (2014). The effect of β -glucan on formation and functionality of neutrophil extracellular traps in carp (*Cyprinus carpio L.*). *Dev Comp Immunol*, 44(2), 280-285.

Burnaugh, L., Sabeur, K., & Ball, B. A. (2007). Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology*, 67(3), 580-589.

Casida, J. E., & Quistad, G. B. (2004). Organophosphate toxicology: safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem Res Toxicol*, 17(8), 983-998.

Carmona-Rivera, C., Purmalek, M. M., Moore, E., Waldman, M., Walter, P. J., Garraffo, M., Phillips, K. A., Preston, K. L., Graf, J., Kaplan, M. J., Grayson, C. P., (2017). A role for muscarinic receptors in neutrophil extracellular trap formation and levamisole-induced autoimmunity. *JCI Insight*. 2(3): e89780.

Carruthers, S. P., Gurvich, C. T., & Rossell, S. L. (2015). The muscarinic system, cognition and schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev*, 55, 393-402.

Ccancapa, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y., & Barceló, D. (2016). Pesticides in the Ebro River basin: occurrence and risk assessment. *Environ Pollut*, 211, 414-424.

Chaparro, J., Taborda, A., Alfonso, D., Urrea, L., & Rodríguez, B. D. J. (2013). Liver immunolocation of CYP P450 in an subacute toxicity experiment with Clorpirifos o, o-(3, 5, 6-trichloride-2-pyridyl phosphorotioato in young male tilapia (*Oreochromis spp.*). *Ces Med Vet Zootec*, 8(2), 61-72.

Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2), S3-S23.

Charoenying, T., Suriyo, T., Thiantanawat, A., Chaiyaroj, S. C., Parkpian, P., & Satayavivad, J. (2011). Effects of paraoxon on neuronal and lymphocytic cholinergic systems. *Environ Toxicol Pharmacol*, 31(1), 119-128.

CICOPLAFEST: Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. (2004). Catálogo oficial de plaguicidas. México, D.F. pp 15-27.

CONAPESCA (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5798s.pdf>

Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta*, 366(1-2), 1-13.

Cortjens, B., van Woensel, J. B. M., & Bem, R. A. (2017). Neutrophil extracellular traps in respiratory disease: guided anti-microbial traps or toxic webs?. *Paediatr Respir Rev*, 21, 54-61.

Covantes-Rosales, C. E., Trujillo-Lepe, A. M., Díaz-Reséndiz, K. J. G., Toledo-Ibarra, G. A., Ventura-Ramón, G. H., Ortiz-Lazareno, P. C., & Girón-Pérez, M. I.

(2019). Phagocytosis and ROS production as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) leukocytes by exposure to organophosphorus pesticides. *Fish & shellfish immunology*, 84, 189-195.

Cross, A. R., & Jones, O. T. G. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*, 1057(3), 281-298.

Dale, D. C., Boxer, L., & Liles, W. C. (2008). The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 112(4), 935-945.

Darby, M., Schnoeller, C., Vira, A., Culley, F., Bobat, S., Logan, E., Kirstein, F., Wess, J., Cunningham, A. F., Brombacher, F., Selkirk, M. E., Selkirk, M. E. & Horsnell, W. G. C. (2015). The M3 muscarinic receptor is required for optimal adaptive immunity to helminth and bacterial infection. *PLoS pathogens*, 11(1), e1004636.

de la Torre, E., Davel, L., Jasnis, M. A., Gotoh, T., de Lustig, E. S., & Sales, M. E. (2005). Muscarinic receptors participation in angiogenic response induced by macrophages from mammary adenocarcinoma-bearing mice. *Breast Cancer Res*, 7(3), R345.

Della, R. M., Villani, G. R., Di, E. M., Squillacioti, C., De, L. M., Vuotto, P., Belisario, M. A., & Staiano, N. (1994). Glutathione depletion induced in rat liver fractions by seven pesticides. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 70(8-9), 185-192.

DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., & Ross, P. E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environ Toxicol Chem*, 20(1), 84-98.

Díaz-Resendiz, K. J. G., Toledo-Ibarra, G. A., & Girón-Pérez, M. I. (2015). Modulation of immune response by organophosphorus pesticides: fishes as a potential model in immunotoxicology. *J Immunol Res*, 2015.

Díaz-Resendiz, K. J. G., Ortiz-Lazareno, P. C., Covantes-Rosales, C. E., Trujillo-Lepe, A. M., Toledo-Ibarra, G. A., Ventura-Ramón, G. H., & Girón-Pérez, M. I. (2019). Effect of diazinon, an organophosphate pesticide, on signal transduction and death induction in mononuclear cells of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Fish & shellfish immunology*.

Du, Y., Tang, X., Zhan, W., Xing, J., & Sheng, X. (2016). Immunoglobulin Tau Heavy Chain (IgT) in Flounder, *Paralichthys olivaceus*: Molecular Cloning, Characterization, and Expression Analyses. *Int J Mol Sci*, 17(9), 1571.

Dzul-Caamal, R., Domínguez-López, M. L., Olivares-Rubio, H. F., García-Latorre, E., & Vega-López, A. (2014). The relationship between the bioactivation and detoxification of diazinon and chlorpyrifos, and the inhibition of acetylcholinesterase activity in *Chirostoma jordani* from three lakes with low to high organophosphate pesticides contamination. *Ecotoxicology*, 23(5), 779-790.

El-Bouhy, Z. M., El-Nobi, G., Reda, R. M., & Ibrahim, R. E. (2017). Effect of insecticide "chlorpyrifos" on immune response of *Oreochromis niloticus*. *Zag Vet J*, 44(3).

Eldefrawi, A. T., Jett, D., & Eldefrawi, M. E. (1992). Direct actions of organophosphorus anticholinesterases on muscarinic receptors. In *Organophosphates chemistry, fate, and effects* (pp. 257-270).

Elerse, T., & Filipic, M. (2011). Organophosphorus pesticides-mechanisms of their toxicity. In *Pesticides-the impacts of pesticides exposure*. InTech.

Ellison, C. A., Tian, Y., Knaak, J. B., Kostyniak, P. J., & Olson, J. R. (2012). Human hepatic cytochrome P450-specific metabolism of the organophosphorus pesticides methyl parathion and diazinon. *Drug Metab Dispos*, 40(1), 1-5.

Eglen, R. M. (2005). Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem*, 43, 105-136.

Esteban, M. Á., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., & Meseguer, J. (2015). Phagocytosis in teleosts. Implications of the new cells involved. *Biology*, 4(4), 907-922.

Estévez, R. A., Mostazo, M. G. C., Rodríguez, E., Espinoza, J. C., Kuznar, J., Jónsson, Z. O., ... & Maier, V. H. (2018). Inducers of salmon innate immunity: An *in vitro* and *in vivo* approach. *Fish & shellfish immunology*, 72, 247-258.

FAO, (2006). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas y la Alimentación. Artículo 2°. Accesado a la red en: <https://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf> el día 16 de mayo del 2015.

FAO, FAOstat, (2016). Acceso a la red el día 12/11/18 en <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>

FAO, FishStat. (2015). Acceso a la red el día 02/06/15 en http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es

Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7, 61-98.

Flaskos, J. (2012). The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: a direct role for the oxon metabolites. *Toxicol Lett*, 209(1), 86-93.

Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., & Kawashima, K. (2017). Expression and function of the cholinergic system in immune cells. *Frontiers in immunology*, 8, 1085.

Fujii, Y. X., Tashiro, A., Arimoto, K., Fujigaya, H., Moriwaki, Y., Misawa, H., Fujii, T., Matsui, M., Kasahara, T., & Kawashima, K. (2007). Diminished antigen-specific IgG 1 and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M 1 and M 5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *J neuroimmunol*, 188(1), 80-85.

Fujioka, K., & Casida, J. E. (2007). Glutathione S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives. *Chem Res Toxicol*, 20(8), 1211-1217.

Fukuto, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect*, 87, 245-254.

Galloway, T., & Handy, R. (2003). Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*, 12(1-4), 345-363.

Giordano, G., Afsharinejad, Z., Guizzetti, M., Vitalone, A., Kavanagh, T. J., & Costa, L. G. (2007). Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol Appl Pharmacol*, 219(2-3), 181-189.

Girón-Peréz, M.I. (2007). Efecto tóxico y mecanismo supresor de diazinón sobre la respuesta inmune de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Tesis de doctorado. Universidad autónoma de Guadalajara. 82 pp.

Girón-Pérez, M. I., Zaitseva, G., Casas-Solis, J., & Santerre, A. (2008). 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*, 25(5), 517-521.

Girón-Pérez, M. I., Velázquez-Fernández, J., Díaz-Resendiz, K., Díaz-Salas, F., Canto-Montero, C., Medina-Díaz, I., Robledo-Marengo, M., Rojas-García, A., & Zaitseva, G. (2009). Immunologic parameters evaluations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentrations of diazinon. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(2), 383-385.

Gonzales-Arias, C. A., Robledo-Marengo, M. D. L., Medina-Díaz, I. M., Velázquez-Fernández, J. B., Girón-Pérez, M. I., Quintanilla-Vega, B., Rojas-García, A. E. (2010). Patrón de uso y venta de plaguicidas en Nayarit, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 26(3), 221-228.

Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: a mutual interplay. *Redox biology*, 6, 260-271.

Guimaraes-Costa, A. B., Nascimentoa, M. T., Fromenta, G. S., Soares, R. P., Morgado, F. N., Conceição-Silva, F., Saraiva, E. M. (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 21;106(16):6748-53.

Gwilt, C. R., Donnelly, L. E., Rogers, D. F. (2007). The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? *Pharmacol Ther* 115:208–222

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2001). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed., UK: Oxford University Press; 385926-6.00045-4.

Handy, R. D., Abd-El Samei, H. A., Bayomy, M. F. F., Mahran, A. M., Abdeen, A. M., El-Elaimy, E. A. (2002). Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. *Toxicology*, 172(1), 13-34.

Harford, A. J., O'Halloran, K., Wright, P. F. (2005). The effects of *in vitro* pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aquatic Toxicology*, 75(4), 330-342.

Haugland, G. T., Jakobsen, R. A., Vestvik, N., Ulven, K., Stokka, L., Wergeland, H. I. (2012). Phagocytosis and respiratory burst activity in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.) leucocytes analysed by flow cytometry. *PloS One*; 7:e47909.

Heano S., Corey G. (1986). Plaguicidas organofosforados y carbámicos. *Serie Vigilancia 2; OPS/OMS. Metepec, México*, pp: 3-40.

Henderson, L. M., & Chappel, J. B. (1993). Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation?. *European Journal of Biochemistry*, 217(3), 973-980.

Holladay, S. D., Smith, S. A., El-Haback, H., Caceci, T. (1996). Influence of chlorpyrifos, an organophosphate insecticide, on the immune system of Nile tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8(2), 104-110.

Hosseinzadeh, A., Thompson, P. R., Segal, B. H., Urban, C. F. (2016). Nicotine induces neutrophil extracellular traps. *Journal of leukocyte biology*, 100(5), 1105-1112.

Ibigbami, O. A., Aiyesanmi, A. F., Adeyeye, E. I., Adebayo, A. O., Aladesanwa, R. D. (2016). Concentration and Potential Health Risks Associated with Organophosphorus Pesticides Residues in Fish from Three Rivers in Ekiti State, South-Western Nigeria. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 8(6), 324-331.

Jinno, M., Ohta, S., Tanaka, A., Satou, H., Uno, T., Fujiwara, A., Uchida, Y., Manabe, R., Kuwahara, N., Hirai, K., Miyata, Y. (2017). Muscarinic M3 Receptor Blockage Inhibits The Development Of M2 Macrophages In Allergic Inflammation. In C35. ASTHMA AND ALLERGY CELLULAR INVESTIGATIONS (pp. A5282-A5282). American Thoracic Society.

Kappers, W.A., Edwards, R.J., Murray, S., Boobis, A.R. (2001). Diazinon is activated by CYP2C19 in human liver. *Toxicology and applied pharmacology*, 177(1), 68-76.

Kavitha, P., Rao, J. V. (2007). Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87(2), 182-188.

Kawashima, K., Fujii, T. (2003). The lymphocytic cholinergic system and its biological function. *Life Sci.*, 72, 2101-2109.

Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., Misawa, H., Horiguchi, K. (2012). Reconciling neuronally and nonneuronally derived acetylcholine in the regulation of immune function. *Ann. N.Y. Acad. Sci. Life Sci.* 91; 1027-1032.

Kepka, M., Verburg-van-Kemenade, B. M. L., Chadzinska, M. (2013). Neuroendocrine modulation of the inflammatory response in common carp: adrenaline regulates leukocyte profile and activity. *Gen Comp Endocrinol*, 188, 102-109.

Koarai, A., Traves, S. L., Fenwick, P. S., Brownm S, M., Chana, K. K., Russell, R. E., Nicholson, A. G., Barnes, P. J., Donnelly, L.E. (2012). Expression of muscarinic receptors by human macrophages. *Eur Respir J*, erj01367-2010.

Ku, Y., Chang, J. L., Shen, Y. S., Lin, S.Y. (1998). Decomposition of diazinon in aqueous solution by ozonation. *Water Research*, 32(6), 1957-1963.

Lans-Ceballos, E., Lombana-Gómez, M., & Pinedo-Hernández, J. (2018). Residuos de pesticidas organoclorados en leche pasteurizada distribuida en Montería, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 20, 208-214.

Leyva-Morales, J. B., García de la Parra, L. M., Bastidas-Bastidas, P. J., Astorga-Rodríguez, J. E., Bejarano-Trujillo, J., Cruz-Hernández, A., Martínez-Rodríguez, I. E., Betancourt-Lozano, M. (2014). Uso de plaguicidas en una región agrícola tecnificada al noroeste de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30(3): 247-261.

Liu, C. J., Men, W. J., Liu, Y. J. (2002). The pollution of pesticides in soils and its bioremediation. *System Sciencs and Comprehensive Studies in Agriculture*, 18(4): 295-297

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25: 402–408.

Lukaszewicz-Hussain, A. (2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity—Short review. *Pesticide biochemistry and physiology*, 98(2), 145-150.

Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology*, 101(1), 13-30.

Nagasawa, T., Nakayasu, C., Rieger, A. M., Barreda, D. R., Somamoto, T., Nakao, M. (2014). Phagocytosis by Thrombocytes is a Conserved Innate Immune Mechanism in Lower Vertebrates. *Front Immunol.* 5:445. Published 2014 Sep 16. doi:10.3389/fimmu.2014.00445.

Nelson, J. S. (2006) *Fishes of the world*, 4th edn. New York, NY: Wiley.

Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 137-151.

Masroor, F., Ahmad, I. I., Sayeed, I. I., Athar, M., Raisuddin, S. (2000). Pollutant-induced overactivation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquat Toxicol*; 49:243–50.

Matzinger, P. (2012). The evolution of the danger theory. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 8, 311–317 10.1586/eci.12.21

McLean, L. P., Smith, A., Cheung, L., Urban, Jr. J. F., Sun, R., Grinchuk, V., Desai, N., Zhao, A., Raufman, J. P., Shea-Donohue, T. (2016). Type 3 muscarinic receptors contribute to intestinal mucosal homeostasis and clearance of *Nippostrongylus brasiliensis* through induction of TH2 cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 311(1), G130-G141.

Medina, E. (2009). Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. *Journal of innate immunity*, 1(3), 176-180.

Medzhitov, R., Janeway, C. A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, 296(5566), 298-300.

Miyata, T., Fan, X. (2012). A second hit for TMA. *Blood*, 120(6), 1152-1154.

Ogasawara, N., Matsushima, M., Kawamura, N., Atsumi, K., Yamaguchi, T., Ochi, H., Ueyama, J. (2017). Modulation of immunological activity on macrophages induced by diazinon. *Toxicology*, 379, 22-30.

Oruç, E. Ö., Usta, D. (2007). Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 23(1), 48-55.

Palić, D., Ostojić, J., Andreasen, C. B., & Roth, J. A. (2007). Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(8), 805-816.

Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakim, A., Zychlinsky, (2010). A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 191(3):677-91.

Pavlov, V. A., Wang, H., Czura, C. J., Friedman, S. G., Tracey, K.J. (2003). The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med*, 9(5-8), 125.

Planchart, A., Mattingly, C. J., Allen, D., Ceger, P., Casey, W., Hinton, D., ... & Burgess, S. M. (2016). Advancing toxicology research using *in vivo* high throughput toxicology with small fish models. *Altex*, 33(4), 435.

- Pijanowski, L., Golbach, L., Kolaczowska, E., Scheer, M., Verburg-van Kemenade, B. M. L., Chadzinska, M. (2013). Carp neutrophilic granulocytes form extracellular traps via ROS-dependent and independent pathways. *Fish & shellfish immunology*, 34(5), 1244-1252.
- Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and environmental Ethics*, 8(1), 17-29.
- Rauta, P. R., Nayak, B., Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunology letters*, 148(1), 23-33.
- Ravi, V., Venkatesh, B. (2018). The divergent genomes of teleosts. *Annual review of animal biosciences*, 6, 47-68.
- Razani-Boroujerdi, S., Behl, M., Hahn, F. F., Pena-Philippides, J. C., Hutt, J., Sopori, M. L. (2008). Role of muscarinic receptors in the regulation of immune and inflammatory responses. *J Neuroimmunol*, 194(1-2), 83-88. *Research*, 7(3), R345.
- Remijsen, Q., Berghe, T. V., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Vandenabeele, P. (2011). Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell research*, 21(2), 290.
- Reynaud, S., Deschaux, P. (2006). The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic toxicology*, 77(2), 229-238.
- Romero, L. P., Hernández, M. E., Salinas, F. L., López, G. S. (2004). Interacciones neuroendocrino-inmunológicas. *Salud Ment*, 27(3), 19-25.
- Rowley, A. F. (1990). Collection, separation and identification of fish leucocytes. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, van Muiswinkel WB, editors. *Techniques in fish immunology—fish immunology technical communications no. 1*. Fair Haven, NJ, USA: SOS Publications; p. 113.
- Sabra, F. S., Mehana, E. S. E. D. (2015). Pesticides toxicity in fish with particular reference to insecticides. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences (ISSN: 2321-1571)*, 3(01).
- Sarasamma, S., Varikkodan, M. M., Liang, S. T., Lin, Y. C., Wang, W. P., & Hsiao, C. D. (2017). Zebrafish: A premier vertebrate model for biomedical research in indian scenario. *Zebrafish*, 14(6), 589-605.
- Sato, K., Fujii, T., Kawashima, K. (1999). Expression of mRNA for muscarinic receptor subtypes and neuronal nicotinic receptor subunits in human mononuclear leukocytes. *Jpn J Pharmacol* 79; 48P.
- Saurabh, S., Sahoo, P. K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture research*, 39(3), 223-239.
- Savan, R., Sakai, M. (2006). Genomics of fish cytokines. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 1(1), 89-101.
- Seo, J. S., Kim, M. S., Park, E. M., Ahn, S. J., Kim, N.Y., Jung, S. H., Kim, J. W., Lee H. H., Chung, J. K. (2009). Cloning and characterization of muscarinic receptor genes from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol Cells*, 27(3), 383-390. doi:10.1007/s10059-009-0048-5.

Seow, W. K., Thong, Y. H., Nelson, R. D., MacFarlane, G.D., Herzberg, M.C. (1994). Nicotine-induced release of elastase and eicosanoids by human neutrophils. *Inflammation*, 18(2), 119-127.

Soulliere C., Dixon B. (2017). Immune System Organs of Bony Fishes. Reference Module in Life Sciences.

Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nat. Immunol.* 14: 320-326.

Toledo-Ibarra, G. A., Rojas-Mayorquín, A. E., Girón-Pérez, M.I. (2013). Influence of the cholinergic system on the immune response of teleost fishes: potential model in biomedical research, *Clinical and Developmental Immunology*, vol.2013, ArticleID536534, 9 p.

Toledo-Ibarra, G. A., Díaz-Resendiz, K. J. G., Pavon, L., & Girón-Pérez, M. I. (2014). Cholinergic activity in mononuclear cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish. *Advances in Neuroimmune Biology*, 5(4), 229-234.

Toledo-Ibarra, G. A., Díaz-Resendiz, K. J. G., Pavón-Romero, L., Rojas-García, A. E., Medina-Díaz, I. M., & Girón-Pérez, M. I. (2016). Effects of diazinon on the lymphocytic cholinergic system of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Vet Immunol Immunopathol*, 176, 58-63.

Toscano-Márquez, B., Dunn, R. J., & Krahe, R. (2013). Distribution of muscarinic acetylcholine receptor mRNA in the brain of the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J Comp Neurol*, 521(5), 1054-1072.

Torrealba, D., Balasch, J. C., Criado, M., Tort, L., Mackenzie, S., & Roher, N. (2018). Functional evidence for the inflammatory reflex in teleosts: A novel $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor modulates the macrophage response to dsRNA. *Dev Comp Immunol*, 84, 279-291.

Trailović, S. M., Marjanović, D. S., Uzelac, T. V., Milovanović, M., & Trailović, J. N. (2017). Two opposite dose-dependent effects of diazinon on the motor activity of the rat ileum. *Research in veterinary science*, 112, 18-25.

Ullah, S., & Zorriehzahra, M. J. (2015). Ecotoxicology: a review of pesticides induced toxicity in fish. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 3(1), 40-57.

Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., ... & Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS pathogens*, 5(10), e1000639.

Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol*, 8:668e76.

USEPA, (2018). Diazinon IRED Facts. Accesado a la red el 25 de Agosto del 2018 en: https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/diazinon_ired_fs.html

Vale, J. A. (1998). Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology letters*, 102, 649-652.

Vega-Villasante, F., Cortés-Lara, M. C, Zúñiga-Medina, L. M., Jaime-Ceballos, B., Galindo-López, J., Basto-Rosales, M. E. R., Nolasco-Soria, H. (2010). Cultivo de tilapia

(*Oreochromis niloticus*), a pequeña escala ¿Alternativa alimentaria para familias rurales y periurbanas de México? *Redvet*, 11 (03): 1965-7504.

Verburg-van Kemenade, B. M. L., Van der Aa, L. M., & Chadzinska, M. (2013). Neuroendocrine-immune interaction: regulation of inflammation via G-protein coupled receptors. *Gen Comp Endocrinol*, 188, 94-101.

Warr, G. W., Magor, K. E., & Higgins, D. A. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology today*, 16(8), 392-398.

Wess, J., Eglen, R. M., & Gautam, D. (2007). Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 6(9), 721-733. doi:10.1038/nrd2379.

Wessler, I., & Kirkpatrick, C. J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology*, 154(8), 1558-1571.

Wester, P. W., Vethaak, A. D., & Van Muiswinkel, W. B. (1994). Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology*, 86(3), 213-232.

Williams, F. E., & Messer Jr, W. S. (2004). Muscarinic acetylcholine receptors in the brain of the zebrafish (*Danio rerio*) measured by radioligand binding techniques. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 137(4), 349-353.

Yam-Puc, J. C., García-Marín, L., Sánchez-Torres, L. E. (2012). Trampas extracelulares de neutrófilos (NET), consecuencia de un suicidio celular. *Gaceta Médica de México*. 148: 68-75.

Yonar, S. M., Ural, M. Ş., Silici, S., & Yonar, M. E. (2014). Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 102, 202-209.

Yousefi, S., Mihalache, C., Kozłowski, E., Schmid, I., Simon, H.U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 16(11):1438-44.

Zabrodskii, P. F., Grishin, V. A., & Borodavko, V. K. (2013). Mechanism of suppression of phagocytic and metabolic activity of neutrophils and production of proinflammatory cytokines during chronic poisoning with organophosphorus compounds. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 155(4), 464-466.

Zapata, A. G., & Cooper, E. L. (1990). *The immune system: comparative histophysiology*. John Wiley & Sons.

Zhang, W. J., Jiang, F. B., Ou, J. F. (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1(2): 125-144.

Zhang, Y. A., Salinas, I., Li, J., Parra, D., Bjork, S., Xu, Z., LaPatra, S. E., Bartholomew, J., Sunyer, J. O. (2010). IgT, a primitive immunoglobulin class specialized in mucosal immunity. *Nature immunology*, 11(9), 827.

Zhang, Y. A., Salinas, I., & Sunyer, J. O. (2011b). Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish & shellfish immunology*, 31(5), 627-634.

Zimring, J.C., Kapp, L. M., Yamada, M., Wess, J., Kapp, J. A. (2005). Regulation of CD8+ cytolytic T lymphocyte differentiation by a cholinergic pathway. *J Neuroimmunol* 164: 66–75.

Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909-950.

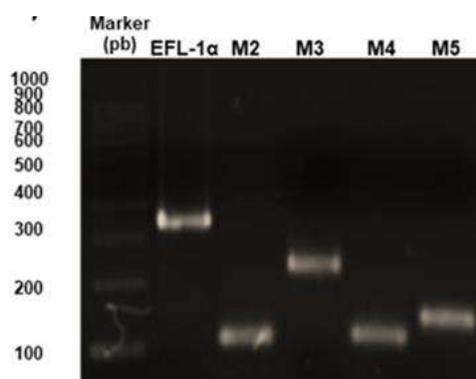
Zou, J., & Secombes, C. J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology*, 5(2), 23.

11. ANEXOS

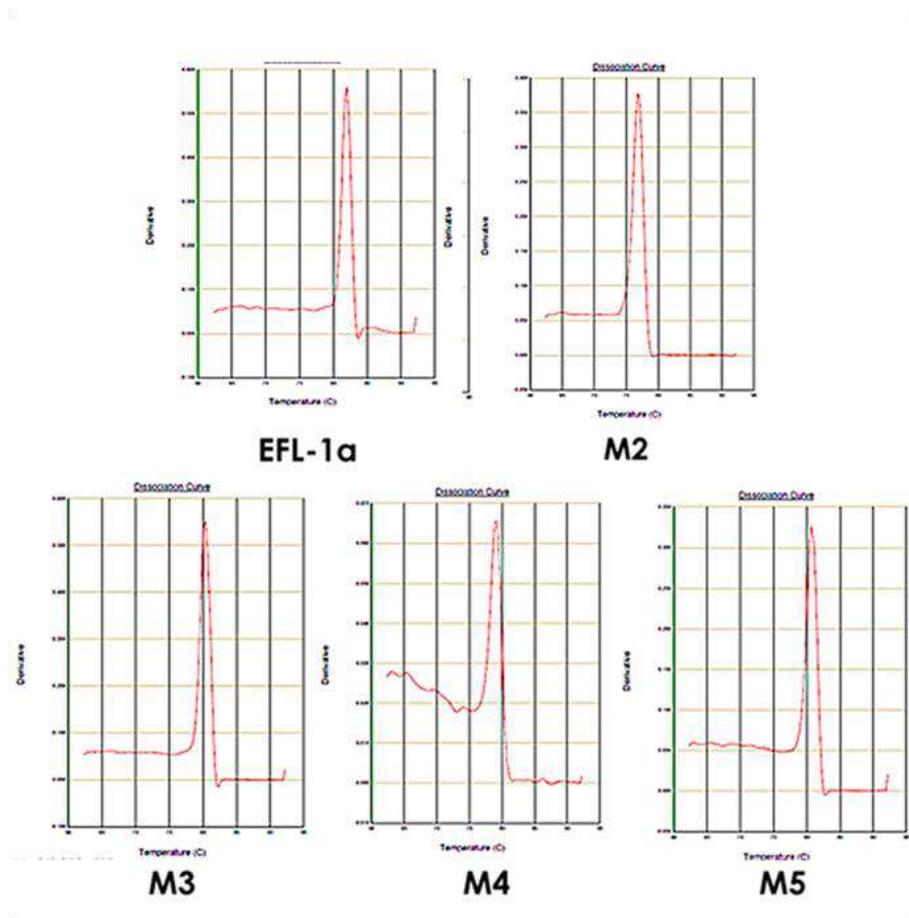
Anexo 1

Anexo 1A: Concentración y pureza del RNA aislado de muestras empleadas para el análisis de la expresión de mAChR (n=8).

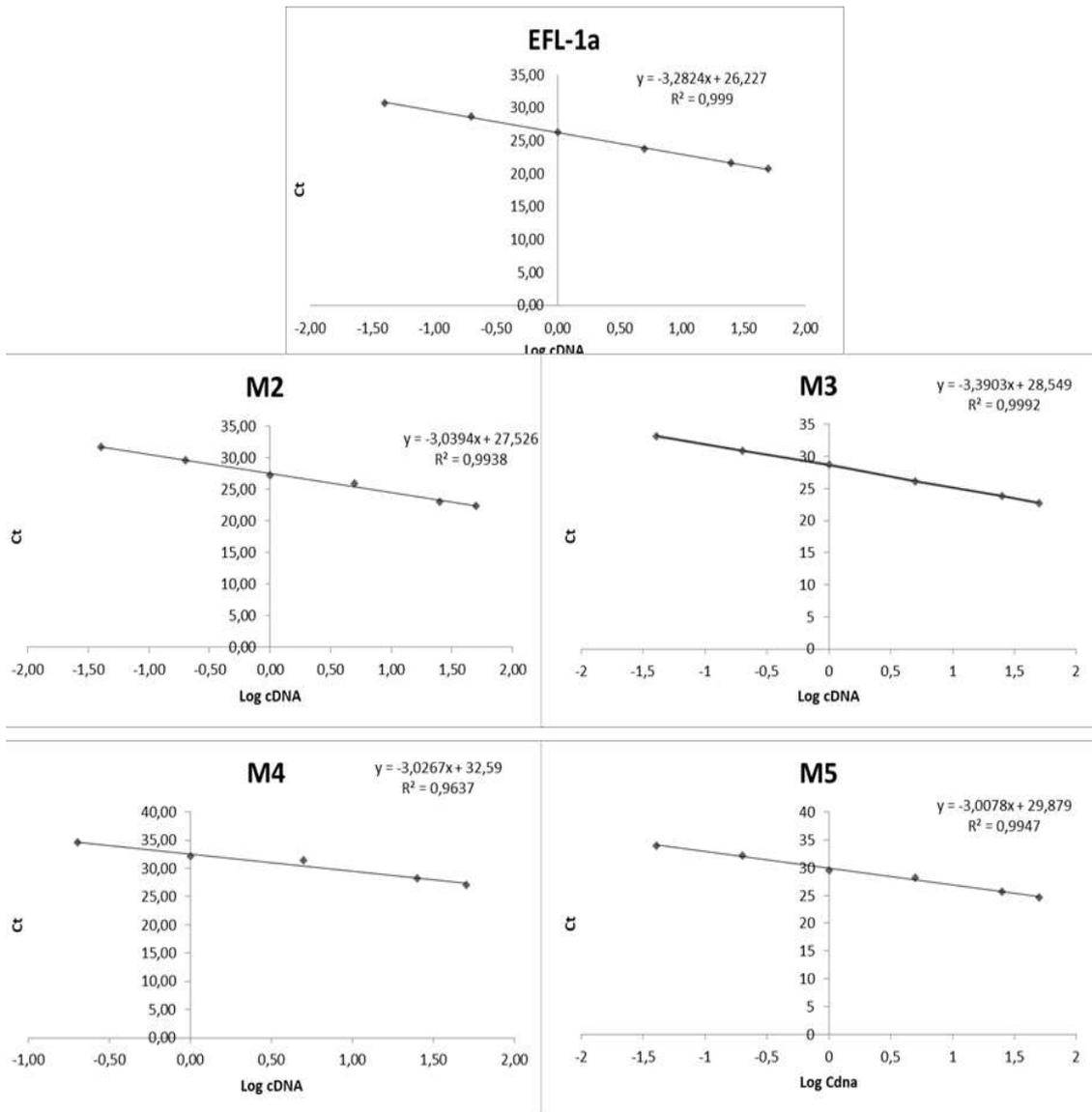
Tejido	horas	DZN [mg/L]	RNA [ng/ μ L]	260/280
Cerebro	6	0	526,83	1,90
Cerebro	24	0	632,95	1,87
Cerebro	6	0.97	616,99	1,90
Cerebro	24	0.97	742,29	1,88
Cerebro	6	1.95	667,06	1,88
Cerebro	24	1.95	854,04	1,89
Cerebro	6	3.91	731,44	1,86
Cerebro	24	3.91	644,86	1,88
CMB	6	0	373,44	1,86
CMB	24	0	693,21	1,90
CMB	6	0.97	233,15	1,87
CMB	24	0.97	742,29	1,88
CMB	6	1.95	325,73	1,89
CMB	24	1.95	433,99	1,87
CMB	6	3.91	328,36	1,88
CMB	24	3.91	560,57	1,85



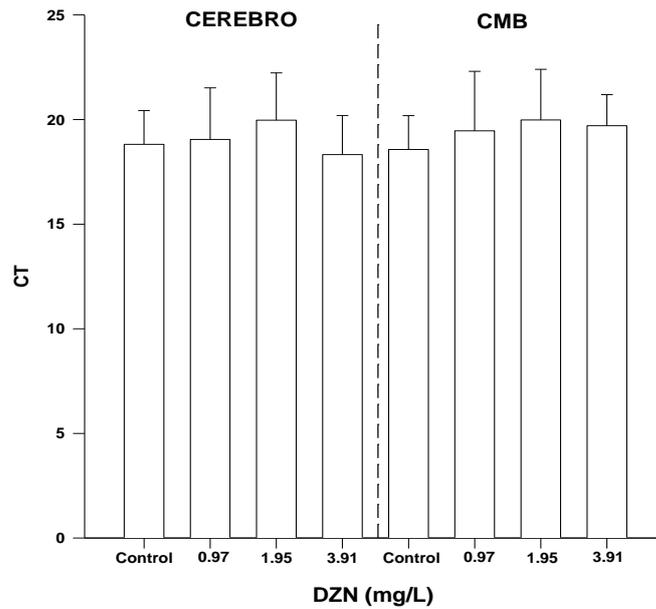
Anexo 1B: Gel de agarosa-brEt (1.5 %), visualizado bajo luz ultravioleta en el que se observan los tamaños de los productos obtenidos por qPCR para los genes EFL-1a y mAChR (M2-M5) de tilapia nilótica. Con ello comprobamos que el tamaño de los productos esperados coincide con el observado. El Tamaño correspondiente de los productos amplificados en pares de bases (pb) son los siguientes: EFL-1a (327); M2 (100); M3 (200); M4 (100) y M5A: (130).



Anexo 1C: Curvas de disociación de los productos de PCR obtenidos para cada juego de oligonucleótidos (EFL-1a, mAChR M2-M5). Con esto, comprobamos la especificidad de los juegos de oligonucleótidos para cada gen. Los cuales sólo muestran un pico de fluorescencia.



Anexo 1D: Curvas de eficiencia de amplificación de cada juego de oligonucleótidos (EFL-1a, mAChR M2-M5). Los valores aceptables de eficiencia son entre 90 y 110. Las eficiencias obtenidas para cada gen amplificado fueron los siguientes: EFL-1a: 101.68; mAChR-M2: 113.30; mAChR-M3: 97.22; mAChR-M4: 113.99 y mAChR-M5A: 115.02.

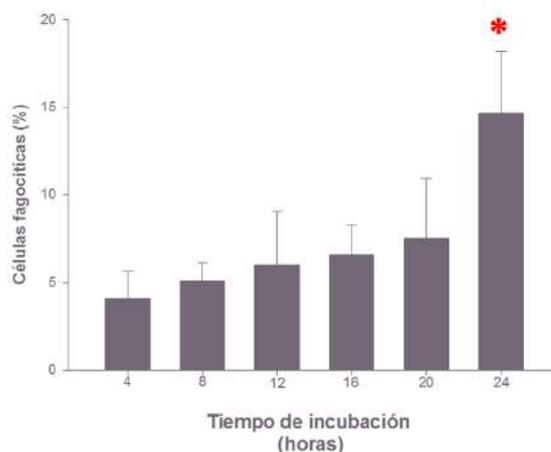


Anexo 1E: Comparación de los CTs obtenidos de la amplificación del gen EFL-1a tanto de cerebro como de células mononucleares de bazo provenientes de peces de grupo control y peces expuestos a DZN. Los datos fueron analizados con la prueba estadística ANOVA de 1 vía con un nivel de significancia de 0.05 ($P = 0,654$). Con este análisis observamos que EFL-1a no se modifica en presencia de DZN, por lo que se decidió utilizarlo como gen constitutivo en esta investigación.

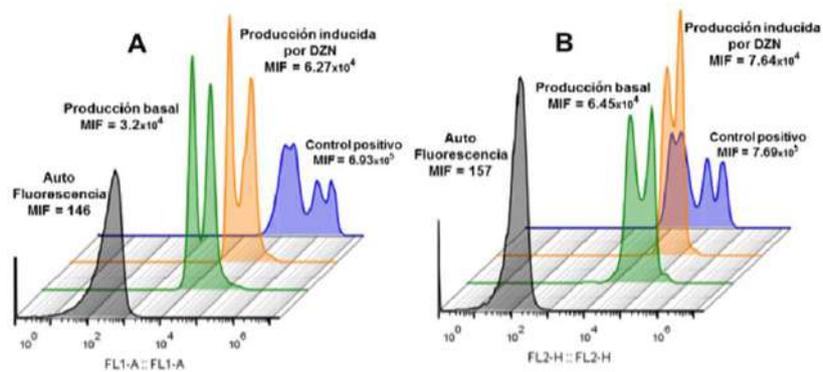
Anexo 2

En esta sección observamos los anexos de la sección de citometría.

En el anexo 2A, se observan los porcentajes de células fagocíticas obtenidos de leucocitos totales incubados con perlas fluorescentes durante 4 hasta 24 horas.

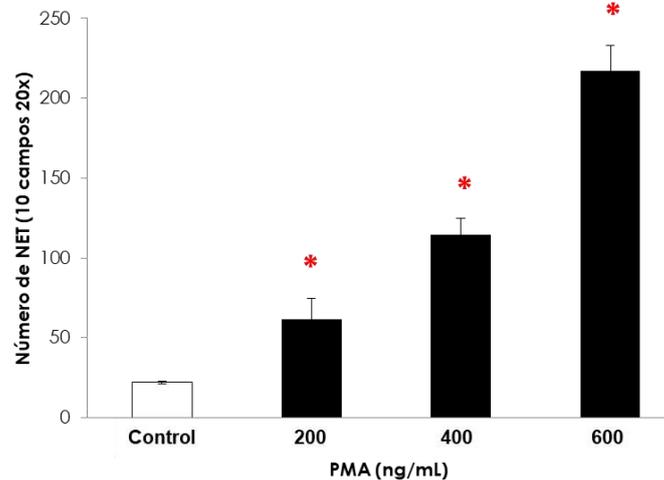


Anexo 2A: Curva de porcentajes de células fagocíticas a diferentes tiempos de incubación con perlas fluorescentes (relación célula-perla 1:20). Las células fueron incubadas a 4, 6, 12, 18 y 24 h. *: Diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de células fagocíticas de peces expuestos a DZN respecto al control ($p < 0.05$).



Anexo 2B: Gráfica representativa de la fluorescencia de DHR (A) y DHE (B). IMF de células sin teñir y producción de ROS (DHR o DHE indicativos de la producción basal de H_2O_2 y O_2^-) en células de peces grupo control, expuestos y control positivo. Se observa la fluorescencia basal de las células (gris), de células de grupo control (verde) y expuestos (naranja). Sumado a lo anterior, también se observa la fluorescencia de una muestra con peróxido de hidrógeno como control positivo (azul).

Anexo 3



Anexo 3A: Producción basal e inducida de trampas extracelulares de neutrófilos en peces incubados con PMA durante 3 horas. Se observa una curva formación de NETs en células estimuladas con diferentes dosis de PMA (200-600 ng/mL). En la que podemos observar que 200 ng/mL son suficientes para inducir significativamente la producción de NETs. ANOVA de una vía. *: Diferencia estadísticamente significativa en la formación de NETs en neutrófilos estimulados respecto al grupo control ($p < 0.05$).