

El sistema inmune como biomarcador de toxicidad por endosulfán en peces teleósteos y otros modelos de laboratorio

Martha Cecilia Téllez-Bañuelos, Anne Santerre-Lucas y Galina P. Zaitseva

Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Jalisco (México)
e-mail: ceciliat@prodigy.net.mx, zgalina@cucba.udg.mx

Resumen

El endosulfán es un plaguicida organoclorado ciclodieno. Se introdujo en el medio agrícola en 1956 y emergió como uno de los más importantes productos químicos usados para controlar una amplia variedad de insectos en la agricultura. Estas sustancias inevitablemente entran en contacto con los cuerpos de agua por escorrentía, afectando a la flora y fauna acuática. El uso de endosulfán está severamente restringido en Argentina, Brasil, Canadá, Holanda, Noruega y Gran Bretaña por sus efectos adversos al ambiente y para la salud de los organismos. El endosulfán se liga a los canales de cloro y bloquea su activación por el ácido gamma-aminobutírico (GABA), y esta ausencia de inhibición sináptica lleva a una hiperexcitación del sistema nervioso central (SNC). El sistema inmune se encarga de la defensa del organismo ante cualquier señal de peligro. El presente trabajo muestra el efecto del endosulfán sobre el sistema inmune en los peces teleósteos, así como en pequeños mamíferos y líneas celulares, lo que permite alertar de un impacto potencial sobre la salud humana y del ecosistema.

Palabras clave: sistema inmune, plaguicida, endosulfán, teleósteos

Summary

The immune system as a toxicity biomarker for endosulfan in teleost fish and other laboratory models

Endosulfan is a chlorinated hydrocarbon insecticide of the cyclodiene subgroup. It was introduced into agriculture in 1956 and emerged as one of the most important chemical products used to control a wide variety of insects. These substances unfortunately enter into contact with water bodies by runoff, affecting flora and aquatic fauna. Its use is severely restricted in Argentina, Brazil, Canada, the Netherlands, Norway and Great Britain due to its adverse effects on the environment and on the health of organisms. Endosulfan binds to chlorine channels and blocks activation by gamma-aminobutyric acid (GABA). In the absence of inhibitory synapses there is a hyperexcitation of the central nervous system (CNS). The immune system defends the organism from any danger signal. The present review describes its effect on the immune system in teleost fishes, as well as on small mammals and cell lines as a biomarker of exposure to pesticides, underlying its potential harmful impact on human and ecosystem health.

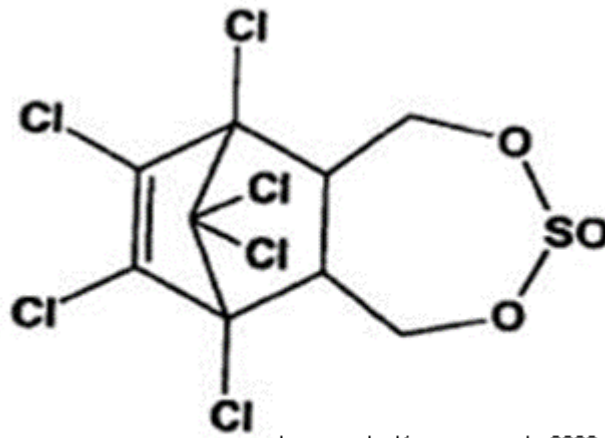
Key words: immune system, insecticide, endosulfan, teleosts

Introducción

Los plaguicidas son un importante tema de estudio para la inmunotoxicología moderna por su efecto inmunomodulador (Descotes y cols., 2000). Son sustancias diseñadas para el control de plagas agrícolas y de organismos dañinos a la salud pública (Stenersen, 2004). La utilización de los peces en estudios inmunotoxicológicos puede servir como alerta de un impacto potencial sobre la salud humana y los ecosistemas debido a que las sustancias contaminantes son frecuentemente liberadas a ambientes

acuáticos por una gran variedad de rutas; que finalmente pueden afectar a animales terrestres y al hombre (Rocha y cols., 2001; Harford y cols., 2005).

Figura 1. Formula química del Endosulfán.



El endosulfán

El endosulfán (6-7-8-9-10-10-hexacloro-1, 5, 5a, 6, 9a-hexahidro-6, 9 metano-2,4,3-benzodioxatiepín-3-óxido) es un insecticida organoclorado ciclodieno (Figura 1). Sus propiedades insecticidas fueron descritas por W. Finkenbrink en 1956 después de la II Guerra Mundial (Ware y cols., 2004), con un peso molecular de 406,95. Se desarrolló en Alemania por la compañía Hoechst y fue registrado en Estados Unidos en 1960. El producto técnico es mezcla de dos isómeros, alfa (endosulfán I) y beta (endosulfán II), en relación aproximada 70:30. (Hayes y cols., 1991). El endosulfán sulfato es el principal producto de degradación. Este es tan tóxico como la mezcla original pero más persistente (PANAP, 2006). El endosulfán se utiliza para el control de plagas en varios cultivos como té, café, frutas, arroz, maíz, sorgo y otros granos (EXTOXNET, 1996). Es una sustancia persistente. En el Valle Bajo Fraser de la Columbia Británica en Canadá se han encontrado residuos en suelo del plaguicida, aplicado hace 30 años (Wan y cols., 2005). Estas escorrentías entran en contacto con los cuerpos de agua y alteran la flora, la fauna acuática e inducen inmunotoxicidad sobre el sistema inmune de los peces. Así por ejemplo se ha observado endosulfán en linfocitos de riñón anterior de peces dulceacuicolas australianos con diferente peso corporal, tales como perca plateada (<10 g), pez arcoíris de Australia (5-10 g), perca dorada (150-200 g) y bacalao Murray (150-200 g) expuestos a 10 mg/L a endosulfán por 18, 20, 22 y 48 h respectivamente. Se reportó que el plaguicida induce una polaridad en las células FITC+ que va desde una inmunosupresión en peces de bajo peso hasta la inmunoestimulación en peces con mayor peso corporal (Harford y cols., 2005).

Mecanismo de acción del endosulfán

El endosulfán se une al sitio de reconocimiento de la picrotoxina (PTX) ubicado en el canal de Cl⁻ acoplado al receptor de GABA (ácido gamma amino butírico) en las neuronas, lo que determina una interrupción del flujo de Cl⁻ dependiente de GABA, bloquea el paso del anión a través del canal iónico asociado a este receptor lo que lleva a una hiperexcitación neuronal. La acción de los plaguicidas en los insectos es

justamente causar hiperexcitabilidad del sistema nervioso central (SNC) hasta la muerte (Casida y cols., 2004; Stenersen, 2004; Alam y cols., 2006).

Los linfocitos, macrófagos y células citotóxicas no específicas (NCC) que son consideradas precursores evolutivos de las células NK (Jaso-Friedmann y cols., 2001), poseen canales Cl⁻ acoplados al receptor de GABA (Praveen y cols., 2006). Además se ha reportado en macrófagos peritoneales de ratón la participación del sistema GABAérgico en la síntesis de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-12) (Reyes-García y cols., 2007). Se ha reportado que el endosulfán altera parámetros funcionales y estructurales en células inmunocompetentes e.g. en linfocitos T de *Rana pipiens* canadiense una exposición de 21 días a una mezcla de plaguicidas donde se incluye el endosulfán- con dosis 0,1, 10 y 100X, se observó una disminución significativa en la proliferación (Christin y cols., 2004) y en linfocitos de riñón anterior de peces dulceacuícolas australianos con diferente peso corporal expuestos a 10 mg/L, el endosulfán induce una polaridad en el conteo de linfocitos que va desde una inmunosupresión hasta la inmunoestimulación (Harford y cols., 2005).

Toxicidad del endosulfán en peces

El endosulfán es muy tóxico para peces. Su toxicidad para varias especies de agua dulce varía entre 0,2 y 8,1 µg/L y para peces de agua salada está en el rango de 0,3 a 2,9 µg/L (García-Camberos y Soler Rodríguez, 2005) (Tabla 1). Se ha reportado en fauna silvestre la CL50 es de 0,56 µg/L en bangus (Magesh y cols., 2006), de 1,2-1,5 µg/L en trucha arcoiris y siluros, de 1,42 µg/L para crías de peso y talla 3,2-11,0 g / 5,0- 9,0 cm respectivamente para tilapia (Pesticide Action Network, 2004).

Tabla 1. Clasificación de la toxicidad de pesticidas en peces crustáceos y algas.

Toxicidad	CL ₅₀ (mg/mL)
Extrema	<1
Alta	1-10
Mediana	10-100
Ligera	>100

Toxicocinética del endosulfán en peces

La ingestión de pesticidas ocurre por vía digestiva y la absorción a través de las branquias. La piel es otro órgano de absorción, pero ésta participa de forma mucho menos importante.

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

Los peces eliminan sus residuos a través de orina, secreciones (como el mucus) o a través de branquias en su proceso ventilatorio. Un factor muy importante en la eliminación es la polaridad del compuesto, cuanto más polar sea el compuesto, mayor y más fácil eliminación, se sabe que el orden de eliminación sería lindano > dieldrin >

DDT > endosulfán (García-Camero y Soler Rodríguez, 2005) queda el endosulfán en el último orden de eliminación por ser el plaguicida más polar del grupo.

En ratones Balb/c la vía de excreción después de una dosis única de 0,3 mg de endosulfán es en un 65% por heces fecales seguido por grasa en vísceras > orina > intestino delgado > riñón > cerebro > sangre (McGregor, 1998).

El sistema inmune de peces como biomarcador de contaminación

El sistema inmune de los peces es, en término general, muy similar y comparable al de los vertebrados superiores. La notable diferencia con los vertebrados superiores es que carecen de nódulos linfáticos, amígdalas. Cuenta con la presencia de riñón anterior análogo a la médula ósea de vertebrados superiores y con una tetramérica inmunoglobulinas IgM (Olabuenaga, 2000; Fernández y cols., 2002; Ruiz y cols., 2003; Dominguez y cols., 2004). De igual forma en los dos grupos de vertebrados la inmunidad innata como la específica cooperan en el mantenimiento de la homeostasis (Magnadóttir, 2006).

La respuesta inmune innata en peces óseos se encuentra altamente desarrollada (Watts y cols., 2001), y ofrece varias ventajas como un recurso de bioindicador. Un "bioindicador" se define como una variación en los procesos o funciones celulares y bioquímicas que se induce por xenobióticos y que son medibles en una muestra o en un sistema biológico; e. g. la actividad fagocítica y el estallido respiratorio en macrófagos son funciones sensibles en varias especies de peces a una variedad de contaminantes donde se incluyen los pesticidas (Rice y cols., 1996). Mientras que el biomarcador permite inferir exposición y mide los efectos biológicos desfavorables (Wester y cols., 1994; Bols y cols., 2001).

Efecto del endosulfán en biomarcadores inmunológicos inespecíficos en modelos de laboratorio

Los indicadores inespecíficos (Romano, 1999) se definen como aquellos parámetros que brindan información sobre el estado macroscópico, microscópico y celular de los órganos que participan en los mecanismos de defensa. Estudios realizados por Dunier y cols. (1993) reportaron que el endosulfán reduce el peso relativo del bazo en trucha de los lagos y salmón a 0,36 µg/L por 25 días. Por su parte Abadin y cols. (2007) expusieron ratas Wistar a 20 µg/L de endosulfán por 22 semanas obteniendo el mismo resultado. También Banerjee y cols. (1986) en sus experimentos muestran como el endosulfán en dosis crónicas disminuye significativamente el peso del bazo. Sugerimos que el efecto del endosulfán sobre este parámetro implica dependencia de tiempo más que de la dosis.

Respecto a la concentración de esplenocitos Christin y cols. (2004) muestran en un estudio *in vivo* con el anfibio *Xenopus laevis* expuesto a una mezcla de pesticidas (donde se incluye el endosulfán con dosis 1X de 0,02 ng/L), bajo una exposición aguda a una concentración 100X disminuye la celularidad del bazo, mientras que para una exposición subcrónica es suficiente una concentración 10X para provocar la reducción de este parámetro. Por su parte Antherieu y cols. (2007) demostraron *in vitro* en queratinocitos HaCaT, que la exposición crónica a 50 µM a endosulfán inhibe el crecimiento celular y sugieren que esta respuesta se debe a una disminución en la expresión de las ciclinas A, B1 y D1. Su efecto podría ser citotóxico a las concentraciones altas y exposición prolongada.

En la viabilidad celular Dorval y cols. (2003) reportaron que no se presentan cambios en células de riñón anterior de trucha arcoíris juvenil (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas *in vitro* a 1×10^{-5} M de endosulfán. Sin embargo, Christin y cols. (2004) evidenciaron *in vivo* que los esplenocitos de *X. laevis* expuestos a un cóctel de plaguicidas con una concentración 100X muestran una mortalidad del 20% a los 7 días. Para Kannan y cols. (2000) el endosulfán en células Jurkat induce apoptosis en un 90% a una concentración 50 μ M por 48 h, sugiriendo una asociación dependiente de la excesiva producción de ROS.

Con los informes presentados, se evidencia que la viabilidad celular está influenciada por concentración y tiempo de exposición al plaguicida.

El efecto del endosulfán en biomarcadores inmunológicos inespecíficos detectados con y sin estimulación de antígenos en modelos de laboratorio

Estudios realizados por Christin y cols. (2004) reportan en esplenocitos de *X. laevis* que el endosulfán (21 días de exposición) incrementa la actividad fagocítica en concentraciones 1X, 10X, y 100X, así como con Harford y cols. (2005) quienes observaron un incremento significativo de células FITC⁺ de células de riñón anterior de perca dorada y de bacalao Murray expuestas *in vitro* a 10 mg/L de endosulfán.

Estos hallazgos se correlacionan con los datos de Dorval y cols. (2003) quienes reportaron que una concentración 1×10^{-4} M de endosulfán inhibe la secreción de cortisol, hormona reguladora de la síntesis de citoquinas proinflamatorias y de la actividad fagocítica. Este dato se asocia con la investigación de Han y cols. (2007), quienes trabajando con macrófagos peritoneales de ratón expuestos a endosulfán a concentraciones 1,5 y 10 μ M, observaron un incremento de la síntesis de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α) vinculando este hecho con la activación del factor de transcripción NF- κ B. Lo anterior nos lleva a sugerir que el endosulfán en una exposición aguda y subcrónica, *in vivo* como *in vitro* es un estimulante de la actividad fagocítica.

Por su parte Ledirac y cols. (2005) en un estudio *in vitro*, en el que utilizaron queratinocitos HaCaT expuestos a endosulfán reportan un incremento en la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) dosis dependiente. Cuando las ROS interaccionan con la membranas celulares, se producen alteraciones como la lipoperoxidación (LPO). La LPO es una manifestación de estrés oxidativo debido a la pérdida del equilibrio fisiológico entre el sistema de oxidación y el sistema de protección antioxidantes. Así Dorval y cols. (2003) reportaron en células de riñón anterior de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) expuestas a concentraciones 1×10^{-7} , 1×10^{-6} y 1×10^{-4} M a endosulfán, un incremento de lipoperóxidos del 110, 118 y 109% respectivamente, lo que indujo un daño al tejido adrenocortical y sugieren que se debe a una disminución de la actividad enzimática antioxidante. También reportan como el endosulfán produce un efecto polarizante en la enzima antioxidante catalasa (CAT) (a bajas concentraciones incrementa y a altas concentraciones disminuye la actividad de la enzima) mientras que para la enzima glutatión peroxidasa (GPx) se reduce la función significativamente.

En una recopilación de resultados podemos señalar que el endosulfán es un plaguicida que a bajas dosis y cortos tiempos de exposición intensifica la actividad fagocítica en esplenocitos, lo que a su vez conduce a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y a un significativo incremento de (LPO), evidenciando estrés oxidativo.

Mecanismo hipotético de la alteración de la respuesta inmune por endosulfán

Podemos sugerir que este efecto se debe a una cascada de eventos que comienza con la activación del macrófago por la alteración del flujo de iones de cloro y, como consecuente de calcio, lo que activa el factor de transcripción NF- κ B, incrementando la síntesis de citoquinas proinflamatorias y los niveles de ROS. Así mismo se mostró que el endosulfán disminuye la actividad de enzimas antioxidantes y la secreción de cortisol. Lo que a su vez, incrementa la síntesis de citoquinas proinflamatorias y activación de macrófagos a través de retroalimentación positiva provocando un daño por el estrés oxidativo, observado por el incremento de los niveles de LPO (Betoulle y cols., 2000; Shiibashi y cols., 2001; Dorval y cols., 2003; Ledirac y cols., 2005; Antherieu y cols., 2007; Han y cols., 2007; Reyes-García y cols., 2007).

Por su parte Wade y cols. (2002) reportaron un efecto bifásico en la actividad de las células NK en ratas Sprague-Dawley cuando se administró una dosis oral de un cóctel de contaminantes donde se incluye al endosulfán (contaminantes reportados persistentes en el ambiente y cuantificados en tejidos reproductivos de pobladores de Canadá), bajo una exposición crónica (70 días). A dosis bajas (1X) se incrementó de la actividad lítica y a dosis altas (1000X) disminuyó significativamente su función.

Los resultados presentados aquí no se consideran exclusivos para modelos de estudio de laboratorio, sería pertinente estudiar la implicación del endosulfán en habitantes expuestos a este plaguicida por su trabajo, aquellos que viven en áreas agrícolas o por consumo de alimentos contaminados. Hoy en día existe información abundante sobre enfermedades asociadas al incremento de especies reactivas de oxígeno y a estados de inflamación crónica que llevan a enfermedades autoinmunes como Alzheimer, Parkinson y Diabetes. En humanos un incremento anormal de ROS se ha involucrado en padecimiento degenerativos severos (Hernández-Flores, 2003; Migliore y cols., 2002; Dalle-Donne y cols., 2006). Por lo que consideramos al endosulfán en dosis o concentraciones tanto bajas como altas con diferentes tiempos de exposición como un factor de riesgo para la salud.

El endosulfán, es un plaguicida organoclorado de uso permitido en México (INE, 2005). Severamente restringido en Argentina, Brasil, Canadá, Holanda, Noruega así como en Gran Bretaña por su persistencia y potencial de transporte a larga distancia en el ambiente, bioacumulación y efectos biológicos adversos. La Unión Europea solicitó la incorporación de este plaguicida a los compuestos orgánicos persistentes (COPs) (UNEP, 2007). Por lo que sugerimos ante las evidencias mostradas considerar las modificaciones legales que sean necesarias en aquellos países que actualmente lo utilizan.

Bibliografía

1. Abadin, H.G., CH. Chou, F.T. Lladós (2007). Health effects classification and its role in the derivation of minimal risk levels: immunological effects. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 47(3): 249-56.
2. Alam, S, D.L. Laughton, A. Walding, A.J. Wolstenholme (2006). Human peripheral blood mononuclear cells express GABAA receptor subunits. *Mol. Immunol.*, 43(9): 1432-42.
3. Antherieu, S. N. Ledirac, A.P. Luzy, P. Lenormand, J.C. Caron, R. Rahmani (2007). Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. *J. Cell Physiol.*, 213(1): 177-86.

4. Banerjee, B.D., Q.Z. Hussain (1986). Effect of sub-chronic endosulfan exposure on humoral and cell-mediated immune responses in albino rats. *Arch. Toxicol.*, 59(4): 279-84.
5. Betoulle, S. C. Duchiron, P. Deschaux (2000). Lindane increases in vitro respiratory burst activity and intracellular calcium levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) head kidney phagocytes. *Aquat. Toxicol.*, 48(2-3): 211-221.
6. Bols, N.C. J.L. Brubacher, R.C. Ganassin, L.E. Lee (2001). Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, 25(8-9): 853-73.
7. Casida, J.E., G.B. Quitad (2004). Why insecticides are more toxic to insects than people; The unique toxicology of insects. *J. Pestic.Sci.*, 29: 81-86.
8. Christin, M.S. L. Ménard , A.D. Gendron , S. Ruby , D. Cyr , D.J. Marcogliese , L. Rollins-Smith, M. Fournier (2004). Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquat. Toxicol.*, 67(1): 33-43.
9. Dalle-Donne, I. R. Rossi , R. Colombo, D. Giustarini, A. Milzani (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.*, 52(4): 601-23.
10. Descotes, J. G. Choquet-Kastylevsky , E. Van Ganse, T. Vial (2000). Responses of the immune system to injury. *Toxicol. Pathol.*, 28(3): 479-81.
11. Dominguez, M., T. A., M.Tsuchiya, Nakamura Shigeo (2004). Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 241: 491-500.
12. Dorval, J., V.S. Leblond, A. Hontela (2003). Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vitro* to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquat. Toxicol.*, 63(3): 229-41.
13. Dunier, M., A.K. Siwicki (1993). Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish: a review. *Fish & Shellfish Immunology*, 3: 423-438.
14. EXTOWNET (1996). Endosulfan. Extension Toxicology Network. En: <http://extownet.orst.edu/pips/endosulf.htm>
15. Fernández AB, de Blas I, Ruiz I. El sistema inmune de los teleosteos (I): Células y órganos. *Revista AquaTIC*, nº 16, Abril 2002. En URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=146>.
16. García-Camberos J.P., F.Soler Rodríguez (2005). *Los plaguicidas organoclorados y sus implicaciones en el medio ambiente acuático*. Universidad de Extremadura. España. 65-73
17. Han, E. H., Y. P. Hwang, H. G. Kim, H. G. Jeong (2007). Inflammatory effect of endosulfan via NF-kappaB activation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355(4): 860-5.
18. Harford, A. J., K. O'Halloran, P. F.Wright (2005). The effects of in vitro pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aquat. Toxicol.*, 75(4): 330-42.
19. Hayes, W.J., E. R. Laws (1991). Handbook of pesticide toxicology. Vol. 2. Academic Press, San Diego, CA.
20. Hernández- Flores, G. (2003). *Efecto de la radiación gamma en la apoptosis de macrófagos peritoneales murinos*. En: Tesis de Doctorado en Inmunología. Universidad de Guadalajara y Centro de Investigaciones Biomédicas de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara Jalisco, México. 1-140.
21. Instituto Nacional de Ecología (2005). Fuentes de contaminación en México. Agroquímicos. En: <http://www.ine.gob.mx>
22. Jaso-Friedmann, L. J. H. Leary, 3rd D. L. Evans, Jaso-Friedmann, L., J. H. (2001). The non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP-1): molecular organization and signaling properties. *Dev Comp Immunol.*, 25(8-9): 701-11.
23. Kannan, K., R. F. Holcombe, S. K.Jain, X. Alvarez-Hernandez, R. Chervenak, R. E. Wolf, J.Glass (2000). Evidence for the induction of apoptosis by endosulfan in a human T-cell leukemic line. *Mol. Cell Biochem.*, 205(1-2): 53-66.
24. Ledirac, N., S. Antherieu, A. D. d'Uby, J. C.Caron, R.Rahmani (2005). Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species. *Toxicol. Sci.*, 86(2): 444-52.

25. Magesh, S., A. K. Kumaraguru (2006). Acute toxicity of endosulfan to the milkfish, *Chanos chanos*, of the Southeast Coast of India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 76(4): 622-8.
26. Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (revisión). *Fish Shellfish Immunol.*, 20(2): 137-51.
27. McGregor, D. B. (1998). ENDOSULFAN. JMPR International Agency for Research on Cancer Lyon, France. En: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v075pr20.htm>
28. Migliore, L., L. Petrozzi, C. Lucetti, G. Gambaccini, S. Bernardini, R. Scarpato, F. Trippi, R. Barale, G. Frenzilli, V. Rodilla, U. Bonuccelli (2002). Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurology*, 58(12): 1809-15.
29. Olabuenaga, Susana E. Sistema Inmune en Peces. *Gayana (Concepto)*. [online]. 2000, vol.64, no.2 [citado 07 Junio 2008], p.205-215. En la World Wide Web: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071765382000000200010&lng=es&nrm=iso. ISSN 0717-6538.
30. Pesticide Action Network (2004). PAN Pesticides Database - Chemical Toxicity Studies on Aquatic Organisms. En: <http://www.pesticideinfo.org>
31. Praveen, K., J. H. Leary, 3rd D. L. Evans, L. Jaso-Friedmann (2006). Molecular characterization and expression of a granzyme of an ectothermic vertebrate with chymase-like activity expressed in the cytotoxic cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Immunogenetics*, 58(1): 41-55.
32. Reyes-García, M. G., F. Hernández-Hernández, B. Hernández-Tellez, F. García-Tamayo (2007). GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulates their IL-6/IL-12 production. *J. Neuroimmunol.*, 188(1-2): 64-8.
33. Rice, C.D., D. H. Kergosien, S. M. Adams (1996) Innate Immune Function as a Bioindicator of Pollution Stress in Fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 33: 186-192
34. Rocha A², Ruiz S², Estepa A¹, Coll JM². Biología molecular de los peces: Interés y aplicaciones. *Revista AquaTIC*, nº 15: 1-10, Noviembre 2001. En URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=129>.
35. Romano, L. A. Bioindicadores de Contaminación Acuática en Peces. *Revista AquaTIC*, nº 7, Junio 1999. En URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=67>
36. Ruiz I, Fernández AB, de Blas I. El sistema inmune de los teleósteos (III): Respuesta inmune específica. *Revista AquaTIC*, nº 18: 33-38. Enero-Junio 2003. En URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=p&c=162>
37. Shiibashi, T., T. Iida (2001). NADPH and NADH serve as electron donor for the superoxide-generating enzyme in tilapia (*Oreochromis niloticus*) neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.*, 25(5-6): 461-5.
38. Srikanth, N. S., P. K. Seth (1990). Alterations in xenobiotic metabolizing enzymes in brain and liver of rats coexposed to endosulfan and malathion. *J Appl Toxicol* 10(3): 157-60.
39. Stenersen, J. (2004). Chemical Pesticides Mode of action and toxicology. CRC Press LLC. USA. 10-16.
40. UNEP (2007). Propuesta sobre el Endosulfán. Convenio de Estocolmo. UNEP/POPS/POPRC.3/5. http://www.pops.int/documents/meetings/poprc/chem_review/Endosulfan/Endosulfan_Proposal_s.pdf.
41. Wade, M. G., W. G. Foster, E. V. Younglai, A. McMahon, K. Leingartner, A. Yagminas, D. Blakey, M. Fournier, D. Desaulniers, C. L. Hughes (2002). Effects of subchronic exposure to a complex mixture of persistent contaminants in male rats: systemic, immune, and reproductive effects. *Toxicol. Sci.*, 67(1): 131-43.
42. Wan, M. T., J. N. Kuo, J. Pasternak (2005). Residues of endosulfan and other selected organochlorine pesticides in farm areas of the Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *J. Environ. Qual.*, 34(4): 1186-93.
43. Ware, G. W., D. M. Whitacre (2004). An Introduction to Insecticides. Extraído de *The Pesticide Book*, 6th ed. En: MeisterPro Information Resources. Una división de Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio. USA
44. Watts, M., B. L. Munday, C. M. Burke (2001). Immune responses of teleost fish. *Aust. Vet. J.*, 79(8): 570-4.

45. Wester, P. W., A. D. Vethaak, W. B. van Muiswinkel (1994). Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology*, 86(3): 213-32.
46. PANAP (Pesticide Action Network Asia & The Pacific) (2006). Position Paper on Endosulfan. En: http://www.panap.net/sites/default/files/PAN_AP_Endosulfan_Position_July_06.pdf