

ISSN: 1988-2688<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>*Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2010 4(1): 1-22*

**EFFECTO DE LOS HERBICIDAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE: UNA
APROXIMACIÓN EN PECES
EFFECTS OF HERBICIDES ON IMMUNE SYSTEM: AN APPROACH TO FISH**

Rondón-Barragán IS. *, Pardo-Hernández D. y Eslava-Mocha PR.

Grupo de Investigación en Sanidad de Organismos Acuáticos, IALL. *Universidad del Tolima, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – Departamento de Sanidad Animal
Email: iangrondon@gmail.com.

RESUMEN

La exposición a compuestos xenobióticos, incluyendo herbicidas, en ambientes naturales, principalmente por prácticas agrícolas, ha llevado a cuestionar el impacto de estas prácticas sobre los organismos vivos. Se han demostrado efectos deletéreos de tal exposición en animales, tanto terrestres como acuáticos, siendo estos últimos los más afectados, pues actúan en muchos casos como receptores finales, por lixiviación, escorrentía o por aspersión directa de productos agroquímicos. Existen pocos trabajos que sustenten la inocuidad de los herbicidas para organismos acuáticos, específicamente peces y hay evidencia de inmunomodulación por diversos compuestos derivados de los compuestos xenobióticos. El objetivo del presente artículo es revisar y discutir posibles mecanismos de acción de los herbicidas en relación con alteraciones de la función inmune, así como enfatizar la importancia de los estudios en peces sobre el particular.

Palabras clave: Inmunomodulación, peces, respuesta inmune, xenobióticos

ABSTRACT

Exposure to xenobiotics, including herbicides, in natural environments, mainly by agricultural practices has brought to question about the impact of these practices on live organism. Thus, deleterious effects of these exposures to animals, both terrestrial and aquatic have been proved, being the last one the most affected, since they function in some cases as final receptors, by lixiviation, run-off, or direct spray of agrochemical products. Still when,

there are a few studies that support the innocuousness of herbicides to aquatic organisms, specifically fish, there is evidence of immunomodulation by diverse derivatives compounds of them. The objective of the current article is to discuss about the possible mechanisms of action of herbicides related with alteration of immune function, as well as to emphasize the importance application of these studies in fish.

Keywords: Immunomodulation, fish, immune response, xenobiotics

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es capaz de modular y generar respuestas celulares o humorales frente a los factores medioambientales, principalmente agentes potencialmente lesivos así como a fenómenos propios del cuerpo como la eliminación de células senescentes, procesos autoinmunes o neoplásicos. En diferentes estudios se ha planteado el efecto de los compuestos xenobióticos tales como los herbicidas sobre el sistema respiratorio, digestivo, nervioso (Ramírez-Duarte *et al.*, 2008; Eslava *et al.*, 2007) reproductor, endocrino (Gould *et al.*, 1999; Fielden *et al.*, 2001) incluyendo el desarrollo embrionario (Scheil *et al.*, 2009).

En la literatura se describen efectos de herbicidas en sistemas orgánicos como el respiratorio y el tegumentario en peces; sin embargo, los estudios acerca del efecto de tales productos en el sistema inmune y sistema nervioso de animales acuáticos son tan escasos como necesarios. La alteración de la dinámica y el equilibrio de la respuesta inmune podría estar generando efectos importantes sobre la capacidad del pez para sobrevivir en el medio. Además, algunas alteraciones metabólicas y enzimáticas (incremento en los niveles de glucosa, función colinesterasa), así como alteraciones en la diferenciación de las células del sistema inmune, pueden estar mediadas por cambios cuantitativos y cualitativos en las proteínas fosforiladas, que pueden afectar las funciones básicas tanto del sistema inmune como del nervioso (Luster *et al.*, 1989). El objetivo de la presente revisión es contextualizar la problemática de las interacciones de herbicidas con el sistema inmune y sus posibles efectos sobre el sistema neuroendocrino.

Los herbicidas se clasifican según su acción fitotóxica sobre las malas hierbas (según la clasificación de la HARC – Comité de Acción de Resistencia a Herbicidas, 2002). Si los diferentes grupos de herbicidas comparten el mismo modo de acción sólo se utiliza una letra; así por ejemplo, los compuestos inhibidores de la fotosíntesis mediante la interferencia del

transporte de electrones en el Fotosistema II, se denominan con la letra C y las subclases C₁ (e.g. atrazina, prometrina, simazina), C₂ (e.g. diuron, propanil, metoxuron) y C₃ (e.g. piridato, bentazon, ioxinil) indican diferente acción en el sitio de unión (proteína D1). Los herbicidas con modos de acción desconocidos son clasificados en el grupo Z (e.g. difenzoquat) hasta que sean agrupados exactamente. Para una revisión completa de la clasificación se sugiere revisar Schmidt (1997).

Herbicidas y sistema inmune

El sistema inmune es sensible a los compuestos xenobióticos y reacciona más rápidamente que cualquier otro sistema, incluso a concentraciones más bajas que las requeridas para generar una respuesta tóxica sistémica aguda (Salazar-Lugo *et al.*, 2009), por lo que sus componentes son candidatos para ser utilizados como biomarcadores en estudios de inmunotoxicología.

Uno de los principales problemas asociados a la exposición a compuestos xenobióticos es la inmunosupresión, que puede favorecer el desarrollo y crecimiento de células tumorales (Studnicka *et al.*, 2000), así como el desarrollo de enfermedades. Cabassi (2007) describe que los efectos inmunosupresores asociados a los organofosforados, así como a los carbamatos, están ligados al efecto inhibitorio que poseen estos en serina-proteasas, enzimas de vital importancia en la función inmune para la activación de la cascada del complemento y como esterasas de membrana en las células mononucleares. De la misma manera, la exposición a compuestos organoclorados (aldrin, dieldrin, DDT, etc.) induce efectos inmunosupresores tanto a nivel celular como humoral, reduciendo los niveles de inmunoglobulinas, la quimiotaxis de macrófagos y la fagocitosis.

Frente a estos efectos inmunosupresores, se han propuesto mecanismos tales como: a) Interacción negativa con la prolactina y la tiroxina, las cuales son hormonas moduladoras de la respuesta inmune. b) Propiedades mielotóxicas de ciertos ácidos fenocarboxílicos, lo cual alteraría la capacidad de diferenciación de linfocitos en la médula ósea (Cabassi, 2007); de manera similar, la exposición a atrazina disminuye la capacidad de maduración mielóide/linfóide (Pinchuk *et al.* 2007). c) Disminución de la actividad metabólica de los fagocitos, aunado a una linfopenia y neutrofilia (e.g. en exposición a Cloridazona, diclofuanol, endosulfan, simazine y trialato) (Pistl *et al.*, 2002; Pistl *et al.*, 2003) así como disminución en la viabilidad celular de monocitos (e.g. en exposición a glifosato y

surfactantes acompañantes) (Martínez *et al.*, 2007), inhibición de la proliferación de las células mononucleares - monocitos (*e.g.* exposición a metil-paration)(Lima & Vega (2005), células NK y macrófagos (*e.g.* exposición a propanil) (McClure *et al.*, 2001; Sheil *et al.*, 2006). En este último caso se evidencia alteración en el proceso de presentación de antígenos. Y por último, d) Incremento en la expresión de aberraciones cromosómicas (intercambio de cromátides hermanas), acompañada de inhibición del ciclo celular, lo cual altera su inmunocompetencia (Šivikova & Dianovský, 2006). Esto último ya se había descrito por otros autores (Marc *et al.*, 2004a; Marc *et al.*, 2004b; Marc *et al.*, 2003; Marc *et al.*, 2002).

Herbicidas y organismos acuáticos

La inclusión de compuestos xenobióticos en los sistemas acuáticos es una consecuencia no sólo de la aspersión directa sobre cuerpos de agua, sino también productos de la lixiviación y escorrentía, bien sea en sistemas agrícolas como en producciones pecuarias. La exposición a herbicidas a niveles por debajo de las concentraciones ambientales esperadas se ha demostrado que compromete la supervivencia, reproducción y desarrollo del zooplancton, así como de algunos anfibios; dicho efecto está relacionado con un bajo nivel de pH en el agua (Chen *et al.*, 2008). Existen diversos estudios que describen los efectos de los herbicidas sobre ecosistemas acuáticos incluyendo los peces. Elandalousi *et al.* (2008) evidenciaron que la exposición de almejas *Ruditapes decussatus* a glifosato (grado técnico) y Roundup® (producto comercial a base de glifosato), redujo la supervivencia frente a un desafío con el protozoario *Perkinsus olseni*. Los efectos fueron mayores en la exposición al Roundup® ante lo cual los autores argumentaron un efecto más tóxico debido al surfactante. Sun y Ye (2009) demostraron que los surfactantes, los cuales son adicionados a las mezclas de herbicidas, incrementan la susceptibilidad a los patógenos en el camarón de agua dulce (*Macrobrachium rosenbergii*), y esta susceptibilidad es causada por una inhibición en la transcripción de genes, relacionados con la respuesta inmune, como fue demostrado por la inhibición de algunos de estos genes.

Kiesecker (2002) demostró (*in vivo*) que la exposición de sapos de bosque (*Rana sylvatica*) a pesticidas y herbicidas induce estados inmunosupresivos, haciéndolos más susceptibles a la infestación con parásitos trematodos, los cuales causan deformidades en las extremidades. Así mismo, en Rana Leopardo (*Rana pipiens*, expuesta *in vivo* a bajas concentraciones de atrazina (herbicida) se ha demostrado el desarrollo de oocitos testiculares (hermafroditismo; a 0,1 ppb), así como una disminución en el contenido de células

germinales, posiblemente debido a desmasculinización de las gónadas (fallo en la inducción de espermatogénesis) (Hayes *et al.*, 2003).

Efecto sobre peces

Aun cuando existen trabajos y diversas aproximaciones para evaluar el papel de los compuestos xenobióticos en peces (Shim *et al.*, 2002), son pocos los trabajos que valoran específicamente el impacto de los herbicidas sobre la respuesta inmune. En Colombia en particular, donde las prácticas de aspersión con herbicidas son de uso común en el control de plagas, cultivos tradicionales y para procesos de maduración de caña y otros cultivos, así como para el control de cultivos de coca y amapola, fuentes para producción de drogas ilícitas, los estudios son escasos, estableciéndose la necesidad de profundizar en los efectos de este uso sobre los ecosistemas.

Efectos sobre órganos y células

Segnini *et al.*, (2005) estudiaron el efecto de la exposición a dosis de aspersión del herbicida 2-cloro, 4,6-bis-etilamina-s-triazina (2,5 ppm) en mojarra amarilla (*Caquetaia kraussii*) y cachama negra (*Colossoma macropomum*). En *C. kraussii* expuestas se evidenciaron lesiones renales caracterizadas por abundantes estructuras vesiculares, interrupción y pérdida de la membrana basal, tumefacción de la membrana nuclear, estructuras similares a mielina, vacuolas autofágicas y alta densidad electrónica de las microvellosidades, sugiriendo una alta actividad metabólica. Por otra parte, en *Colossoma macropomum* las lesiones renales se caracterizaron por vacuolización citoplasmática de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales e incremento en las vacuolas autofágicas, inducidas por la exposición al herbicida. Así mismo, Gómez *et al.* (1998) demostraron que la exposición de la tenca (*Tinca tinca*) al herbicida 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) generó lesión en la porción hematopoyética del riñón, en la cual se vieron afectados los neutrófilos, con alteraciones específicas en los gránulos, así como la formación de figuras similares a mielina.

En cachama blanca (*Piaractus brachipomus*) Ramírez-Duarte *et al.*, (2008); Eslava *et al.*, (2007) y Rondón *et al.*, (2007) han demostrado lesiones hepáticas tales como cambios grasos degenerativos y granulaciones hialinas y eosinofílicas de los hepatocitos, post-exposición a Roundup® (glifosato). Dichas lesiones comprometen el funcionamiento del órgano y disminuyen la síntesis proteica incluyendo las proteínas de fase aguda, necesarias

para una respuesta inmune. Dicho hallazgo concuerda con lo descrito por otros autores (Szarek *et al.*, 2000; Gluszczak *et al.*, 2007). Por otro lado, Gluszczak *et al.* (2007) demostraron en el bagre sur americano (*Rhamdia quelen*) expuesto al glifosato, un incremento en el glicógeno, lactato, proteína hepática y amonio y además una disminución en el contenido de glucosa en el hígado. En el músculo, a excepción de la proteína y el glicógeno, los demás valores fueron elevados comparados con el grupo control. Por lo tanto fue evidente el daño oxidativo en el cerebro e hígado.

Fatima *et al.* (2007) demostraron que una mezcla de herbicidas, probada en peces, genera un bloqueo del sistema de defensa antioxidante enzimático, causando daño celular y estrés oxidativo, lo cual interfiere con la actividad fagocítica y la actividad lisosómica, generando inmunosupresión. Por otra parte, Rice *et al.* (1996) describieron que la capacidad de respuesta inmune en los peces se ve afectada negativamente tras la exposición a diferentes pesticidas y herbicidas, incluyendo metales.

Studnicka *et al.* (2000) encontraron que la inyección intraperitoneal de lindano en carpa común (*Cyprinus carpio*), después de la inmunización con bacterina de *Yersinia ruckeri* y estimuladas con lisozima dimerizada, disminuyó los niveles de anticuerpos en plasma y de células productoras de anticuerpos.

Algunas de las alteraciones inducidas por compuestos xenobióticos en la respuesta inmune innata de los peces, principalmente en procesos oxidativos (*e.g.* explosión respiratoria), pueden presentarse por eventos de membrana, incluyendo activación de la proteína G, activación de la fosfolipasa y de la NADPH-oxidasa y mieloperoxidasa (Rice *et al.*, 1996). Recientemente, Salazar-Lugo *et al.*, (2009) demostraron que el tabaqui o cachama negra (*Colossoma macropomum*) expuestos a Paraquat[®], evidencia una disminución significativa en la capacidad bactericida de los leucocitos, así como una disminución en la concentración de leucocitos circulantes, principalmente neutrófilos.

Silveira *et al.* (2007) demostraron que el estrés oxidativo generado por agua contaminada con herbicida, puede suprimir la actividad de defensa antioxidante (*e.g.* catalasa), debido al daño oxidativo y a la pérdida de mecanismos compensatorios.

Efecto sobre citoquinas

Las citoquinas son moléculas mediadoras celulares involucradas en la modulación de la respuesta inmune, activación y diferenciación celular, así como en la quimiotaxis (Tizard, 2009). La exposición a herbicidas inhibe la liberación de calcio de los macrófagos, sugiriendo que se interfiere directamente la función normal del IP₃ (inositol trifosfato). El fallo en dicha liberación altera los procesos intracelulares dependientes de calcio, incluyendo la producción de citoquinas (Xie *et al.*, 1997). Estudios realizados por Hooghe *et al.* (2000) demostraron que la exposición *in vitro* a atrazina induce una síntesis disminuida de algunas citoquinas (Interferón (IFN)- γ , interleucina (IL)-5, Factor de necrosis tumoral (TNF)- α). De la misma manera, un estudio hecho por Corsini *et al.* (2007) demostró que la exposición *in vitro* e *in vivo* a propanil, es capaz de alterar la síntesis de citoquinas, produciendo un incremento en los niveles plasmáticos de IgG₁, IL-6 y TNF- α , así como una disminución dependiente de la dosis de la producción de IFN inducidos por fitohemaglutinina tanto en células CD4⁺ como CD8⁺ y la producción de IL-10 en células CD4⁺. Así mismo, trabajos de Xie *et al.* (1997) demuestran que la exposición *in vitro* e *in vivo* a propanil genera una reducción en la producción de IL-6 y TNF- α . Por otra parte, Lima y Vega (2005) demostraron que la secreción de IL-2 y la expresión de receptores α para esta interleucina, tras tratamiento con metilparation, dimetilfosfato o dietiltiofosfato, (estos dos últimos metabolitos de organofosforados) se ven reducidas, implicando que dicho hallazgo tenga un comprometimiento en la activación celular de células del sistema inmune. Así mismo, Devos *et al.* (2003) evidenciaron que la inhibición de la síntesis de algunas citoquinas no se encuentra mediada por el receptor de glucocorticoides, receptor de andrógenos, receptor activado por la proliferación de peroxisomas o receptor retinoide huérfano alfa (ROR α). No obstante, Corsini *et al.* (2007) demostraron que el efecto se alcanzaba a nivel pre-transcripcional, evidenciando una inhibición de la expresión de ARNm (ARN mensajero) de las citoquinas, efectos que han sido adscritos al metabolito del propanil 3,4-DCA (3,4- dicloroanilina). De la misma manera, Xie *et al.* (1997) demostraron que la reducción de citoquinas (IL-6 y TNF- α) debido a la exposición de propanil correspondía a una disminución en el ARNm, sugiriendo alteraciones pretranscripcionales o transcripcionales. Kardo y Sultatos (2000) plantean un mecanismo de acción alternativo en el cual dicha supresión se produce debido a inhibición de la fosforilación por medio de kinasas, la cual puede estar relacionada con la caída en la concentración de calcio intracelular.

Regulación neuroendocrina del sistema inmune

Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre el sistema inmune y el denominado sistema neuroendocrino, siendo evidente que en la inflamación el comportamiento de enfermedad esta mediado por la acción de algunas citoquinas sobre el sistema nervioso central (SNC) y la acción de éste sobre la secreción de hormonas (Gupta y Lalchhandama, 2002; Webster *et al.*, 2002). La clave de esta comunicación bidireccional es que comparten receptores que reaccionan a señales mutuas (Engelsma *et al.*, 2002). Se ha descrito que éstas pueden influir el cerebro a través de la activación de segundos mensajeros tales como el oxido nítrico y las prostaglandinas, después de la unión a receptores en las células endoteliales. Existe además una retroalimentación de regulación por parte del SNC la cual puede presentarse tanto a nivel local en el sitio de la inflamación regional en el órgano, como sistémico, a través de rutas hormonales.

Ante la exposición a compuestos xenobióticos se estimula la actividad del eje hipotálamo-hipofisiario-interrenal, a través de una vía simpática. En mamíferos la hormona liberadora de corticotropina (HLC) así como de la arginina vasopresina (AVP) (arginina vasotocina -AVT - en peces) son liberadas desde el núcleo paraventricular del hipotálamo (mientras en peces es desde el núcleo preóptico) y estimula la síntesis del polipéptido precursor de la pro-opiomelanocortina (POMC) en el lóbulo anterior de la hipófisis y la consecuente liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH), así como de otras hormonas tales como la hormona estimulante de los melanocitos (HSM) y β -endorfinas (Engelsma *et al.*, 2002; Wendelar-Bonga, 1997). La ACTH induce la síntesis de glucocorticoides a nivel adrenal (interrenal en peces). La hormona liberadora de corticoides es regulada positivamente por los sistemas histaminérgicos, colinérgicos y serotoninérgicos (Webster *et al.*, 2002).

La regulación neuroendocrina del sistema inmune se presenta principalmente por dos vías: a través de la secreción de catecolaminas (noradrenalina, adrenalina y dopamina) y glucocorticoides. Las catecolaminas son liberadas por estimulación del sistema nervioso simpático y su acción es mediada en órganos linfoides y células a través de los receptores β -adrenérgicos. Sin embargo, la sub-regulación de la secreción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos se presenta a través de receptores α -2-adrenérgicos (Engelsma *et al.*, 2002). Los glucocorticoides y sus receptores pueden unirse como heterodímeros al ADN (Gupta y Lalchhandama, 2002). Esta interacción genera una sub-regulación de la transcripción mediada

por la inhibición de los factores de transcripción AP-1 y el NF- κ B. Los glucocorticoides pueden reducir la capacidad de unión al ADN de los complejos Fos y Jun de la AP-1 mediante interacciones proteína-proteína, por tanto reprimiendo la activación de genes mediada por AP-1 (Webster *et al.*, 2002). Referente al NF- κ B existen algunos mecanismos descritos. El primero, que la acción inhibitoria de los glucocorticoides se presente gracias al incremento de la proteína inhibitoria I κ B que secuestra al NF- κ B en el citoplasma y previene su traslocación al núcleo. El segundo, que la inhibición del NF- κ B se presenta por interacción directa del receptor de glucocorticoide (Padgett y Glasser, 2003). Un tercer mecanismo sugerido para la represión de los glucocorticoides sobre el NF- κ B es la competencia por algunos cofactores, los cuales son limitados, tales como la proteína de unión al elemento sensible a AMP cíclico (CREB) y coactivador de receptor de esteroides 1 (SRC-1) (Webster *et al.*, 2002). Dada la importancia de estos factores nucleares para la síntesis de citoquinas, así como de proteínas incluyendo moléculas de adhesión y receptores de reconocimiento de patrón, se genera un fenómeno de inmunodepresión. Éste además puede verse acompañado de la disminución en la producción de mediadores inflamatorios debido a la represión citosólica de los glucocorticoides sobre la fosfolipasa A2 y sobre los niveles de ARNm de la ciclooxigenasa 2, así como por la inhibición de los genes de la sintasa de óxido nítrico (Webster *et al.*, 2002) (Figura 1). Por otra parte, la melatonina, hormona secretada por la glándula pineal ha demostrado regular la fagocitosis y la producción de peroxidasa en leucocitos (Calderon *et al.*, 2003), lo cual puede ser un mecanismo alternativo de regulación central.

(Baigent, 2001), aunado a la secreción de serotonina e histamina que regulan centralmente la producción de ACTH. Por otra parte, algunas citoquinas secretadas por las células como la IL-1, TNF y en menor medida la IL-6 incrementan la secreción de HLC (Engelsma *et al.*, 2002).

Disrupción endocrina y respuesta inmune

El sistema endocrino abarca los mecanismos hormonales que regulan el funcionamiento general de los animales, siendo reconocido como un sistema de integración que es capaz de responder a cambios en las condiciones del medio, incluyendo la exposición a agentes potencialmente lesivos o compuestos xenobióticos. Estos últimos han demostrado causar disturbios hormonales gracias a la capacidad de ejercer tanto acciones antagonistas, como agonistas y de supresión de las cascadas hormonales, o interferir en la secreción o sitio de acción de las mismas (receptores de estrógenos/andrógenos) (Zou, 2005; Iguchi *et al.*, 2007). Estos efectos pueden evidenciarse desde etapas prenatales (*e.g.* embriogénesis, desarrollo fetal, etc.) hasta los estados adultos (*e.g.* pubertad, ciclos reproductivos). Los herbicidas han demostrado tener efectos de disrupción endocrina en diferentes especies animales incluyendo el hombre (Neubert, 1997). En los animales la disrupción endocrina se caracteriza por cambios en los patrones de secreción de hormonas sexuales, andrógenos y estrógenos, que conllevan, según el estado de desarrollo, a alteraciones irreversibles en estados prenatales, así como a problemas reproductivos en estados posnatales. Estos últimos se pueden presentar por estimulación de la actividad aromatasa (CYP19) (Sanderson *et al.*, 2000) o por alteración de otros citocromos (CYP450) (Pollino *et al.*, 2009; Sancho *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que algunos citocromos son inducidos tras una interacción inicial con la hormona adrenocorticotropa – ACTH (Sanderson *et al.*, 2000), pudiendo ésta ser regulada por fenómenos de estrés.

Tomando como premisa que la respuesta inmune puede ser modulada por las hormonas sexuales, aun cuando existen estudios contradictorios, esta vía se constituye en una alternativa indirecta por la cual los compuestos xenobióticos inducen efectos deletéreos sobre la respuesta inmune.

Así, en trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) el incremento en los esteroides sexuales (estradiol, testosterona en hembras y 11-cetotestosterona, testosterona en machos durante la maduración sexual) esta correlacionado con inmunosupresión y aumento susceptibilidad a las

enfermedades, probablemente debido a una disminución de las células productoras de anticuerpos y los niveles circulantes de las mismas (Hou *et al.*, 1999).

Wang y Belosevic (1995) demostraron que el estradiol, al igual que el cortisol, son capaces de disminuir la capacidad fagocítica de macrófagos de peces, lo cual está acorde con lo descrito por Yamaguchi *et al.*, (2001) quienes demostraron que en carpa común (*Cyprinus carpio*), la progesterona, el estradiol y la testosterona disminuyen la capacidad fagocítica de los macrófagos. En tanto que sólo la progesterona y testosterona inhiben la producción de óxido nítrico (Yamaguchi *et al.*, 2001) necesaria para la producción de compuestos antimicrobianos (*i.e.* peroxinitritos) (Tizard, 2009).

Herbicidas vs sistema inmune: aproximación al mecanismo de acción

La inmunosupresión mediada por herbicidas se ha sometido a continuo debate, sin que estén dilucidados completamente los mecanismos de acción. Teniendo en cuenta la relación bidireccional entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino, y tomando como base las alteraciones causadas a organismos expuestos a herbicidas, se podría inferir que existen mecanismos mediados por el sistema nervioso central que pueden estar modulando la respuesta inmune (Figura 2). Sin embargo, existen correlaciones no descritas en la literatura frente a las cuales argumentamos y proponemos los siguientes mecanismos:

Ha sido descrita una vía antiinflamatoria colinérgica, que se sugiere está implicada en la regulación de la inmunidad innata mediada por acetilcolina (ACh) (Gallowitsch-Puerta y Pavlov, 2007). Estos autores han demostrado que la inervación vagal eferente inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la respuesta inflamatoria sistémica; esta regulación requiere la interacción entre las señalizaciones vagales eferentes y los receptores nicotínicos expresados en macrófagos y otras células no neuronales productoras de citoquinas que residen en diferentes órganos, principalmente del sistema reticuloendotelial. Investigaciones recientes han demostrado la importancia crítica del receptor de acetilcolina alfa 7 nicotínico ($\alpha 7nAChR$) en la mediación de la respuesta colinérgica anti-inflamatoria, el cual es expresado en macrófagos y linfocitos (Wang *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la disminución de la producción de TNF en el bazo se debe a interacción del estímulo colinérgico vía $\alpha 7nAChR$ (Huston *et al.*, 2006)

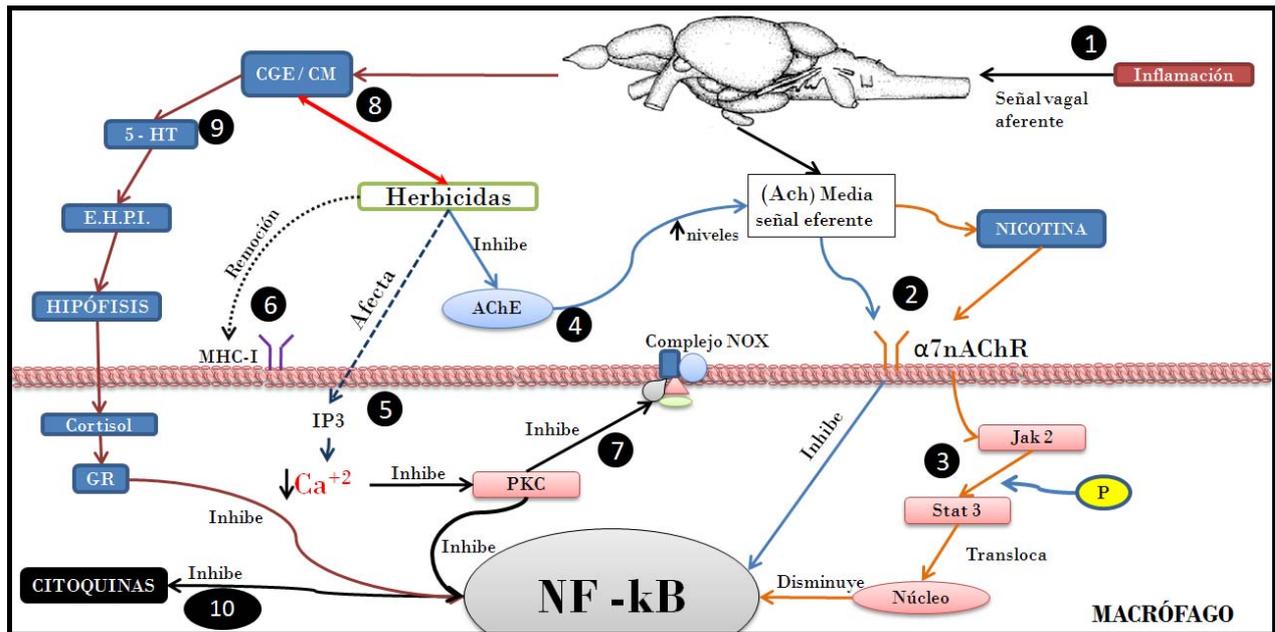


Figura 2. Mecanismos propuestos de inmunomodulación inducidos por herbicidas. (1) El esquema representa una señal aferente (inflamación), que es llevada a la médula oblonga del cerebro, donde desemboca por la porción del hipotálamo como una (2) señal eferente mediada por la acetilcolina (ACh). Esta señal estimula el receptor de acetilcolina nicotínico conteniendo la subunidad $\alpha 7$, ($\alpha 7nAChR$) el cual inhibe al factor nuclear kappa B (NF- κ B) y la síntesis de de citoquinas (9) este efecto se puede presentar tras estimulación con nicotina (3) El efecto de la nicotina que se une al receptor ($\alpha 7nAChR$), y por medio de la señal de kinasa Janus (Jak 2), la cual fosforila moléculas adaptadoras de transducción de señal (Stat 3), produce una traslocación al núcleo del macrófago y causa una disminución de la síntesis de citoquinas. (4) El efecto de los herbicidas por inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), causa un aumento en los niveles de ACh la cual indirectamente inhibe al NF- κ B; a través de $\alpha 7nAChR$. (5) Por otra parte, los herbicidas pueden interferir con la función de inositol trifosfato (IP3), como segundo mensajero que regula la liberación de Ca^{+2} intracelular, inhibiendo los pasos para la síntesis de citoquinas, dependientes de NF- κ B. (6). Esta inhibición puede estar mediada por la inhibición de la proteína kinasa C (PKC) (7) lo que a su vez inhibe la internalización de las partículas en la fagocitosis, la síntesis de citoquinas así como la formación del complejo enzimático de la NADPH oxidasa (NOX) requerido la explosión respiratoria. Así mismo, los herbicidas pueden causar remoción del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I), el cual es importante para el reconocimiento de antígenos. (8) se ha demostrado que la exposición a herbicidas incrementa la expresión de células granulares eosinofílicas/mastocitos (CGE/CM) en el cerebro las cuales son capaces de generar aminas vasoactivas, e.g. de serotonina o 5-HT, (9) la cual actúa a nivel del eje hipotalámico pituitario interrenal (EHPI), causando la liberación de cortisol, que se une intracelularmente al receptor de glucocorticoide (GR), causando la inhibición de NF- κ B; inhibiendo finalmente la síntesis de citoquinas (10).

Estudios realizados por Qiu *et al.* (1996) demuestran que la elevación de los niveles de ACh debido a la disminución de acetilcolinesterasa (AChE) (principalmente en el hipocampo e hipotálamo), así como la inhibición de la noradrenalina (NA), causa inmunosupresión de la respuesta de anticuerpos, posiblemente mediado para la ACh por la vía de receptores colinérgicos muscarínicos. Además, la interacción entre linfocitos – ACh incrementa la inmunidad celular en bazo de murinos, principalmente por estimulación de la proliferación de linfocitos T. Se ha sugerido que la exposición de antígenos al sistema nervioso central

incrementa el contenido de NA a nivel de hipocampo e hipotálamo, mostrando una relación entre la inervación simpática y el sistema inmune. Así también, se ha demostrado inhibición de la función de los linfocitos T, principalmente a través de los receptores α - β adrenérgicos, en las terminaciones nerviosas en contacto directo con linfocitos, en zonas de tejido linfoide (Qiu *et al.*, 1996).

Pavlov *et al.*, (2009) demostraron que la supresión de AChE suprime la síntesis de citoquinas a nivel sistémico durante la endotoxemia, principalmente en la ruta anti-inflamatoria colinérgica, a través de la señalización mediada por α 7AChR (receptor de acetilcolina nicotínico conteniendo sub unidad α 7), causando una supresión de la inflamación sistémica.

Así, las funciones anticolinesterasas ejercidas por los herbicidas pueden generar estados de inmunosupresión al permitir la estimulación constante de receptores nicotínicos y muscarínicos por la ACh sobre las células del sistema inmune, utilizando la vía anti-inflamatoria colinérgica. Esto se refleja en la disminución marcada de citoquinas que no sólo altera respuestas humorales sino también celulares, debido a inhibición de la diferenciación celular, principalmente en células presentadoras de antígeno, como se describió arriba. Existen diversos trabajos en peces que reportan la inhibición de la colinesterasa tras exposición a herbicidas (Gonzales *et al.*, 2007; Suarez y Gonzales, 2007). Recientes estudios han descrito un efecto marcado de los herbicidas sobre la actividad colinesterasa. Así, Silveira *et al.* (2007) demostraron que la actividad de la acetilcolinesterasa en el cerebro de la piava (*Leporinus obtusidens*), disminuyó significativamente tras exposición a los herbicidas clomazone y quiclorac; sin embargo, esto no ocurrió en exposición a propanil y metsulfuron metil. De la misma manera, Glusczak *et al.* (2006) demostraron que en la piava la exposición al Roundup[®] (principio activo: glifosato) causa una disminución y una elevación de la acetilcolinesterasa en el cerebro y el músculo respectivamente. Además, los animales mostraron un incremento en los niveles de glucógeno y glucosa, así como disminución en el contenido de proteína y lactato hepático contrario a lo ocurrido en el músculo. Por otro lado, se evidenció hipoproteinemia y anemia (bajo hematocrito, bajo recuento eritrocítico y bajo contenido de hemoglobina), los cuales han sido relacionado con fallos en la osmorregulación (Silveira *et al.*, 2007). Los efectos fueron atribuidos más al surfactante (*i.e.* POEA) que al glifosato.

Por otra parte, como se ha descrito las CGE/CM poseen aminas vasoactivas (serotonina e histamina); la serotonina (5-HT; 5-hidroxitriptamina) en particular puede poseer un efecto inmunosupresor principalmente por mecanismos periféricos relacionados con receptores serotoninérgicos (Qiu *et al.*, 1996). Clöez-Tayanari y Changeux, (2007) demostraron que a parte de la nicotina, la 5-HT puede activar receptores de acetilcolina nicotínicos nAChRs, causando una inhibición en la síntesis de TNF de macrófagos y células derivadas de monocitos. Del mismo modo, se les ha atribuido una activación de la ruta de señalización intracelular, causando la transcripción de NF-kB principalmente células mononucleares residentes en el bazo.

La estimulación colinérgica y nicotínica del receptor $\alpha 7$ nAChR induce la fosforilación de moléculas activadoras y transductoras de señal (STAT) por medio de la interacción con quinasas Janus (JAK), lo cual produce una traslocación al núcleo de la célula inmune (*e.g.* macrófago) y causa una disminución de la síntesis de citoquinas (Gallowitsch-Puerta y Pavlov, 2007). Esta ruta, específicamente para la nicotina se da a través de la estimulación de la cascada anti-inflamatoria STAT 3, por el supresor de señalización de citoquinas (SOCs) 3 de macrófagos (Clöez-Tayanari y Changeux, 2007).

Khan y Deschaux (1997) demostraron que la 5-HT puede alterar el funcionamiento de las células inmunes del pez (linfocitos y macrófagos), posiblemente mediante los canales del receptor de serotonina 5-HT₃, acoplado con el movimiento de Na⁺ interno, que a su vez es modulado por la proteína quinasa C, calmodulina y Ca⁺² intracelular libre. La principal vía de acción de la serotonina, es la interacción con el complejo Ca⁺²/calmodulina, el cual activa la calcineurina, causando una traslocación de los factores nucleares (NF-kB y STAT), del citoplasma al núcleo. Por otra parte, la serotonina puede alterar la señalización de Ca⁺², la activación de la quinasa C, o una transcripción de genes envueltas en la activación de linfocitos B y T. Cualquier alteración en la activación de linfocitos T o B puede resultar en una disminución en la síntesis de citoquinas y otros factores solubles, importantes para el reconocimiento célula – célula, durante la exposición a un antígeno. No obstante, algunos trabajos han demostrado que el incremento de 5-HT en los tejidos linfoides puede incrementar la capacidad funcional de las células del sistema inmune en murinos así como un incremento en la producción de IL-1- β y IFN- γ (Clöez-Tayanari y Changeux, 2007). La secreción de cortisol inducida por 5-HT, permite la inhibición de NF-kB (Padgett y Glaser, 2003) y la inhibición de la producción de citoquinas se produce por formación de complejos

del receptor de glucocorticoides con elementos de respuesta a los glucocorticoides que pueden silenciar los genes (Engelsma *et al.*, 2002).

Es de destacar además que la alteración de la funcionalidad de la proteína Kinasa C posee efectos directos sobre el proceso de fagocitosis, gracias al papel de esta en la internalización de las partículas así como en la producción de citoquinas. Además, la proteína kinasa C es necesaria para la activación de la NADPH oxidasa, enzima requerida para la generación de radicales libre y compuestos bactericidas (Toro, 2004).

Por otra parte, existen respuestas alternativas a la inmunosupresión, siendo reportada la existencia de herbicidas que son capaces de eliminar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) de la superficie de células dendríticas contribuyendo a la evasión inmune (Pinchuk *et al.*, 2007) e impidiendo la citotoxicidad mediada por células (Tizard, 2009).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Aun cuando existen gran cantidad de trabajos asociados a los efectos deletéreos de los herbicidas sobre la reproducción e incluso sobre el crecimiento de diversas especies de peces, la profundización en las alteraciones sobre el sistema inmune de animales es escasa. El presente trabajo propone posibles mecanismos de acción que permitan plantear interrogantes básicos y problemas de investigación en la inmunotoxicología relacionada con herbicidas.

La evaluación de la respuesta inmune innata se constituyen en una de las estrategias de seguimiento y evidencia de la alteración en la capacidad de respuesta frente a patógenos, por lo cual se sugiere, como se ha hecho en diversos estudios relacionados con compuestos xenobióticos, examinar la actividad del sistema inmune innato como un biomarcador de respuesta a exposición. Esto es significativo dado que los efectos de los herbicidas en el medio acuático no sólo son importantes por la mortalidad que puedan causar de manera directa, sino por una diversa gama de disturbios neuroendocrinos y disminución de la resistencia a patógenos oportunistas que pueden estar el medio y que inter-dependen de complejas relaciones bióticas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Grupo de Investigación en Sanidad de Organismos Acuáticos por la lectura crítica y correcciones pertinentes al texto, en especial a David Alberto Gómez Beltrán, por sus aportaciones. Este trabajo se encuentra dentro del marco del proyecto: “**Estudio sobre los efectos del glifosato y surfactantes acompañantes en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)**” Universidad de los Llanos –CORMACARENA

BIBLIOGRAFÍA

- Baigent SM. Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides*. 22: 809-820, 2001
- Cabassi E. Immune system and exposure to xenobiotics in animals. *Vet Res Comm*. 2007, 31(supp 1): 115-120.
- Calderon MV, Rodriguez A, Esteban MA, Meseguer J. Estudio in vitro de la melatonina sobre la fagocitosis y la peroxidasa intracelular de los leucocitos de lubina (*Dicentrarchus labrax* L). *CIVA* 2003, 829-836.
- Chen CY, Hathaway KM, Thompson DG, Folt CL. Multiple stressor effects of herbicide, pH, and food on wetland zooplankton and a larval amphibian. *Ecotox Environ Safety* 2008, 71: 209-218.
- Clöz-Tayanari I, Changeux JP. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. *J Leuk Biol* 2007, 81: 599-606
- Corsini E, Codecà I, Mangiaratti S, Birindelli S, Minoia C, Turci R, Viviani B, Facchi A, Vitelli N, Lucchi L, Galli Cl, Marinovich M, Colosio C. Immunomodulatory effects of the herbicide propanil on cytokine production in humans: In vivo and in vitro exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, 222: 202-210.
- Cuesta A, Vargas-Chacoff L, García-López A, Arjona FJ, Martínez-Rodríguez G, Meseguer J, Mancera JM, Esteban MA. Effect of sex-steroid hormones, testosterone and estradiol, on humoral immune parameters of gilthead seabream. *Fish Shellfish Immunol* 2007, 23: 693-700
- Devos S, De Bosscher K, Staels B, Bauer E, Roels F, Vandem Berghe W, Haegeman G, Hooghe R, Hooghe-Peters EL. Inhibition of cytokine production by the herbicide atrazine Search for nuclear receptor targets. *Biochemical Pharmacol* 2003, 65: 303-308.
- Elandalousi LM, Leite RB, Rodrigues PM, Afonso R, Cancela ML. Effects of herbicide Roundup® on *Perkinsus olseni* in vitro proliferation and in vivo survival when infecting a

permissive host, the claim *Ruditapes decussatus*. Bull Environ Contam Toxicol 2008, 80: 512-515.

Engelsma MY, Huising MO, van Muiswinkel WB, Flik G, Kwang J, Savelkoul HF, Verburg-van Kemenade L. Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. Vet Immunol Immunopathol. 2002. 87: 467-479.

Eslava-Mocha PR, Ramírez-Duarte WF, Rondón-Barragán IS. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: Impacto sobre peces nativos. Villavicencio-Meta, Editorial Juan XXIII. Universidad de los Llanos. 2007. p 150.

Fatima M, Mandiki SNM, Douxfils J, Silvestre F, Coppe P, Kestemont P. Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune–endocrine interactions in goldfish immune and antioxidant effects. Aquat Toxicol 2007, 81: 159–167

Fielden MR, Halgren RG, Tashiro CHM, Yeo BR, Chittim B, Choub K, Zacharewski TR. Effects of gestational and lactational exposure to Aroclor 1242 on sperm quality and in vitro fertility in early adult and middle-aged mice. Reprod Toxicol 2001, 15: 281–292

Gallowitsch-Puerta M, Pavlov VA. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. Life Sci 2007, 80: 2325–2329

Gluszczak L, Dos Santos D, Crestani M, Braga M, De Araújo F, Frescura M, Pimentel VL. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). Ecotoxicol Environ Safety 2006, 65: 237-241.

Gluszczak L, Dos Santos D, Silveira B, Rodrigues R, Chitolina MR, Morsch V, Loro V. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comp Biochem Physiol Part C 2007, 146: 519–524

Gómez L, Masot J, Martínez S, Durán E, Soler F, Roncero V. Acute 2,4-D poisoning in Tench (*Tinca tinca* L.): Lesions in the hematopoietic portion of the kidney. Arch Environ Contam Toxicol 1998, 35: 479–483.

Gonzales JF, Ochoa DM, Figueredo D, Gonzáles CA. Efectos tóxicos del Roundup® (glifosato) en tilapia roja (*Oreochromis sp.*), yamú (*Brycon amazonicus*) y bocachico (*Prochilodus magdalenae*). Rev Med Vet Zoot Suppl 2007, 54(2).113-119.

Gould JC, Cooper KR, Scanes CG. Effects of polychlorinated biphenyls on thyroid hormones and liver type I monodeiodinase in the chick embryo Ecotoxicol Environl Safety 1999, 43: 195-203

Gupta B, Lalchhandama K. Molecular mechanisms of glucocorticoid action. Curr Sci. 2002. 83(9): 1103-11.

- Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environ Health Perspec* 2003, 11:568-575
- Hooghe RJ, Devos S, Hooghe-Peters EL. Effects of selected herbicides on cytokine production in vitro. *Life Sci* 2000, 66(26): 2519-2525.
- Hou Y, Suzuki Y, Aida K. Effects of steroids on the antibody producing activity of lymphocytes in rainbow trout. *Fisheries Science* 1999, 850-855
- Huston JM, Ochani M, Rosas-Ballina M, Liao H, Ochani K, Pavlov VA, Gallowitsch-Puerta M, Ashok M, Czura CJ, Foxwell B, Tracey KJ, Ulloa L. Splenectomy inactivates the cholinergic anti-inflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 2006, 203(7): 1623–1628.
- Iguchi T, Watanabe H, Katsu Y. Toxicogenomics and ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption and basic biology. *Gen Comp Endocrinol* 2007, 153: 25-29.
- Kardos SA, Sultatos LG. Interactions of the organophosphates paraoxon and methyl paraoxon with mouse brain acetylcholinesterase. *Toxicol Sci* 2000, 58: 118–126.
- Khan N A, Deschaux P. Role of serotonin in fish immunomodulation. *J Exp Biol* 1997, 200: 1833–1838
- Kiesecker JM. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature?. *PNAS* 2002, 99: 9900-9904
- Lima A, Vega L. Methyl-parathion and organophosphorous pesticides metabolites modify the activation status and interleukin-2 secretion of human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Lett* 2005, 158: 30-38.
- Luster MI, Ackermann MF, Germolec DR, Rosenthal GJ. Perturbations on the immune system by xenobiotics. *Environ Health Persp* 1989, 81: 157-162.
- Marc J, Bellé R, Morales J, Cormier P, Mulner-Lorillon O. Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicol Sci* 2004, 82: 436-442.
- Marc J, Mulner-Lorillon O, Bellé R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation *Biol Cell* 2004, 96: 245.249.
- Marc J, Mulner-Lorillon O, Boulben S, Hureau D, Durand G, Bellé R. Pesticides Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem Res Toxicol* 2002, 15: 326-331.
- Marc J, Mulner-Lorillon O, Durand G, Bellé R. Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. *Environ Chem Lett* 2003, 1: 8-12.

- Martínez A, Reyes I, Reyes N. Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana. *Biomédica* 2007, 27:594-604
- McClure GYH, Helm RM, Stine K, Burks AW, Jones SM, Gandy J. Evaluation of immune parameters in propanil-exposed farm families. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001, 41: 104-111.
- Neubert D. Vulnerability of the Endocrine System to Xenobiotic Influence. *Reg Toxicol Pharmacol* 1997, 26: 9–29.
- Padgett AD, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol* 2003, 24(8):444-448.
- Pavlov VA, Parrish WR, Rosas-Ballina M, Ochani M, Puerta M, Ochani K, Chavan S, Al-Abed Y, Tracey KJ. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain Behav Immun* 2009, 23(1): 41-45
- Pinchuk L, Lee S-R, Filipov NM. *In vitro* atrazine exposure affects the phenotypic and functional maturation of dendritic cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007, 223: 206–217.
- Pistl J, Kovalkovičová N, Legáth J, Novotný J, Holovská V, Mikula I. Metabolic activity of sheep peripheral blood phagocytes after exposure to selected pesticides *in vitro*. *Bull Vet Inst Pulawy* 2002, 46: 247-253.
- Pistl J, Kovalkovičová N, Reichel P, Holovská V, Mlynarčíková H, Legáth J, Kováč G, Mikula I. Influence of herbicide chloridazone on haematological parameters and functional activity of leukocytes in sheep. *Bull Vet Inst Pulawy* 2003, 47: 145-152.
- Pollino CA, Georgiades E, Holdway DA. Physiological changes in reproductively active rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) following exposure to naphthalene. *Ecotoxicol Environ Safety* 2009, 72: 1265-1270.
- Qiu Y, Peng Y, Wang J. Immunoregulatory role of neurotransmitters. *Adv in Neuroimmunol* 1996, 6: 223-231.
- Ramírez-Duarte WF, Rondón-Barragán IS, Eslava-Mocha PR. 2007. Implicaciones bioenergéticas de la exposición de juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) a la mitad de la CL50 de la mezcla Roundup® más Cosmoflux® 411F. *Rev Med Vet Zoot Suppl* 2007, 54(2): 178.
- Ramírez-Duarte WF, Rondón-Barragán IS, Eslava-Mocha PR. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachypomus*). *Pesq Vet Bras* 2008, 28(11):547-554
- Rice CD, Kergosien DH, Adams SM. Innate immune function as a bioindicator of pollution stress in fish. *Ecotoxicol Environ Safety* 1996, 33: 186-192.

Rondón-Barragán IS, Ramírez-Duarte WF, Eslava-Mocha PR. Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux[®] 411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev Col Ciencias Pec 2007, 20(4): 431-446.

Salazar-Lugo R, Estrella A, Oliveros A, Rojas-Villaruel E, Villalobos L, Lemus M. Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. Environ Toxicol Pharmacol. 2009. 27: 312-326.

Sancho E, Fernández-Vega C, Villaruel MJ, Andreu-Moliner E, Ferrando ME. Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery. Comp Biochem Physiol Part C 2009, 150: 25-32

Sanderson JT, Seinen W, Giesy JP, Van den Berg M. 2-chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: A novel mechanism for estrogenicity. Toxicol Sci. 2000. 54: 121-127.

Scheil V, Kienle C, Osterauer R, Gerhardt A, Köhler HR. Effects of 3,4-dichloroaniline and diazinon on different biological organisation levels of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. Ecotoxicology 2009, 18: 355-363.

Schmidt R. HRAC Classification of herbicides according to mode of action. Brighton Crop Protection Conference – Weeds 1133-1140, 1997

Segnini MI, Medina J, Marcano S, Finol HJ, Boada-Sucre A. Effects of herbicide on the kidneys of two Venezuelan cultured fish: *Caquetaia kraussii* and *Colossoma macropomum* (Pisces: Ciclidae an Characeae). Int J Trop Biol 2005, 53(Suppl 1):55-59

Sheil JM, Frankenberry MA, Schell TD, Brundage KM, Barnett JB. Propanil exposure induces delayed but sustained abrogation of cell-mediated immunity through direct interference with cytotoxic T-lymphocyte effectors. Environ Health Perspect 2006, 114(7): 1059-1064.

Shim KJ, Jung KH, Chung MK, Choung SY. Development of an *in vitro* environmental monitoring system by using immune cells. J Health Sci 2002, 48(2): 130-133.

Silveira B, Loro V, Glusczak L, Pretto A, Menezes C, Marchezan E, De Oliveira S. Effect of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). Chemosphere 2007, 68: 1597-1601

Šivikova K, Dianovský J. Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. Int J Hyg Environ Health 2006, 209: 15-20.

Studnicka M, Siwicki AK, Morand M, Rymuszka A, Bownik A, Terech-Majewska E. Modulation of nonspecific defence mechanisms and specific immune responses after suppression induced by xenobiotics. J Appl Ichthyol 2000, 16:1 -7.

- Suárez RO, Gonzales, JF. Actividad colinesterasa cerebral, muscular, hepática y plasmática ne juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*): efecto inhibitor del clorpirifos (LORSBAN 4EC®). Rev Med Vet Zoot Suppl 2007, 54(2).180.
- Sung H-H, Ye Y-Z. Effect of nonylphenol on giant freshwater prawn (*Macrobrachium roosebergii*) via oral treatment: Toxicity and messenger RNA expression on hemocyte genes. Aquat Toxicol. 2009. 91: 270-277
- Szarek J, Siwicki A, Andrzejewska A, Terech-Majewska E, Banaszkiwicz T. Effects of the herbicide Roundup™ on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). Mar Environ Res 2000, 50: 263-266.
- Tizard I. Chapter 3 - How inflammation is triggered. Chapter 12 – Helper T cells and their response to antigens En: Veterinary immunology. 8 edition. Saunders Elsevier 2009. 11-27.
- Toro F. La respuesta inflamatoria. In: Rugeles MT, Patino PJ. Edits. Inmunología: Una ciencia activa. Tomo I. Fondo Editorial Biogénesis, Colombia. 2004. p. 177-201
- Wang R, Belosevic M. The in vitro effects of estradiol and cortisol on the function of long term goldfish macrophage cell line. Dev Comp Immunol 1995, 19(4): 327-336
- Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 subunit is an essential regulator of inflammation. Nature 2003, 421: 384–388.
- Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. Ann Rev Immunol 2002, 20: 125-163.
- Wendelaar-Bonga SE. The stress response in fish. Physiol Rev 1997, 77: 591-625
- Xie YC, Schafer R, Barnett JB. The immunomodulatory effects of the herbicide propanil on murine macrophage interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production. Toxicol Appl Pharmacol 1997, 145: 184– 191.
- Yamaguchi T, Watanuki H, Sakai M. Effects of estradiol, progesterone and testosterone on the function of carp, *Cyprinus carpio*, phagocytes in vitro. Comp Biochem Physiol Part C 2001, 129: 49-55.
- Zou E. Impacts of xenobióticos on crustacean molting: the invisible endocrine disruption. Integr Comp Biol 2005, 45: 35-38