



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN *IN VITRO* A DIAZOXÓN EN  
ESPLENOCITOS DE TILAPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*) SOBRE LA  
EXPRESIÓN DE AChR Y CITOCINAS PRO Y ANTI INFLAMATORIAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

GLADYS ALEJANDRA TOLEDO IBARRA

DIRECTOR DE TESIS

DR. LENIN PAVÓN ROMERO  
INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA

COMITÉ TUTOR

DR. JORGE MORALES MONTOR  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS

DR. CUAHUTEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2023

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue financiado por el proyecto CONACyT  
Ciencia básica (número de proyecto A1-S-53561).

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

Agradezco a el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto (número de becario 287281).

Agradezco a mi tutor, Dr. Lenin Pavón Romero, por su confianza, guía, apoyo y enseñanzas durante mi formación académica.

Agradezco a los miembros de mi comité tutor, Dr. Juan Humberto Lanz Mendoza y Dr. Jorge Morales Montor, por su apoyo, orientación y asesoramiento durante la realización de este trabajo.

Agradezco a los miembros del jurado, Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Dr. Isaac González Santoyo, Dra. Maricela Luna Muñoz y Dra. María del Carmen Jiménez Martínez, por su tiempo y aportaciones para la revisión del presente documento.

Agradezco al Dr. Manuel Iván Girón Pérez, por todo el apoyo que siempre me ha proporcionado. Por ser mi mentor en el mundo de la investigación.

Agradezco al equipo de la Unidad de Psicoimmunología en el Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", por el apoyo para la realización del proyecto.

Agradezco al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA) Unidad Nayarit por el apoyo para la realización del proyecto.

Agradezco a toda la familia LANIIA, por los maravillosos momentos dentro y fuera del laboratorio. Gracias por ser excelentes amigos y por ser personas tan admirables y dedicados profesionistas. Los quiero mucho y les tengo una profunda admiración.

A la Universidad Autónoma de Nayarit, por ser mi segunda casa y permitirme desarrollarme profesional y académicamente.

Agradezco a mi familia por el cariño, apoyo constante y comprensión en mis momentos difíciles.

Agradezco especialmente a mi mamá, Leticia Ibarra por todo tu esfuerzo, por la paciencia, por siempre motivarme, confiar en mí y ayudarme a lograr mis metas, pero sobre todo por el amor. Este logro también es tuyo y me siento profundamente orgullosa de ser tu hija.

Agradezco a mis primos Luis y Paco, a mis sobrinos Luisito, Marifer y Andreita, por alegrarme en mis momentos de estrés y ser mi motivación para lograr esta meta.

Agradezco a Isaías Ríos por acompañarme en todo este camino, por las palabras de aliento y siempre creer en mí, gracias por todo el amor.

Agradezco a cada uno de mis amigos por su tiempo para escucharme, por su paciencia, consejos y palabras de apoyo.

## **Dedicatorias**

A Leticia Ibarra Martínez por todo su amor.

A María Fernanda Ibarra Najar por ser la luz que guía mi camino.

## Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Peces como modelo de estudio	3
1.1.1. Tilapia nilótica ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	4
1.2. Sistema inmune de peces	5
1.2.1. Órganos linfoides	7
1.2.2. Células del sistema inmunológico	10
1.2.3. Citocinas	15
1.2.3.1. Interleucina 1	17
1.2.3.2. Interleucina 6	18
1.2.3.3. Interleucina 10	19
1.2.3.4. Interleucina 12	20
1.2.3.5. Interleucina 35	21
1.2.3.6. Factor de necrosis tumoral $\alpha$	22
1.2.3.7. Factor de crecimiento transformante $\beta$	23
1.2.4. Factores que modulan la respuesta inmunológica	24
1.3. Plaguicidas organofosforados	25
1.3.1. Diazinón	27
1.3.1.1. Características fisicoquímicas	27
1.3.1.2. Contaminación ambiental	28
1.3.1.3. Toxicocinética y toxicodinamia	29
1.3.1.4. Neurotoxicidad	31
1.3.1.5. Inmunotoxicidad	32
1.3.1.5.1. Diazinón y susceptibilidad a infecciones	35
1.4. Sistema colinérgico	36
1.4.1. Sistema colinérgico neuronal	36
1.4.1.1. Acetilcolina	38
1.4.1.2. Acetilcolinesterasa	39
1.4.1.3. Receptores de acetilcolina	39

1.4.2. Sistema colinérgico leucocitario	44
1.4.2.1. Acetilcolina leucocitaria	46
1.4.2.2. Acetilcolinesterasa leucocitaria	46
1.4.2.3. Receptores colinérgicos leucocitarios	47
1.4.3. Regulación colinérgica de la respuesta inmunológica	49
2. Antecedentes	50
3. Planteamiento del problema	52
4. Hipótesis	52
5. Objetivos	53
5.1. Objetivo general	53
5.2. Objetivos específicos	53
6. Materiales y métodos	54
6.1. Organismos de experimentación	54
6.2. Aislamiento y cultivo celular	54
6.2.1. Preparación de muestra	54
6.2.2. Conteo y viabilidad celular	55
6.2.3. Cultivo celular	56
6.3. Grupos experimentales	56
6.4. Exposición <i>in vitro</i>	57
6.4.1. Exposición <i>in vitro</i> a diazoxón	57
6.4.2. Exposición <i>in vitro</i> a agonistas y antagonistas de AChR	57
6.5. Evaluación de actividad enzimática de AChE	58
6.6. Cuantificación de ACh	58
6.7. Expresión de AChR y citocinas	60
6.7.1. Extracción de RNA	60
6.7.2. Síntesis de cDNA	60
6.7.3. PCR en tiempo real	61
6.8. Determinación del flujo de calcio intracelular	64
6.9. Análisis estadístico	64
7. Resultados	65
7.1. Exposición <i>in vitro</i> a diazoxón	65



7.1.1. Actividad enzimática de AChE	65
7.1.2. Cuantificación de ACh	69
7.1.3. Expresión de AChR	71
7.1.4. Expresión de citocinas	72
7.1.5. Viabilidad celular	74
7.2. Exposición <i>in vitro</i> a agonistas y antagonistas de AChR	75
7.2.1. Flujo de Calcio intracelular	75
7.2.2. Expresión de AChR	79
7.2.3. Expresión de citocinas	81
8. Discusión	84
9. Conclusiones	101
10. Referencias	102
11. Anexos	
Anexo 1. Viabilidad celular	120
Anexo 2. Curva de ACh	120
Anexo 3. Curvas de amplificación y disociación de genes	121

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b>	Tilapia nilótica ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	4
<b>Figura 2</b>	Órganos linfoides en peces	7
<b>Figura 3</b>	Comparativa de células T, moléculas de superficie y expresión de citocinas en mamíferos y peces	16
<b>Figura 4</b>	Estructura química de POF	26
<b>Figura 5</b>	Estructura química de diazinón	27
<b>Figura 6</b>	Mecanismo de biotransformación de diazinón en vertebrados	30
<b>Figura 7</b>	Mecanismo de acción de la enzima AChE e inhibición inducida por diazoxón	31
<b>Figura 8</b>	Estructura química de acetilcolina	39
<b>Figura 9</b>	Señalización de receptores nicotínicos en la sinapsis colinérgica	41
<b>Figura 10</b>	Señalización de receptores muscarínicos	43
<b>Figura 11</b>	Papel del sistema colinérgico en leucocitos	45
<b>Figura 12</b>	Paneles representativos de la identificación de la población de CMB por citometría de flujo, mediante tamaño (FSC) y granularidad (SSC)	55
<b>Figura 13</b>	Condiciones utilizadas para la amplificación de los genes de interés mediante PCR en tiempo real	62
<b>Figura 14</b>	Actividad de AChE en CMB por la exposición <i>in vitro</i> a diazoxón durante 1 h	66
<b>Figura 15</b>	Actividad de AChE en CMB por la exposición <i>in vitro</i> a diazoxón durante 24 h	68
<b>Figura 16</b>	Actividad de AChE en CMB por la exposición <i>in vitro</i> a diazoxón durante 1 h y 24 h	69
<b>Figura 17</b>	Porcentaje de inhibición de AChE en CMB expuestas <i>in vitro</i> a diazoxón durante 1 y 24 h	69
<b>Figura 18</b>	Concentración de ACh en CMB expuestas <i>in vitro</i> a diazoxón durante 1 h y 24 h	70
<b>Figura 19</b>	Concentración de ACh en CMB expuestas <i>in vitro</i> a diazoxón durante 24 h	70
<b>Figura 20</b>	Niveles de expresión relativa de mAChR M2, M3, M4, M5 y nAChR $\beta$ 2 en CMB expuestas <i>in vitro</i> a 1 nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M de diazoxón durante 24h	72

<b>Figura 21</b>	Niveles de expresión relativa de mRNA de las citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-35, TGF- $\beta$ y TNF- $\alpha$ en CMB expuestas <i>in vitro</i> a 1 nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M de diazoxón durante 24h	74
<b>Figura 22</b>	Porcentaje de flujo de Ca <sup>2+</sup> intracelular en CMB expuestas <i>in vitro</i> a nicotina (0.1, 1 y 10 $\mu$ M)	76
<b>Figura 23</b>	Porcentaje de flujo de Ca <sup>2+</sup> intracelular en CMB expuestas <i>in vitro</i> a carbacol (0.1, 1 y 10 $\mu$ M)	76
<b>Figura 24</b>	Porcentaje de flujo de Ca <sup>2+</sup> intracelular en CMB expuestas <i>in vitro</i> a bungarotoxina (0.1, 1 y 10 $\mu$ M)	77
<b>Figura 25</b>	Porcentaje de flujo de Ca <sup>2+</sup> intracelular en CMB expuestas <i>in vitro</i> a atropina (1, 10 y 100 $\mu$ M)	78
<b>Figura 26</b>	Niveles de expresión relativa de mAChR M2, M3, M4, M5 y nAChR $\beta$ 2 CMB expuestas <i>in vitro</i> a los agonistas nicotina y carbacol, antagonistas bungarotoxina y atropina de nAChR y mAChR, respectivamente	80
<b>Figura 27</b>	Niveles de expresión relativa de mRNA de las citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-35, TGF- $\beta$ y TNF- $\alpha$ en CMB expuestas <i>in vitro</i> a 1 $\mu$ M de nicotina y 1 $\mu$ M de bungarotoxina	82
<b>Figura 28</b>	Niveles de expresión relativa de mRNA de las citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-35, TGF- $\beta$ y TNF- $\alpha$ en CMB expuestas <i>in vitro</i> a 1 $\mu$ M de carbacol y 1 $\mu$ M de atropina	83
<b>Figura 29</b>	Sistema colinérgico de leucocitos	91

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b>	Principales características de la respuesta inmunológica de peces	6
<b>Tabla 2</b>	Efectos inmunotóxicos de diazinón en peces teleósteos	34
<b>Tabla 3</b>	Criterios de selección de concentración de diazoxón	57
<b>Tabla 4</b>	Concentraciones y tiempo de exposición de agonistas y antagonistas colinérgicos	57
<b>Tabla 5</b>	Condiciones de reacción de retotranscripción	60
<b>Tabla 6</b>	Condiciones de corrimiento de retotranscripción	61
<b>Tabla 7</b>	Condiciones de reacción de PCR tiempo real	61
<b>Tabla 8</b>	Características de oligonucleótidos para PCR tiempo real	62
<b>Tabla 9</b>	Porcentaje de actividad de AChE en CMB por la exposición <i>in vitro</i> a diazoxón durante 1 h	67
<b>Tabla 10</b>	Porcentaje de actividad de AChE en CMB por la exposición <i>in vitro</i> a diazoxón durante 24 h	67
<b>Tabla 11</b>	Viabilidad de CMB tras la exposición a diazoxón durante 24 h	74
<b>Tabla 12</b>	Alteración de componentes colinérgicos por exposición a POF	85
<b>Tabla 13</b>	Reportes de la modulación del proceso inflamatorio mediado por citocinas debido a la exposición a POF	94

## **Abreviaturas**

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterasa

AChR: Receptores de acetilcolina

ASTDR: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades

CL<sub>50</sub>: Concentración letal 50

CMB: Células mononucleares de bazo

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

Ct: Umbral de ciclos del inglés cycle threshold

CYP: Citocromo P

CYP 450: Citocromo P450

DEP: Dietilfosfato

DEPT: Dietiltiofosfato

dNTP: Deoxinucleósido trifosfato

DXN: Diazoxón

EFL-1: Factor de elongación 1

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleucina

mAChR: Receptor muscarínico de acetilcolina

nAChR: Receptor nicotínico de acetilcolina

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: Solución salina amortiguada de fosfatos

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RNA: Ácido ribonucleico

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta

TM: Temperatura de alineación

TNF $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

## Resumen

Los plaguicidas organofosforados, como diazinón, son sustancias beneficiosas para la productividad agrícola y el control de enfermedades transmitidas por vectores. Sin embargo, pueden causar una disrupción de la comunicación neuroinmune, debido a que su mecanismo de neurotoxicidad se basa en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, aumentando así la concentración de acetilcolina y sobreestimando los receptores colinérgicos. Diazinón y su metabolito diazoxón tienen efectos tóxicos sobre el sistema inmunológico en diversos organismos, incluyendo los peces, alterando tanto parámetros de inmunidad innata como adaptativa. Sin embargo, el mecanismo de inmunotoxicidad aún no es claro. Por lo cual, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la exposición *in vitro* a diazoxón sobre el sistema colinérgico no neuronal y las citocinas pro y antiinflamatorias en células mononucleares de bazo de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), con el propósito de proponer un posible mecanismo por medio del cual los plaguicidas organofosforados inducen inmunotoxicidad en vertebrados. Los resultados evidencian el efecto de diazoxón sobre el sistema colinérgico no neuronal en células mononucleares, mediante la inhibición de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa, así como en el incremento de los niveles de expresión de los mAChR M2 y M4. Además, se evidencia la inducción de una respuesta inflamatoria, con el incremento en la expresión de las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  tras la exposición *in vitro* a diazoxón. Los mecanismos subyacentes al aumento inducido por diazoxón en la expresión de citocinas, no implican únicamente mecanismos canónicos de toxicidad por organofosforados que involucren la inhibición de la acetilcolinesterasa, sino también la modulación de los receptores colinérgicos. Por lo cual, mediante el uso de agonistas y antagonistas colinérgicos, se evidenció la capacidad de modulación vía nicotínica como muscarínica de las citocinas pro y anti inflamatorias. El fenómeno inflamatorio debe ser un mecanismo fisiológico perfectamente guiado por las interacciones neuro-inmunológicas, sin embargo, los resultados indican que diazoxón es capaz de inducir cambios de los principales componentes del sistema colinérgico no neuronal leucocitario, así como los procesos inmunológicos que regula.

## **Abstract**

Organophosphate pesticides, such as diazinon, are beneficial for agricultural productivity and vector-borne disease control. However, they can disrupt neuroimmune communication because their mechanism of neurotoxicity is based on the enzyme acetylcholinesterase inhibition, which increases acetylcholine levels and overstimulates cholinergic receptors. Diazinon and its metabolite diazoxon have toxic effects on the immune system in various organisms, including fish, altering both innate and adaptive immune parameters. However, the mechanism of immunotoxicity is still unclear. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of *in vitro* exposure to diazoxon on the non-neuronal cholinergic system and pro- and anti-inflammatory cytokines in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spleen mononuclear cells, to propose a possible mechanism by which organophosphorus pesticides induce immunotoxicity in vertebrates. The results show the effect of diazoxon on the non-neuronal cholinergic system in mononuclear cells, through the inhibition of the enzymatic activity of acetylcholinesterase, as well as the increase in the expression levels of mAChR M2 and M4. In addition, the induction of inflammatory response was demonstrated, with increased expression of the cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  following *in vitro* exposure to diazoxon. The mechanisms underlying the diazoxon-induced increase in cytokine expression involve not only the canonical mechanisms of organophosphate toxicity involving acetylcholinesterase inhibition but also the modulation of cholinergic receptors. Therefore, the use of cholinergic agonists and antagonists has demonstrated the ability to modulate pro- and anti-inflammatory cytokines through nicotinic and muscarinic pathways. The inflammatory phenomenon must be a physiological mechanism perfectly controlled by neuro-immunological interactions, but the results indicate that diazoxon can induce changes in the main components of the non-neuronal leukocyte cholinergic system, as well as the regulation of immunological processes.

## 1. Introducción

### 1.1. Peces como modelo de estudio

Los peces pertenecen al grupo filogenéticamente más antiguo de vertebrados, aparecieron en el planeta aproximadamente hace más de 500 millones de años, son el grupo de vertebrados más abundante y diverso con más de 27,000 especies, de las cuales 20,000 son peces teleósteos (peces óseos), por lo que representan más de la mitad de todos los vertebrados en el planeta (Rauta *et al.*, 2012).

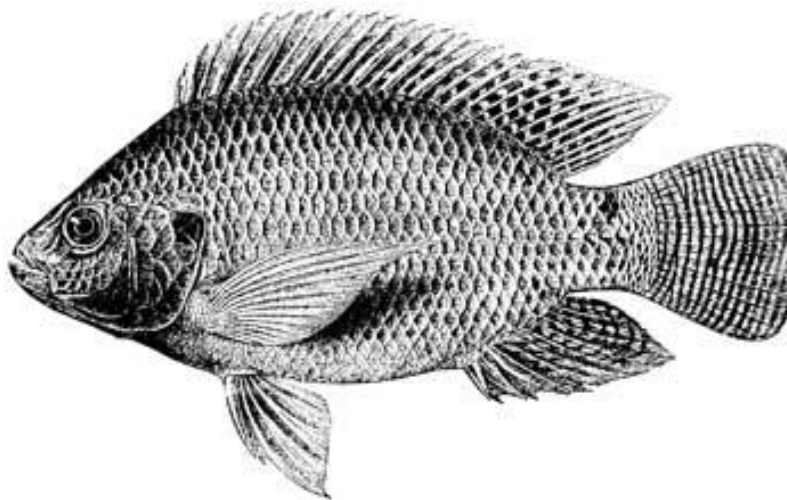
Actualmente, los peces se destacan por su importancia ecológica y económica, así mismo, algunas especies son ampliamente utilizadas como modelos biológicos. Debido a que estos organismos son los primeros en presentar mecanismos de inmunidad innata y adaptativa, el estudio del sistema inmune en estos organismos es de gran relevancia, ya que proporciona información sobre la evolución del sistema inmune en vertebrados, apoyando así el conocimiento de aspectos básicos de la inmunología, y por lo tanto el posible tratamiento de enfermedades emergentes en humanos y otros animales (Lin *et al.*, 2016; Wilson, 2017).

De esta manera, los vertebrados inferiores se han vuelto cada vez más relevantes en el campo de la investigación biomédica, dado que ofrecen ventajas sobre diferentes modelos de estudio (por ejemplo, ratones) (Lin *et al.*, 2016; Wilson, 2017). En este sentido, el uso de sistemas modelo, como los peces, en inmunología es fundamental para elevar nuestra capacidad para aumentar el conocimiento de los estados normales y de enfermedad. Por lo tanto, los peces son un modelo eficiente para observar las respuestas inmunitarias debido a la presencia de amplios brazos adaptativos e innatos del sistema inmunitario (Kumar *et al.*, 2022).



### 1.1.1. Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

La tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (figura 1) es una especie de pez teleósteo, perteneciente a la familia *Cichlidae* en el orden de los Perciformes (FAO, 2015). En México, la producción de tilapia es sumamente importante en términos económicos y de soberanía alimentaria para prácticamente todas las entidades federativas (Vázquez-Vera y Chávez-Carreño, 2022). A nivel nacional, la tilapia por su volumen de producción se encuentra en el 5<sup>to</sup> lugar; mientras que por el valor de la producción pesquera se encuentra posicionada en el 2<sup>do</sup> lugar. La tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años es de 3.75%. En lo que respecta a la tilapia como fuente de alimentación, el consumo nacional de esta especie fue de 228,561 toneladas en el 2019, así como un consumo per cápita de 1.81 Kg (CONAPESCA, 2019).



**Figura 1.** Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (FAO, 2015)

La tilapia es una especie rentable en la acuicultura por su rápido crecimiento, buena conversión alimenticia, fácil reproducción y alta adaptabilidad a diferentes ambientes, así mismo son tolerantes a cambios en factores ambientales, tales como temperatura, salinidad, pH y variaciones en los niveles de oxígeno. Estos organismos poseen bajo costo de producción, soportan altas tasas de densidad de

siembra y aceptan varios tipos de alimento (Fitzsimmons, 2000; Vega-Villasante *et al.*, 2010).

Además, la tilapia nilótica es una especie muy resistente, que sólo desarrolla infecciones cuando factores abióticos afectan su sistema inmune, por lo que considera un buen modelo de estudio en inmunotoxicología (Tellez-Bañuelos *et al.*, 2009; Zaitseva *et al.*, 2006).

## **1.2. Sistema inmune de peces**

Los peces óseos (teleósteos) son el primer grupo de organismos vertebrados que presentan mecanismos de respuesta inmune innata y adaptativa (tabla 1) (Kordon, Pinchuk, y Karsi, 2021; Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022; Rauta *et al.*, 2012).

La inmunidad innata, es la primera línea del sistema de defensa contra antígenos extraños (Somamoto y Nakanishi, 2022); siendo los mecanismos innatos los primeros en responder frente a un antígeno, reconociéndolo de una forma genérica y no específica, de esta manera se crea una reacción rápida para eliminarlo (Kordon, Pinchuk, y Karsi, 2021; Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022; Rauta *et al.*, 2012).

La inmunidad innata comprende barreras físicas tales como mucus, piel, branquias, intestinos y fosas nasales; moléculas efectoras como interferones, proteínas del complemento, anticuerpos naturales, inhibidores del crecimiento, inhibidores de proteasa; así como células tales como macrófagos, monocitos y neutrófilos (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022).

Se ha considerado que la inmunidad innata es evolutivamente más antigua que la inmunidad adaptativa (Somamoto y Nakanishi, 2022), siendo de primordial importancia en peces (Rauta *et al.*, 2012), a tal punto que se sugiere que los peces teleósteos poseen una respuesta innata más robusta que los mamíferos (Somamoto y Nakanishi, 2022). Además, tienen un papel instructor para los mecanismos de inmunidad adaptativa (Rauta *et al.*, 2012).

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

Componente	Teleósteos
Células B y T	+
BCR	+
TCR	+
TCR, CD4, CD8	+
T <sub>H</sub> 1, T <sub>H</sub> 2 y T <sub>H</sub> 17	+
Inmunoglobulinas	IgM, IgD y IgT (o IgZ)
AID	+
Mecanismos de diversidad	Recombinación V(D)J
Genes RAG	+
Memoria	+
MHC clase I y II	Si
Órganos linfoides primarios	Timo y pronefro
Órganos linfoides secundarios	Bazo y MALT
Tejido linfoide asociado a mucosas	+
Nódulos linfáticos y centros germinales	-
Memoria	+

---

Modificado de Kordon, Pinchuk y Karsi (2021)

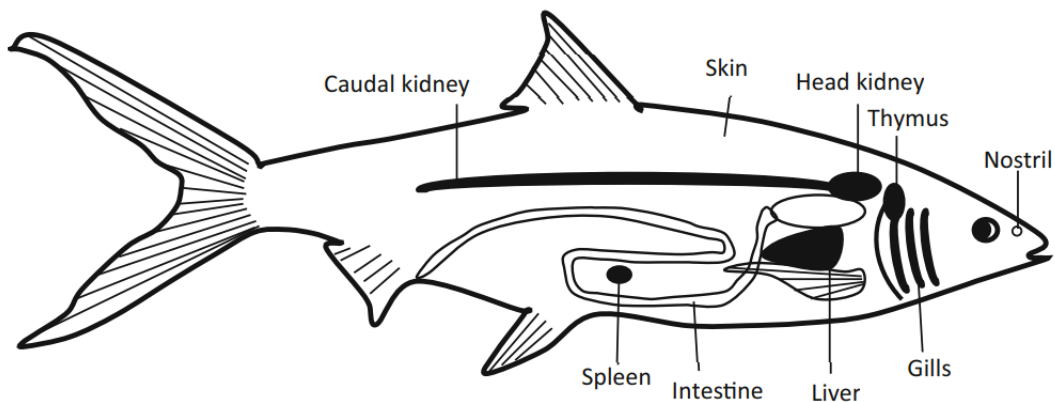
+ Presente. - Ausente

Por otro lado, los teleósteos poseen una respuesta de inmunidad adaptativa, la cual es equivalente a la de los mamíferos, se compone por células altamente especializadas, las cuales son poblaciones de linfocitos análogas a las células B, células T, y células asesinas naturales (NK), así como de inmunoglobulinas y el sistema del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Kordon, Pinchuk, y Karsi, 2021; Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022; Somamoto y Nakanishi, 2022). De esta manera, el sistema inmunitario adaptativo responde específicamente contra el antígeno que desencadenó la respuesta inmunitaria (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022).

Una propiedad clave de la inmunidad adaptativa es el desarrollo de memoria inmunológica, ya que se generan células de memoria que proporcionan una inmunidad específica de larga duración, por lo que desempeña un papel crucial en la protección contra infecciones recurrentes con una respuesta rápida, intensa y eficiente (Kordon, Pinchuk, y Karsi, 2021; Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022; Rauta *et al.*, 2012), lo cual conduce a una respuesta más eficiente en encuentros posteriores con el antígeno (Nakanishi *et al.*, 2015).

### 1.2.1. Órganos linfoides

En los teleósteos, los órganos linfoides primarios son el timo y riñón. Los órganos linfoides secundarios son el bazo y el tejido linfóide asociado a las mucosas (MALT) (figura 2) (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022; Sayed *et al.*, 2022). Mientras que, carecen de médula ósea, ganglios linfáticos y centros germinales (Sunyer, 2013).



**Figura 2.** Órganos linfoides en peces. Tomado de Makesh, Bedekar y Rajendran (2022).

El timo, al igual que en mamíferos, tiene un papel fundamental en la producción y maduración de los linfocitos T (Uribe *et al.*, 2011). De esta manera, el timo es un órgano esencial para el desarrollo de linfocitos T, desde progenitores de timocitos tempranos hasta células T funcionalmente competentes. Está bien documentado que los primeros pasos en el desarrollo de células T (timocitos) y la organogénesis

tímica en teleósteos son similares a los de los vertebrados superiores (Somamoto y Nakanishi, 2022).

El riñón en los peces teleósteos es el equivalente a la médula ósea en los mamíferos, es el sitio más grande de hematopoyesis hasta la edad adulta (Uribe *et al.*, 2011), en el cual se observan todos los linajes de hematopoyesis, incluidas la eritropoyesis, mielopoyesis y linfopoyesis. En teleósteos, el riñón se compone de dos partes, el riñón posterior (pronefro) y el riñón troncal. El pronefro se considera un órgano hematopoyético más importante que el troncal, ya que los tejidos linfoides intertubulares son más desarrollados en pronefro, mientras que el troncal contiene abundantes tejidos urinarios (Somamoto y Nakanishi, 2022).

En el pronefro existe una gran cantidad de linfocitos B en diferentes etapas de desarrollo (Kordon, Pinchuk y Karsi, 2021; Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022). Asimismo, se expresan genes considerados específicos de líneas celulares linfoides como TdT, RAG 1 y 2 e Ikaros. Además de las células linfoides, las principales células presentes son los macrófagos, que se agregan en estructuras llamadas centros de melanomacrófagos (CMM) (Uribe *et al.*, 2011). El pronefro también participa en la eliminación de antígenos tanto solubles como particulados (Zapata *et al.*, 2006).

El bazo es el principal órgano linfoide secundario en peces, es el único órgano similar a un ganglio linfático. El bazo consta de pulpa roja y blanca, vasos sanguíneos, elipsoides y tejido linfoide. La pulpa blanca está compuesta por vainas de leucocitos con una estructura linfoide organizada, que consisten principalmente en células linfoides (linfocitos T) y macrófagos con materiales fagocitados. Mientras que, la pulpa roja está formada por extensa red de cordones esplénicos y capilares sinusoidales. Los elipsoides son capilares de paredes gruesas con un lumen estrecho; está constituida fundamentalmente por células eritroides y trombocitos, que componen la mayor parte del parénquima esplénico (Sayed *et al.*, 2022).

Las células leucocitarias granulares que han sido detectadas en el bazo son eosinófilos, basófilos, neutrófilos y macrófagos (Sayed *et al.*, 2022). Además, contiene un número importante de linfocitos (IgM+B), se ha considerado que el bazo tiene un papel importante en la inducción de respuestas inmunitarias adaptativas. Las células a lo largo de las paredes del bazo participan activamente en la fagocitosis de antígenos por parte de los macrófagos. Por lo general, en forma de anticuerpos o productos metabólicos, los antígenos pueden permanecer detenidos durante largos períodos de tiempo, lo que tiene un importante papel en la memoria inmunológica (Uribe *et al.*, 2011). Así mismo, tiene la capacidad de atrapar material particulado en circulación (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022), siendo fundamental para la eliminación de inmunocomplejos (Sayed *et al.*, 2022).

En peces teleósteos, los CMM están formados por numerosos macrófagos, son abundantes en bazo y en pronefro, lo que ha sugerido que estos podrían actuar como análogos de centros germinales (Kordon, Pinchuk, y Karsi, 2021; Verburg-van Kemenade *et al.*, 2013; Zapata *et al.*, 2006; Zwollo *et al.*, 2005). Los CMM proporcionan los microambientes para la presentación de antígenos por parte de las células dendríticas a las células T y la diferenciación/maduración de las células B (Magor, 2015). Debido a que, las agregaciones de linfocitos y macrófagos, con su capacidad de generar una respuesta inmunológica, se ubican cerca de los sitios de captura de antígenos y, a menudo, se asocian con los CMM, donde los linfocitos B maduros son activados por antígenos que dan como resultado el desarrollo de células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células de memoria (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022). Además, los CMM desempeñan un papel importante en relación con la respuesta a cuerpos extraños (Xing *et al.*, 2017) con actividad bactericida (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022).

El MALT consiste en tejido linfoide asociado mucosas como de intestino, piel, branquias y a nasofaringe, son sitios importantes para la generación y maduración de células inmunitarias adaptativas (Salinas, 2015). De esta manera, las escamas, la mucosidad de la piel y de las branquias actúan como la primera barrera contra la

infección. Particularmente la piel está recubierta de una capa mucus debido a la falta de queratinización, además es la primera barrera física, química y biológica contra la infección por patógenos y lesiones por contacto (Salinas, 2015). El mucus en los peces óseos contiene lectinas, pentraxinas, lisozimas, proteínas del complemento, péptidos antibacterianos e inmunoglobulina M (IgM), que tienen un papel importante en la inhibición de la entrada de patógenos (Uribe *et al.*, 2011).

### **1.2.2. Células del sistema inmunológico**

Los leucocitos (griego; leuko = blanco y cito = célula), son parte del sistema inmune que participa en las respuestas inmunes innatas y humorales. Circulan en la sangre y montan respuestas inflamatorias y celulares a lesiones o patógenos. Sin embargo, las funciones específicas varían para cada tipo de célula (Tigner, Ibrahim & Murray, 2020).

Los leucocitos de peces óseos se clasifican en linfocitos, granulocitos, monocitos/macrófagos, células dendríticas y trombocitos. A su vez, los granulocitos se dividen en neutrófilos, eosinófilos y basófilos (Somamoto y Nakanishi, 2022). En lo que respecta a los linfocitos, los peces poseen poblaciones que son análogas a las células T, células B y células citotóxicas (similares a las células asesinas naturales) (Uribe *et al.*, 2011).

#### Células de inmunidad innata

Una amplia variedad de células están involucradas en la inmunidad innata de los teleósteos, incluidos macrófagos, monocitos, células similares a las asesinas naturales (NK), células citotóxicas no específicas (NCC) y granulocitos como los neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Para estas células se han descrito funciones similares a las que llevan a cabo en mamíferos (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022).

Los neutrófilos en teleósteos, como en los mamíferos, son las células más abundantes entre los granulocitos en sangre y tejidos, muestran actividad fagocítica y digiere sustancias extrañas ingeridas. Son los primeros leucocitos reclutados a un sitio inflamatorio (Somamoto y Nakanishi, 2022) y son capaces de eliminar patógenos utilizando especies reactivas de oxígeno y trampas extracelulares de neutrófilos (Palić *et al.*, 2007). Los neutrófilos poseen mieloperoxidasa en sus gránulos citoplasmáticos, que en presencia de haluro y peróxido de hidrógeno mata a las bacterias por halogenación de la pared celular bacteriana. Además, estas células tienen lisozimas y otras enzimas hidrolíticas en su lisosoma (Uribe *et al.*, 2011).

Los monocitos y los macrófagos son células fagocíticas importantes; los monocitos circulan en el torrente sanguíneo, se encuentra más comúnmente en el riñón, mientras que los macrófagos se encuentran ampliamente distribuido en tejidos que incluyen branquias, riñón, bazo, corazón y en la cavidad peritoneal (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022; Zapata *et al.*, 1996). Tanto los monocitos como los macrófagos son capaces de engullir una amplia variedad de patógenos, restos celulares, partículas y sustancias extrañas. Se considera que los monocitos son los precursores de los macrófagos que migran a los sitios de inflamación y se diferencian en macrófagos. Después de la diferenciación en el sitio de la inflamación, los macrófagos se vuelven más fagocíticos y con una mayor actividad antimicrobiana (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022).

Los monocitos/macrófagos también migran al sitio inflamado después de los neutrófilos (Zapata *et al.*, 1996). Además, los macrófagos liberan cientos de moléculas bioactivas (citocinas) que controlan la inflamación, que es crucial para la supervivencia de un organismo (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022). En este sentido, los macrófagos al ser células fagocíticas profesionales, responden mediante la producción de varias citocinas que ayudan a la inflamación y elevan la función antimicrobiana de las células residentes. En respuesta al estímulo, los macrófagos se activan para enfrentar y ejercer un papel inmunomodulador contra



los patógenos y mantener la integridad del tejido (Kumar *et al.*, 2022). Los macrófagos también desempeñan un papel en la presentación de antígenos a las células T, por lo que unen el sistema inmunitario innato y adaptativo (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022).

Aunque se ha informado sobre la caracterización funcional de eosinófilos, basófilos y mastocitos en varias especies de peces, sus funciones aún no se han descrito completamente (Somamoto y Nakanishi, 2022), sin embargo, se han descrito como células granulocíticas que protegen contra parásitos (Nishiya *et al.*, 2020). Particularmente, los eosinófilos se encuentran distribuidos por todo el tejido conjuntivo, están presentes en mayor número durante procesos inflamatorios crónicos. Por lo cual, se sugiere que pueden presentar un papel similar en peces y mamíferos (Corrêa *et al.*, 2017). Así mismo, se ha reportado que las respuestas agudas de los mastocitos de peces son similares a las de los mamíferos, en particular en lo que respecta a las respuestas vasomotoras y la permeabilidad vascular inducida por los gránulos (Nishiya *et al.*, 2020). De esta manera, el daño tisular agudo puede ser causado por la desgranulación y liberación de mediadores de inflamación por mastocitos y eosinófilos (Reite y Evensen, 2006).

Las células linfoides innatas (ILC), incluidas las células NK, desempeñan un papel importante en las defensas innatas contra los patógenos y mantienen la homeostasis inmunitaria. En los peces teleósteos, se han encontrado varios tipos de células similares a NK en trucha arcoíris, bagre, tilapia y el pez cebra (Somamoto y Nakanishi, 2022).

#### Células de inmunidad adaptativa

Los linfocitos se clasifican en células T, células B y células similares a NK (ILC). Se ha considerado que las células T y las células B son los principales actores en la inmunidad adaptativa, mientras que, las ILC son fundamentales en la inmunidad innata (Somamoto y Nakanishi, 2022).

Las células T son componentes clave del sistema inmunitario adaptativo (Kumar *et al.*, 2022), desempeñan un papel fundamental en las respuestas mediadas por células, ya sea involucrando la regulación de otras funciones de los leucocitos o matando directamente a las células huésped infectadas (Kordon, Pinchuk y Karsi, 2021). Las células T se desarrollan y maduran en el timo; por lo tanto, también se les llama timocitos. Los factores de transcripción para el desarrollo de células T en peces teleósteos, como *ikaros* (expresado por células T tempranas) y *Ick* (expresado más tarde en el desarrollo) parecen ser similares en mamíferos (Kordon, Pinchuk y Karsi, 2021). Mientras que, las células T maduras están presentes en los tejidos linfoides de los peces teleósteos, como el timo, riñón, bazo y MALT, incluidos el intestino, piel y branquias (Nakanishi *et al.*, 2015). Los linfocitos T se clasifican en tres linajes principales, células T citotóxicas (CTL CD8+), células T cooperadoras (células Th CD4+) y células T reguladoras (células Treg) (Somamoto y Nakanishi, 2022). Se ha evidenciado que los linfocitos CD4+ y CD8+ pueden encontrarse en sangre periférica, así como en órganos linfoides tales como bazo y riñón (Xing *et al.*, 2017).

Los linfocitos T CD4+ cooperadores son estimulados por péptidos derivados de antígenos extracelulares y presentados por moléculas MHC de clase II, regulando las respuestas de otros leucocitos (Kordon, Pinchuk y Karsi, 2021). Además, la evidencia molecular y funcional muestra que la vía de presentación de antígenos a través del MHC de clase II se conserva en la mayoría de los peces teleósteos (Nakanishi *et al.*, 2015). Las células T CD4+ juegan un papel muy importante ya que contribuyen a la eliminación de antígenos mediada por fagocitos junto con la activación de leucocitos y estimulan la producción de anticuerpos por parte de las células B (Kumar *et al.*, 2022).

Tras la activación, las células T CD4+ vírgenes se diferencian en subconjuntos específicos llamados Th1, Th2, Th9, Th17, células Tfh y Tregs, con cada subconjunto definido por un control de perfil de citocinas particular sobre las respuestas inmunitarias (Kordon, Pinchuk y Karsi, 2021). Los estudios funcionales

y la identificación molecular sugieren que la diferenciación de las células Th en células Th1 y Th2 también se produce en los peces teleósteos, en función de su perfil de citocinas y funciones efectoras (Nakanishi *et al.*, 2015).

Las respuestas de tipo Th1 son principalmente de naturaleza proinflamatoria y responsables de matar patógenos intracelulares. El subconjunto Th1 polariza la activación del macrófago en el subconjunto M1 (acciones inflamatorias) y, por otro lado, el subconjunto Th2 activa el macrófago M2 (acciones antiinflamatorias). El IFN- $\gamma$  es la principal citocina Th1 y el desarrollo de las células Th1 se atribuye al factor de transcripción t-bet y a citocinas como la IL-12. Mientras que, las respuestas de tipo Th2 son de naturaleza mayormente antiinflamatoria e incluyen citocinas como IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ , se desarrollan bajo la influencia del factor de transcripción GATA-3. A diferencia del sistema de los mamíferos, donde la diferenciación Th1/Th2 está descrita, en los peces, la evidencia exacta de tal diferenciación no se ha establecido completamente (Kumar *et al.*, 2022; Kokubo *et al.*, 2022).

Por otra parte, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son activados por péptidos derivados de antígenos intracelulares y presentados por moléculas MHC de clase I, y su función es destruir las células huésped infectadas. Así mismo, las células T CD8<sup>+</sup> desempeñan un papel crucial en la defensa inmunitaria contra los patógenos intracelulares, especialmente la infección por virus (Kordon, Pinchuk y Karsi, 2021). Las células CD8<sup>+</sup> se encuentran en mayor abundancia en MALT (branquias e intestino) ya que estos tejidos están continuamente expuestos a una alta concentración de microflora comensal y antígenos alimentarios (Xing *et al.*, 2017).

Las células B, elementos clave de la inmunidad adaptativa humoral, se producen en el pronefro de los peces teleósteos. Aunque los ganglios linfáticos no están presentes en los peces teleósteos, las células B maduras se encuentran en el bazo y el riñón posterior de los peces teleósteos (Zwollo *et al.*, 2005). Además, se ha reportado que las células B en los peces teleósteos son capaces de fagocitar (Kordon, Pinchuk y Karsi, 2021).

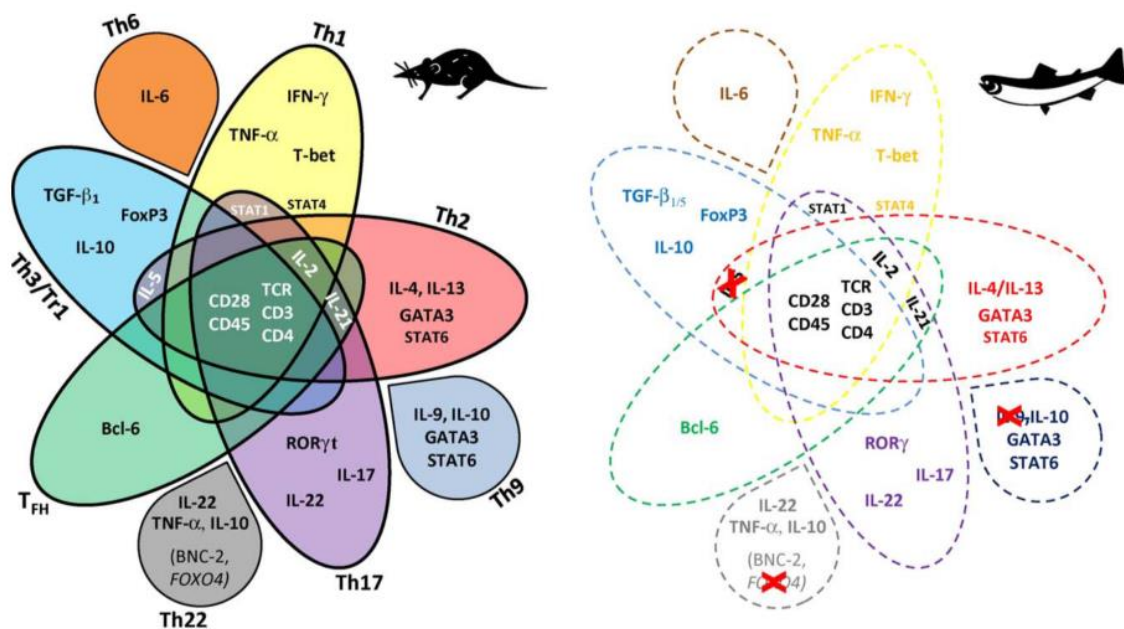
Las células B se diferencian en células plasmáticas que producen inmunoglobulinas (Ig) (Kordon, Pinchuk y Karsi, 2021), que desempeñan un papel importante en la inmunidad humoral del sistema inmunitario adaptativo. Las células B de teleósteos comparten muchas similitudes con las células B de mamíferos, incluidos los reordenamientos del gen Ig, la exclusión alélica, la producción de Ig de membrana e Ig secretadas, además son capaces de producir tres clases de Ig: IgM, IgT e IgD (Somamoto y Nakanishi, 2022). Las Ig se dividen en dos grupos: forma soluble secretada (Igs o anticuerpos) o receptores de células B (BCR), forma unida a la membrana (Kordon, Pinchuk y Karsi, 2021).

### **1.2.3. Citocinas**

Las citocinas son pequeñas proteínas secretadas por las células inmunitarias, son el regulador clave del sistema inmunitario (Wang y Secombes, 2013), tanto de los mecanismos innatos como adaptativos (Kaiser *et al.*, 2004). Las citocinas se han agrupado por su estructura molecular, ya que esto determina los receptores utilizados y las vías de señalización que se activan intracelularmente (Zou y Secombes, 2016). De esta manera, estas moléculas efectúan pequeños cambios fisiológicos a través de receptores específicos presentes en las superficies de las células diana y son responsables de la transmisión de señales entre las células (Zou y Secombes, 2016), por lo cual son herramientas importantes en la comunicación entre los leucocitos (Somamoto y Nakanishi, 2022).

Las citocinas son moléculas conservadas en los vertebrados inferiores y muestran funciones similares a las que se encuentran en otros organismos superiores (figura 3) (Laing *et al.*, 2001; Laing y Secombes, 2004; Rauta *et al.*, 2012; Secombes *et al.*, 2011). En los peces, las citocinas tienen un papel en el desarrollo y la hematopoyesis, atraen leucocitos a un sitio de infección y activan sus mecanismos antimicrobianos (Zou y Secombes, 2016).

De esta manera, su papel en el inicio de respuestas proinflamatorias y antiinflamatorias ha sido descrito en varios modelos animales, incluidos los peces (Kumar *et al.*, 2022). Estas moléculas pueden ser producidas en el sitio de entrada de un patógeno, por lo cual, se generan señales inflamatorias que regulan la capacidad de los fagocitos residentes y recién llegados para destruir el patógeno invasor. También regulan la función de presentación de antígenos en las células dendríticas y su migración a los ganglios linfáticos para iniciar la respuesta inmunitaria adaptativa (Ashfaq *et al.*, 2019; Wang y Secombes, 2013).



**Figura 3.** Comparativa de células T, moléculas de superficie y expresión de citocinas en mamíferos y peces (Lainga y Hansen, 2011)

En este sentido, las citocinas son factores importantes para conectar la red de células T, células B y dendríticas en la inmunidad adaptativa (Secombes, 2008; Wang y Secombes, 2013; Zou y Secombes, 2016). Debido a que, para la activación de las células T se requiere la combinación de tres señales diferentes enviadas en secuencia: 1) reconocimiento de antígeno (TCR: MHC), 2) coestimulación y 3) citocinas. Las citocinas secretadas por las células presentadoras de antígenos (APC) determinan la diferenciación de las células T activadas en un subconjunto particular de células T efectoras (Kordon, Pinchuk y Karsi, 2021).

Las células Th1, Th2, Th17, Th9 e iTreg delimitan la división del trabajo de las células CD4+ para modular una respuesta inmunitaria particular. Este control sobre el sistema inmunitario se basa en la producción de diferentes tipos de citocinas, de forma similar a como ocurre en los mamíferos. Cada célula T CD4+ posee una capacidad característica para responder a una citocina en particular (inductiva) y la procesa a través de factores de transcripción maestros selectivos y, a su vez, produce otro conjunto de citocinas (funcionales) para desempeñar sus funciones. La diferenciación de diferentes linajes de células inmunitarias depende de la compleja red de factores de transcripción y señalización de citocinas específicas, seguida de modificaciones epigenéticas (Ashfaq *et al.*, 2019).

#### **1.2.3.1. Interleucina 1**

La interleucina 1 (IL-1) es una citocina pro inflamatoria, tiene diversas funciones fisiológicas que media la regulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, que se conservan en los peces (Sakai *et al.*, 2021; Sayed *et al.*, 2022; Zou y Secombes, 2016). Recientes estudios genómicos han identificado a la IL-1 como la citocina evolutivamente más temprana en los peces (Sakai *et al.*, 2021), además IL-1 $\beta$  fue la primera interleucina caracterizada en peces óseos y cartilagosos (Zou y Secombes, 2016). Según Rauta *et al.* (2012) ha sido caracterizada en 13 especies de peces teleósteos.

La IL 1 $\beta$  es producida por una amplia gama de tipos de células, tales como células endoteliales activadas, macrófagos tisulares, monocitos sanguíneos, linfocitos T activados, granulocitos y otros tipos de células (Rauta *et al.*, 2012; Sayed *et al.*, 2022) después de la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) del huésped por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados al peligro (DAMP). La IL-1 $\beta$  se sintetiza como un precursor que carece de un péptido señal y se requiere que se procese para liberar la proteína activa. La IL-1 $\beta$  de teleósteos puede ser escindida por caspasas y el procesamiento de proIL-1 $\beta$  en la forma activa implica la activación canónica y no

canónica de las caspasas efectoras, en particular las caspasas 1 y 8 dentro del inflamasoma. Los mecanismos para el procesamiento de la IL-1 $\beta$ , en peces, son complejos y están delicadamente regulados durante la inflamación (Zou y Secombes, 2016).

La función de la IL-1 $\beta$  en peces es análoga a la de IL-1 $\beta$  de los mamíferos (Magnadottir, 2010; Uribe *et al.*, 2011). En los peces, la IL-1 $\beta$  desempeña un papel importante en la inflamación y la defensa del huésped, debido a que tiene actividades de defensa antibacteriana y antiviral, siendo un mediador esencial de las respuestas tempranas a la infección (Sayed *et al.*, 2022). Así mismo, desempeña un papel importante en la inmunidad de los peces al activar linfocitos y células fagocíticas, de esta manera aumenta la resistencia a la infección por *Aeromonas hydrophila* (Sakai *et al.*, 2021). Por lo tanto, la IL-1 $\beta$  está involucrada en la regulación de la inmunidad a través de la estimulación de las células T (Magnadottir, 2010; Uribe *et al.*, 2011).

#### **1.2.3.2. Interleucina 6**

Las citocinas de la subfamilia IL-6 son actores importantes en la hematopoyesis y tienen propiedades proinflamatorias y antiinflamatorias. En los peces existen cuatro miembros de la familia IL-6: IL-6, IL-11, una molécula denominada similar a CNTF y M17 (Zou y Secombes, 2016).

Los genes de IL-6 se han caracterizado en varias especies de peces teleósteos, incluidos el fugu (*Takifugu rubripes*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), pez globo verde moteado (*Dichotomyctere nigroviridis*), platija japonesa (*Hippoglossoides elassodon*), besugo (*Pagellus bogaraveo*), mero naranja manchado (*Epinephelinae*) y halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) (Ashfaq *et al.*, 2019; Wang y Secombes, 2013). En el pez trucha arcoíris (*O. mykiss*) la expresión de IL-6 fue detectada en bazo, branquias, tracto gastrointestinal, ovarios y cerebro; tanto en bazo como cerebro, se regula al alza después de la

estimulación inmunitaria, vacunación con ADN y procesos infecciosos (Wang y Secombes, 2013).

La IL-6 está involucrada en la cascada que conduce a una respuesta inflamatoria (Uribe *et al.*, 2011). En la trucha (*O. mykiss*), IL-6 es capaz de promover el incremento de macrófagos a través de la inducción de la fosforilación de STAT3 formada durante los eventos de la respuesta inflamatoria (Ashfaq *et al.*, 2019). Aunque aún no se han descrito todas las funciones de IL-6, se ha reportado que la IL-6 recombinante (rIL-6) promueve la proliferación de fagocitos en la trucha arcoíris (Costa *et al.*, 2011), lo que sugiere que la IL-6 producida durante eventos inflamatorios puede promover la proliferación local de macrófagos (Wang y Secombes, 2013) a través de la vía JAK2/STAT3 (Zou y Secombes, 2016). Además, IL-6 y TGF- $\beta$  estimulan la producción de un tipo no patógeno de células Th17 (Wang y Secombes, 2013).

### **1.2.3.3. Interleucina 10**

La familia de citocinas IL-10 se compone de IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-28B e IL29. Se pueden subdividir en varios grupos con diferentes funciones biológicas, siendo la IL-10 una citocina inmunorreguladora, con función antiinflamatoria crítica, cuya expresión se induce después de los mediadores proinflamatorios. Así mismo, ayuda a atenuar las respuestas inmunitarias, minimizando así el daño tisular (Wang y Secombes, 2013; Zou y Secombes, 2016).

Se han reportado genes de IL-10 en los peces tales como la carpa común (*Cyprinus carpio*), trucha arcoíris (*O. mykiss*), carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), pez cebra (*Danio rerio*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), bacalao (*Gadus morhua*), pez dorado (*Carassius auratus*) y carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) (Wang y Secombes, 2013; Zou y Secombes, 2016). La IL-10 en peces, similar a los ortólogos de mamíferos, actúa como supresora y ejerce un papel conservado en la amortiguación de las respuestas inflamatorias. Las funciones de IL-10 que se han



caracterizado en peces son: suprimir las respuestas inmunitarias, inhibir la inflamación, promover la proliferación de células T y células B de memoria, producción de IgM (Sakai *et al.*, 2021; Zou y Secombes, 2016). Así mismo, Wang y Secombes (2013) han informado que, en el pez dorado, rIL-10 redujo la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-10, pero aumentó la expresión de SOCS3.

Aunque la IL-10 es producida por todos los tipos de células CD4+, las células Treg son la fuente clave de esta citocina (Ashfaq *et al.*, 2019). Particularmente, la IL-10 producida por Tregs ha sido identificada en la mayoría especies de peces teleósteos. Además, las citocinas, IL-10 y TGF- $\beta$ , juegan un papel vital en la diferenciación de las células Treg a través del principal factor de transcripción FoxP3 (Kordon, Pinchuk y Karsi, 2021).

#### **1.2.3.4. Interleucina 12**

La familia de citocinas IL-12 consiste en heterodímeros de una cadena  $\alpha$  (p19, p35, p28) y una cadena  $\beta$  (p40, EBI3). Se han descrito cuatro miembros: IL-12 (p35/p40), IL-23 (p19/p40), IL-27 (p28/EBI3) e IL-35 (p35/EBI3) (Zou y Secombes, 2016). A pesar de compartir muchas características estructurales y moleculares, las citocinas de la familia IL-12 median efectos funcionales sorprendentemente diversos, siendo IL-12 e IL-23 reguladores positivos, IL-27 e IL-35 siendo reguladores negativos (Wang y Secombes, 2013).

La L-12 es una citocina heterodimérica compuesta por subunidades p35 y p40 unidas covalentemente. Las subunidades p35 y p40 de peces se identificaron por primera vez en fugu (*T. rubripes*). La subunidad p35 de IL-12 no es tan expresiva en peces como en mamíferos, con expresión restringida en sitios como el timo y branquias, expresión ilimitada en sangre, riñones y bazo. Sin embargo, en la carpa común después de la exposición viral o bacteriana, la expresión de la subunidad p35 aumenta (Ashfaq *et al.*, 2019).

Particularmente, la citocina IL-12 es un tipo de interleucina producida principalmente por monocitos, macrófagos, dendritas y neutrófilos y, en menor medida, células B. La cual es secretada en grandes cantidades por las APC después de su activación por PAMP y DAMP (Wang y Secombes, 2013).

De esta manera, la IL-12 es un regulador crítico de la inmunidad de tipo Th1 o mediada por células. Una función importante de la IL-12 es la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa, principalmente a través de la inducción de otras citocinas, que coordinan la respuesta inmunitaria subsiguiente. Esto es debido a que, cuando las células T CD4+ vírgenes reciben señales intensas a través de su TCR en presencia de IL-12 e IFN- $\gamma$ , la señalización de STAT1 induce la expresión del factor de transcripción maestro Tbet. Entonces, Tbet induce la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células T en diferenciación, lo que amplifica la expresión de Tbet y refuerza el fenotipo Th1 en un ciclo de retroalimentación positiva, regula al alza la expresión de IL12Rb2. Estas últimas células son seleccionadas por la abundante IL-12 de las APC, asegurando así la expansión selectiva de las células Th1 en diferenciación (Wang y Secombes, 2013). De esta manera, IL-12 induce la proliferación de células T y la diferenciación y expansión de Th1. Además, mejora la actividad citolítica de las células NK y T, a través de la producción de IFN- $\gamma$  (Ashfaq *et al.*, 2019).

#### **1.2.3.5. Interleucina 35**

La citocina IL-35 (p35/EBI3) es un heterodímeros que pertenece a la familia de IL-12 (Zou y Secombes, 2016), la cual es considerada como regulador negativo (Wang y Secombes, 2013). IL-35 es un actor clave en la regulación de la comunicación celular, la diferenciación y la inflamación. Ha sido identificada como una nueva citocina inmunosupresora (Zhang *et al.*, 2019 a,b). En la carpa herbívora (*C. idella*) se ha reportado que tiene la capacidad de inducir células Treg, inhibir la proliferación de células T efectoras, restringir la diferenciación y función de las células Th17, disminuyendo la síntesis de IL-17 (Zhang *et al.*, 2019 a,b).

#### 1.2.3.6. Factor de necrosis tumoral $\alpha$

El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) como citocina proinflamatoria, es uno de los primeros genes inmunitarios que se expresa en una etapa temprana de la infección en los vertebrados, incluyendo los peces, tiene un papel clave en la regulación de la inflamación. Al igual que sus homólogos de mamíferos, el TNF- $\alpha$  de los peces muestra funciones superpuestas con la IL-1 $\beta$  (Zou y Secombes, 2016).

El TNF- $\alpha$  puede inducir su propia secreción, pero también estimula la producción de otras citocinas y quimiocinas inflamatorias (Wang y Secombes, 2013). La liberación de TNF- $\alpha$  soluble requiere la eliminación de la región precursora, incluido el dominio intracelular N-terminal y la región transmembrana. Este proceso es facilitado por la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (TACE, también conocida como ADAM17), que escinde el proTNF- $\alpha$ . El sitio de corte para TACE está presente en todas las secuencias de TNF- $\alpha$  de peces, lo que sugiere que el procesamiento y liberación de TNF- $\alpha$  es un mecanismo conservado para en todos los vertebrados (Zou y Secombes, 2016).

Al ser TNF una citocina antigua, sus homólogos funcionales se remontan incluso a los invertebrados. En peces óseos, TNF- $\alpha$  ha sido caracterizado en distintas especies de peces, incluidos la platija verde oliva o fletán japonés (*Paralichthys olivaceus*), trucha arcoíris (*O. mykiss*), la dorada (*Sparus auratus*), carpa común (*C. carpio*), bagre (*Siluriformes*), fugu (*Takifugu rubripes*), pez cebra (*D. rerio*), lubina (*D. labrax*), rodaballo (*Psetta máxima*), atún de aleta azul (*Thunnus orientalis*), mero de manchas naranjas (*Epinephelus coioides*) y carpa herbívora (*C. idella*), en los cuales su filogenia se ha estudiado ampliamente (Rauta *et al.*, 2012; Wang y Secombes, 2013; Zou y Secombes, 2016). En la trucha (*O. mykiss*) se detectó expresión constitutiva de TNF- $\alpha$  en el timo, lo que sugiere que podría desempeñar un papel en la promoción del crecimiento de los timocitos (Hino *et al.* 2006).

Además, se ha sugerido que los miembros de la familia TNF- $\alpha$  de peces están involucrados en la regulación de la migración, homing, proliferación y localización de leucocitos (Sakai *et al.*, 2021; Zou y Secombes, 2016). También se ha descrito que TNF- $\alpha$  tiene un papel importante en la respuesta neuro- inmunoendocrina en peces (Rauta *et al.*, 2012).

Así mismo, varios estudios en peces han proporcionado evidencia directa que sugiere que TNF- $\alpha$  es un importante activador de macrófagos, lo que lleva a un aumento de la actividad respiratoria, la fagocitosis y la producción de óxido nítrico (Uribe *et al.*, 2011). Además, se ha probado que induce apoptosis siendo un mediador clave de las reacciones inflamatorias sistemáticas tanto agudas como crónicas (Rauta *et al.*, 2012).

#### **1.2.3.7. Factor de crecimiento transformante**

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) es una citocina pleiotrópica que tiene un papel inmunorregulador esencial en las vías inmunitarias innatas y adaptativas (Sayed *et al.*, 2022). En el contexto de las respuestas inmunitarias, la mayoría de los estudios se han centrado en la función de TGF- $\beta$  como una molécula impulsora de la diferenciación Th17 en combinación con otras citocinas (IL-6), además de mantener el entorno inflamatorio, suprimir la diferenciación de células Th1 y Th2. Pero también es una citocina inmunosupresora clave secretada por las células Treg (Ashfaq *et al.*, 2019; Sakai *et al.*, 2021; Zou y Secombes, 2016).

En peces se ha reportado que TGF-  $\beta$  pertenece a un gran grupo de citocinas multifuncionales, consta de tres isoformas, TGF-  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3. Se ha descrito que TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 son reguladores importantes de la diferenciación celular y también afectan el desarrollo, mientras que los efectos del TGF- $\beta$ 1 son principalmente inmunológicos, conocido como regulador negativo del sistema inmunológico. TGF- $\beta$  se ha caracterizado bien en una amplia variedad de vertebrados inferiores, con las tres isoformas de TGF-  $\beta$  encontradas en teleósteos

(Kapoor, 2009). En peces, se detectó TGF- $\beta$ 1 en tejidos asociados al sistema inmunitario, incluidos el bazo, el timo y el pronefro (Sayed *et al.*, 2022). Además, se ha informado de una isoforma de TGF- $\beta$  específica para peces (TGF- $\beta$ 6), aunque aún no se ha determinado el papel de esta molécula (Zou y Secombes, 2016). El TGF- $\beta$  es una citocina producida por varias células como fibroblastos, plaquetas, incluidas las células inmunitarias como macrófagos, regulando los estados activo e inactivo de los macrófagos y monocitos en condiciones específicas. Tiene un impacto significativo en la proliferación celular, la oncogénesis y la supresión de la respuesta inmunitaria, además de la supresión de las respuestas inflamatorias intestinales a los antígenos bacterianos (Sayed *et al.*, 2022).

#### **1.2.4. Factores que modulan al sistema inmunológico en peces**

La respuesta inmunitaria de los peces está influida por factores extrínsecos como los cambios ambientales naturales del agua, incluidos la temperatura, acidez, salinidad y el oxígeno disponible, la calidad del agua y densidad poblacional, además de los aditivos alimentarios, incluidos varios inmunoestimulantes y probióticos (Magnadottir, 2006, 2010; Uribe *et al.*, 2011). Así mismo, la respuesta puede verse influenciada por factores intrínsecos como la inmunocompetencia del pez, edad, maduración sexual y el estado fisiológico, además de los mecanismos inmunorreguladores propios del pez (Makesh, Bedekar y Rajendran, 2022; Somamoto y Nakanishi, 2022). Los mecanismos de comunicación entre los elementos del sistema inmunológico en peces son muy sensibles y están condicionados por su naturaleza poiquiloterma, así también pueden ser alterados por factores contaminantes presentes en el ambiente (bióticos y abióticos) (Al-Ghanim, 2012; Chen *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2013; Rauta *et al.*, 2012; Somamoto y Nakanishi, 2022; Tort, 2011). Un ejemplo son los plaguicidas, sustancias que pueden causar alteraciones estructurales o funcionales en la respuesta inmunológica innata o adaptativa de los peces, lo que conlleva entre otras cosas a un incremento en la susceptibilidad a infecciones, repercutiendo en el ecosistema acuático o bien en la producción pesquera (Blakley *et al.*, 1999).

### 1.3. Plaguicidas organofosforados

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

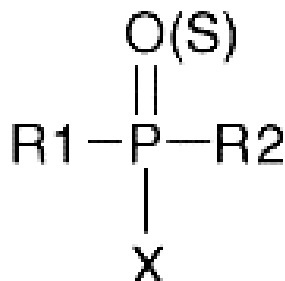
El uso de plaguicidas se ha incrementado debido a que son empleadas en el ámbito de la agricultura, en salud pública para la eliminación de vectores transmisores de enfermedades y plagas urbanas, así como, para la fabricación de jabones acaricidas y otras formulaciones de uso veterinario (OMS, 2018-a). Se estima que entre 2008 y 2012 se emplearon más de 10,000 millones de toneladas de plaguicidas, con un aproximado de 2,000 millones de toneladas usadas por año (EPA, 2017). En México, en el año 2021 se produjeron aproximadamente 59,000 toneladas (INEGI, 2021).

Estas sustancias se pueden clasificar en función de algunas de sus características principales, como su naturaleza, tipo de plaga que combaten, persistencia en el ambiente, peligrosidad para la salud, potencial carcinogénico y por su composición química. La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) sugiere su clasificación por su familia química, de acuerdo a esta los plaguicidas se subclasifican en compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, etc. (COFEPRIS, 2004).

Los plaguicidas organofosforados (POF) son ésteres del ácido fosfórico, en su estructura poseen un átomo de fósforo pentavalente y un característico enlace P=S o P=O. En el primer caso, se denominan “tiones”, los cuales son inhibidores pobres de la colinesterasa, no obstante, son capaces de penetrar las membranas biológicas más rápidamente que los oxones, los cuales se forman cuando el átomo que se une

al fósforo con el doble enlace es el oxígeno, estos compuestos denominados oxones, son potentes inhibidores de la colinesterasa y de otras esterasas.

Los POF en su estructura poseen dos sustituyentes alquil (R1 y R2) que comúnmente son grupos alcoxi, además poseen un grupo saliente (X), el cual es más fácil de ser hidrolizado (figura 4) (Costa, 2006; Gupta y Milatovic 2012).



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

Los POF son un grupo de insecticidas de amplio espectro extensamente utilizados en las actividades agrícolas y representan aproximadamente el 50% del uso mundial de plaguicidas (Casida y Quistad, 2004). En México, los POF son los plaguicidas más utilizados en actividades agropecuarias para el control de plagas debido a que tienen gran eficiencia contra su blanco (plagas) y limitada persistencia en el ambiente, sin embargo, el mal manejo de estas sustancias durante su almacenamiento, transporte, aplicación y eliminación causa efectos tóxicos sobre la salud de organismos no blancos (Al-Grahim, 2012; Carrera *et al.*, 2019). Según información publicada por el Centro Nacional de Información de Plaguicidas (NPIC) de los Estados Unidos (EE. UU.), los POFs más utilizados son clorpirifos, malatión, acefato, naled, dicrotofos, fosmet, forato, diazinón, dimetoato y azinfosmetil (EPA, 2017).

### 1.3.1. Diazinón

El plaguicida diazinón (CAS 333-41-5) (O, O-Dietil-O-(2-isopropil-6-metil-pirimidin-4-il) fosforotioato) (figura 5) es un POF utilizado ampliamente como insecticida para el control de plagas como moscas, ácaros, pulgas, garrapatas y plagas caseras (cucarachas, arañas y ratas), así como gusanos y otros insectos en cultivos agrícolas; es aplicado en el control de plagas del hogar, industria, campo y granjas, así como antiparasitario en la acuicultura, por lo cual existe una evidente preocupación del riesgo potencial a la salud humana, así como del daño ecológico causado por diazinón (ATSDR, 2008a; Khoshbavar-Rostami *et al.*, 2006; NRA 2002).

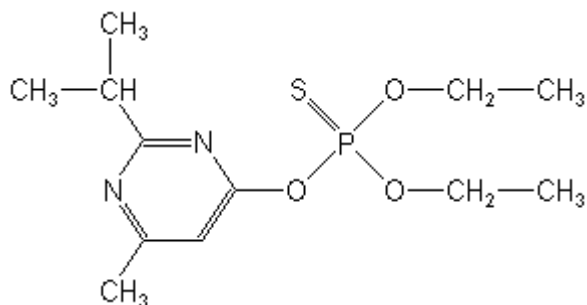


Figura 5. Estructura química de diazinón (Poet *et al.*, 2004)

#### 1.3.1.1. Características fisicoquímicas

La organización mundial de la salud (OMS) clasifica a diazinón como un plaguicida moderadamente peligroso (clase II). Mientras que, la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC) clasificó en 2018 a diazinón como un compuesto carcinogénico en animales y probable carcinogénico en humanos (grupo 2A). El tiempo de vida media de diazinón en el ambiente depende de las condiciones físicas y químicas del medio, en aire su vida media es de 1.5 h, mientras en suelo es de 2 a 4 semanas y en agua es de 5 a 15 días (INECC, 2021). De acuerdo con sus características fisicoquímicas presenta moderada absorción en suelo (Koc: 2.281), solubilidad en agua (40 ppm), baja volatilidad y moderada persistencia en el ambiente (ATSDR, 2008).



### 1.3.1.2. Contaminación ambiental

Aunque los beneficios del uso de plaguicidas son muchos, la dispersión de grandes cantidades al medio ambiente afecta negativamente a los ecosistemas, así como a la salud humana (Levy-Morales *et al.* 2017).

La FAO reportó que en el año 2013 se aplicaron 1.29 millones de toneladas de plaguicidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas y bactericidas). En México, se estima que en 2007 se comercializaron 100 000 toneladas de estos compuestos, equivalentes al 4 % del consumo mundial (FAO, 2017). Los plaguicidas más utilizados en México, en zonas como el estado de Nayarit y en la zona costera del Golfo de México corresponden principalmente a los compuestos de tipo insecticida, herbicida y fungicida (Leyva-Morales *et al.* 2014). Existe evidencia de la presencia de POF en diversos cuerpos de agua (García Hernández *et al.*, 2018; Leyva-Morales *et al.*, 2017), así como en granjas con actividad acuícola en el Pacífico Mexicano (García de la Parra *et al.*, 2014), en las cuales uno de los principales fue diazinón.

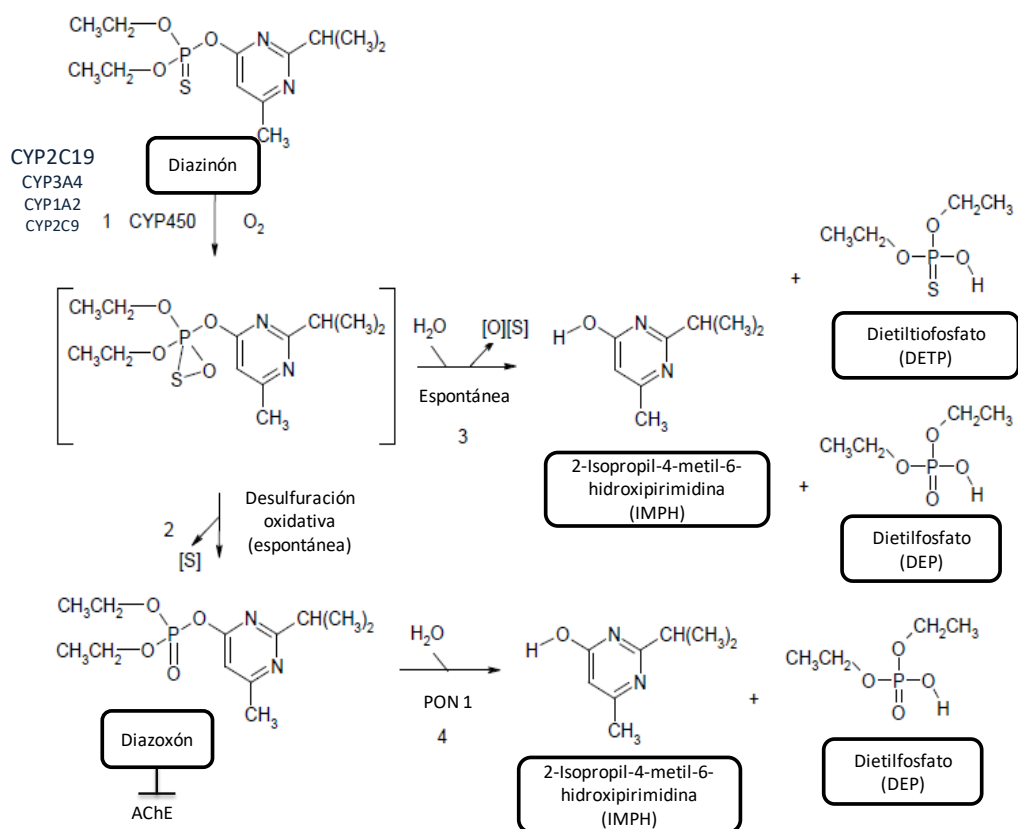
Una de las más importantes vías por las cuales los plaguicidas pueden entrar a estos sistemas es vía atmosférica o mediante transporte en el agua marina, lagunas costeras o estuarios. También se tiene que considerar la coexistencia de campos agrícolas con granjas acuícolas, la movilidad y propiedades de los plaguicidas, así como su forma de aplicación (García de la Parra *et al.*, 2014; INEC, 2022). Se estima que apenas 1% del plaguicida rociado llega al insecto o plaga en una aplicación aérea; otra porción se queda en el follaje, una más llega al suelo y puede filtrarse profundamente, incluso contaminar el agua subterránea (ATSDR, 2013). De esta manera, estas sustancias tóxicas pueden alcanzar de forma directa o indirecta los cuerpos de agua, afectando a organismos “no blanco” (mamíferos, anfibios, reptiles, aves, peces e invertebrados,) desbalanceando así las interacciones tróficas de los ecosistemas (Köhler *et al.*, 2013).

### 1.3.1.3. Toxicocinética y toxicodinamia

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

En vertebrados, la biotransformación de diazinón es un proceso que se lleva a cabo en distintas etapas que implican su bioactivación y detoxificación. Diazinón al ser un fosfotioato (P=S), es menos electronegativo y necesita de biotransformación, la familia CYP450 cataliza la desulfuración oxidativa para formar diazoxón (P=O) o 2-isopropil-4-metil-6-hidroxipirimidina (IMHP) y dietiltiofosfato (DETP) (figura 6). Es escasa la información del metabolismo completo de diazinón en peces, sin embargo, existe evidencia que demuestra homología entre los citocromos P450 en humanos y peces, principalmente CYP450 de la familia 1A. En este sentido la activación de diazinón al igual que en humanos se llevaría a cabo mayoritariamente en hígado por oxidación vía (CYP4501A) (Burkina *et al.*, 2017). Existen diversos estudios que evidencian la capacidad de diversos peces (trucha, carpa, guppy, pez zebra, tilapia, entre otros) para convertir el diazinón en diazoxón mediante desulfuración oxidativa por citocromo P450 y la posterior hidrólisis del oxón en microsomas hepáticos por A-esterasas.

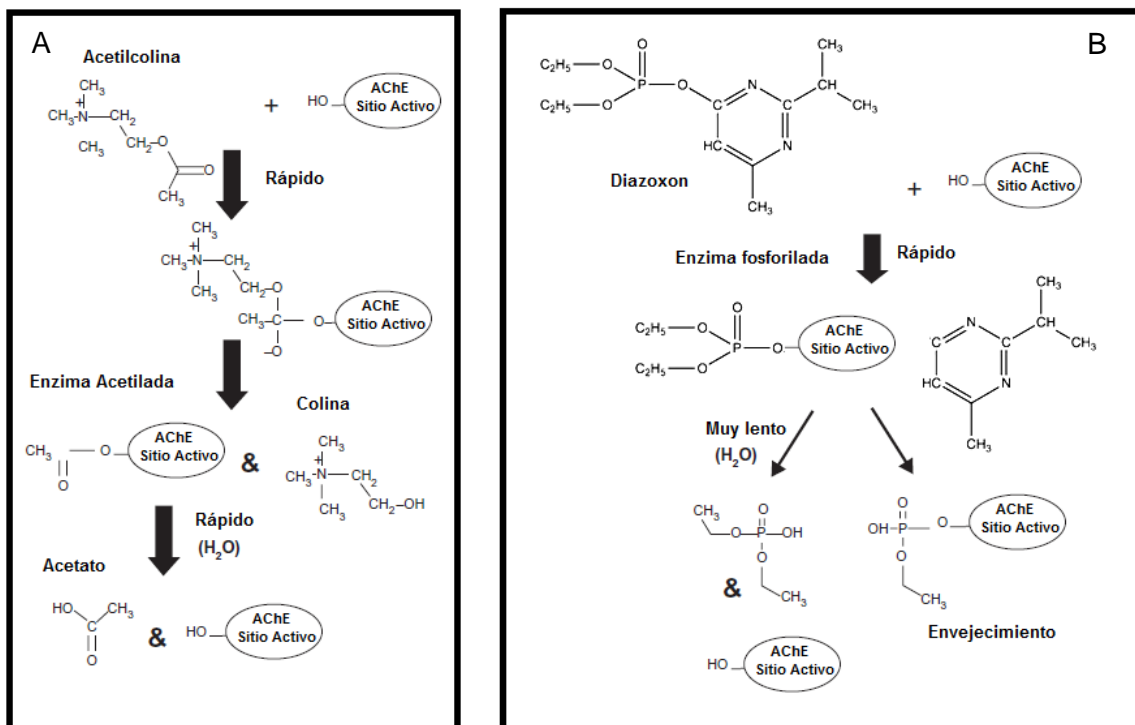
Por otra parte, también se ha reportado que, en estos organismos, tanto los compuestos padres como los oxones, pueden ser desactivados por conjugación con glutatión (Schlenk, 2005). Posteriormente, diazoxón es detoxificado por las enzimas hepáticas y extra-hepáticas A y B esterasas, formando IMHP y dietilfosfato (DEP) (Assis *et al.*, 2012; Kappers *et al.*, 2001; Poet *et al.*, 2004).



**Figura 6.** Mecanismo de biotransformación de diazínón en vertebrados (Kappers *et al.*, 2001).

### 1.3.1.4. Neurotoxicidad

El principal efecto tóxico de los POF es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7). Aunque diazinón es capaz de inhibir la actividad enzimática, diazoxón (análogo oxón) posee un mayor potencial de inhibición. Este efecto inhibitorio es llevado a cabo debido a que diazoxón compite con el neurotransmisor acetilcolina (ACh) por el sitio activo de la enzima AChE (figura 7). Debido a que el átomo central de fósforo del diazoxón muestra una deficiencia de electrones, provoca una configuración electrónica favorable para la atracción hacia el sitio estérico de la enzima AChE, la cual posee un excedente de electrones. Así el fósforo forma una unión covalente con grupo hidroxil de la serina presente en el sitio activo de la enzima, formándose un complejo enzimático con poca o nula actividad, lo que impide la hidrólisis de ACh y produce su acumulación en cantidades excesivas (Assis *et al.*, 2012; Durmaz *et al.*, 2006; Poet *et al.*, 2004).



**Figura 7.** Mecanismo de acción de la enzima AChE e inhibición inducida por diazoxón. Actividad de la enzima AChE en condiciones fisiológicas normales (A). Mecanismo de inhibición de la enzima AChE inducida por diazoxón (B) (Adaptado de Klaassen *et al.*, 2001).

La acumulación de ACh y la subsecuente sobre estimulación de los receptores muscarínicos (mAChR) y nicotínicos (nAChR), provoca efectos tóxicos en el sistema nervioso central y periférico (ATSDR, 2008). Sumado a lo anterior, el efecto crónico provocado por la exposición a POFs es la polineuropatía inducida por organofosforados (OPIDP), la cual se caracteriza por ataxia y parálisis músculo-esquelética. Estos signos aparecen de 2 a 3 semanas posterior a la exposición a POFs (Orient-López *et al.*, 2009).

En los peces, la intoxicación por diazinón provoca alteración en el nado, espasmos, hiperactividad, convulsiones y aumento de secreciones en branquias, afectando la fisiología de los organismos. Además, altera el índice de supervivencia, ya que disminuye la capacidad para alimentarse y de escape, lo que finalmente puede ocasionar la muerte del organismo (Banaee *et al.*, 2011).

#### **1.3.1.5. Inmunotoxicidad**

La presencia de POF en ecosistemas acuáticos tiene diversos efectos adversos, entre ellos la alteración en la respuesta inmunológica de los peces, resultando en susceptibilidad a infecciones (ATSDR, 2008a; Khoshbavar-Rostami *et al.*, 2006; NRA 2002).

En años recientes, se ha reportado que diversos POF, como clorpirifos, malatión, diazinón, entre otros, poseen un efecto inmunotóxico sobre diversos organismos, incluyendo los peces, pudiendo afectar al sistema inmunológico a diversos niveles, desde barreras físicas hasta mecanismos de respuesta innata y adaptativa (Banaee *et al.*, 2011; Díaz-Resendiz *et al.*, 2015; Girón-Pérez *et al.*, 2009; Kaya *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013; Soltani y Pourgholam, 2007). En el caso específico de los efectos inmunotóxicos de diazinón, se ha evidenciado que este plaguicida puede alterar parámetros humorales y celulares (tabla 2).

En el primer caso, se ha reportado que en beluga (*Huso huso*) expuesta de forma aguda a diazinón (1.5 mg/L), la actividad de lisozima incrementó significativamente en hígado y bazo (Khoshbavar-Rostami *et al.*, 2006).

Sin embargo, en carpa (*Ctenopharingodon idella*) expuesta de forma aguda a diazinón (2 y 5 mg/L), la actividad enzimática de lisozima disminuyó significativamente en pronefro y en plasma (Soltani y Pourgholam, 2007). Así mismo, existen reportes que mencionan que en tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuesta a diazinón (1.96 mg/L), los niveles plasmáticos de IgM incrementan significativamente en plasma (Girón-Pérez *et al.*, 2008). En lo que respecta a la influencia de POF en la respuesta de citocinas, en carpa (*Cyprinus carpio* L) expuesta 40 días a clorpirifos (1.16, 11.6 y 116 µg/L), se observa un incremento de la expresión de IL6, IL8 y TNF- $\alpha$ , tanto en bazo como en pronefro (Chen *et al.*, 2014). Por otra parte, se ha reportado que diazinón también puede alterar parámetros de la respuesta celular, existe evidencia que demuestra que la exposición en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y en carpa (*Cyprinus carpio*) provoca una disminución en leucocitos, mostrando una mayor disminución en el porcentaje de linfocitos, monocitos y basófilos (Ahmadi *et al.*, 2014; Banaee *et al.*, 2008).

Sin embargo, diazinón además de alterar el número de células, también afecta la morfología y funcionalidad, Dutta *et al.*, (1997) mencionan que en el pez *Lepomis macrochirus* posterior a la exposición a diazinón (15, 30, 45, 60 y 75 µg/L) se observan cambios en el tamaño de macrófagos presentes en riñón y bazo; en lo que respecta a la funcionalidad celular, Girón-Pérez *et al.*, (2009) señalan que diazinón afecta el índice de fagocitosis en esplenocitos de tilapia nilótica expuesta *in vivo* a concentraciones de 3.91 y 7.83 mg/L. Respecto al efecto sobre la capacidad proliferativa de los linfocitos, se ha reportado que ésta disminuye significativamente tras la exposición *in vivo* a diazinón (1.95, 3.91 y 7.83 mg/L) durante 96 h en tilapia nilótica (Girón-Pérez *et al.*, 2009; Girón-Pérez *et al.*, 2008; Girón-Pérez *et al.*, 2007).

**Tabla 2.** Efectos inmunotóxicos de diazinón en peces teleósteos

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

#### **1.3.1.5.1. Diazinón y susceptibilidad a infecciones**

La alteración de la respuesta inmune puede conducir a hipersensibilidad (respuesta exacerbada en la respuesta contra antígeno) inmediata o tardía, autoinmunidad, inmunoestimulación o inmunosupresión. Esto induce tolerancia a antígenos potencialmente dañinos, inespecificidad de reconocimiento antigénico, incremento de hipersensibilidad, inflamación, alergia, susceptibilidad a infecciones, aparición de linfomas y otros tumores (Galloway, 2003). En este sentido, los plaguicidas organofosforados pueden alterar las funciones inmunitarias y ocasionar fenómenos como inmunosupresión y alteración de la defensa del huésped frente a patógenos (Sunanda *et al.*, 2016).

Diazinón al igual que otros plaguicidas inducen mortalidad por necrosis o apoptosis, lo que puede deberse al aumento del estrés oxidativo generado, efectos observados en diferentes tejidos como hígado y branquias. Sin embargo, si este fenómeno afecta las células inmunes, como los leucocitos, esto podría llevar a una desestabilización de las funciones inmunes. De esta manera, la presencia de plaguicidas en el ecosistema acuático, así como el estrés por factores ambientales (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, etc.) contribuyen al aumento de la susceptibilidad a enfermedades ocasionada por bacterias oportunistas (Dietrich *et al.*, 2014; Marchand *et al.*, 2017), incluso pudiendo ocasionar la mortalidad de los organismos expuestos (Pucher *et al.*, 2014).



## 1.4. Sistema colinérgico

### 1.4.1. Sistema colinérgico neuronal

El sistema colinérgico está conformado por enzimas de síntesis como colina acetiltransferasa (ChAT, E.C. 2.3.1.6.), la molécula transmisora acetilcolina (ACh), elementos de almacenaje y transporte como las vesículas de ACh (VChA) y el transportador vesicular de ACh (VChAT), mAChR y nAChR, enzimas de degradación como AChE (E.C. 3.1.1.7) y colinesterasas no específicas como la butirilcolinesterasa (BChE, E.C. 3.1.1.8.), así como el transportador de colina (CHT) (Wessler y Kirkpatrick, 2001). Este conjunto de elementos, tiene un papel fundamental en el sistema nervioso, en regulación de eventos como: proliferación, diferenciación, neurogénesis, gliogénesis, maduración neuronal y plasticidad, desarrollo axonal y regulación de expresión génica (Abreu-Villaca *et al.*, 2011), por lo que se ha relacionado con procesos básicos del sistema nervioso como memoria y aprendizaje, así como en la activación de la placa neuromuscular, control de funciones viscerales y del tracto gastrointestinal (Bellier y Kimura, 2011; Bentley *et al.*, 2011; Deiana *et al.*, 2011; Graef *et al.*, 2011).

El neurotransmisor ACh, está presente a lo largo de la evolución en diferentes sistemas biológicos y se ha relacionado con la regulación de las funciones vitales de las células (Wessler y Kirkpatrick, 2001). ACh está ampliamente distribuida en el sistema nervioso central, tanto periférico, autonómico y entérico. Tiene un papel fundamental en sistema nervioso autónomo, siendo el principal neurotransmisor en las neuronas pre ganglionares tanto en sistema simpático como parasimpático, y como neurotransmisor en neuronas pos ganglionares en el sistema parasimpático (Abreu-Villaca *et al.*, 2011; Nizri y Brenner, 2013).

Este neurotransmisor es sintetizado en el citosol por la enzima ChAT, a partir de colina y acetil-coenzima A, cuando los valores oscilan entre 1 mM y 10  $\mu$ M, respectivamente. La colina requerida para la síntesis de ACh proviene de la dieta,

endosíntesis, hidrólisis de ACh, pero principalmente por el rompimiento de los fosfolípidos membranales que contienen colina (fosfatidilcolina). Mientras que, acetil-coenzima A, se origina a partir del piruvato y lactato, por acción del complejo piruvato deshidrogenasa en la membrana mitocondrial (Abreu-Villaca *et al.*, 2011; Wessler y Kirkpatrick, 2001). Una vez sintetizada, la ACh es tomada por el VACHT que utiliza un gradiente transvesicular de protones ligados a una ATPasa para la acumulación de ACh en las VACH (Deiana *et al.*, 2011). Cuando es necesaria la liberación, se activa una cascada de señalización de unión a la membrana que junto con factores solubles median su liberación de una forma altamente sincronizada, en función de los receptores postsinápticos, la actividad de colinesterasas y la concentración de ACh en el microambiente extracelular (Abreu-Villaca *et al.*, 2011; Wessler y Kirkpatrick, 2001).

Una vez liberada en el microambiente extracelular (ej. Sinapsis), dependiendo su localización, ACh para ejercer su acción, puede interactuar con nAChR o mAChR. Los nAChR son receptores del tipo ionotrópico, es decir que forman canales de iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), son pentaméricos conformado por unidades  $\alpha$  (2-10),  $\beta$  (2-4),  $\gamma$ ,  $\delta$  ó  $\epsilon$ , lo que permite una variabilidad de funciones con diferente afinidad por su ligando. Por otro lado, se han identificado cinco genes que codifican para cinco subtipos de mAChR denominados como M1, M2, M3, M4 y M5. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores metabotrópicos, debido a que interaccionan con proteínas G (Abreu-Villaca *et al.*, 2011; Carruthers *et al.*, 2015; Deiana *et al.*, 2011; Drever *et al.*, 2011). Estos receptores modulan canales de iones, así como pasos claves en la cascada de señalización intracelular, como es la activación del flujo de iones, movilización de calcio intracelular, incremento de cGMP, liberación de óxido nítrico (NO), activación de tirosina quinasas, proteínas G y MAPK (Picciotto *et al.*, 2012; Wessler y Kirkpatrick, 2001).

Por lo tanto, los receptores colinérgicos juegan un papel importante en la modulación de la proliferación y diferenciación celular, organización del citoesqueleto, regulación de expresión génica, activación de canales y

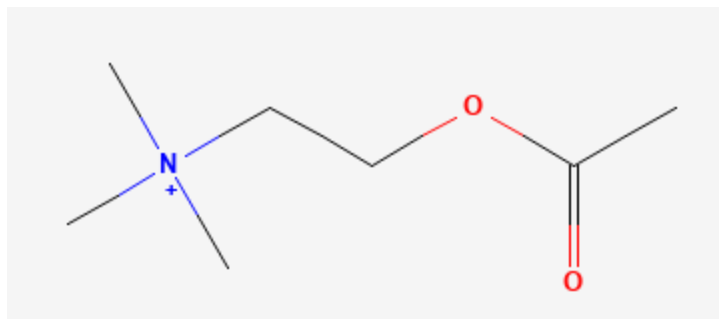
transportadores. Puntualmente, a nivel de sistema nervioso modula la formación y maduración de sinapsis, desarrollo axonal y liberación de neurotransmisores (Abreu-Villaca *et al.*, 2011).

La actividad colinérgica termina cuando la ACh es hidrolizada por la enzima AChE o BChE, produciendo colina y acetato, regulando de esta manera la concentración extracelular de ACh. Además de su actividad enzimática, AChE tiene propiedades importantes en el desarrollo del SNC, como adhesión, crecimiento de neurita, formación de circuitos e incluso en procesos apoptóticos (Abreu-Villaca *et al.*, 2011). AChE se encuentra principalmente en cerebro, músculo, eritrocitos y neuronas colinérgicas (Schetinger *et al.*, 2000), mientras que BChE está presente en diferentes tejidos como intestino, hígado, riñón, corazón, pulmón y suero (Bodur y Layer, 2011; Scacchi *et al.*, 2011).

Una vez hidrolizada la ACh, la colina producida de la hidrólisis, es recuperada rápidamente por el CHT, hacia la célula presináptica, lo que favorece la continua síntesis de ACh (Abreu-Villaca *et al.*, 2011). Este transportador posee una alta afinidad por colina ( $K_m \sim 1 - 2 \mu M$ ) y su actividad es influenciada por un gradiente electroquímico de sodio (Black y Rylett, 2012). El CHT está localizado predominantemente en compartimientos intracelulares, pasando por un ciclo entre estos compartimientos y la membrana celular, para posteriormente ser internalizado, esto es un proceso altamente controlado, el cual es activado solo cuando se necesita incrementar la síntesis de ACh (Black y Rylett, 2012).

#### **1.4.1.1. Acetilcolina**

El neurotransmisor ACh es un éster de ácido acético y colina (figura 8) (PubChem, 2023). La ACh posee importancia evolutiva y filogenética, se ha descrito que muchos de los componentes del sistema colinérgico están presentes desde organismos unicelulares hasta mamíferos (Wessler *et al.*, 1999).



**Figura 8.** Estructura química de acetilcolina (PubChem, 2023)

#### 1.4.1.2. Acetilcolinesterasa

La AChE es una enzima con alta actividad catalítica en la hidrólisis de la acetilcolina, que es un importante neurotransmisor en los sistemas nerviosos central y periférico. La AChE no solo juega un papel crítico en la modulación de la neurotransmisión colinérgica, sino que también es una enzima importante durante el desarrollo neurológico que se asocia con una variedad de trastornos neurológicos, como enfermedades neurodegenerativas y ciertos trastornos neuromusculares. La AChE también es un biomarcador de uso común para evaluar la neurotoxicidad de ciertos contaminantes (Gupta, 2004). Se ha utilizado durante mucho tiempo para monitorear la contaminación de POF y carbamatos debido a la inhibición directa e irreversible de estos compuestos sobre la actividad enzimática de la AChE (Xie *et al.*, 2021).

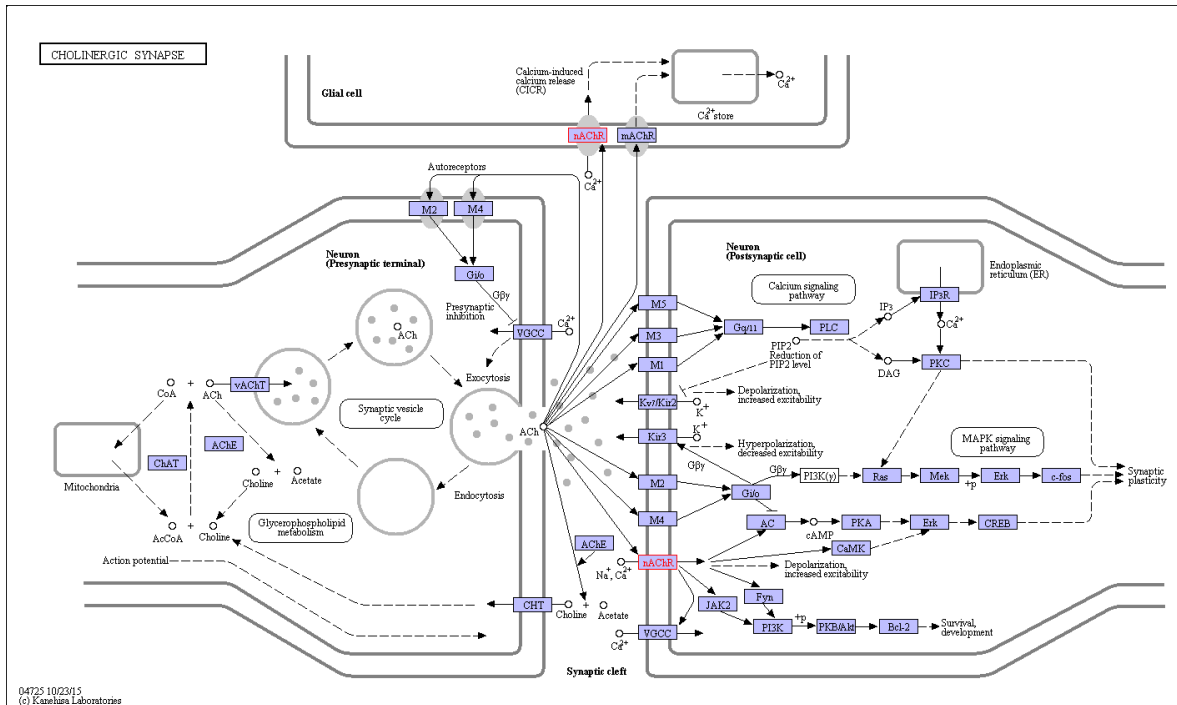
#### 1.4.1.3. Receptores de acetilcolina

##### *Receptores nicotínicos de acetilcolina*

Los nAChR son receptores ionotrópicos que se encuentran preferentemente en la placa neuromuscular. Estos receptores son proteínas de membrana formadas por 5 subunidades, conformados por combinaciones de subunidades  $\alpha$  (2-10),  $\beta$  (2-4),  $\gamma$ ,  $\delta$  o  $\epsilon$ , lo que permite una variabilidad de funciones con diferente afinidad por su ligando. En este sentido, existen dos formas de clasificarlos: 1) homo pentaméricos,

que contienen subunidades iguales, principalmente  $\alpha 7$ , el cual es sumamente permeable a  $\text{Ca}^{2+}$ . 2) Heteropentamérico, que contiene subunidades diferentes ( $\alpha 2 - 6$  y  $\beta 2 -4$ ), el cual es menos permeable (Abreu-Villaca *et al.*, 2011; Qian *et al.*, 2011).

Estos receptores constituyen una macro molécula con dominios extracelulares con regiones amino terminal que forma el receptor de alta afinidad para ACh, y un dominio que atraviesa la membrana formando un canal iónico permeable a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Para la transmisión colinérgica, dos moléculas de ACh se unen a la porción amino terminal de la subunidad  $\alpha$ , el receptor sufre un cambio conformacional que resulta en la apertura del canal, así los iones  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  fluyen a través de un gradiente electroquímico que finalmente resulta en la despolarización de la célula efectora. Los nAChR mediante la modulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , son capaces de regular eventos como la activación de segundos mensajeros y la inducción de expresión de genes, debido a que permite la fosforilación de CREB (figura 9). Este receptor se relaciona con la regulación del crecimiento neuronal, diferenciación y la formación de sinapsis durante el desarrollo, así mismo, es de vital importancia en procesos de aprendizaje y memoria (Abreu-Villaca *et al.*, 2011; Deiana *et al.*, 2011; KEGG, 2000).

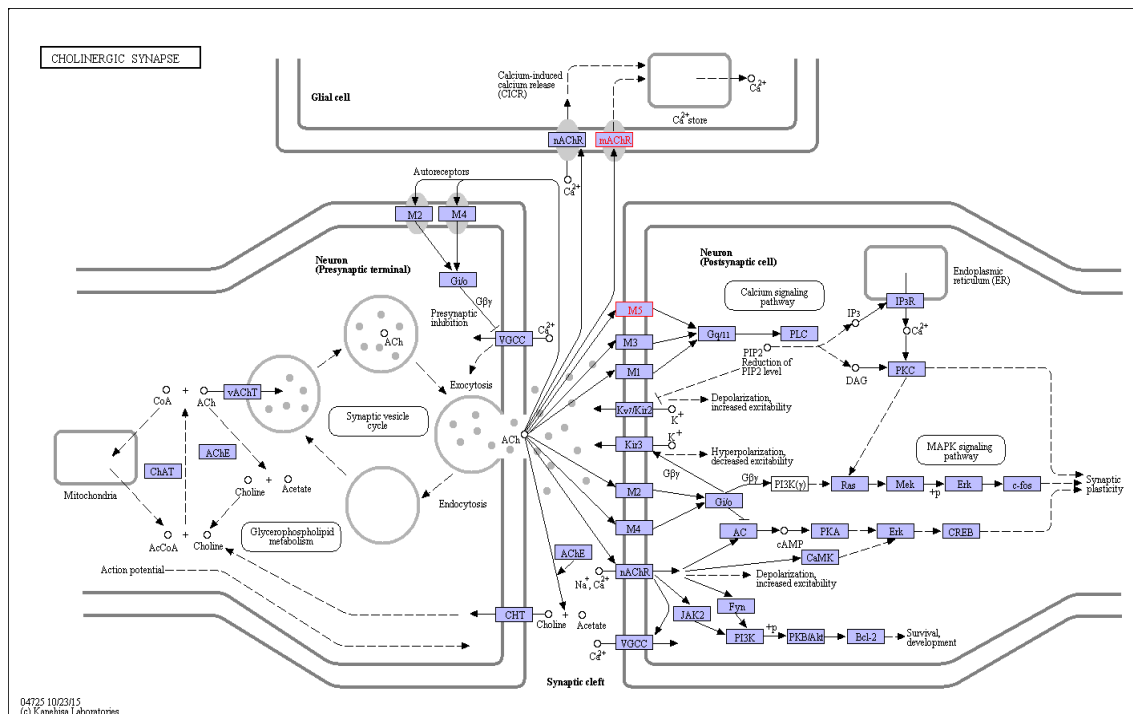


**Figura 9.** Señalización del nAChR en la sinapsis colinérgica. AC: adenilato ciclasa; ACh: acetilcolina; AChE: acetilcolinesterasa; Bcl-2: célula-B CLL/linfoma 2; ChAT: colina acetil transferasa; CHT: transportador de colina; ERK: MAPK cinasa; JAK2: cinasa Jano 2; nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina; PI3K: fosfoinositol 3-cinasa; PKA: proteína cinasa A; PKB: proteína cinasa B; vAChT: vesículas transportadoras de acetilcolina. Tomado de KEGG (2000).

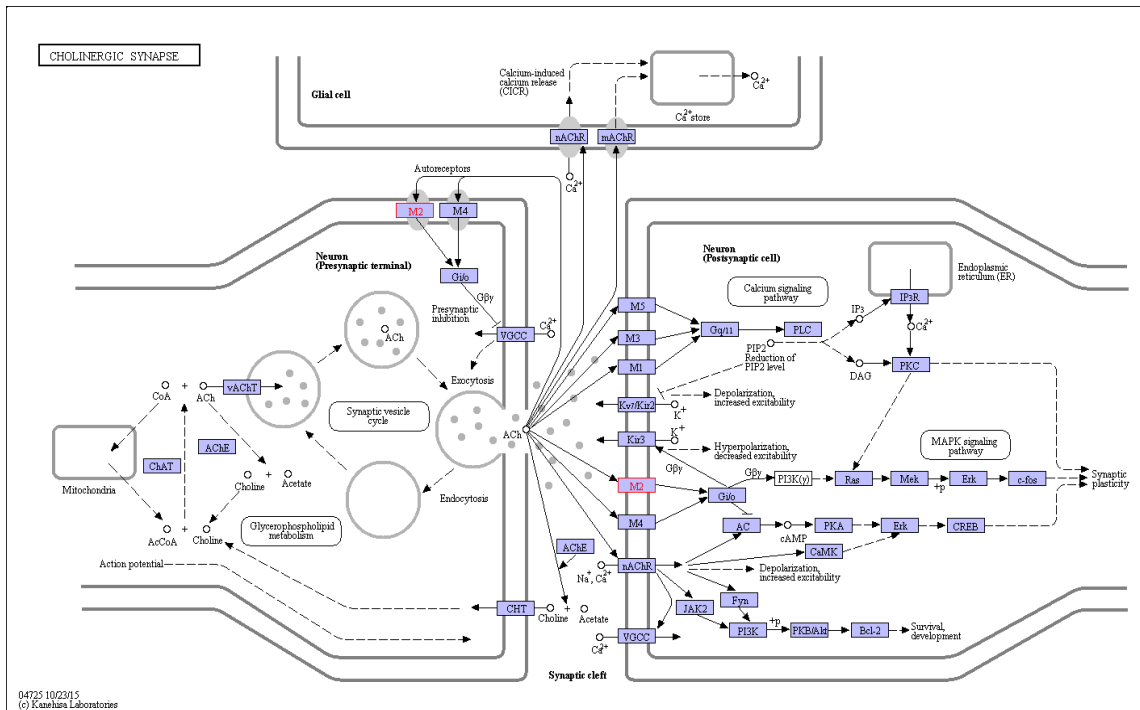
## Receptores muscarínicos de acetilcolina

Los mAChR pertenecen a la familia de receptores metabotrópicos, se componen de una proteína con siete dominios transmembranales, el tercer dominio se ubica en la zona intracelular y es el que le da la funcionalidad característica a cada subtipo de receptor debido a que es el dominio que interacciona con la proteína G. Diferentes vías de señalización se activan dependiendo del subtipo de mAChR. En el caso de los receptores M2 y M4 se encuentran en neuronas pre y post sinápticas, están acoplados a una proteína Gi/o y después de la estimulación, provocan la inhibición de adenil ciclasa, lo que provoca una disminución de cAMP. Mientras que, M1, M3 y M5 se encuentran en neuronas postsinápticas, están acoplados a una proteína Gq/11, activa fosfolipasa C (PLC), lo que provoca la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilgriceol (DAG), a su vez, IP3 moviliza  $Ca^{2+}$  y DAG que activa proteína cinasa C (PKC) (figura 10) (Abreu-Villaca *et al.*, 2011; Carruthers *et al.*, 2015; Deiana *et al.*, 2011; Drever *et al.*, 2011).

A



B



**Figura 10.** Señalización de los subtipos de mAChR excitatorios M1, M3 y M5 (A) e inhibitorios M2 y M4 (B) en la sinapsis colinérgica. AC: adenilato ciclasa; ACh: acetilcolina; AChE: acetilcolinesterasa; Bcl-2: célula-B CLL/linfoma 2; ChAT: colina acetil transferasa; CHT: transportador de colina; DAG: diacilglicerol; ERK: MAPK cinasa; IP3R: Receptor de inositol trifosfato; JAK2: cinasa Jano 2; mAChR: receptor muscarínico de acetilcolina; PI3K: fosfoinositol 3-cinasa; PKA: proteína cinasa A; PKC: proteína cinasa C; PLC: fosfo lipasa C; vAChT: vesículas transportadoras de acetilcolina. Tomado de KEGG (2000).

### Receptores colinérgicos neuronales en peces

En lo que respecta a la presencia de receptores colinérgicos en peces óseos, Seo *et al.* (2009) demostraron mediante secuenciación que los peces teleósteos poseen los genes de 4 de los subtipos de mAChR (M2-M5) pero no M1. En peces se sugieren diversas funciones de los distintos tipos de mAChR al ser estimulados; el mAChR M2 se asocia en la regulación de la frecuencia cardiaca en estados de hipoxia en la larva del pez zebra (*D. rerio*), induciendo la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular que dirige una señalización nuclear y sobre regula la expresión de algunos genes. Mientras que, los mAChR M3 y M5 están acoplados a PLC, que

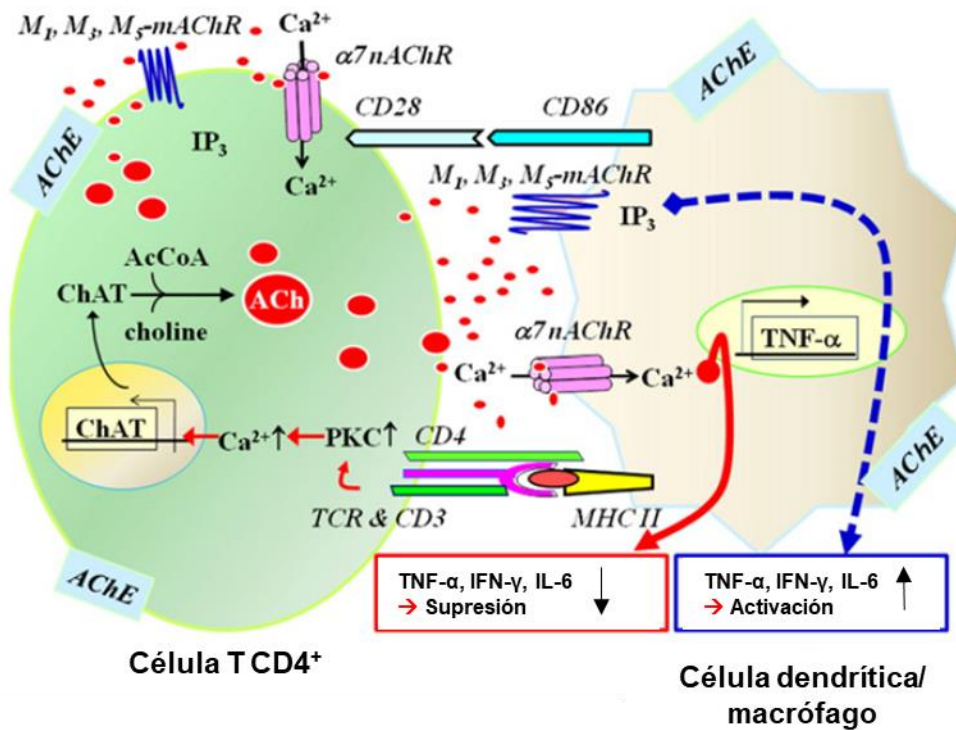


ayuda a la síntesis de NO, cGMP e induce citotoxicidad (Steele *et al.*, 2007), además se han realizado esfuerzos para comprender el papel de estos receptores en la contracción en músculo liso, como tejido intestinal de peces óseos como la tilapia (Seo *et al.*, 2009).

En lo que respecta a los nAChR, en el pez zebra (*D. rerio*), se expresan los nAChR funcionales  $\beta 3$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 7$ , estos receptores muestran un alto grado de similitud con los receptores presentes en mamíferos (Ackerman *et al.*, 2009; Bencan y Levin, 2008; Zirger *et al.*, 2003). Por otro lado, la enzima AChE se ha caracterizado en tejido cerebral de diferentes peces tropicales, como pirarucu (*Arapaima gigas*), cobia (*Rachycentron canadum*) y tilapia nilótica (*O. niloticus*) (Assis *et al.*, 2012).

#### **1.4.2. Sistema colinérgico leucocitario**

El término "sistema colinérgico no neuronal" se refiere a la síntesis de ACh en células no neuronales (Wessler *et al.*, 1999), es decir, que células epiteliales, endoteliales y del sistema inmune (linfocitos, macrófagos, mastocitos, eosinófilos y neutrófilos) poseen la maquinaria bioquímica necesaria para sintetizar *de novo* ACh y responder ante su estímulo, independientemente de la inervación neuronal (Abreu-Villaca *et al.*, 2011; Kawashima y Fujii, 2000) (figura 11).



**Figura 11.** Papel del sistema colinérgico en leucocitos Diagrama esquemático que ilustra las funciones del sistema colinérgico linfocítico en la regulación inmunitaria. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tienen capacidad para la síntesis de ACh catalizada por ChAT que se activa durante la interacción con células presentadoras de antígenos (células dendríticas) y macrófagos, mediante la adhesión de célula a célula. La ACh liberada de las células CD4<sup>+</sup> en el microambiente durante la interacción actúa sobre los mAChR y los nAChR expresados en la membrana plasmática de las células liberadoras y en las células adyacentes que interactúan. La estimulación de los mAChR M1/M5 aumenta la producción de citocinas proinflamatorias, lo que lleva a elevaciones en la IgG sérica. Por el contrario, la señalización de α7 nAChR regula a la baja la producción de citocinas proinflamatorias, lo que conduce a una reducción de la IgG sérica. ACh, acetilcolina; AcCoA, acetil coenzima A; AChE, acetilcolinesterasa; ChAT, colina acetiltransferasa; IL-6, interleucina-6; IFN-γ, interferón-γ; IP<sub>3</sub>, inositol-1,4,5-trifosfato; mAChR, receptor muscarínico de acetilcolina; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; nAChR, receptor nicotínico de acetilcolina; PKC, proteína cinasa C; TCR, receptor de células T; TNF-α, factor de necrosis tumoral-α (modificado de Kawashima *et al.*, 2012).

En este sentido, se ha reportado que las células no neuronales muestran acetil-Coenzima A y colina (Wessler y Kirkpatrick 2008), así como la presencia de ChAT (Hanna-Mitchell *et al.*, 2007), además de actividad enzimática de ChAT y AChE (Abreu-Villaca *et al.*, 2011; Wessler *et al.*, 2003).

#### **1.4.2.1. Acetilcolina leucocitaria**

En lo que respecta a la presencia de este sistema en leucocitos, se evidenció la síntesis de ACh catalizada por ChAT principalmente en células T CD4<sup>+</sup> y en menor medida en células CD8<sup>+</sup>, células dendríticas, granulocitos y monocitos/macrófagos. La síntesis de ACh es un proceso altamente regulado en estas células, es necesaria la activación de células T mediante la presentación de antígeno vía receptor TCR/CD3 con la interacción con células presentadoras de antígeno, la activación de T CD4<sup>+</sup> por medio de ICAM-1 también aumenta la síntesis del neurotransmisor, lo anterior sugiere que la interacción célula-célula aumenta la actividad colinérgica en linfocitos. En leucocitos esta producción de ACh es modulada por PKA, PKC y la concentración de Ca<sup>2+</sup>. Se ha propuesto que la ACh es sintetizada cuando es necesaria y liberada directamente sin almacenarse (Kawashima *et al.*, 2012).

De esta manera, ACh contribuye en la regulación de funciones celulares básicas (actividad ciliar, secreción de agua, iones y moco, organización del citoesqueleto e interacción célula-célula) y en la modulación de funciones inmunes (liberación de citocinas, proliferación, activación y diferenciación) (Abreu-Villaca *et al.*, 2011; Kawashima *et al.*, 2012; Wessler y Kirkpatrick, 2008; Neuman *et al.*, 2007). Sin embargo, el efecto modulador de la ACh dependerá del repertorio de receptores colinérgicos expresado en las células, debido a que poseen diferentes mecanismos de señalización, lo que provocará cambios en el estado y función de cada célula, necesarios para sincronizar y balancear los eventos celulares (Qian *et al.*, 2011).

#### **1.4.2.2. Acetilcolinesterasa leucocitaria**

Se ha detectado actividad de AChE en leucocitos, como en células T y B. Se ha observado una modulación en la actividad de la enzima vía receptores M1/M5, pero de forma independiente con los nAChR. Lo que sugiere que la activación de las

células T mediante estímulo antigénico sobre regula la síntesis de ACh, la expresión de los mAChR y la degradación de ACh (Kawashima *et al.*, 2012).

#### **1.4.2.3. Receptores colinérgicos leucocitarios**

El sistema inmune puede regular sus funciones de manera autocrina y paracrina a través de vías de señalización colinérgicas, aunado a esto numerosa evidencia demuestra que los receptores colinérgicos se expresan prácticamente de forma constitutiva en células del sistema inmune de humanos y modelos mamíferos: neutrófilos (Bany *et al.*, 1999; Dulis *et al.*, 1978; Profita *et al.*, 2005), eosinófilos (Blanchet *et al.*, 2007; Watson *et al.*, 2014), basófilos (Watson *et al.*, 2014), mastocitos (Chahdi *et al.*, 1998; Masini *et al.*, 1983; Masini *et al.*, 1985; Nemmar *et al.*, 1999), monocitos (Pahl *et al.*, 2006; Profita *et al.*, 2005), macrófagos (Gwilt *et al.*, 2007; Kawashima *et al.*, 2007; Koarai *et al.*, 2012; Profita *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 1999) y linfocitos (Eva *et al.*, 1989; Fujii y Kawashima, 2001; Hellstrom-Lindahl y Nordberg, 1996; Kawashima y Fujii 2003; Kawashima *et al.*, 2012; Tayebati *et al.*, 1999; Tayebati *et al.*, 2002).

#### *nAChR leucocitarios*

En las células no neuronales, predominan nAChR heteropentaméricos compuestos por las subunidades  $\alpha 2$ - $\alpha 6$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$ ,  $\alpha 9$ - $\alpha 10$ , o compuesto de forma homopentamérica principalmente por  $\alpha 7$ . Los nAChR se han relacionado con una disminución de la producción de anticuerpos y de las citocinas proinflamatorias (Roshchina, 2010; Fujii *et al.*, 2007; Kawashima *et al.*, 2012). Se ha evidenciado que la respuesta inmune puede ser modulada por este receptor, pues el nAChR  $\alpha 7$  regula negativamente la expresión de TNF- $\alpha$  en macrófagos (Wang *et al.*, 2003), y mediante el uso de ratones KO e inmunización con ovoalbúmina (OVA) se evidenció su papel en la regulación negativa de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6, por lo que se podría mencionar su papel en la regulación de citocinas proinflamatorias (Fujii *et al.*, 2007).

Particularmente, en el caso de linfocitos T, la activación vía TCR modifica los receptores tanto a nivel de mRNA como de proteína, se ha reportado que en modelos murinos, en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, el estímulo vía TCR/CD3 induce la expresión de  $\alpha 4$  y  $\alpha 7$ , aumenta la de  $\alpha 5$ ,  $\alpha 10$  y  $\beta 4$ , disminuye la de  $\alpha 9$  y  $\beta 2$ , mientras que en linfocitos T CD8<sup>+</sup> aparece  $\alpha 4$  y  $\alpha 7$ , se aumenta  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 4$ , disminuye  $\alpha 10$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . Mediante el uso de agonistas (nicotina), antagonistas (mecamilamina) y activadores, se demostró que los nAChR polarizan la respuesta Th1 de los CD4<sup>+</sup>, mientras que producen la inhibición hacia una respuesta Th17 (Qian *et al.*, 2011). Por otro lado, en linfocitos B de ratones C57Bl/6J, se demostró que los nAChR se expresan de una forma diferencial dependiendo del estadio de maduración, mientras que en médula ósea predominan las subunidades  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$  (B220+IgM+), en bazo predomina la subunidad  $\alpha 7$ . Se sugiere que estas subunidades de nAChR ayudan a los linfocitos B durante el proceso de diferenciación y selección, pero que limitan su activación en un estado de maduración, debido a la relación con CD40 (Skok *et al.*, 2007).

#### *mAChR leucocitario*

La mayoría de los estudios revisados mencionan que los leucocitos en mamíferos expresan los cinco subtipos de mAChR (M1-M5), sin embargo, la intensidad de la expresión de cada subtipo depende del estado del sistema inmunológico (Kawashima y Fujii, 2004; Qian *et al.*, 2011). Se ha evidenciado que la respuesta inmune puede ser modulada por estos receptores y viceversa. Su estimulación causa cambios funcionales y bioquímicos en dichas células como aumento de citotoxicidad, proliferación celular, acumulación de IP3 e incremento de Ca<sup>2+</sup>, sobrerregulación de c-fos, aumento de NO e inducción en la transducción de señales de diversas citocinas. En linfocitos T, la activación vía TCR/CD3 modifica los receptores tanto a nivel de mRNA como de proteína, por ejemplo, se reportó el aumento de la expresión de M5 en linfocitos CD4<sup>+</sup>, mientras que en linfocitos T CD8<sup>+</sup> se aumenta la expresión de M1 y M4, y disminuye M3 (Qian *et al.*, 2011).

Por otro lado, mediante el uso de ratones KO, se evidenció que los receptores M1 o M5 no están involucrados en la respuesta antiviral de los T CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, se ha evidenciado el papel de M1 y M5 en la producción de citocinas pro inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) y la producción de anticuerpos (IgM) (Fujii *et al.*, 2003). En este sentido y de una manera más detallada, se demostró que en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, la señalización de ACh promueve el desarrollo de una respuesta Th2 y Th17, pues mediante el uso de agonistas (muscarina) y activación vía TCR/CD3 se demostró el incremento en la expresión de IL-10 e IL-17, inhibición de la secreción de IFN- $\gamma$ , efectos que son bloqueados con antagonistas de los receptores (atropina) (Qian *et al.*, 2011). Mientras que, la activación de células B con estímulos antigénicos aumenta la expresión de M5, por lo que se sugiere que la activación inmunológica de linfocitos facilita la transmisión colinérgica, aumentando la síntesis de ACh y la expresión de M5 (Fujii *et al.*, 2003).

#### **1.4.3. Regulación colinérgica de la respuesta inmune en peces**

Los componentes del sistema colinérgico no neuronal y su papel inmunomodulador en peces aún está poco estudiado. Los primeros reportes fueron publicados por Flory y Bayne (1991), los cuales demostraron en trucha (*O. mykiss*), que el carbacol (agonista muscarínico) incrementa las células productoras de anticuerpos. Mientras que, estudios en pez tenca (*Tinca tinca*) mostraron que la exposición a ACh induce una reducción de tejido esplénico, efecto que se revierte con tratamientos con atropina (antagonista muscarínico) (Nilsson *et al.*, 1975). Recientemente, se demostró que en células mononucleares de bazo de tilapia nilótica, existe actividad de AChE y presencia de mAChR y nAChR, además que estas células poseen ACh y que su acumulación provoca cambios en la cantidad de los AChR, a nivel de proteína (Toledo Ibarra *et al.*, 2016). Los estudios antes mencionados evidencian la presencia de un sistema colinérgico no neuronal en células del sistema inmune y su capacidad de respuesta ante el estímulo del neurotransmisor.

## 2. Antecedentes

En el ambiente, existen contaminantes que pueden causar una disrupción de la comunicación neuroinmune, como los POF, los cuales inhiben la enzima AChE, aumentando así la concentración de ACh y sobreestimación los mAChR y nAChR. Diazinón y su metabolito diazoxón, poseen efectos neurotóxicos ampliamente estudiados, sin embargo, este plaguicida también tiene efectos tóxicos sobre el sistema inmunológico, alterando tanto parámetros de inmunidad humoral como celular. Sin embargo, el mecanismo de toxicidad aún no es claro (Díaz-Resendiz *et al.*, 2014; Galloway y Handy, 2003; Li, 2007).

Se ha propuesto que esta alteración podría atribuirse al sistema colinérgico no neuronal presente en las células del sistema inmunológico (Charoenying *et al.*, 2011). Girón-Pérez *et al.* (2008) sugieren que este plaguicida no tiene efecto inmunotóxico directo, debido a que en estudios *in vitro*, la exposición a diazinón (1, 2, 5 y 10 ppm) o su metabolito diazoxón (5, 10 y 20 ppm) no altera la proliferación de linfocitos de tilapia. Sin embargo, al evaluar *in vitro* la proliferación de linfocitos después de exponerlos a 40 y 80  $\mu$ M de ACh (concentraciones similares a las alcanzadas en exposiciones *in vivo* a diazinón), se observó que la alta concentración de este neurotransmisor disminuye significativamente la proliferación de linfocitos. Así mismo, se ha reportado que la exposición *in vivo* a diazinón (3.97 mg/L) de tilapia nilótica, provoca en células mononucleares de bazo, inhibición de la actividad de AChE y acumulación de ACh, lo que tiene efecto directo sobre los AChR, que se reduce significativamente su concentración (Toledo-Ibarra *et al.*, 2016). Por lo tanto, debido a que diazinón tiene como molécula blanco la enzima AChE y provoca un incremento de los niveles de ACh, la existencia de un sistema colinérgico no neuronal en linfocitos, los hace susceptibles a la perturbación por POF (Charoenying *et al.*, 2011).

Así mismo, se ha reportado el efecto tóxico de diazinón sobre los mecanismos de señalización intracelular, demostrando que la exposición al plaguicida, induce desregulación del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y fosforilación de ERK1/2, e induce apoptosis y senescencia celular (Díaz-Reséndiz *et al.*, 2019, 2020). Covantes *et al* reportaron la inducción en la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Covantes-Rosales *et al.*, 2020), formación de ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y disminución de la actividad fagocítica (Covantes-Rosales *et al.*, 2019), derivada de la exposición *in vivo* con diazinón. Evidenciando de esta manera, los efectos subletales de la exposición *in vivo* a diazinón sobre los mecanismos de inmunidad innata celular de leucocitos del pez tilapia nilótica, la cual es la primera línea de defensa frente a microorganismos patógenos.

De esta manera, la información generada *in vivo* e *in vitro*, permitió generar una hipótesis sobre un mecanismo indirecto de inmunotoxicidad de los POF, en el cual se sugiere que está involucrando al sistema colinérgico no neuronal (sistema colinérgico leucocitario).



### **3. Planteamiento del problema**

Los POF son sustancias usadas comúnmente para el control de plagas y vectores de enfermedades. Sin embargo, estas sustancias tienen efectos neuro e inmunotóxicos. Actualmente, no está claro el mecanismo por el cual los POF afectan el sistema inmune de los organismos expuestos a estas sustancias; sin embargo, se sugiere que el sistema colinérgico linfocitario (no neuronal) podría estar involucrado en los fenómenos de inmunosupresión y otras alteraciones inmunológicas provocadas por estas sustancias. De esta manera, el presente proyecto propone estudiar la expresión de receptores colinérgicos linfocitarios, así como de citocinas pro y anti-inflamatorias producidas por esplenocitos expuestos a diazoxón, principal metabolito de diazinón (uno de los POF más utilizados en el mundo). Así, los datos obtenidos permitirán sugerir un posible mecanismo de inmunotoxicidad mediado por mecanismos moleculares colinérgicos propios del sistema inmune.

### **4. Hipótesis**

Las células mononucleares expuestas *in vitro* a diazoxón aumentan la expresión de mAChRs e inducen la expresión de citocinas pro inflamatorias.

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición *in vitro* a diazoxón sobre el sistema colinérgico y las citocinas pro y antiinflamatorias en células mononucleares de bazo (CMB) de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

### 5.2. Objetivos específicos

- I. Determinar la concentración de ACh y la actividad enzimática de AChE en CMB de la tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuestas *in vitro* a diazoxón.
- II. Determinar la expresión de nAChR ( $\beta 2$ ) y mAChR (M2-5) en CMB de la tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuestas *in vitro* a diazoxón.
- III. Determinar la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-35, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ) en CMB de tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuestas *in vitro* a diazoxón.
- IV. Determinar la expresión de nAChR ( $\beta 2$ ) y mAChR (M2-5) en CMB de la tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuestas *in vitro* a agonistas y antagonistas de AChR.
- V. Determinar la expresión la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-35, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ) en CMB de tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuestas *in vitro* a agonistas y antagonistas de AChR.

## **6. Materiales y métodos**

### **6.1. Organismos de experimentación**

Los organismos de experimentación son peces machos adultos de la especie Tilapia nilótica (*O. niloticus*), los cuales se obtuvieron de una granja acuícola local. Los peces se mantuvieron durante un periodo de aclimatación de 4 semanas en tanques de 400 L a  $28 \pm 2$  °C con aireación constante, bajo condiciones óptimas (pH 8.0, oxígeno disuelto 6.0 mg/L), donde se alimentaron diariamente con alimento formulado de uso comercial (25% de proteína).

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la directiva 2010/63/UE del parlamento europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

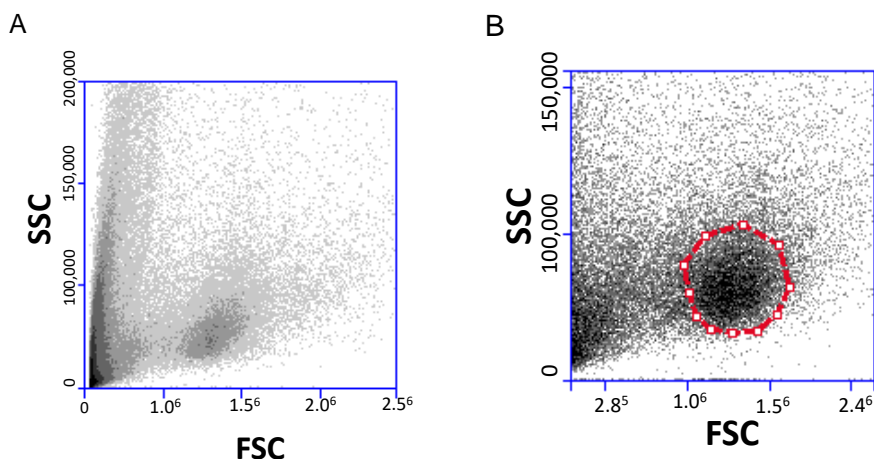
### **6.2. Aislamiento y cultivo celular**

#### **6.2.1. Preparación de muestra**

Una vez transcurrido el periodo de aclimatación, los organismos fueron sacrificados y desinfectados con alcohol al 75%, se obtuvo el bazo en condiciones estériles, se disgregó manualmente en 10 mL de PBS. Una vez homogenizado el tejido, las células mononucleares de bazo (CMB) fueron separadas por gradiente de densidad (histopaque 1077) a 2500 rpm por 20 minutos y lavadas a 3500 rpm por 15 min. Finalmente, el botón celular fue reconstituido en 1mL medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de antibiótico (penicilina y estreptomina).

### 6.2.2. Conteo y viabilidad celular

Las CMB fueron contadas con un citómetro de flujo, la población fue caracterizada mediante citometría de flujo por tamaño (FSC) y granularidad (SSC) (figura 12).



**Figura 12.** Paneles representativos de la identificación de la población de CMB por citometría de flujo, mediante tamaño (FSC) y granularidad (SSC). En el panel A se muestra las poblaciones presentes en la muestra de estudio. En el panel B se muestra un acercamiento de la población de estudio. La población de CMB se muestra identificada en rojo.

Una vez establecida la población de estudio en la plantilla del software, se procedió a realizar el conteo celular, el cual se determinó calculando el número de células presentes en 10  $\mu$ L de PBS, a partir de las cuales se realizaron los ajustes del número de células necesarias para el cultivo celular.

#### *Viabilidad celular*

Se calculó el porcentaje de viabilidad mediante tinción con yoduro de propidio (IP) aceptando un límite de 95% de viabilidad para los subsecuentes experimentos. Para lo cual,  $1 \times 10^6$  células/mL fueron centrifugadas a 1900 rcf durante 7 m. Después las células se lavaron con PBS frío. Al botón celular se adicionó 100  $\mu$ L del buffer de unión y 5  $\mu$ L de IP. La mezcla se dejó incubar por 15 min a temperatura ambiente protegiendo de la luz. Finalmente, las células se resuspendieron en 400  $\mu$ L de solución 1X y se analizaron en el citómetro de flujo con el láser de excitación de 488 nm. En el citómetro de flujo se recolectaron 10 000 eventos.

### 6.2.3. Cultivo celular

Se colocaron  $4 \times 10^5$  CMB viables en medio de cultivo suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y 1 % de antibiótico (penicilina y estreptomicina), lo anterior en un volumen final de 400  $\mu$ L por pozo en una placa estéril de 24 pozos, la cual se incubó a 28°C, 95% aire y 5 % CO<sub>2</sub> durante 24 h. La cantidad de CMB se estableció de acuerdo a las CMB necesarias para realizar la evaluación de la actividad de AChE y la extracción de mRNA.

### 6.3. Grupos experimentales

A las CMB en cultivo, se agregaron los estímulos correspondientes por triplicado de acuerdo a su grupo experimental.

- i. **Control basal:** Las CMB fueron incubadas en medio de cultivo (condiciones anteriormente descritas), pero sin ningún tipo de estímulo.
- ii. **Plaguicida:** Las CMB fueron incubadas con diazoxón.
- iii. **Agonista:** Las CMB fueron incubadas en presencia de agonistas para cada receptor, carbacol para mAChR y nicotina para nAChR.
- iv. **Antagonistas:** Las CMB fueron incubadas en presencia de antagonistas para cada receptor, atropina para mAChR y bungarotoxina para nAChR.

Para todos los reactivos (agonista, antagonista y diazoxón) se preparó una solución stock de acuerdo a las instrucciones del fabricante y a partir de esta se preparó una solución de trabajo las cuales fueron disueltas en medio de cultivo y agregados a las CMB en cultivo. Se realizaron cultivos independientes para cada tratamiento.

## 6.4. Exposición *in vitro*

### 6.4.1. Exposición *in vitro* a diazoxón

Las concentraciones de diazoxón se eligieron en base a su capacidad de inhibir la actividad de AChE (tabla 3). Las concentraciones de diazoxón (grado reactivo 97.3% pureza, Chem service) empleadas para los ensayos *in vitro* fueron 1 nM, 1µM y 10µM. En todos los casos los análisis correspondientes se evaluaron a 24h posterior a la exposición al estímulo.

**Tabla 3.** Criterios de selección de concentración de diazoxón

Grupo experimental	% de actividad de AChE (vs control)	Concentración	Tiempo de exposición
Plaguicida	100%	1 nM	24 h
	50 %	1µM	
	0%	10µM	

### 6.4.2. Exposición *in vitro* a agonistas y antagonistas de AChR

Las concentraciones y tiempos de exposición de los agonistas y antagonistas fueron definidas con base en curvas dosis respuestas mediante el flujo de Ca<sup>2+</sup> (tabla 4).

**Tabla 4.** Concentraciones y tiempo de exposición de agonistas y antagonistas colinérgicos

Grupo Experimental	Tratamiento	Concentración	Tiempo de Exposición
Agonista	Nicotina	1 µM	5 min
	Carbacol	1 µM	10 min
Antagonista	Atropina	1 µM	30 min
	Bungarotoxina	1 µM	10 min

## **6.5. Evaluación de actividad enzimática de AChE**

La actividad de AChE se evaluó en CMB de acuerdo al método descrito por Ellman (1961), en el que se utiliza ioduro de acetiltiocolina (ATC) como sustrato y ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) como indicador. Para lo cual,  $4 \times 10^{-5}$  CMB fueron lisadas y se le adicionó 1 mM de ATC y 10 nM de DTNB. La absorbancia fue determinada a 405 nm. La actividad enzimática fue calculada a partir de la diferencia de absorbancia ( $Abs_{t2} - Abs_{t1}$ ), donde  $t1$  = absorbancia al inicio de la reacción, mientras que  $t2$  = absorbancia obtenida a los 20 min.

## **6.6. Cuantificación de ACh**

### **Cuantificación de ACh mediante fluorescencia**

La determinación de la concentración de ACh en CMB se realizó con un kit comercial "Amplex® Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit" (Molecular Probes, Inc). Para cada determinación se utilizaron controles positivos y negativos de acuerdo a las instrucciones del kit. Para la determinación de ACh, se colocaron  $4 \times 10^{-5}$  CMB en una microplaca de 96 pozos para fluorescencia, se adicionó 100  $\mu$ L de solución de trabajo (peroxidasa de rábano (HRP) 2 U/mL; colina oxidasa 0.2 U/mL; AChE 1 U/mL). La mezcla (200  $\mu$ L) se incubó por 60 min a temperatura ambiente y protegida de la luz. La fluorescencia de la muestra se determinó a 530 nm de excitación y 590 nm de emisión en un lector de microplaca Synergy HT™. La fluorescencia de fondo fue eliminada restando los valores de los controles negativos. La concentración de ACh en la muestra se calculó utilizando una curva estándar de ACh (0.5-100  $\mu$ M) realizada siguiendo las instrucciones del kit (ver anexo 2).

## Cuantificación de ACh mediante LC-MS/MS

A partir de las CMB en cultivo, se cuantificó la concentración de ACh mediante LC-MS/MS, utilizando la metodología propuesta por Santos-Fandila *et al.* (2015). Para lo cual, la muestra se preparó con 1 % de ácido fórmico en metanol. Las muestras se agitaron a 8°C por 5 min a 13000 rpm, posteriormente se centrifugaron a 10°C y 14,000 rpm por 5 min. Finalmente, el sobrenadante se colocó en un vial de UHPLC. La separación cromatografía fue de la siguiente manera: Columnas UPLC BEH C18 (2.1mm x 100 mm, 1.7  $\mu$ m de tamaño de partícula) de Waters; la fase móvil consistió como solvente A en una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido fórmico en proporción de 900:100:1(v/v/v), como solvente B 0.1% (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo. 0.0-1.0 min, 5-50% B; 1.0 – 2.0 min, 50-90% B; 2.0–3.0 min, 95% B; y de nuevo 5% B en 1.0 min; el flujo fue 0.4mLmin<sup>-1</sup>; el volumen de inyección fue de 5 $\mu$ L; la temperatura de la columna fue de 25 °C; la temperatura de la muestra fue de 8 °C; el tiempo de corrida fue de 4min. Rutinariamente, se inyectó una curva de calibración. Se corrieron 3 controles de calidad (bajo, medio y alto) cada 15 inyecciones, con el fin de asegurar la validez de la calibración. El espectrómetro de masas en tándem fue operado en modo multiple reaction monitoring (MRM) y los cuadrupolos Q1 y Q3 se establecieron a una resolución de masa unitaria. Las condiciones de espectroscopia de masas fueron optimizadas mediante la infusión continua de soluciones estándar. El voltaje de pulverización de ionización por electroaspersión fue de 3000 V. Se utilizó nitrógeno como gas de desolvatación a 800 L min<sup>-1</sup> y gas auxiliar en el cono a 50 L min<sup>-1</sup>. La temperatura de la fuente fue de 120°C y la temperatura de desolvatación fue de 350°C. El argón fue utilizado como un gas de colisión a un flujo aproximado de 0.13 mL min<sup>-1</sup>.



## 6.7. Expresión génica de AChR y citocinas

### 6.7.1. Extracción de RNA

Transcurrido el tiempo de exposición para cada tratamiento,  $4 \times 10^{-5}$  CMB fueron cosechadas, se desechó completamente el medio y se separó el RNA total mediante el protocolo del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo (Trizol). Una vez realizada la extracción, el RNA fue resuspendido en agua libre de RNAsas y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El RNA total se cuantificó mediante un espectrofotómetro de micro volumen (Quawell-Q-3000) y se analizó la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa (1%).

### 6.7.2. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó mediante un kit de retrotranscripción (Taqman Reverse Transcription de *Applied Biosystem*), siguiendo las especificaciones del fabricante (tabla 5 y 6).

**Tabla 5.** Condiciones de reacción de retotranscripción

Reactivo	Volumen	Concentración final
Agua DEPC	Cbp	
RT buffer 10 x	2 $\mu\text{L}$	1x
dNTPS (2.5 mM c/u)	4 $\mu\text{L}$	0.5 mM c/u
10 mM DTT	1 $\mu\text{L}$	5.0 mM
25 mM $\text{MgCl}_2$	1.4 $\mu\text{L}$	1.75 mM
Inhibidor de RNAsa (20 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	1.0 U/ $\mu\text{L}$
RT multiscibe (50 U/ $\mu\text{L}$ )	1 $\mu\text{L}$	2.5 U/ $\mu\text{L}$
50 mM Oligo d (T)	1 $\mu\text{L}$	2.5 $\mu\text{M}$
RNA	cbp	<1 $\mu\text{g}$
Volumen final:	20 $\mu\text{L}$	

**Tabla 6.** Condiciones de corrimiento de retotranscripción

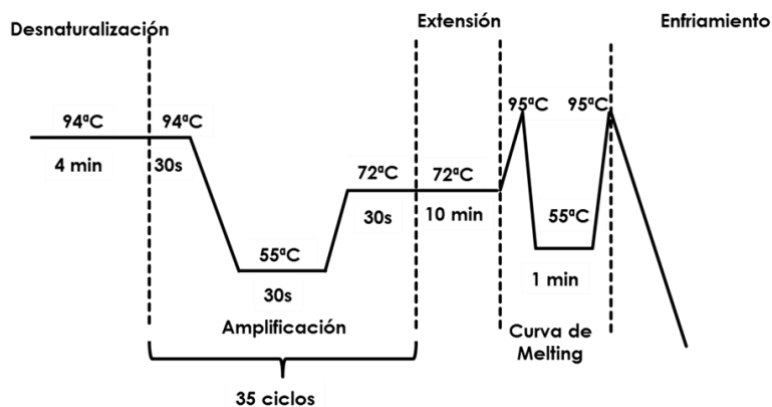
Temperatura	Tiempo
65°C	5 min
4°C	2 min
37°C	30 min
95°C	4 min
4°C	~

### 6.7.3. PCR tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó 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*. Para lo cual, una vez sintetizado el cDNA, este se mezcló con los reactivos indicados según las cantidades señaladas por el fabricante (tabla 7). Además de seguir las condiciones estándar de qPCR (figura 13), se realizaron curvas de disociación para cada producto de PCR (ver anexo 3), con el fin de detectar posibles amplificaciones no específicas o formación de dímeros de primers.

**Tabla 7.** Condiciones de reacción de PCR tiempo real

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Fast SYBR Green master mix	10 µL	
Forward primers	0.4 µL	200 nM
Reverse primers	0.4 µL	200 nM
cDNA	cbp	50 ng
Agua libre de RNAsas	cbp	
Volumen final:	20 µL	



**Figura 13.** Condiciones utilizadas para la amplificación de los genes de interés mediante PCR en tiempo real.

### Oligonucleótidos

Los primers específicos se diseñaron a partir de referencias en artículos científicos publicados o regiones conservadas de cada gen de AChR y citocinas, utilizando los softwares Primer 3 y PrimerBLAST (tabla 8). Los primers fueron sintetizados por la unidad de síntesis de oligos del instituto de Biotecnología (IBT).

**Tabla 8.** Características de oligonucleótidos para PCR tiempo real

Gen	Secuencia del primer (5'→3')	Longitud	Ref.
<b>Receptores colinérgicos</b>			
M2-F	GGCAGATCTCCAGAGCAAGCAAG	23	<i>Seo et al., 2009</i>
M2-R	TTGTTTCTCCTCTGGCCTGGTG	22	
M3-F	CTGGCGCATTTACAAGGAGACCC	23	<i>Seo et al., 2009</i>
M3-R	CTACCAGTTCCCGACATGTGCTC	23	
M4-F	TTTCTACCTACCTGTGGCCATCATG	25	<i>Seo et al., 2009</i>
M4-R	AGTGCCTGAGGTCTTCCTGCTG	22	
M5--F	CCAGGAGCAACGCGGTCAAATC	22	<i>Seo et al., 2009</i>
M5-R	TGGAAGCCTCCTGGAGACACTG	22	
Nb2-F	TGCTACAGATGGAGGGATGGG	21	XM_003450968
Nb2-R	TATCACACTCTTCGTCCCGC	20	

Citocinas			
IL-1 $\beta$ F	TGCTGAGCACAGAATTCCAG	20	Reda <i>et al.</i> , 2016
IL-1 $\beta$ R	GCTGTGGAGAAGAACCAAGC	20	
IL-6 F	ACACTTTTCCTCTGCGGTGAT	20	Primer BLAST
IL-6 R	AAGTCACCTGCCACACTTCC	20	
IL-10 F	TCAGTCCGTCTGAAGACTCCT	20	Primer BLAST
IL-10 R	GCAGAACCGTGTCCAGGTAA	20	
IL-12 F	GGCGGAAGATACTGGTG	17	Wang <i>et al.</i> , 2014.
IL-12 R	ACTTGTGTTGAGGTCAGGA	19	
IL-35 F	CAGGGTGCAGATCAGCTATG	20	XM_00343792.4
IL-35 R	AACCCCGGAATAGGTGCTTT	20	
TNF- $\alpha$ F	GCTGGAGGCCAATAAAATCA	20	Reda <i>et al.</i> , 2016
TNF- $\alpha$ R	CCTTCGTCACTCCAGCTC	20	
TGF- $\beta$ F	CCACTTCCATCCTAGATCTTTCC	21	Pierezan <i>et al.</i> , 2020.
TGF- $\beta$ R	CCACTTCCATCCTAGATCTTTCC	23	
Gen constitutivo			
EFL1-F	CAAGGAAATCCGTCGTGGATAC	20	Yang <i>et al.</i> , 2013
EFL1-R	ACGGCGAAACGACCGAGGGG	20	

### Calculo de la expresión relativa

El cálculo de la expresión relativa se realizó con el método de CT comparativo ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) propuesto por Livak y Schmittgen (2001), empleando el factor de elongación 1- $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) como gen constitutivo para la normalización de la expresión.

## **6.8. Determinación del flujo de Ca<sup>2+</sup> intracelular**

Para determinar el flujo de Ca<sup>2+</sup> intracelular se utilizó Fluo-4 NW Calcium Assay Kit. La determinación se realizó de la siguiente manera, 1x10<sup>6</sup> células/mL fueron centrifugadas a 1900 rcf durante 7 min, posteriormente el botón celular se lavó con PBS, se resuspendió en 300 µL de buffer C (1X HBSS, 20 mM HEPES) y se incubó por 10 min a 28 °C. Después se adicionó 300 µL de buffer A (Fluo-4 NW) y se incubó por 30 min a 28 °C. Finalmente, las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 30 min y se analizaron en el citómetro de flujo con el láser de excitación de 488 nm, durante 10 min.

## **6.9. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa SigmaPlot® (ver. 10.0). Se realizaron análisis de variancia de una vía (ANOVA). Se realizó la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples. Los datos no paramétricos se les realizó la prueba de Kruskal-Wallis, seguido de una comparación múltiple por el Método de Dunn. La diferencia estadística se determinó con nivel de significancia \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p≤0.001.

## 7. Resultados

### 7.1. Exposición *in vitro* a diazoxón

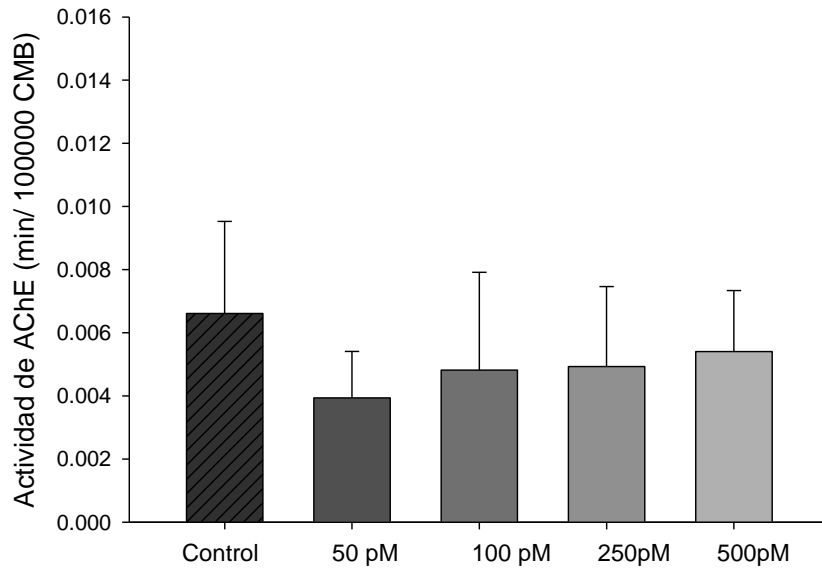
#### 7.1.1. Actividad enzimática de AChE

##### *Curva de exposición in vitro a diazoxón durante 1 h*

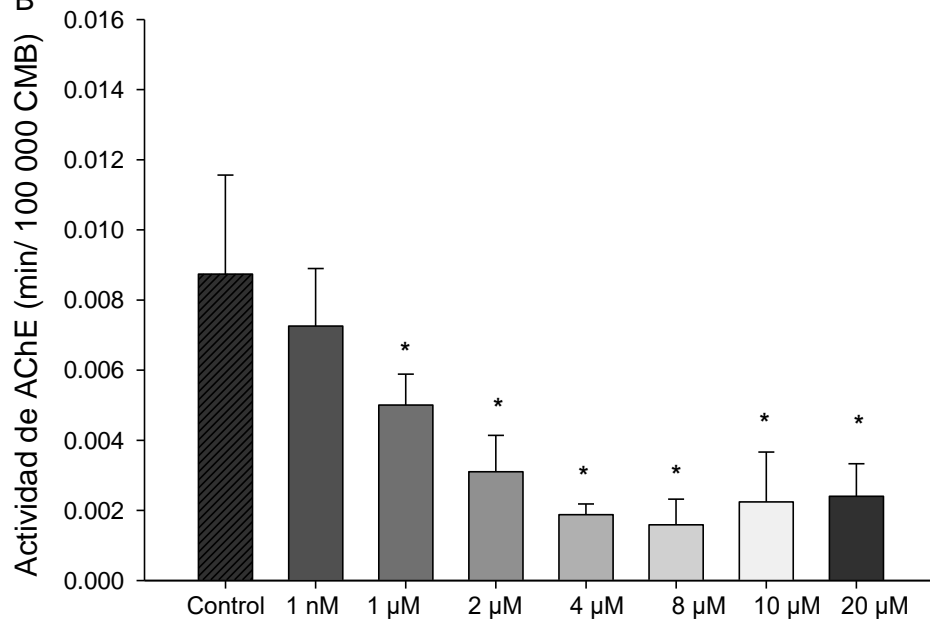
Primeramente, se realizaron curvas de exposición *in vitro* a diazoxón durante 1h, con el fin de conocer el rango de concentraciones capaces de inhibir la actividad enzimática de AChE en CMB. La primera curva se realizó en un rango de 50, 100, 250 y 500  $\mu\text{M}$  de diazoxón, concentraciones que no provocaron efectos significativos sobre la actividad de AChE (figura 14 A). Se realizó una segunda curva en un rango de concentración de 0.01, 1, 2, 4, 8, 10 y 20  $\mu\text{M}$  de diazoxón, los resultados obtenidos indican que existe una inhibición significativa ( $p < 0.05$ ) de la actividad enzimática a partir de 1  $\mu\text{M}$  hasta 20  $\mu\text{M}$  de diazoxón (figura 14 B).

Los resultados obtenidos se interpretaron como porcentaje de actividad, para hacer una comparación más clara de la capacidad de inhibición enzimática (tabla 9). Al establecer el porcentaje de actividad de las CMB control (basal) contra las CMB expuestas a diazoxón, se observa una disminución en la actividad de la enzima AChE de las CMB expuestas a todas las concentraciones de diazoxón evaluadas.

A



B



**Figura 14.** Actividad de AChE en CMB por la exposición *in vitro* a 50-500 pM (A) y 1 nM – 10 μM (B) de diazoxón durante 1 h. Cada barra representa la media  $\pm$  D.S. de n=6. ANOVA y prueba de Dunett. \* representa diferencia significativa vs control ( $p < 0.05$ ).

**Tabla 9.** Porcentaje de actividad de AChE en CMB por la exposición *in vitro* a diazoxón durante 1 h.

Concentración de diazoxón	% de actividad enzimática de AChE vs control
1 nM	83%
1 µM	57%
2 µM	35%
4 µM	21%
8 µM	18%
10 µM	25%
20 µM	27%

n=6 para cada concentración

*Curva de exposición in vitro a diazoxón durante 24 h*

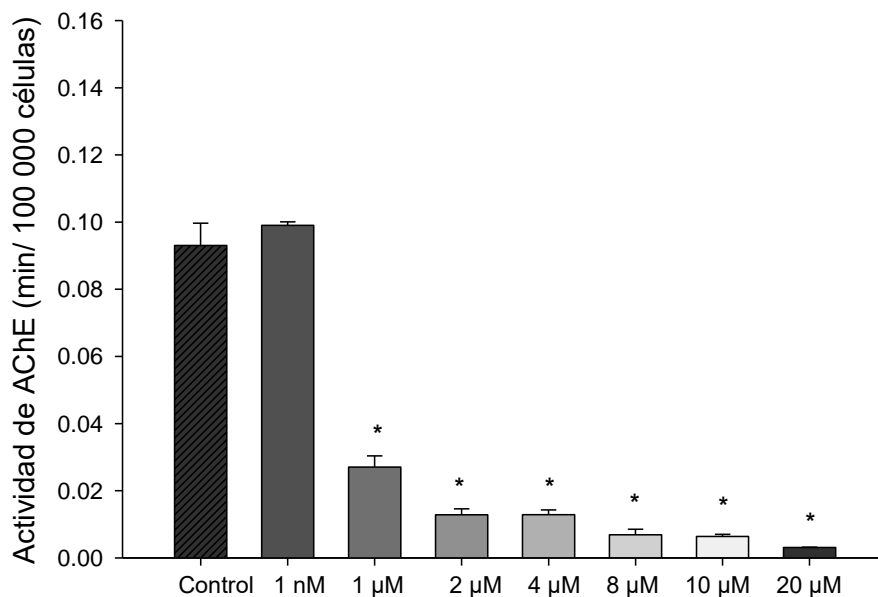
Partiendo de la curva de 1 h de exposición como referencia de concentración, se realizó la exposición *in vitro* a diazoxón durante 24 h. Los resultados indican que diazoxón induce inhibición de forma dosis-dependiente (significativa  $p < 0.05$ ) a las concentraciones de 1 µM hasta 20 µM de diazoxón (figura 15). Al realizar el análisis del porcentaje de actividad de las CMB control contra las CMB expuestas se observa disminución en la actividad desde la concentración 1 µM de diazoxón (tabla 10).

**Tabla 10.** Porcentaje de actividad de AChE en CMB por la exposición *in vitro* a diazoxón durante 24 h.

Concentración de diazoxón	% de actividad enzimática de AChE vs control
1 nM	100%
1 µM	29%
2 µM	13.8%
4 µM	13.8%
8 µM	7.4%
10 µM	6.9%
20 µM	3.3%

n=6 para cada concentración

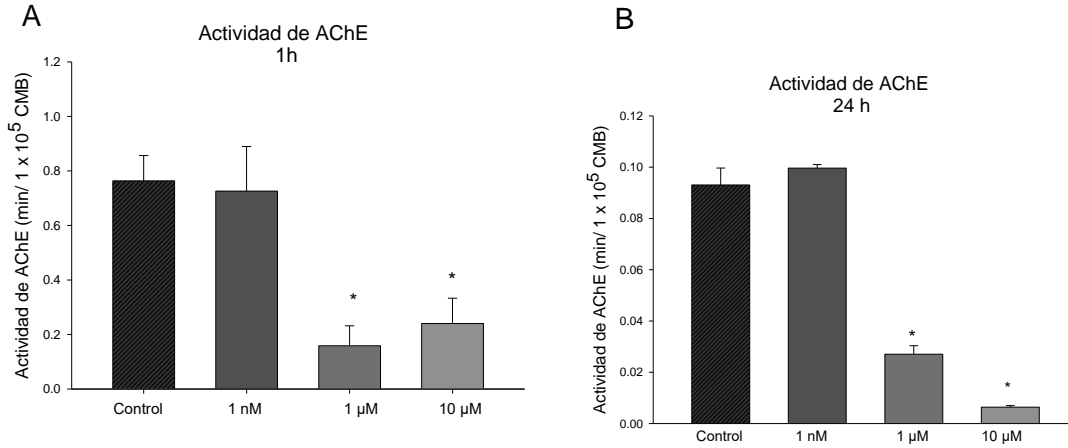




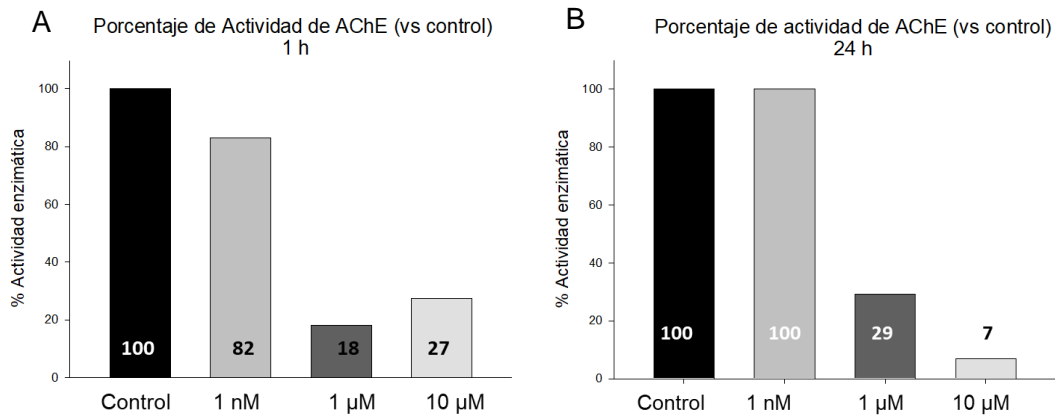
**Figura 15.** Actividad de AChE en CMB por la exposición *in vitro* a diazoxón durante 24 h. Cada barra representa la  $\pm$  S.D de n=6. ANOVA y prueba de Dunett. \* representa diferencia significativa vs control ( $p<0.05$ ).

#### *Evaluación de AChE en CMB expuestas in vitro a diazoxón*

Los resultados indican que la actividad enzimática de AChE disminuye significativamente ( $p<0.05$ ) debido a la exposición de a 1 y 10  $\mu\text{M}$  de diazoxón (figura 16); al realizar el análisis en porcentaje de actividad enzimática de las CMB control contra las CMB expuestas a diazoxón durante 24 h, no se observa disminución de la actividad de AChE a la concentración de 1 nM (100% de actividad), mientras que al tratamiento con 1  $\mu\text{M}$  de diazoxón se observa disminución parcial en la actividad (29% de actividad), de la misma forma, debido a la exposición de 10  $\mu\text{M}$ , la actividad enzimática disminuye fuertemente (7% de actividad) (figura 17 B).



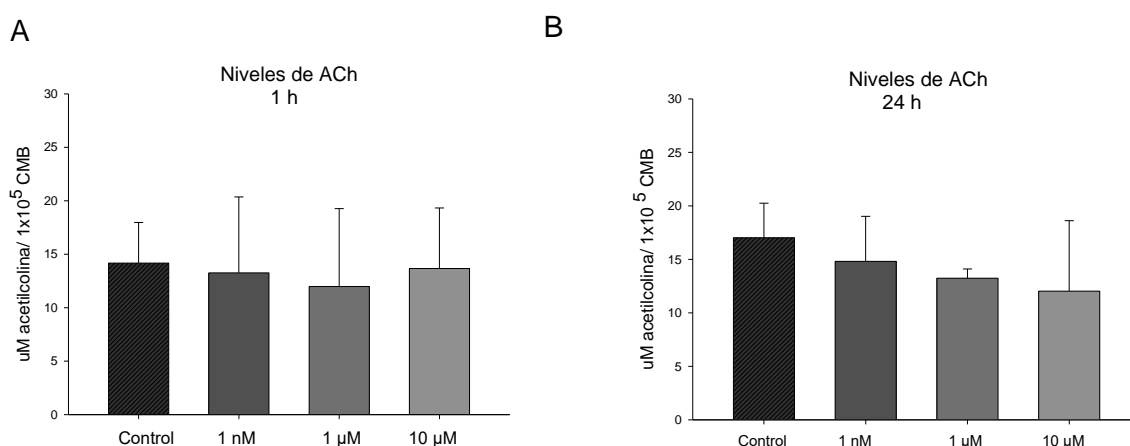
**Figura 16.** Actividad de AChE en CMB por la exposición *in vitro* a diazoxón durante 1 h (A) y 24 h (B). Cada barra representa la media  $\pm$  D.S. de n=6; ANOVA y prueba de Dunnett con 95% de confianza. \* representa diferencia significativa vs control ( $p < 0.05$ ).



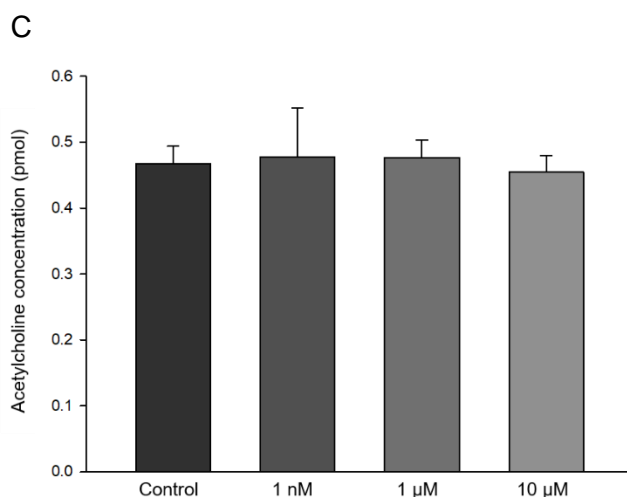
**Figura 17.** Porcentaje de inhibición de AChE en CMB expuestas *in vitro* a diazoxón durante 1 h (A) y 24 h (B). El porcentaje de inhibición de cada concentración se indica con numero en cada barra.

### 7.1.2. Cuantificación de ACh

La determinación, mediante fluorescencia, de la concentración de ACh presente en las CMB control y expuestas *in vitro* a diazoxón durante 1 y 24 h, no mostró diferencia significativa entre los tratamientos (figura 18). Así mismo, los análisis de LC-MS/MS confirman que no hay acumulación de ACh en las CMB tratadas con diazoxón comparado con el grupo control (figura 19), es decir, no se evidencia acumulación en los niveles de ACh, aun cuando existe inhibición enzimática de AChE (figura 16).



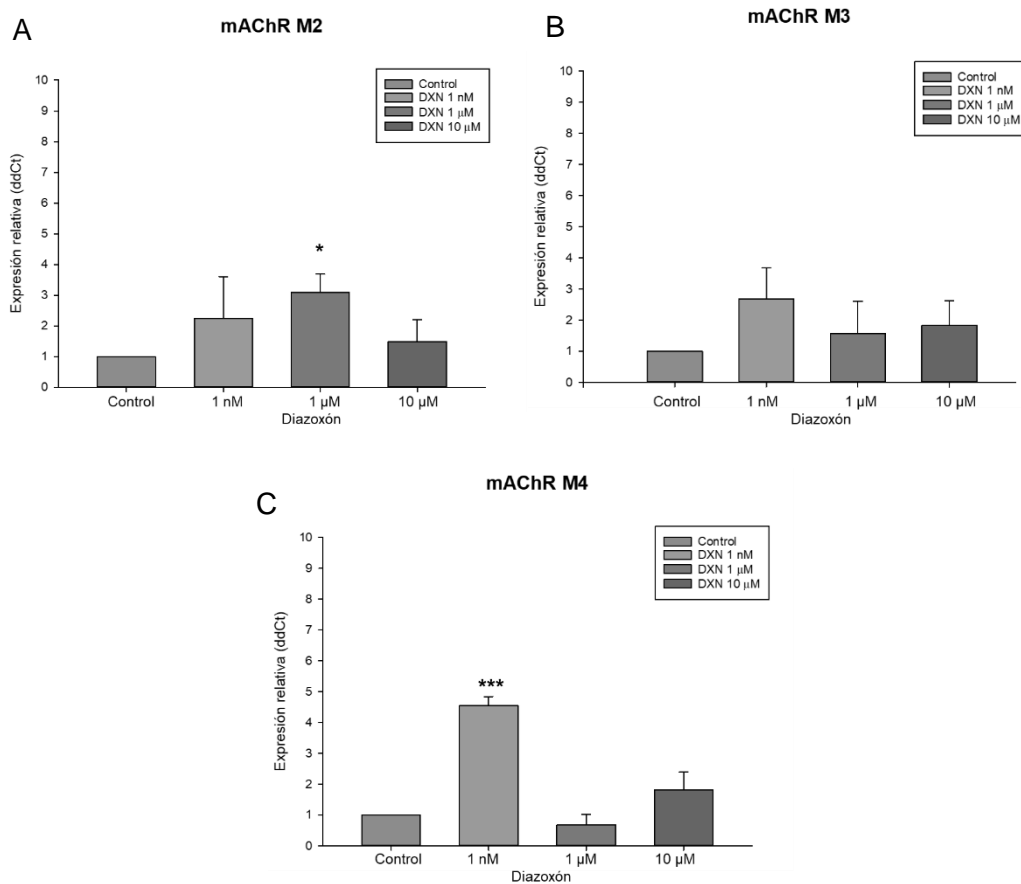
**Figura 18.** Concentración de ACh en CMB expuestas *in vitro* a diazoxón durante 1 h (A) y 24 h (B). Cada barra representa la media  $\pm$  D.S. de n=6.; ANOVA y prueba de Dunett con 95% de confianza.

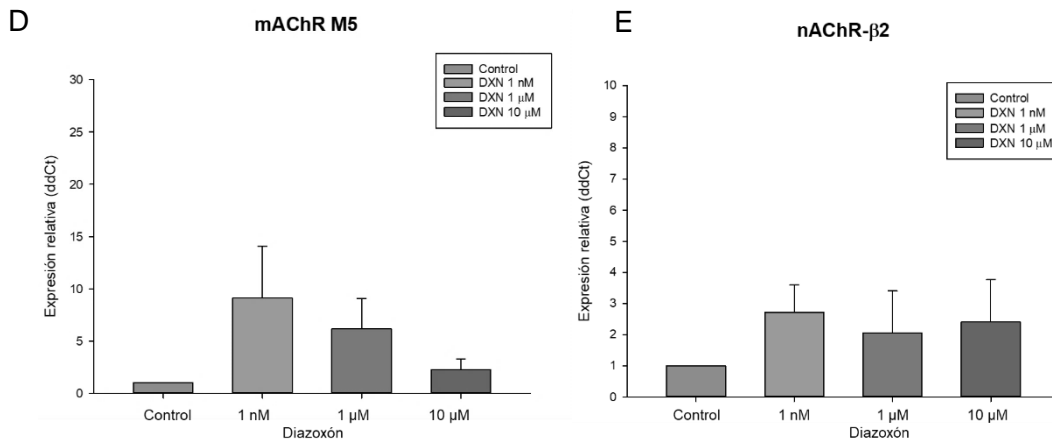


**Figura 19.** Concentración de ACh en CMB expuestas *in vitro* a diazoxón durante 24 h. Cada barra representa la media  $\pm$  D.S. de n=6; ANOVA y prueba de Dunett con 95% de confianza.

### 7.1.3. Expresión de AChR

En lo respectivo a la expresión de los AChR en CMB por efecto de la exposición *in vitro* a diazoxón, los resultados evidencian principalmente la alteración en el patrón de expresión de mAChR (Figura 20). En lo que respecta a mAChR M2, se observa un aumento significativo de la expresión en las CMB tratadas con 1  $\mu$ M de diazoxón respecto al control y a las concentraciones de 1 nM y 10  $\mu$ M de diazoxón (Figura 20 A). Mientras que, la expresión de mAChR M4 aumentó significativamente en las CMB expuestas a 1 nM, más no a las concentraciones de diazoxón (1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) con capacidad inhibitoria. (Figuras 20 C). En lo que respecta a mAChR M3 y M5, la expresión de ambos subtipos de receptores no se modificó bajo ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 20 B, D). En este mismo sentido, la expresión de nAChR  $\beta$ 2 no se modificó en las CMB expuestas a diazoxón (Figura 20 E).

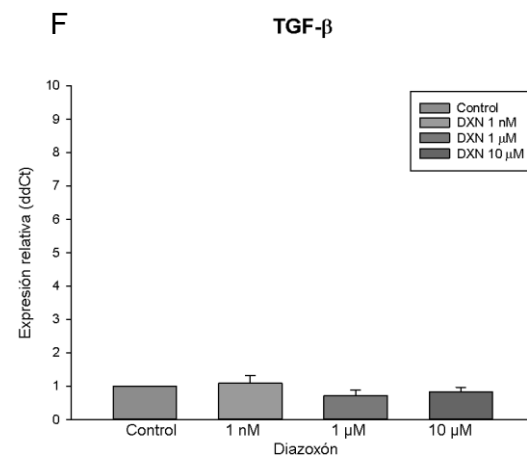
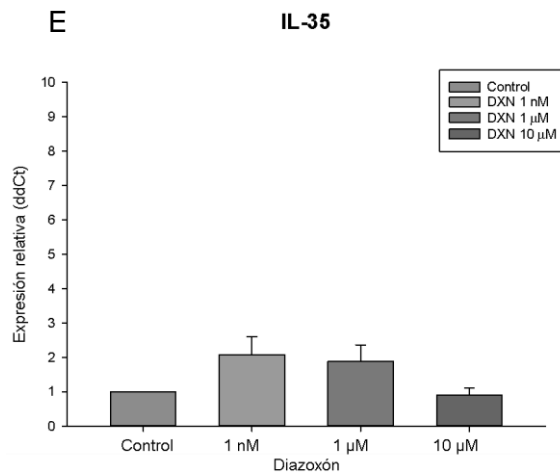
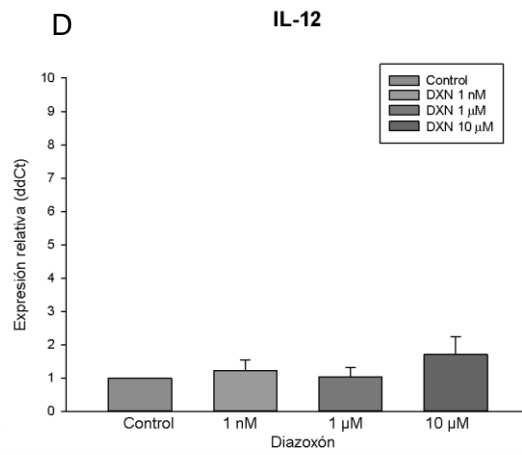
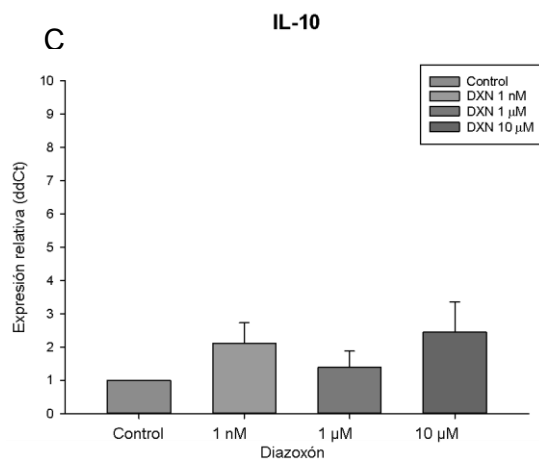
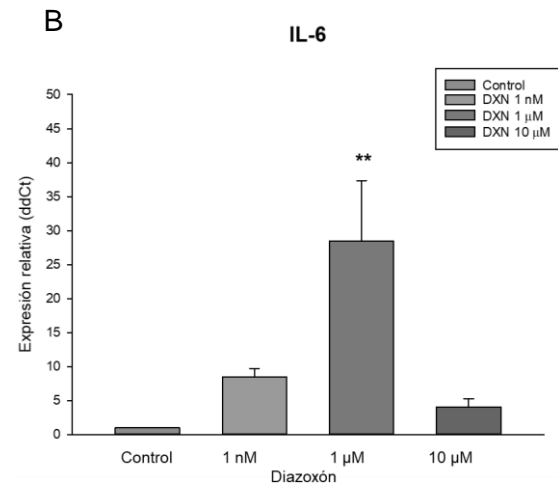
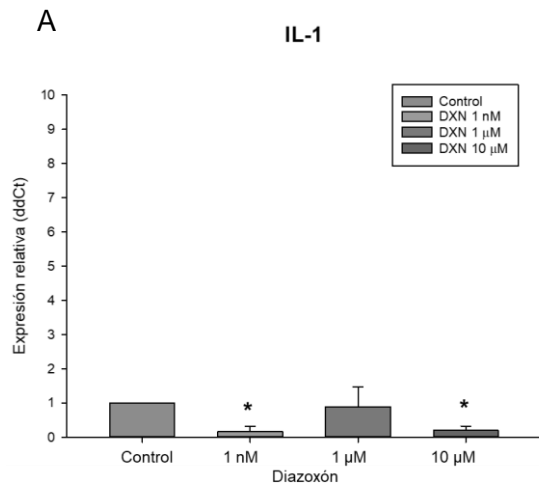


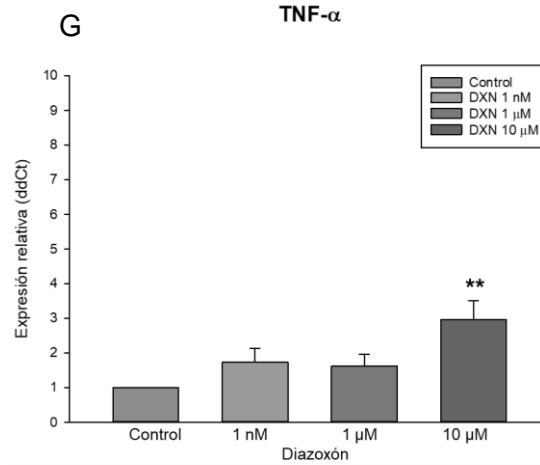


**Figura 20.** Niveles de expresión relativa de mAChR M2 (A), M3 (B), M4 (C), M5 (D) y nAChR β2 (E) en CMB expuestas *in vitro* a 1 nM, 1 μM y 10 μM de diazoxón durante 24h (la expresión fue normalizada con EF1-α). Cada barra representa la media ± SE de n=7. ANOVA en rangos (Kruskal-Wallis). Comparación múltiple versus control (Método de Dunn). \*Indican diferencia significativa respecto al control. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 7.1.4. Expresión de citocinas

A partir de las CMB expuestas *in vitro* a 1 nM, 1 μM y 10 μM diazoxón durante 24h, se evaluó la expresión relativa de las citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-35, TGF-β y TNF-α (figura 21). Los resultados evidencian una disminución significativa de la expresión de IL-1 en las CMB expuestas a 1 nM y 10 μM de diazoxón respecto al grupo control (figura 21 A). Mientras que, la expresión de IL-6 aumenta significativamente en las CMB expuestas a 1 μM de diazoxón, respecto al grupo control (figura 21 B). En el caso de la expresión de TNF-α, existe un aumento significativo en las CMB expuestas a 10 μM de diazoxón, respecto al grupo sin plaguicida (figura 21 G). En lo que respecta a las citocinas IL-10, IL-12, IL-35 y TGF-β, no se observa un cambio significativo por la exposición a diazoxón (Figura 21 C-F).





**Figura 21.** Niveles de expresión relativa de mRNA de las citocinas IL-1 (A), IL-6 (B), IL-10 (C), IL-12 (D), IL-35 (E), TGF- $\beta$  (F) y TNF- $\alpha$  (G) en CMB expuestas *in vitro* a 1 nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M de diazoxón durante 24h (la expresión fue normalizada con EF1- $\alpha$ ). Cada barra representa la media  $\pm$  SE de n=7. ANOVA en rangos (Kruskal-Wallis). Comparación múltiple versus control (Método de Dunn). \*Indican diferencia significativa respecto al control. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 7.1.5. Viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular de las CMB del grupo control como expuesta *in vitro* a diazoxón. Los resultados indican que el diazoxón a las concentraciones evaluadas no altera la viabilidad celular (tabla 11).

**Tabla 11.** Viabilidad de CMB tras la exposición a diazoxón durante 24 h.

	Control	1 nM	1 $\mu$ M	2 $\mu$ M	4 $\mu$ M	8 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M
Viable	98.7	98.4	98.2	98.6	98.8	99.1	98.7	99.1
No viable	1.3	1.6	1.8	1.4	1.2	0.9	1.3	0.9

n=5 para cada concentración. La viabilidad se representa en porcentaje.

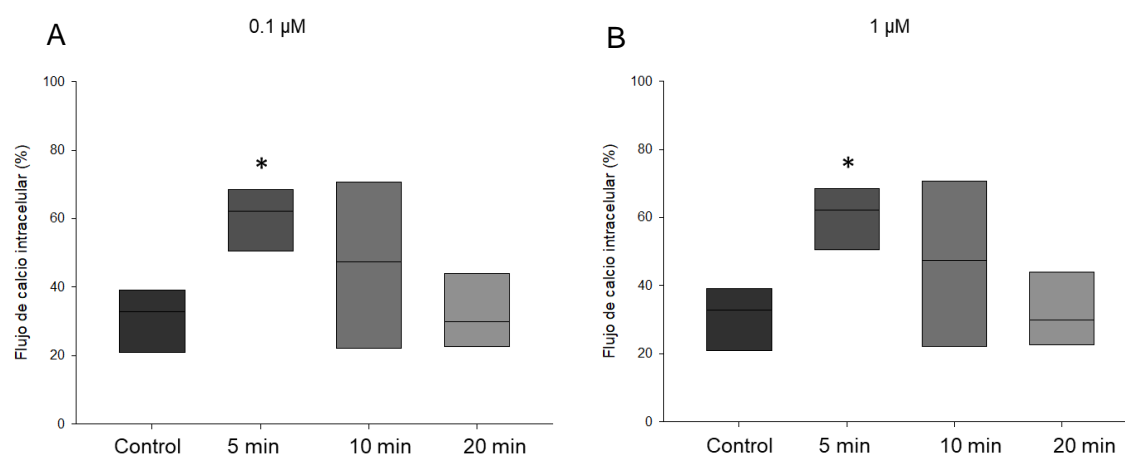
## 7.2. Exposición *in vitro* a agonistas y antagonistas de AChR

### 7.2.1. Flujo de calcio intracelular

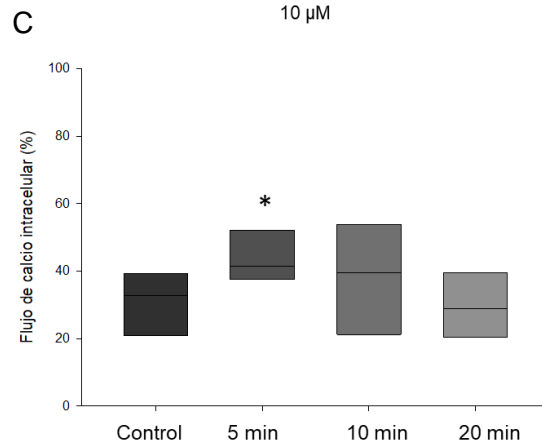
Para definir la concentración y tiempo de exposición a cada agonista y antagonista colinérgico, se evaluó el flujo de calcio intracelular mediante citometría de flujo.

#### *Agonistas de AChR*

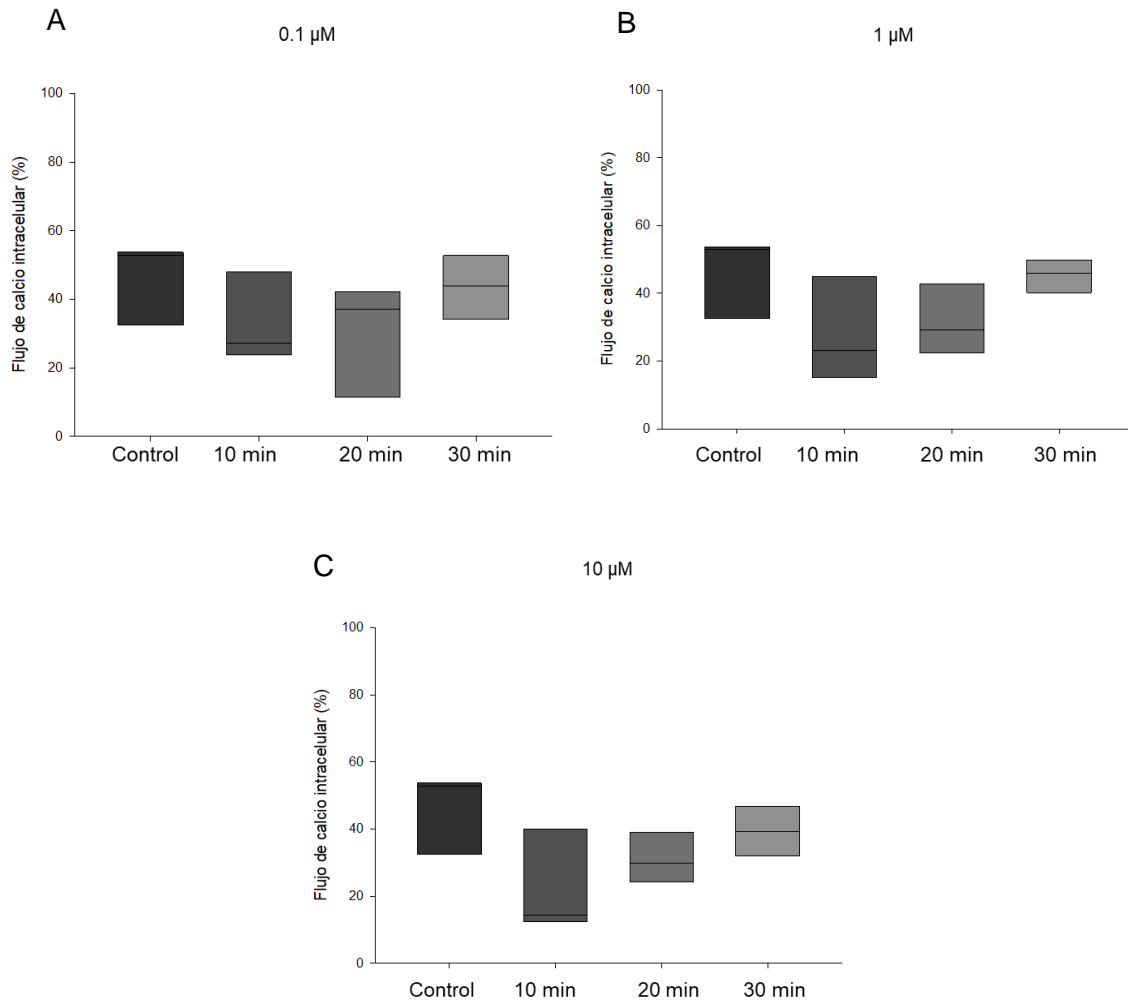
El tratamiento con nicotina (agonista nicotínico) aumentó significativo a los 5 min de exposición a las tres concentraciones evaluadas (0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$ ) (figura 22). Mientras que, el tratamiento con carbacol (agonista muscarínico) a las concentraciones evaluadas (0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$ ), durante el tiempo evaluado (10-30 min), no mostró diferencia significativa en el flujo de calcio (figura 23).







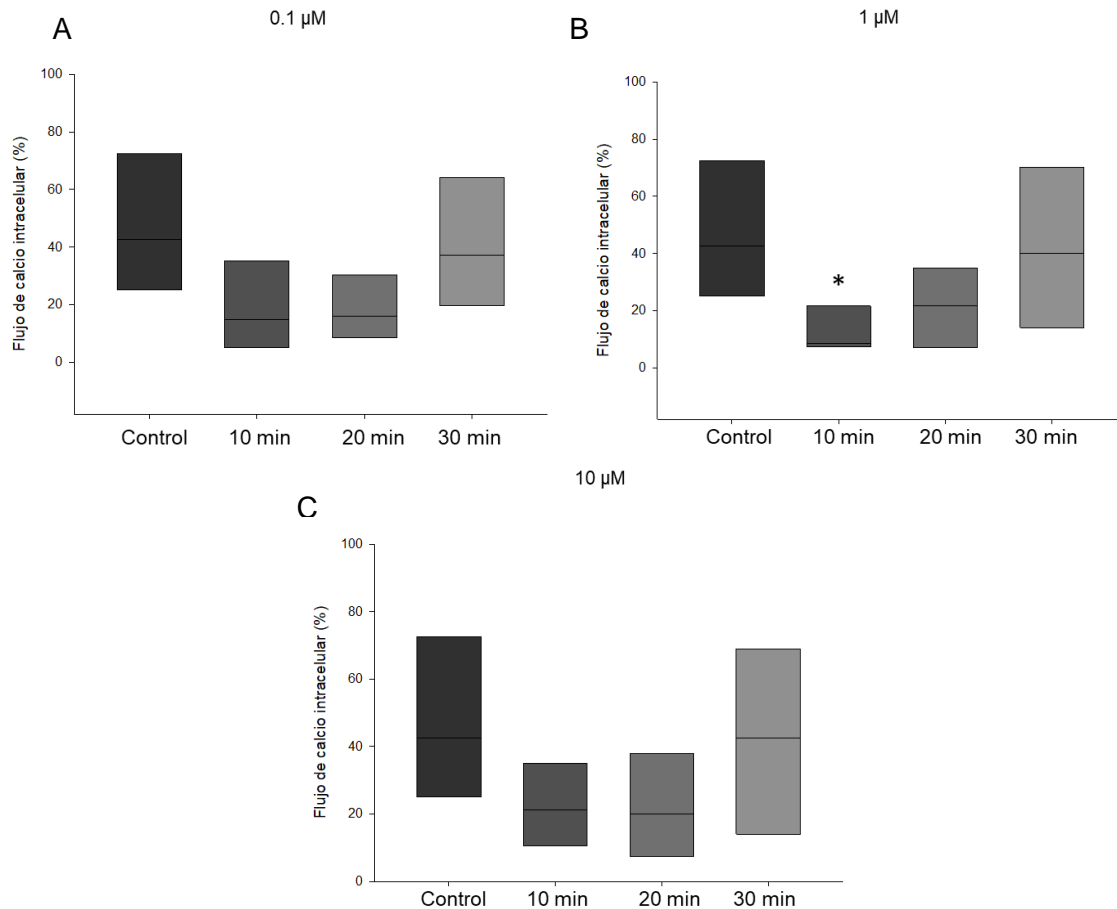
**Figura 22.** Porcentaje de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en CMB expuestas *in vitro* 0.1  $\mu\text{M}$  (A), 1  $\mu\text{M}$  (B) y 10  $\mu\text{M}$  (C) de nicotina. La línea horizontal de cada barra representa el valor de la mediana  $\pm$  el 25 y 75 percentil de  $n=4$ . \* Indica diferencia significativa  $p<0.05$ . vs control. ANOVA y prueba de Dunett.



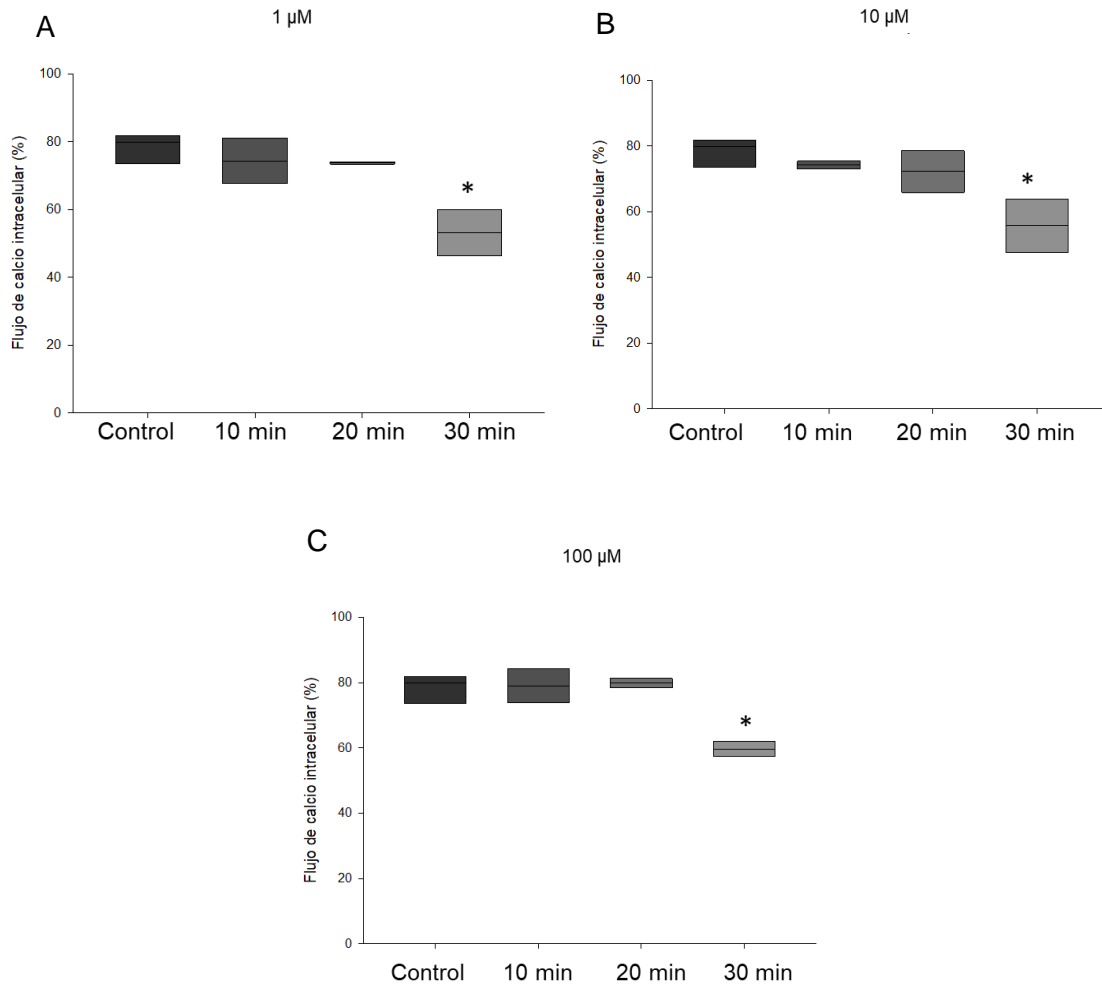
**Figura 23.** Porcentaje de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en CMB expuestas *in vitro* a 0.1  $\mu\text{M}$  (A), 1  $\mu\text{M}$  (B) y 10  $\mu\text{M}$  (C) de carbacol. La línea horizontal de cada barra representa el valor de la mediana  $\pm$  el 25 y 75 percentil de  $n=4$ . \* Indica diferencia significativa  $p<0.05$ . vs control. ANOVA y prueba de Dunett.

## Antagonista de AChR

En lo que respecta al efecto de los agonistas colinérgicos en el flujo de calcio de CMB, los resultados muestran que el tratamiento con 1  $\mu\text{M}$  de bungarotoxina (antagonista nicotínico), durante 10 min, disminuye significativamente este parámetro (figura 24 C). Mientras que, el flujo de calcio en las CMB tratadas (30 min) con atropina (antagonista muscarínico) disminuye significativamente a todas las concentraciones evaluadas (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) (figura 25).



**Figura 24.** Porcentaje de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en CMB expuestas *in vitro* a 0.1  $\mu\text{M}$  (A), 1  $\mu\text{M}$  (B) y 10  $\mu\text{M}$  (C) de bungarotoxina. La línea horizontal de cada barra representa el valor de la mediana  $\pm$  el 25 y 75 percentil de  $n=4$ . \* Indica diferencia significativa  $p<0.05$ . vs control. ANOVA y prueba de Dunnett.

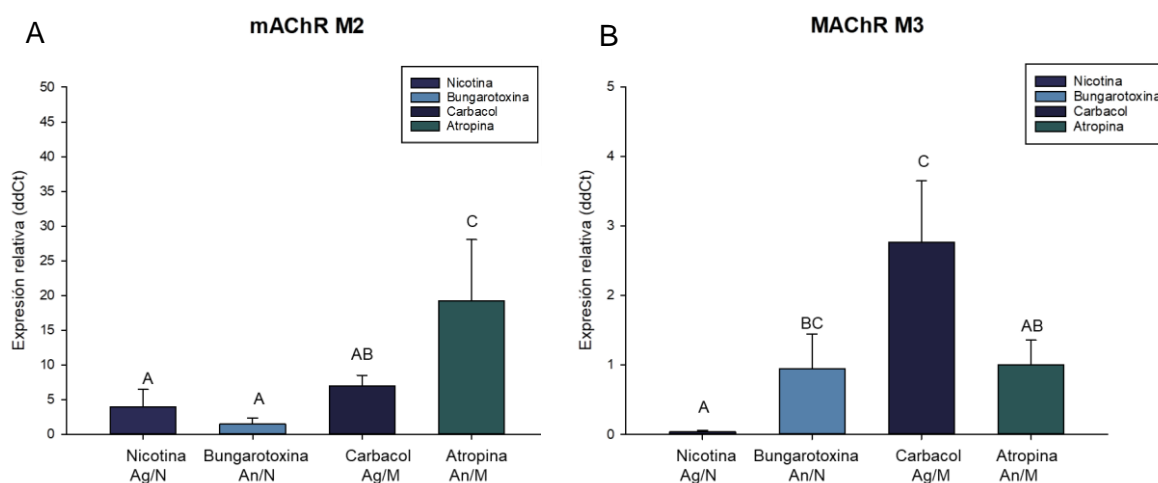


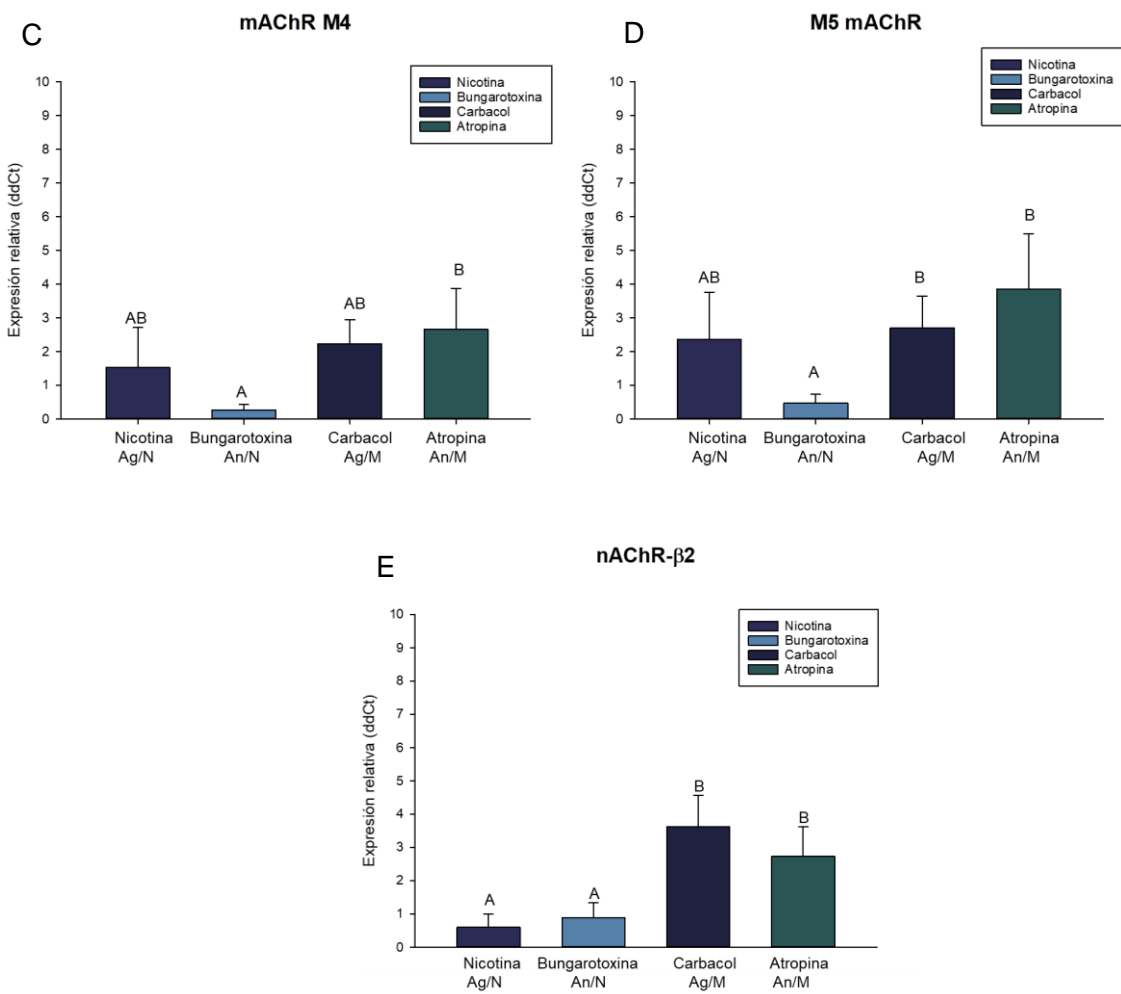
**Figura 25.** Porcentaje de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en CMB expuestas *in vitro* a 1  $\mu\text{M}$  (A), 10  $\mu\text{M}$  (B) y 100  $\mu\text{M}$  (C) de atropina. La línea horizontal de cada barra representa el valor de la mediana  $\pm$  el 25 y 75 percentil de  $n=4$ . \* Indica diferencia significativa  $p < 0.05$ . vs control. ANOVA y prueba de Dunett.

### 7.2.2. Expresión de AChR

Una vez definidos los tiempos y concentraciones de exposición a agonistas y antagonistas, tanto nicotínicos como muscarínicos, se procedió a realizar la exposición *in vitro* de CMB a cada tratamiento. Para evaluar el efecto nicotínico se utilizó como agonista nicotina (1  $\mu$ M / 5 min) y como antagonista bungarotoxina (1  $\mu$ M / 10 min). Mientras que, para evaluar el efecto muscarínico, se utilizó como agonista carbacol (1  $\mu$ M / 10 min) y como antagonista atropina (1  $\mu$ M / 30 min).

En lo que respectivo a la expresión de los AChR por la exposición *in vitro* a agonistas y antagonistas de AChR, los resultados evidencian la alteración en el patrón de expresión de AChR (Figura 26). Particularmente para mAChR M2 y M4, se observa un aumento significativo de la expresión en las CMB tratadas con 1  $\mu$ M de atropina (antagonista) respecto a los demás tratamientos (Figura 26 A, C). Mientras que, la expresión de mAChR M3 aumentó significativamente en las CMB expuestas a 1  $\mu$ M de carbacol (agonista) comparada con los otros tratamientos (Figuras 26 B). En lo que respecta a mAChR M5, la expresión del receptor aumentó en CMB tratadas tanto con carbacol (agonista) como con atropina (antagonista) (Figura 26 D). En este mismo sentido, la expresión de nAChR  $\beta$ 2 aumentó en las CMB tratadas tanto con carbacol (agonista) como con atropina (antagonista) comparado con el tratamiento con nicotina (agonista) y bungarotoxina (antagonista) (Figura 26 E).



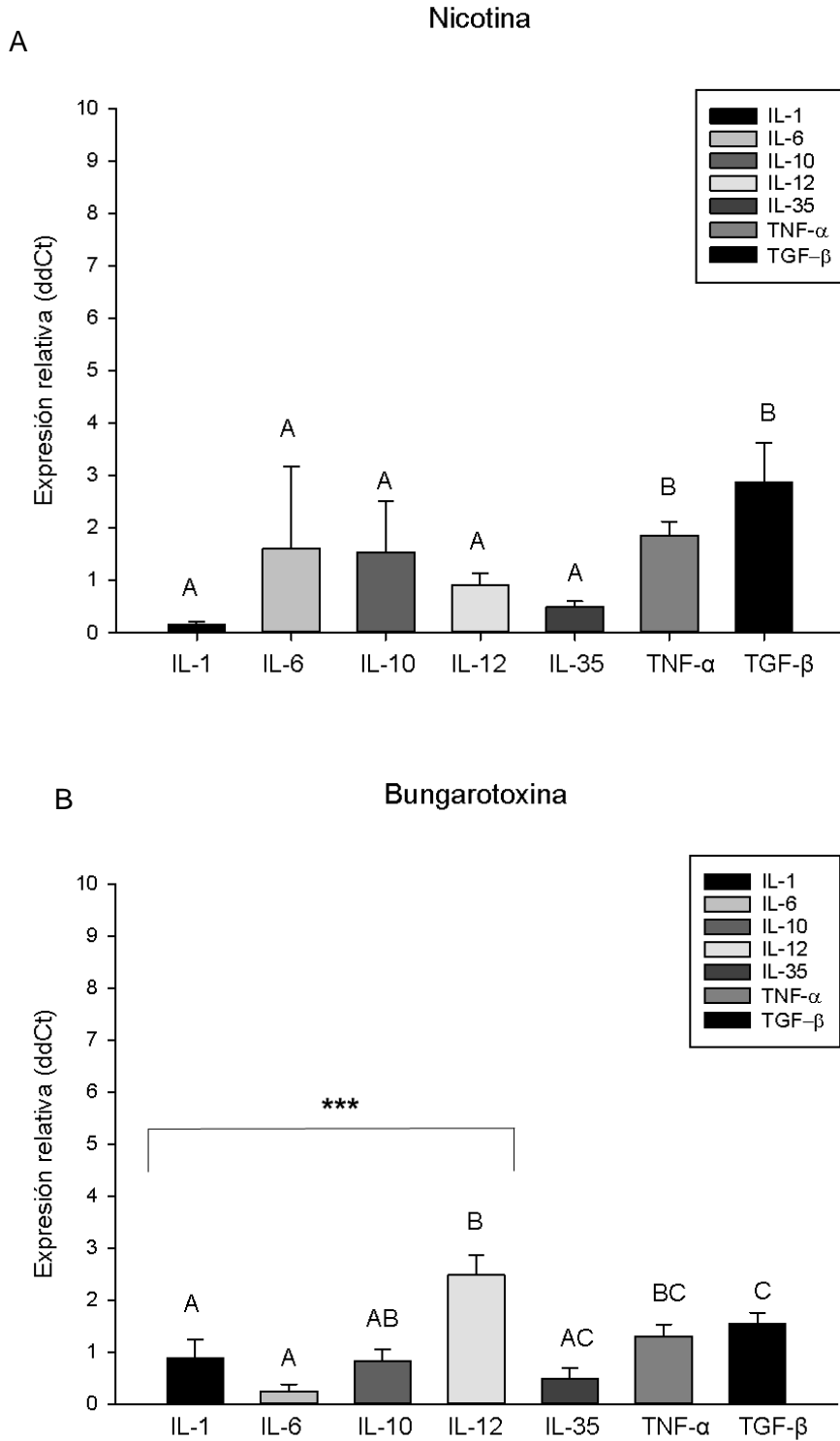


**Figura 26.** Niveles de expresión relativa de mAChR (A) M2, (B) M3, (C) M4, (D) M5 y (E) nAChR β2 CMB expuestas *in vitro* a los agonistas nicotina (1 μM, 5 min) y carbacol (1 μM, 10 min) y antagonistas bungarotoxina (1 μM, 10 min) y atropina (1 μM, 30 min) de nAChR y mAChR, respectivamente (la expresión fue normalizada con EF1-α). Cada barra representa la media ± SE de n=7. ANOVA en rangos (Kruskal-Wallis). Comparación múltiple tratamientos (Método de Dunn). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos.  $p < 0.05$ . An=antagonista, Ag=agonista.

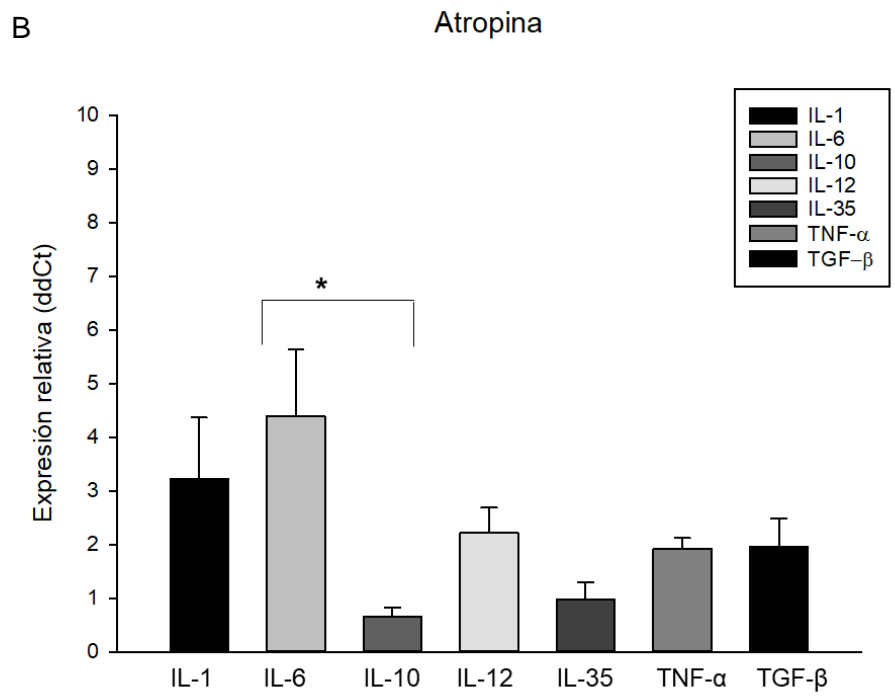
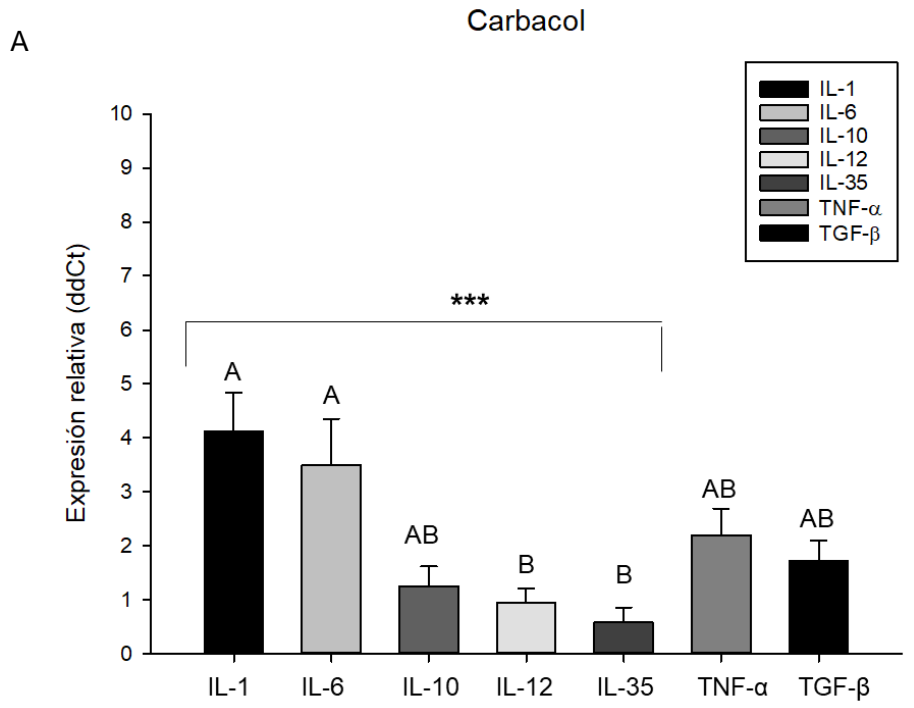
### **7.2.3. Expresión de citocinas**

Los resultados del efecto del nAChR sobre la expresión de citocinas se evidencian tras el tratamiento con agonistas y antagonistas nicotínicos. El tratamiento con 1  $\mu$ M de nicotina (agonista) induce un aumento significativo en la expresión de TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , así como la disminución de IL-1 (figura 27 A). Mientras que, el tratamiento con 1  $\mu$ M de bungarotoxina (antagonista) evidencia la alteración en el patrón de expresión de citocinas tanto inflamatorias como anti-inflamatorias, con aumento significativo de IL-12 y TGF- $\beta$  (figura 27 B).

En lo que respecta a los resultados del efecto del mAChR sobre la expresión de citocinas se evidencian tras el tratamiento con agonistas y antagonistas muscarínicos. El tratamiento con 1  $\mu$ M de carbacol (agonista) en las CMB indujo una disminución significativa de la expresión de IL-12 e IL-35, así mismo aumentó la expresión de IL-1 e IL-6 con respecto a IL-35 (figura 28 A). Por otro lado, el tratamiento con 1  $\mu$ M de atropina (antagonista) indujo aumento en IL-6 (citocina pro-inflamatoria) y disminución en IL-10 (citocina anti-inflamatoria) (figura 28 B).



**Figura 27.** Niveles de expresión relativa de mRNA de las citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-35, TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en CMB expuestas *in vitro* a 1  $\mu$ M de nicotina (A) y 1  $\mu$ M de bungarotoxina (B) (la expresión fue normalizada con EF1- $\alpha$ ). Los resultados son expresados como medias  $\pm$  SE (n=7). ANOVA en rangos (Kruskal-Wallis). Comparación múltiple entre tratamientos (Método de Dunn). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos.  $p < 0.05$ . \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figura 28.** Niveles de expresión relativa de mRNA de las citocinas IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-35, TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en CMB expuestas *in vitro* a 1  $\mu$ M de carbacol (A) y 1  $\mu$ M de atropina (B) (la expresión fue normalizada con EF1- $\alpha$ ). Cada barra representa la media  $\pm$  SE de n=7. ANOVA en rangos (Kruskal-Wallis). Comparación múltiple entre tratamientos (Método de Dunn). Letras diferentes indican diferencia significativa entre tratamiento.  $p < 0.05$ . \*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .



## 8. Discusión

Los POF son sustancias beneficiosas para la productividad agrícola y el control de enfermedades transmitidas por vectores (Naughton y Terry, 2018). Sin embargo, como consecuencia de su uso generalizado y alto consumo a nivel mundial (Atwood y Paisley-Jones, 2017), los POF se encuentran entre los productos químicos sintéticos más comúnmente detectados en el ambiente, así como en tejidos animales y humanos (Leyva-Morales *et al.*, 2017). Sin embargo, los efectos tóxicos de los POF no sólo afectan a las plagas para los cuales están dirigidos; de hecho, todos los organismos que poseen componentes colinérgicos pueden verse afectados (tabla 12) (Camacho-Pérez *et al.*, 2022). Lo cual es una preocupación cada vez mayor porque muchos POF son altamente tóxicos, su mecanismo de acción radica en la inhibición de la AChE, la acumulación de ACh y la sobre estimulación de los AChR (ATSDR, 2008; Flaskos, 2012; Naughton y Terry, 2018).

Además del efecto neurotóxico ampliamente descrito, la exposición a plaguicidas puede inducir diferentes tipos de alteraciones inmunológicas como: autoinmunidad, hipersensibilidad, alergia o inmunosupresión. En este sentido, se propone clasificar los efectos inmunotóxicos directos, tales como: inducción del estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplásmico, interrupción del sistema ubiquitina proteasa o la autofagia, así como la inhibición de enzimas con actividad esterasa, como AChE. Siendo la inhibición de AChE, una de las principales vías por las cuales los POF dañan directamente las células inmunes (Mokarizadeh *et al.*, 2015). Reforzando esta idea, Mitra *et al.* (2017) sugieren que la inmunotoxicidad inducida por POF está mediada por la perturbación de la respuesta colinérgica de los leucocitos, alterando la transducción de señales, exocitosis de gránulos o la vía FasL / Fas.

**Tabla 12.** Alteración de componentes colinérgicos por exposición a POF

POF	Dosis de exposición	Tiempo de exposición	Efecto colinérgico	Tejido/línea celular	Modelo de estudio	Referencia
Diazinón	7.830 mg/L	96 h	↓ actividad de AChE ↑ [ACh]	CMB	Tilapia nilótica ( <i>O. niloticus</i> )	Girón-Pérez <i>et al.</i> , 2008
Diazinón	0.97, 1.95 y 3.91 mg/L	6, 12 y 24 h	↓ Actividad de AChE ↓ [mAChR/nAChR] ↑ [ACh]	CMB	Tilapia nilótica ( <i>O. niloticus</i> )	Toledo-Ibarra <i>et al.</i> , 2016
Paraoxón	1 mg/kg	6-25 h	↓ función mAChR M2 ↑[ACh] ↑estimulación mAChR M3	Sangre periférica	Cuyo ( <i>Cavia porcellus</i> )	Proskocil <i>et al.</i> , 2010
Clorpirifos	LD50 1 /3 LD50	48 h	↓ actividad ChAT ↓ actividad AChE	Corteza cerebral	Rata macho	Poojary y Basha 2012
Clorpirifos	1 mg/Kg	1 -6 h	↓ actividad ChAT ↓ expresión nAChR α4, α7 ↓expresión VACHT	Corteza anterior Sangre periférica	Ratón apoE3	Basaure <i>et al.</i> , 2018
Monocrotofos	0.01, 0.10 y 1.00 mg/L	N/A	↓ actividad ChAT ↓ actividad AChE	Embriones	Erizo de mar ( <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> )	Zhang, 2017

↑ incremento, ↓ Disminución, [ ] concentración. Tomado de Camacho-Pérez *et al.*, 2022

En lo que respecta específicamente al efecto de diazinón en organismos acuáticos, se pueden encontrar algunos reportes recopilados por Díaz-Reséndiz *et al.* (2015) en los cuales se evidencia que diazinón puede alterar parámetros de inmunidad humoral como lisozima o IgM; así como parámetros de inmunidad celular, tales como proliferación celular, estallido respiratorio y fagocitosis. En este sentido,

estudios recientes han puesto en evidencias la alteración de la respuesta inmune por exposición a diazinón. Covantes-Rosales *et al.* (2019a) reportaron que, en peces tilapia nilótica (*O. niloticus*) expuestos *in vivo* a 0.97, 1.95 y 3.97 mg/L de diazinón durante 6 y 24 h, disminuyó la fagocitosis de células mononucleares y de células polimorfonucleares, sin embargo, aumento la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Así mismo, Díaz-Reséndiz *et al.* (2019) observaron un efecto citotóxico de diazinón, evidenciado con disminución de viabilidad, aumento significativo de apoptosis y de senescencia en CMB. Así como disminución del flujo de Ca<sup>2+</sup> intracelular y del potencial de membrana mitocondrial en estas células, lo que demuestra una disfunción mitocondrial de las CMB. Además, bajo las mismas condiciones experimentales, se demostró la inhibición de la actividad de AChE de forma dosis dependiente, acumulación de ACh y disminución de mAChR y nAChR (a nivel proteína) en CMB (Toledo-Ibarra *et al.*, 2016) de tilapia nilótica (*O. niloticus*). La información anterior apoya la hipótesis del papel del sistema colinérgico de leucocitos en el efecto inmunotóxicos de POF (Charoenying *et al.* 2011; Mitra *et al.*, 2017), entre ellos diazinón (Girón-Pérez *et al.*, 2009).

Tarkowski *et al.* (2004) proponen que el efecto tóxico de los POF para el sistema inmune ocurre en cuatro pasos: 1. Inhibición de AChE; 2. Acumulación de ACh en la “sinapsis inmunológica”. 3. La ACh en exceso conduce al aumento de estimulación de AChR. 4. Alteración de las funciones linfocitarias en respuesta a estimulación excesiva de los AChR. La propuesta de Tarkowski se basa en la existencia del sistema colinérgico no neuronal en células propias del sistema inmunológico. En diversos modelos mamíferos se ha evidenciado que las células propias del sistema inmunológico expresan la mayoría de los componentes necesarios para un sistema colinérgico funcional propio, esto incluye ChAT, mAChR y nAChR, y AChE (Fujii *et al.*, 2017). Reforzando la idea anterior, en el presente modelo de estudio (*O. niloticus*) ha sido demostrada la presencia de elementos del sistema colinérgico como AChE, ACh y AChR en CMB (Covantes-Rosales *et al.*, 2019b; Toledo-Ibarra *et al.*, 2013;). Lo que indica que el mecanismo de

inmunotoxicidad de POF a través de la alteración del sistema colinérgico no neuronal es factible en este modelo.

En el actual estudio, en las CMB expuestas *in vitro* a 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de diazoxón se observa inhibición significativa de la actividad de AChE, pero no se observan diferencias en la concentración de ACh, lo que difiere de lo observado previamente en ensayos *in vivo*, en el cual se reportó acumulación de ACh (Toledo-Ibarra *et al.*, 2016). El efecto diferencial en la exposición *in vitro* e *in vivo*, también ha sido observado por Díaz-Reséndiz *et al.* (2020), atribuyéndolo a que la capacidad tóxica no sólo la ejerce el compuesto padre, sino que también se ha relacionado con la capacidad de biotransformación de los organismos y el efecto de los metabolitos de la biotransformación (DXN, IMHP, DETP, DEP) de diazinón.

Además, se ha propuesto otro mecanismo de toxicidad de POF, en el cual existen consideraciones de que los POF tienen más blancos diferentes a la AChE, lo cual depende en gran medida de las concentraciones de los POF (nM o  $\mu\text{M}$ ). Es decir, el efecto inmunotóxico podría ser el resultado de acciones directas o indirectas en objetivos macromoleculares distintos de AChE, como son los AChR (Bomser y Casida, 2001; Guo-Ross *et al.*, 2017; Howard y Pope, 2002; Lein y Fryer, 2005; Yang *et al.*, 2001). En el caso de los nAChR, se ha propuesto que algunos POF como dimetoato, puede ejercer efectos inhibitorios mediante: 1. El bloqueo directo del canal de iones. 2. La unión directa a sitios de unión no propios de ACh o a otros dominios no competitivos de nAChR. La interacción entre el POF y nAChR induce cambios conformacionales del receptor y puede llevar a la desensibilización. La unión POF-nAChR puede competir con el agonista e impedir la respuesta inducida por el agonista (Smulders *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2001).

Mientras que, la información referente a la interacción entre POF y mAChR es más amplia. Existen estudios que demuestran que agentes anticolinesterásicos (Gupta, 2004; Trailović *et al.*, 2017) o bien algunos POF como clorpirifos (Guo-Ross *et al.*, 2017; Howard y Pope, 2002), diazinón o paratión (Lein y Fryer, 2005) pueden inducir

directamente la regulación negativa de los mAChR. Por un lado, Lein y Fryer (2005) han propuesto que los POF antagonizan directamente los mAChR mediante efectos directos sobre los mismos receptores. Por otro lado, se ha propuesto un efecto indirecto, disminuyendo el número de receptores en respuesta a los niveles de ACh resultante de la inhibición de AChE (Gupta, 2004; Lein y Fryer, 2005). Además, se ha demostrado que, en mamíferos, los POF son capaces de modular la unión, expresión y los eventos de transducción de señal del mAChR; siendo las subunidades M2 y M4 particularmente susceptibles a la modulación por POF. De hecho, existe evidencia de la dietilfosforilación del mAChR (M2) por el metabolito oxón de clorpirifos (Bomser y Casida, 2001), sugiriendo que el oxón bloquea irreversiblemente (covalentemente) e impide la unión del agonista con el receptor (Howard y Pope, 2002). Lo que es sumamente importante resaltar es que las interacciones de POF (diazinón o paratión) con receptores mAChR (M2), pueden ocurrir incluso a dosis más bajas que las requeridas para inhibir la actividad de AChE (Lein y Fryer, 2005).

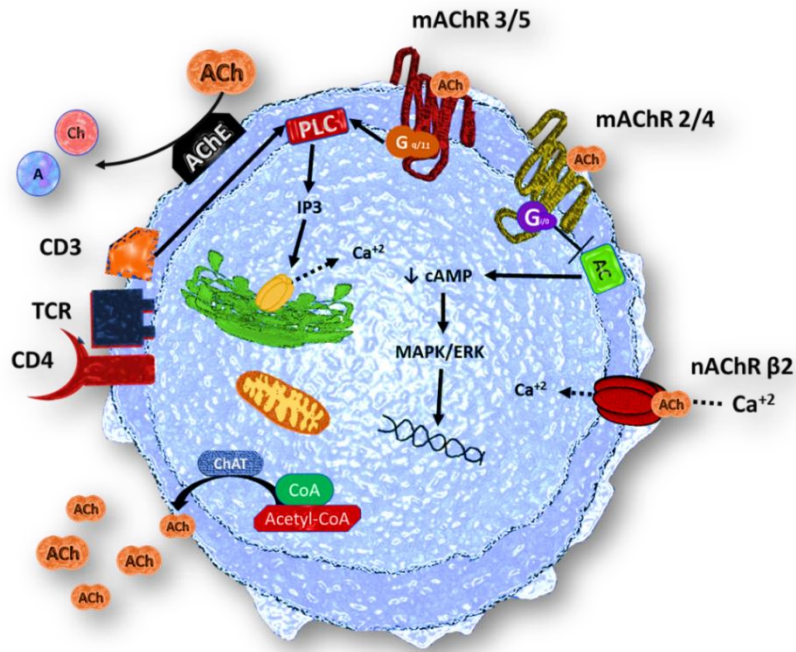
Contrario a lo anterior, los resultados publicados por Charoenying *et al.* (2011) donde se evalúa el sistema colinérgico (AChE y mAChR) en células MOLT3 expuestas *in vitro* a dosis más altas (inhibitorias) de paraoxón (10, 100 y 500  $\mu$ M) durante 24 y 48 h, se reporta que mAChR M1, M2 y M3 disminuyen tras el tratamiento de paraoxón. Mientras que, en estudios *in vivo*, se reportó que la exposición a 3.96 mg/L diazinón durante 24 h, disminuye la concentración de nAChR y mAChR en CMB de tilapia nilótica (Toledo-Ibarra *et al.*, 2016).

Por lo tanto, es importante analizar sistemáticamente los cambios de los componentes principales del sistema colinérgico no neuronal leucocitario; debido a que se producen numerosas interacciones y es necesario dilucidar este complejo escenario para obtener más información sobre el papel regulador del sistema colinérgico no neuronal (Wessler y Kirkpatrick, 2008). En este sentido, los resultados presentados indican que, aunque los niveles de ACh no se modificaron bajo ninguna

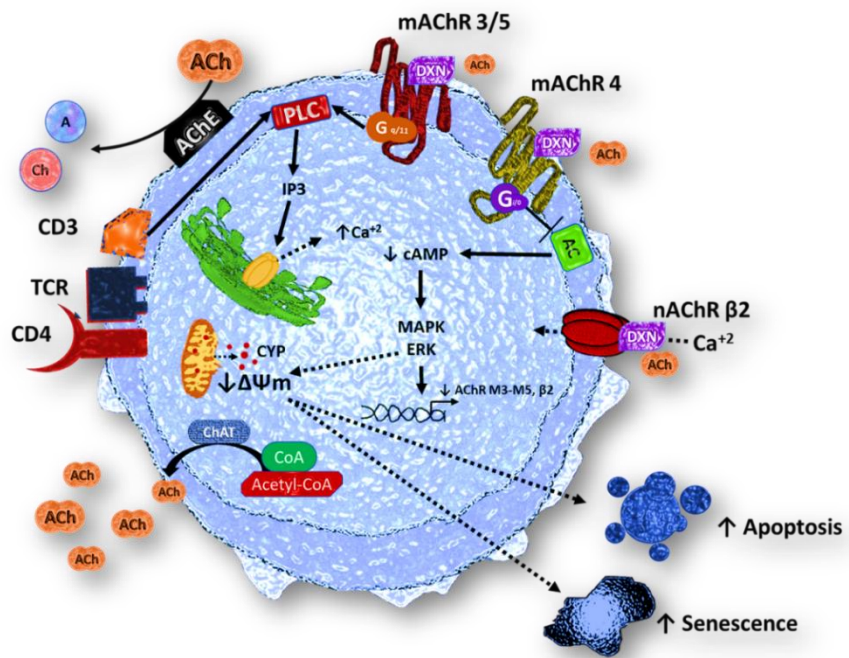
concentración de diazoxón, los niveles de expresión de los mAChR M2 y M4 aumentaron principalmente a 1  $\mu$ M y 1 nM de diazoxón, respectivamente.

Al alterar las densidades de los subtipos de mAChR, en este caso M2 y M4, se pueden modificar los sistemas diferentes de segundo mensajero dependiendo del subtipo de receptor involucrado. Al alterar los receptores de subtipo M3/M5, se podría interrumpir la señalización de la proteína G estimuladora. Mientras que, al modificar los receptores del subtipo M2 / M4, podría alterar la inhibición de la formación de AMPc catalizada por adenilil ciclasa a través de la proteína G inhibidora (Guo-Ross *et al.*, 2017). Debido a que existe una gran cantidad de estudios que sugieren la participación de AChR en la regulación de la función inmune (Fujii *et al.*, 2017), la disrupción y / o alteración en varias partes de las vías de señalización celular puede resultar en un deterioro funcional de las células. En consecuencia, dependiendo del tipo de células afectadas, pueden causar una variedad de trastornos inmunológicos diferentes (Mokarizadeh *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha reportado que la sobre estimulación de los AChR debido a la acumulación de ACh en la sinapsis inmunológica evoca una señalización de  $Ca^{2+}$  intracelular, regulación al alza de c-fos y transducción de señal inducida por IL-2 en células T y B, así como la inducción de respuestas inflamatorias en macrófagos (Banks y Lein 2012; Kawashima y Fujii 2000). En este modelo experimental, Diaz-Reséndiz *et al.* (2020) demostraron alteración en el flujo de calcio intracelular, pérdida del potencial de membrana mitocondrial e inhibición de la fosforilación de ERK1/2, lo cual podría estar relacionado con la alteración en la expresión de mAChR observados en el presente estudio.

A



B







diferenciación celular. La estimulación simultánea de mAChR y nAChR puede ser necesaria para sincronizar y equilibrar eventos iónicos y metabólicos en una sola célula, una diafonía entre mAChR y nAChR puede proporcionar un ajuste fino de las señales que emanan del SNC, las glándulas endocrinas y los estímulos ambientales. La plasticidad del sistema colinérgico no neuronal ayuda a ajustar la homeostasis a las nuevas condiciones ambientales (Grando *et al.*, 2020).

El sistema inmune y la comunicación neuroinmunológica son vitales para mantener la homeostasis del organismo. La presencia de POF en el ecosistema acuático, así como el estrés por factores ambientales (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, etc) contribuyen al aumento de la susceptibilidad a enfermedades ocasionada por microorganismos oportunistas (Dietrich *et al.*, 2014, Marchand *et al.*, 2017), incluso pudiendo ocasionar la mortalidad de los organismos expuestos (Pucher *et al.*, 2014).

Actualmente, la información que relaciona a diazinón con la incidencia de enfermedades en peces es escasa. Sin embargo, estudios con otros POF como clorpirifos apoyan esta información (Marchand *et al.*, 2017), por lo que se sigue se continúe la evaluación de la alteración del sistema colinérgico leucocitario en estos modelos de estudio, lo que puede ayudar a la comprensión de fenómenos biológicos importantes, debido a que el sistema colinérgico es esencial en procesos fisiológicos básicos, como captura del oxígeno, capacidad olfativa (percepción del alimento y presencia de depredadores), así como aspectos conductuales-cognitivos, por lo que su alteración pone en riesgo la supervivencia de las especies.

Los POF son compuestos inmunotóxicos que pueden modificar la función inmunológica de diferentes maneras (tabla 13), como el daño a los tejidos y órganos debido a la inflamación (Mitra *et al.*, 2019). La inflamación es un fenómeno biológico que no se puede restringir una definición simple. Según el contexto, la inflamación se puede considerar como una respuesta, un proceso o un estado del sistema. Cada una de estas nociones enfatiza diferentes aspectos de la inflamación: como respuesta a una perturbación (p. ej., infección o lesión); como un proceso de varios

pasos de movilización de mecanismos defensivos para eliminar la fuente de perturbación; o como un estado alterado del sistema que puede ser protector o patológico (Medzhitov 2021; Roe, 2021, Nasef *et al.*, 2017). La inflamación se puede desencadenar por factores exógenos como un proceso infeccioso o la exposición a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), moléculas extrañas o sustancias químicas irritantes (Nasef *et al.*, 2017), como la inflamación de tipo III, causada por una exposición química (Roe, 2021). Por eso, el papel de las respuestas inflamatorias en el proceso toxicológico es de considerable interés (Lasram *et al.*, 2014). En ese sentido, se ha reportado que la exposición aguda a POF induce una respuesta inflamatoria robusta instantánea y prematura, mientras que la exposición crónica a bajas concentraciones de POF aumenta los mediadores inflamatorios de manera lenta pero sostenida, lo que podría estar relacionada con el desarrollo de enfermedades inflamatorias (Camacho-Pérez *et al.*, 2022).

Por lo cual, es fundamental comprender cómo estas moléculas biológicamente activas afectan las actividades de las células inmunitarias y, en consecuencia, la función del sistema inmunitario, ya que los POF pueden inducir alteraciones en los mecanismos humorales y celulares, teniendo un impacto directo en los tejidos linfoides y la función de las células inmunitarias (Helali *et al.*, 2016). Si bien estudios previos informaron que los POF podrían afectar la inmunidad a través de diferentes mecanismos (Li *et al.*, 2007; Mitra *et al.*, 2019), la supresión/desregulación inmunológica es un mecanismo importante por el cual los plaguicidas ejercen su actividad inmunomoduladora, afectan la inmunocompetencia y, en consecuencia, aumentan la susceptibilidad a enfermedades y una serie de trastornos inmunológicos. Al modificar el sistema colinérgico tanto neuronal como no neuronal, los POF pueden afectar la inmunidad al interferir con las vías de señalización celular, lo que provoca cambios en la producción de citocinas, la expresión de marcadores de superficie y la activación celular (Helali *et al.*, 2016; Mitra *et al.*, 2019).

**Tabla 13.** Reportes de la modulación del proceso inflamatorio mediado por citosinas debido a la exposición a POF

POF	Dosis	Tiempo	Modelo de estudio	Citocina	Alteración biológica	Referencia
Clorpirifos	6.75 mg/kg	8 sem	Rata macho	↑ expresión IL-6, TLR-2, IL-1β, TNF-α y NLRP3	↑ expresión Caspasa 3, Caspasa 9, Caspasa 8 y Bax (apoptosis)	Kianpour <i>et al.</i> , 2021
Malatión	27 mg/kg (1/50 of LD <sub>50</sub> )	30 días	Rata macho	↑ expresión IFN-γ, IL1-β, TNF-α y NFκB	↓ actividad ACh (suero e hígado) ↑ Peroxidación lipídica	Ince <i>et al.</i> , 2017.
Malatión	200 mg/kg/día	28 días	Rata macho (Wistar)	↑ expresión IL-1β, IL-6 y IFN-γ	↑ actividad de enzimas hepatocelulares en plasma ↑ Peroxidación lipídica ↑ Índice CD3+/CD4+ y porcentaje CD3+/CD4+	Lasram <i>et al.</i> , 2014
Clorpirifos	3.375- 13.5 mg/kg	28 días	Rata macho (Wistar)	↑ expresión IL-1β y TNF-α	Activación NF-Kb Ruptura caspasa 3, HO-1 y vía Nrf-2.	El-Sayed <i>et al.</i> , 2018.
Clorpirifos	0-001-10 μM	24 h	Macrófagos de peritoneo de ratón	↓ expresión IL-1β y TNF-α	Respuesta respuestas bifásicas de la actividad enzimática lisosomal. Inhibición de la liberación de óxido nítrico	Helali, I., Ferchichi, S., Maaouia, A., Aouni, M., & Harizi, H. (2016).
Clorpirifos	0.3–300 μM	24 h	BV-2 microglia	↑ expresión IL-1β	↑ expresión NLRP3 ↑ estrés oxidativo ↑ producción óxido nítrico, Malondialdehido y O <sub>2</sub>	Weis <i>et al.</i> , 2021
Diazinón	10-100 μM	24 h	Células RAW264.7	↑ expresión TNF-α e IL-6	↑ generación ROS ↑ expresión COX-2, iNOS, y moléculas de superficie (CD40, CD86 y MHC clase II) ↓ actividad fagocítica	Ogasawara <i>et al.</i> , 2017
Paratión, Malatión, Paraoxón y Malaoxón	100–2000 μmol/L	24 h	Tejido pulmonar de rata	↑ expresión IL-6, GM-CSF y MIP-1α	↓ viabilidad ↓ [GSH] ↓ pSTAT3 ↑ p38MAPK	Tigges <i>et al.</i> , 2022.
Paratión, Clorpirifos y Diazinón	1-100 μM	24 h	Macrófagos diferenciados (células THP1)	↑ expresión TNF-α, IL-1β TGF-β, PDGF y TNF-α	↑ activación NF-κB ↓ actividad AChE	Proskocil <i>et al.</i> , 2019
Clorpirifos, Dimetoato	0–1000 μM	24 h	Células dendríticas diferenciadas (células THP1)	↓ IL-10	↓ Marcadores de superficie en células dendríticas (CD83 y CD209). Inhibición de Akt	Schäfer <i>et al.</i> , 2013

↑ incremento, ↓ Disminución, [ ] concentración

De esta manera, el análisis de expresión de citocinas inflamatorias se utiliza como indicador para detectar respuestas inflamatorias en peces. Las citocinas inflamatorias que pueden incluir IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e IL-18, TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) ya han sido identificados en peces teleósteos (Somamoto y Nakanishi, 2022). En el presente estudio, se seleccionaron los genes marcadores particulares (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-35, TNF $\alpha$ , TGB- $\beta$ ), ya que están relacionados con subconjuntos particulares y nos ayudan a comprender la polarización del estado actual de estos subconjuntos y cómo responde el sistema inmunitario (con respuestas inflamatorias o antiinflamatorias). La interacción de citocinas pro y antiinflamatorias regula la patogénesis microbiana. Las respuestas proinflamatorias ayudan al huésped a controlar las bacterias patógenas y las citocinas antiinflamatorias favorecen la supervivencia de los patógenos dentro del huésped (Kumar *et al.*, 2022).

En el presente estudio, se observa que la exposición *in vitro* a diazoxón durante 24 h induce el aumento en la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en CMB, citocinas que han sido descritas como clásicamente inflamatorias en peces. Se ha reportado que la activación de receptores modula las vías de señalización intracelulares, incluidas las controladas por MAPK, NF- $\kappa$ B y JAK/STAT. Estos factores de transcripción promueven la expresión de citocinas, modulando un gran número de genes inflamatorios, como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, interferones, TGF y quimiocinas (Fioranelli *et al.*, 2021).

En este sentido, el daño por POF (como malatión) libera citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e INF- $\gamma$ . Estas citocinas son responsables de la activación de factores de transcripción nuclear como NF- $\kappa$ B y están involucradas en la inflamación y apoptosis de las células dañadas (Lasram *et al.*, 2014).

Por otra parte, en el presente estudio, se observó disminución de los niveles de expresión de IL-1 cuando se trataron las CMB con 1 nM y 10  $\mu$ M de diazoxón durante 24 h. Se ha reportado que la IL-1 $\beta$  se expresa significativamente en muchos

tejidos de los peces, incluido el bazo. Es una citocina proinflamatoria crítica, que media la regulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. De manera normal, la IL-1 $\beta$  es secretada por células endoteliales activadas, macrófagos tisulares, monocitos sanguíneos, linfocitos T activados y granulocitos (Sayed *et al.*, 2022).

La IL-1 $\beta$  tiene diversas funciones fisiológicas y sus funciones en la regulación del proceso inflamatorio se conservan en los peces (Zou y Secombes, 2016). IL-1 es una de las primeras citocinas proinflamatorias expresadas, que permite a los organismos responder inmediatamente a la infección (Sayed *et al.*, 2022), en leucocitos primarios y macrófagos ha sido demostrada la inducción de la expresión de genes proinflamatorios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-34 y ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Zou y Secombes, 2016). La IL-1 juega un papel importante de respuestas locales y sistémicas a diversos estímulos, como infecciones o lesiones a través de linfocitos T y B, macrófagos activadores y células NK. Además, está involucrada en los mecanismos reguladores de la respuesta inflamatoria durante una infección bacteriana y/o parasitaria. Por lo tanto, IL-1 $\beta$  es un mediador esencial de las respuestas tempranas a la infección y una citocina crítica vinculada a la inflamación (Sayed *et al.*, 2022). Por lo cual, la disminución en su expresión por efecto de diazinón, tendrá un efecto significativo en las funciones de la citocina IL-1, antes mencionadas.

Además, IL-1 $\beta$  es un quimioatrayente para leucocitos en peces. La quimiotaxis de los leucocitos está coordinada por un gradiente secuencial de quimiocinas y la activación de receptores acoplados a proteínas G, esto puede estar asociado con la liberación rápida de iones Ca<sup>+</sup> intracelulares, así como con la regulación al alza de los niveles de transcripción de los receptores de quimiocinas en las células diana (Zou y Secombes, 2016). Tales funciones, de las citocinas de la familia IL-1 están controladas por múltiples proteínas intracelulares. Tras la activación de los receptores por los ligandos, el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y la proteína de interacción Toll (Tollip) se reclutan en el complejo IL-1R1/IL-1RAcP, lo

que da como resultado la fosforilación de las quinasas asociadas a IL-1R (IRAK). Los IRAK fosforilados interactúan con el factor asociado al receptor de TNF (TRAF) 6 y luego se activa NF- $\kappa$ B, lo que lleva a expresión de genes proinflamatorios en las células diana. Hasta el momento, todas estas moléculas de señalización han sido descrito en peces, lo que sugiere que la vía de señalización de IL-1 está bien conservada entre los vertebrados (Zou y Secombes, 2016).

Al igual que sus homólogos de mamíferos, el TNF- $\alpha$  de los peces muestra funciones superpuestas con la IL-1 $\beta$ . El efecto estimulante de TNF- $\alpha$  involucra la vía de señalización de NF- $\kappa$ B. Como citocina proinflamatoria, el TNF- $\alpha$  es uno de los primeros genes inmunitarios que se expresa en una etapa temprana de la infección en los peces y tiene un papel clave en la regulación de la inflamación (Zou y Secombes, 2016). Sin embargo, se demostró que el clorpirifos puede aumentar la expresión de algunos marcadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , además de la activación de NF- $\kappa$ B (El-Sayed *et al.*, 2018). NF- $\kappa$ B es un importante factor de transcripción que se puede encontrar en el citoplasma en forma de dímero de las subunidades p65 y p50. En condiciones de reposo, se encontró que NF- $\kappa$ B se unía a la proteína inhibidora I $\kappa$ B. Sin embargo, tras la exposición a condiciones estresantes (POF), I $\kappa$ B se fosforila y se separa de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B. En consecuencia, NF- $\kappa$ B se traslada al núcleo para activar la transcripción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e interleucinas para instigar respuestas inflamatorias y, en consecuencia, activar la vía de apoptosis (El-sayed *et al.*, 2018).

En el presente estudio, se evidencia un aumento significativo de la expresión de TNF- $\alpha$  en CMB tratadas con 10  $\mu$ M de diazoxón, concentración con capacidad inhibitoria para AChE. Los miembros de la familia TNF- $\alpha$  en los peces ejercen actividad proapoptótica, al igual que sus homólogos de mamíferos. En tilapia (*O. niloticus*), se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  aumenta la expresión de granzimas en células citotóxicas no específicas y protege a estas células de la muerte celular inducida por la activación (Sakai *et al.*, 2021). Se sugieren que la apoptosis desencadenada por TNF- $\alpha$  depende de la dosis y de la célula diana (Zou y

Secombes, 2016). Estos resultados concuerdan con los reportes en los cuales se evidencia que diazoxón a 1 y 10  $\mu\text{M}$  induce apoptosis, además de senescencia celular y alteración sobre los mecanismos de señalización intracelular, evidenciándose en desregulación del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y fosforilación de ERK1/2 (Díaz-Reséndiz *et al.*, 2019, 2020).

Así mismo se ha reportado que, la inducción no regulada de la expresión de TNF- $\alpha$  en las células epiteliales intestinales exacerba la inflamación intestinal, lo que resulta en la eliminación y apoptosis de dichas células, así como el reclutamiento de células inmunitarias y la disfunción de la barrera intestinal en el pez cebra (Zou y Secombes, 2016). Se sugiere que, en peces, TNF- $\alpha$  están involucrados en la regulación del homing, la proliferación y la migración de los leucocitos. En el timo de la trucha (*O. mykiss*), se ha detectado la expresión constitutiva de TNF- $\alpha$ , lo que sugiere que podría desempeñar un papel en la promoción del crecimiento de los timocitos. Además, en pez cebra (*D. rerio*) y la dorada (*C. auratus auratus*), el TNF- $\alpha$  activa la expresión de quimiocinas en células tisulares locales (Zou y Secombes, 2016). Así mismo, se ha asociado TNF- $\alpha$  con la mejora de la actividad fagocítica de los leucocitos en peces. En el pez cebra infectado con *M. marinum*, se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  promueve la supervivencia de los macrófagos, que se acompaña de una mayor generación de especies oxidativas reactivas (ROS) (Zou y Secombes, 2016). Sin embargo, Covantes *et al* reportaron la inducción en la formación de ROS ( $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2^-$ ) y disminución de la actividad fagocítica, derivada de la exposición *in vivo* con diazinón (Covantes-Rosales *et al.*, 2019).

Las células T CD4+ potencian las funciones fagocitarias, además son responsables de proteger contra varios patógenos, ya sean intracelulares o extracelulares. Entre los dos subconjuntos principales de células T, las células T CD4+ juegan un papel muy importante ya que contribuyen a la eliminación de antígenos mediada por fagocitos junto con la activación de leucocitos y estimulan la producción de anticuerpos por parte de las células B. Las células T CD4+ tienen subconjuntos, los subconjuntos Th1 (acciones inflamatorias) y Th2 (acciones antiinflamatorias), ya

que están más vinculados a la polarización de los macrófagos. El subconjunto Th1 polariza la activación del macrófago en el subconjunto M1 (acciones inflamatorias) y, por otro lado, el subconjunto Th2 activa el macrófago en el macrófago M2 (acciones antiinflamatorias). Estos subconjuntos influyen en las acciones de los demás a través de varias moléculas que actúan (Kumar *et al.*, 2022). Por tanto, como las citocinas (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) reguladas al alza son expresadas por macrófagos activados, se puede suponer que los macrófagos juegan un papel importante en la inflamación inducida por POF (Tigges *et al.*, 2022).

Los macrófagos teleósteos se han clasificado en dos fenotipos funcionales que incluyen respuestas proinflamatorias para la defensa antimicrobiana del huésped (clásico, tipo M1) y respuestas antiinflamatorias para funciones reguladoras (tipo M2) (Grayfer *et al.*, 2018; Hodgkinson *et al.*, 2015). Al igual que en el fenotipo tipo M1 de los mamíferos, los macrófagos teleósteos M1 mejoran las respuestas inflamatorias cuando son estimulados por PAMPS, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o factor estimulante de colonias (CSF)-1. Los macrófagos teleósteos M2 muestran una regulación al alza de IL-10 o por estimulación con IL-10 y glucocorticoides, lo que indica que tienen funciones antiinflamatorias (Somamoto y Nakanishi, 2022). Estos macrófagos polarizados no solo exhiben diferentes propiedades funcionales, sino que también expresan distintos factores de transcripción y marcadores de activación. Las respuestas de M1 ayudan a mantener el entorno proinflamatorio y contener la agresión patógena. Sin embargo, las respuestas M1 sostenidas a menudo son perjudiciales para el huésped, ya que provocan inflamación crónica y daño tisular. Por otro lado, el tipo de respuestas M2 regula las acciones antiinflamatorias y ayuda en la reparación de tejidos y la homeostasis. La diafonía de las respuestas M1 y M2 es una parte integral de la inmunidad del huésped (Kumar *et al.*, 2022).

Ogasawara *et al.*, (2017) demostraron que los POF no solo incrementan la producción de marcadores proinflamatorios como IL-6 y TNF- $\alpha$ , sino también la cantidad de macrófagos y aumentan la expresión de ciclooxigenasa (COX) -2 y



óxido nítrico sintasa como fuente principal de ROS. De esta manera, el estrés oxidativo puede estimular la expresión de factores de transcripción inflamatorios, que son componentes reguladores cruciales en la inducción de respuestas inflamatorias (El-Sayed *et al.*, 2018).

Con respecto al papel del sistema colinérgico, la sobreestimulación del receptor colinérgico debido a la acumulación de ACh en la sinapsis inmunológica, Proskocil *et al.*, (2019) sugirieron que los mecanismos subyacentes a los aumentos inducidos por POF en la expresión de citocinas y la liberación de TNF- $\alpha$  en los macrófagos no implican mecanismos canónicos de toxicidad por POF que involucren la inhibición de la AChE, la modulación de la actividad del AChR o cambios en los niveles intracelulares de calcio. Aunque el proceso inflamatorio es un mecanismo fundamental para la eliminación del agente infeccioso y la reparación de los tejidos afectados (Fioranelli *et al.*, 2021, Nasef *et al.*, 2017), la inflamación excesiva debido a citocinas inflamatorias no controladas es causante de la patogénesis de muchas enfermedades (Gupta *et al.*, 2020). El control sobre los parámetros inflamatorios, lo ejercen principalmente el sistema nervioso central, el sistema endocrino y el sistema inmunitario. El fenómeno inflamatorio debe de ser un mecanismo fisiológico perfectamente guiado por las interacciones neuro-inmuno-endocrinológicamente (Fioranelli *et al.*, 2021).

## 9. Conclusiones

Existe un efecto de diazoxón sobre el sistema colinérgico no neuronal en células mononucleares, evidenciado mediante la inhibición dosis-dependiente de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa, así como en el incremento de los niveles de expresión de los mAChR M2 y M4.

Además, se evidencia la inducción de una respuesta inflamatoria, con el incremento en la expresión de las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  tras la exposición *in vitro* a diazoxón. Los mecanismos subyacentes al aumento inducido por diazoxón en la expresión de citocinas, no implican únicamente mecanismos canónicos de toxicidad por organofosforados que involucren la inhibición de la acetilcolinesterasa, sino también la modulación de los receptores colinérgicos.

Así mismo, mediante el uso de agonistas y antagonistas colinérgicos, se evidenció la capacidad de modulación vía nicotínica (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-12) como muscarínica (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-35) de las citocinas pro y anti inflamatorias.

El fenómeno inflamatorio debe ser un mecanismo fisiológico perfectamente guiado por las interacciones neuro-inmunológicas, sin embargo, diazoxón es capaz de inducir cambios de los principales componentes del sistema colinérgico no neuronal leucocitario, así como los procesos inmunológicos que regula.

## 10. Referencias

- Abreu-Villaça, Y., Filgueiras, C. C., & Manhães, A. C. (2011). Developmental aspects of the cholinergic system. *Behavioural brain research*, 221(2), 367-378.
- Ackerman, K. M., Nakkula, R., Zirger, J. M., Beattie, C. E., & Boyd, R. T. (2009). Cloning and spatiotemporal expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 6 and alpha 4 subunit RNAs. *Developmental Dynamics*, 238(4), 980-992.
- AG Black, S., & Jane Rylett, R. (2012). Choline transporter CHT regulation and function in cholinergic neurons. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*, 12(2), 114-121.
- 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). *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 6(1), 1-7.
- Al-Grahim. 2012. Acute toxicity and effects of sub-lethal malathion exposure on biochemical and haematological parameters of *Oreochromis niloticus*. *Sci. Res. Essays*, 7: 1674:1680
- Alpuche-Gual, L., & Gerardo, G. B. (2008). Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3), 787-797.
- 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 research bulletin*, 66(4), 421-425.
- Ashfaq, H., Soliman, H., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2019). CD4: a vital player in the teleost fish immune system. *Veterinary research*, 50(1), 1-11.
- Assis, C. R. D., Linhares, A. G., Oliveira, V. M., França, R. C. P., Carvalho, E. V. M. M., Bezerra, R. S., & de Carvalho, L. B. (2012). Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. *Science of the total environment*, 441, 141-150.

- ATSDR, 2008. Toxicological profile for diazinon. Agency for toxic substances and disease registry. [Consultado 2016 noviembre 8] Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=512&tid=90>
- Banaee, M., Mirvagefei, A. R., Rafei, G. R., & Amiri, B. M. (2008). Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry.
- Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A. R., & Ahmadi, K. (2011). Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99(1), 1-6.
- Basaure, P., Guardia-Escote, L., Cabré, M., Peris-Sampedro, F., Sánchez-Santed, F., Domingo, J. L., & Colomina, M. T. (2018). Postnatal chlorpyrifos exposure and apolipoprotein E (APOE) genotype differentially affect cholinergic expression and developmental parameters in transgenic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 42-52.
- Bellier, J. P., & Kimura, H. (2011). Peripheral type of choline acetyltransferase: biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. *Journal of chemical neuroanatomy*, 42(4), 225-235.
- Bencan, Z., & Levin, E. D. (2008). The role of  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors in the nicotine-induced anxiolytic effect in zebrafish. *Physiology & behavior*, 95(3), 408-412.
- Bentley, P., Driver, J., & Dolan, R. J. (2011). Cholinergic modulation of cognition: insights from human pharmacological functional neuroimaging. *Progress in neurobiology*, 94(4), 360-388.
- Bodur, E., & Layer, P. G. (2011). Counter-regulation of cholinesterases: Differential activation of PKC and ERK signaling in retinal cells through BChE knockdown. *Biochimie*, 93(3), 469-476.
- Camacho-Pérez, M. R., Covantes-Rosales, C. E., Toledo-Ibarra, G. A., Mercado-Salgado, U., Ponce-Regalado, M. D., Díaz-Resendiz, K. J. G., & Girón-Pérez, M. I. (2022). Organophosphorus Pesticides as Modulating Substances of Inflammation through the Cholinergic Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4523.

- Carruthers, S. P., Gurvich, C. T., & Rossell, S. L. (2015). The muscarinic system, cognition and schizophrenia. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *55*, 393-402.
- Charoenying, T., Suriyo, T., Thiantanawat, A., Chaiyaroj, S. C., Parkpian, P., & Satayavivad, J. (2011). Effects of paraoxon on neuronal and lymphocytic cholinergic systems. *Environmental toxicology and pharmacology*, *31*(1), 119-128.
- Chen, D., Zhang, Z., Yao, H., Cao, Y., Xing, H., & Xu, S. (2014). Pro-and anti-inflammatory cytokine expression in immune organs of the common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *Pesticide biochemistry and physiology*, *114*, 8-15.
- Chernyavsky, A. I., Arredondo, J., Skok, M., & Grando, S. A. (2010). Auto/paracrine control of inflammatory cytokines by acetylcholine in macrophage-like U937 cells through nicotinic receptors. *International immunopharmacology*, *10*(3), 308-315.
- COFEPRIS. Introducción catálogo oficial de plaguicidas. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. 2004. Consultado [21 Noviembre 2016]. Disponible en: [www.cofepris.gob.mx/CAS/.../Catalogo%20de%20plaguicidas/INTRO.pdf](http://www.cofepris.gob.mx/CAS/.../Catalogo%20de%20plaguicidas/INTRO.pdf)
- CONAPESCA, 2015. Comisión Nacional de acuicultura y pesca. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>
- Corrêa, S. A. D. S., Abessa, D. M. D. S., Santos, L. G. D., da Silva, E. B., & Seriani, R. (2017). Differential blood counting in fish as a non-destructive biomarker of water contamination exposure. *Toxicological & Environmental Chemistry*, *99*(3), 482-491.
- Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica chimica acta*, *366*(1), 1-13.
- 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.
- Covantes-Rosales, C. E., Toledo-Ibarra, G. A., Díaz-Resendiz, K. J. G., Ventura-Ramón, G. H., & Girón-Pérez, M. I. (2019). Muscarinic acetylcholine receptor expression in brain and immune cells of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Neuroimmunology*, *328*, 105-107.
- Covantes-Rosales, C. E., Toledo-Ibarra, G. A., González-Navarro, I., Agraz-Cibrian, J. M., Girón-Pérez, D. A., Ventura-Ramón, G. H., ... & Girón-Pérez, M. I. (2020). Diazinon acute exposure induces neutrophil extracellular traps in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food and Agricultural Immunology*, *31*(1), 1004-1013.
- Deiana, S., Platt, B., & Riedel, G. (2011). The cholinergic system and spatial learning. *Behavioural brain research*, *221*(2), 389-411.
- 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. *Journal of immunology research*, *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*, *89*, 12-17.
- Díaz-Resendiz, K. J. G., Bernal-Ortega, J. A., Covantes-Rosales, C. E., Ortiz-Lazareno, P. C., Toledo-Ibarra, G. A., Ventura-Ramón, G. H., & Girón-Pérez, M. I. (2020). In-vitro effect of diazoxon, a metabolite of diazinon, on proliferation, signal transduction, and death induction in mononuclear cells of Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, *105*, 8-15.
- Drever, B. D., Riedel, G., & Platt, B. (2011). The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behavioural brain research*, *221*(2), 505-514.

- Durmaz, H., Sevgiler, Y., & Üner, N. (2006). Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 84(3), 215-226.
- Dutta, H. M., Qadri, N., Ojha, J., Singh, N. K., Adhikari, S., Datta Munshi, J. S., & Roy, P. K. (1997). Effect of diazinon on macrophages of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*: a cytochemical evaluation. *Bulletin of environmental Contamination and Toxicology*, 58(1), 135-141.
- El-Sayed, N. M., Ahmed, A. A., & Selim, M. A. (2018). Cytotoxic effect of chlorpyrifos is associated with activation of Nrf-2/HO-1 system and inflammatory response in tongue of male Wistar rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(12), 12072-12082
- EPA. 2017 United states Environmental protection agency "Pesticides industry sales and usages; Market Estimates". United States.
- Fanta, E., Rios, F. S. A., Romão, S., Vianna, A. C. C., & Freiburger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and environmental safety*, 54(2), 119-130.
- FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2013. [Consultado 27 Octubre 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s00.htm>
- FAO. Programa de información de especies acuáticas. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015- Consultado [noviembre 2016]. Disponible en: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es)
- Ferretti, M., Fabbiano, C., Bari, M. D., Conte, C., Castigli, E., Sciacaluga, M., ... & Calogero, A. (2013). M2 receptor activation inhibits cell cycle progression and survival in human glioblastoma cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17(4), 552-566.
- Fioranelli, M., Rocca, M. G., Flavin, D., & Cota, L. (2021). Regulation of inflammatory reaction in health and disease. *International Journal of*

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8157220/>

- Fitzsimmons K. Tilapia aquaculture in Mexico. In *Tilapia Aquaculture in the Americas. Volume 2*. Edited by Costa-Pierce B, Rakocy J. Baton Rouge: The World Aquaculture Society; Louisiana: 2000:171-183
- Flory, C. M., & Bayne, C. J. (1991). The influence of adrenergic and cholinergic agents on the chemiluminescent and mitogenic responses of leukocytes from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental & Comparative Immunology*, 15(3), 135-142.
- Foster, D. J., Gentry, P. R., Lizardi-Ortiz, J. E., Bridges, T. M., Wood, M. R., Niswender, C. M., ... & Conn, P. J. (2014). M5 receptor activation produces opposing physiological outcomes in dopamine neurons depending on the receptor's location. *The Journal of Neuroscience*, 34(9), 3253-3262.
- Fujii, T., Watanabe, Y., Fujimoto, K., & Kawashima, K. (2002). Expression of acetylcholine in lymphocytes and modulation of an independent lymphocytic cholinergic activity by immunological stimulation. *Biogenic amines*, 17(4), 373-386.
- Fujii, T., Watanabe, Y., Inoue, T., & Kawashima, K. (2003). Upregulation of mRNA encoding the M5 muscarinic acetylcholine receptor in human T- and B-lymphocytes during immunological responses. *Neurochemical research*, 28(3-4), 423-429.
- Fujii, Y. X., Fujigaya, H., Moriwaki, Y., Misawa, H., Kasahara, T., Grando, S. A., & Kawashima, K. (2007). Enhanced serum antigen-specific IgG 1 and proinflammatory cytokine production in nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit gene knockout mice. *Journal of neuroimmunology*, 189(1), 69-74.
- Fujii, Y. X., Tashiro, A., Arimoto, K., Fujigaya, H., Moriwaki, Y., Misawa, H., ... & 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. *Journal of neuroimmunology*, 188(1), 80-85.



- Galloway, T., & Handy, R. (2003). Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology*, 12(1-4), 345-363.
- Giráldez Pérez, R. M., Gaytán Guía, S. P., Dionisio, P., & Rosario, M. (2013). Cholinergic and nitregeric neuronal networks in the goldfish telencephalon.
- Girón-Pérez, M. I., Santerre, A., Gonzalez-Jaime, F., Casas-Solis, J., Hernández-Coronado, M., Peregrina-Sandoval, J., ... & Zaitseva, G. (2007). Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish & Shellfish Immunology*, 23(4), 760-769.
- Girón-Pérez, M. I., Velázquez-Fernández, J., Díaz-Resendiz, K., Díaz-Salas, F., Canto-Montero, C., Medina-Díaz, I., ... & Zaitseva, G. (2009). Immunologic parameters evaluations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentrations of diazinon. *Fish & shellfish immunology*, 27(2), 383-385.
- 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 immunology*, 25(5), 517-521.
- Graef, S., Schönknecht, P., Sabri, O., & Hegerl, U. (2011). Cholinergic receptor subtypes and their role in cognition, emotion, and vigilance control: an overview of preclinical and clinical findings. *Psychopharmacology*, 215(2), 205-229.
- Gupta RC, Milatovic D. Chapter 45 - Organophosphates and carbamates. In: Gupta RC, editor. *Veterinary Toxicology (Second Edition)*. Boston: Academic Press; 2012. p. 573-585. ISBN 9780123859266 <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385926-6.00045-4>
- Gupta, K. K., Khan, M. A., & Singh, S. K. (2020). Constitutive inflammatory cytokine storm: a major threat to human health. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 40(1), 19-23. [https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jir.2019.0085?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed](https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jir.2019.0085?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed)

- Hanna-Mitchell, A. T., Beckel, J. M., Barbadora, S., Kanai, A. J., de Groat, W. C., & Birder, L. A. (2007). Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life sciences*, *80*(24), 2298-2302.
- Helali, I., Ferchichi, S., Maaouia, A., Aouni, M., & Harizi, H. (2016). Modulation of macrophage functionality induced in vitro by chlorpyrifos and carbendazim pesticides. *Journal of Immunotoxicology*, *13*(5), 745-750
- igges, J., Worek, F., Thiermann, H., & Wille, T. (2022). Organophosphorus pesticides exhibit compound specific effects in rat precision-cut lung slices (PCLS): mechanisms involved in airway response, cytotoxicity, inflammatory activation and antioxidative defense. *Archives of toxicology*, *96*(1), 321-334.
- Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Demirel, H. H., Varol, N., Ozyurek, H. A., Zemheri, F., & Kucukkurt, I. (2017). Taurine alleviates malathion induced lipid peroxidation, oxidative stress, and proinflammatory cytokine gene expressions in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *96*, 263-268.
- Kapoor, B. G. (2009). *Fish defenses*. G. Zacccone, J. Meseguer, & A. Garcia-Ayala (Eds.). Plymouth, UK: Science Publishers.
- 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.
- Kawashima, K., & Fujii, T. (2000). Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology & therapeutics*, *86*(1), 29-48.
- Kawashima, K., & Fujii, T. (2003). The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life sciences*, *74*(6), 675-696.
- Kawashima, K., Fujii, T., Moriwaki, Y., & Misawa, H. (2012). Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. *Life sciences*, *91*(21), 1027-1032.
- Kaya, H., Çelik, E. Ş., Yılmaz, S., Tulgar, A., Akbulut, M., & Demir, N. (2015). Hematological, serum biochemical, and immunological responses in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to phosalone. *Comparative Clinical Pathology*, *24*(3), 497-507.

- KEGG. Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27-30.
- Khoshbavar-Rostami, H. A., Soltani, M., & Hassan, H. M. D. (2006). Immune response of great sturgeon (*Huso huso*) subjected to long-term exposure to sublethal concentration of the organophosphate, diazinon. *Aquaculture*, 256(1), 88-94.
- Kianpour, F., Mohseni, M., Beigmohamadi, M., Yazdinezhad, A., Ramazani, A., Hosseini, M. J., & Sharafi, A. (2021). The protective effects of *Ziziphora tenuior* L. against chlorpyrifos induced toxicity: Involvement of inflammatory and cell death signaling pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 272, 113959.
- Klaassen C, Casarett L, Doull J. Toxicology: The basic science of poisons. Internacional. 6a ed. The McGraw-Hill; 2001. p. 981.
- Kokubo, K., Onodera, A., Kiuchi, M., Tsuji, K., Hirahara, K., & Nakayama, T. (2022). Conventional and pathogenic Th2 cells in inflammation, tissue repair, and fibrosis. *Frontiers in Immunology*, 13.
- Kordon, A. O., Pinchuk, L., & Karsi, A. (2021). Adaptive Immune System in Fish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(4).
- Kumar, J., Kumar, M., Sharma, S., Srivastava, N., Singh, R., Hussain, M. A., & Mazumder, S. (2022). Th1–Th2 and M1-M2 interplay sculpt *Aeromonas hydrophila* pathogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology*, 127, 357-365.
- Lasram, M. M., Lamine, A. J., Dhouib, I. B., Bouzid, K., Annabi, A., Belhadjhmida, N., ... & Gharbi, N. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory effects of N-acetylcysteine against malathion-induced liver damages and immunotoxicity in rats. *Life Sciences*, 107(1-2), 50-58.
- Levin, E. D., Rezvani, A. H., Xiao, Y., Slade, S., Cauley, M., Wells, C., ... & Paige, M. A. (2010). Sazetidine-A, a selective  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor desensitizing agent and partial agonist, reduces nicotine self-administration in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(3), 933-939.

- Ley general de salud, Título decimosegundo, Control Sanitario de Productos y Servicios y de su Importación y Exportación. Capítulo XII Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Substancias Tóxicas o Peligrosas. Artículo 278. Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación. 14 de junio de 1992.
- Li, Q. (2007). New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity. *Journal of Nippon Medical School*, 74(2), 92-105.
- Li, Q., Kobayashi, M., & Kawada, T. (2007). Organophosphorus pesticides induce apoptosis in human NK cells. *Toxicology*, 239(1-2), 89-95.
- Li, X., Liu, L., Zhang, Y., Fang, Q., Li, Y., & Li, Y. (2013). Toxic effects of chlorpyrifos on lysozyme activities, the contents of complement C3 and IgM, and IgM and complement C3 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Chemosphere*, 93(2), 428-433.
- Lin, C. Y., Chiang, C. Y., & Tsai, H. J. (2016). Zebrafish and Medaka: new model organisms for modern biomedical research. *Journal of biomedical science*, 23(1), 1-11.
- 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(4), 402-408.
- Magnadottir, B. (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine biotechnology*, 12(4), 361-379.
- Magor, B. G. (2015). Antibody affinity maturation in fishes—our current understanding. *Biology*, 4(3), 512-524.
- Makeesh, M., Bedekar, M. K., & Rajendran, K. V. (2022). Overview of Fish Immune System. *Fish immune system and vaccines*, 1.
- Medzhitov, R. (2021). The spectrum of inflammatory responses. *Science*, 374(6571), 1070-1075.
- Mitra, A., Sarkar, M., & Chatterjee, C. (2019, March). Modulation of immune response by organophosphate pesticides: Mammals as potential model. In *Proceedings of the Zoological Society* (Vol. 72, No. 1, pp. 13-24). Springer India.

- Mueller, T., Vernier, P., & Wullimann, M. F. (2004). The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. *Brain research*, *1011*(2), 156-169.
- Nakanishi, T., Shibasaki, Y., & Matsuura, Y. (2015). T cells in fish. *Biology*, *4*(4), 640-663.
- Nasef, N. A., Mehta, S., & Ferguson, L. R. (2017). Susceptibility to chronic inflammation: an update. *Archives of Toxicology*, *91*(3), 1131-1141.
- Neumann, S., Razen, M., Habermehl, P., Meyer, C. U., Zepp, F., Kirkpatrick, C. J., & Wessler, I. (2007). The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. *Life sciences*, *80*(24), 2361-2364.
- Nilsson, S., Holmgren, S., & Grove, D. J. (1975). Effects of drugs and nerve stimulation on the spleen and arteries of two species of dogfish, *Scyliorhinus canicula* and *Squalus acanthias*. *Acta Physiologica Scandinavica*, *95*(3), 219-230.
- Nishiya, K., Sawada, M., Dijkstra, J. M., Miyamae, J., Okano, M., Katakura, F., & Moritomo, T. (2020). A fish cytokine related to human IL-3, IL-5, and GM-CSF, induces development of eosinophil/basophil/mast-cell type (EBM) granulocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, *108*, 103671.
- Nizri, E., & Brenner, T. (2013). Modulation of inflammatory pathways by the immune cholinergic system. *Amino acids*, *45*(1), 73-85.
- NRA. The NRA review of Diazinon. National Registration Authority for Agricultural and Veterinary chemicals. National Registration Authority. 2002. Canberra, Australia. Disponible en: <http://apvma.gov.au/sites/default/files/publication/14961-diazinon-chemistry.pdf>
- Oenema, T. A., Mensink, G., Smedinga, L., Halayko, A. J., Zaagsma, J., Meurs, H., ... & Dekkers, B. G. (2013). Cross-Talk between Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and Muscarinic M2 Receptors Augments Airway Smooth

- Muscle Proliferation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 49(1), 18-27.
- Ogasawara, N., Matsushima, M., Kawamura, N., Atsumi, K., Yamaguchi, T., Ochi, H., ... & Kawabe, T. (2017). Modulation of immunological activity on macrophages induced by diazinon. *Toxicology*, 379, 22-30
- Orient-López, F., Fontg-Manzano, F., Fernández-Mariscal, E., Vilarrasa-Sauquet, R., & Sañudo-Martín, I. (2009). Polineuropatía tardía secundaria a intoxicación por insecticidas organofosforados. *Rehabilitación*, 43(4), 183–186.
- Palić, D., Andreasen, C. B., Ostojić, J., Tell, R. M., & Roth, J. A. (2007). Zebrafish (*Danio rerio*) whole kidney assays to measure neutrophil extracellular trap release and degranulation of primary granules. *Journal of immunological methods*, 319(1-2), 87-97.
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., & Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76(1), 116-129.
- Poet, T. S., Kousba, A. A., Dennison, S. L., & Timchalk, C. (2004). Physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for the organophosphorus pesticide diazinon. *Neurotoxicology*, 25(6), 1013-1030.
- Poojary, A.; Basha, P.M. Cold stress interaction on organophosphate insecticide poisoning: Age-related assessment in rat cerebral cortex. *Indian J. Exp. Biol.* 2012, 50, 110–116.
- Proskocil, B. J., Bruun, D. A., Thompson, C. M., Fryer, A. D., & Lein, P. J. (2010). Organophosphorus pesticides decrease M2 muscarinic receptor function in guinea pig airway nerves via indirect mechanisms. *PLoS One*, 5(5), e10562.
- Proskocil, B. J., Grodzki, A. C. G., Jacoby, D. B., Lein, P. J., & Fryer, A. D. (2019). Organophosphorus pesticides induce cytokine release from differentiated human THP1 cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 61(5), 620-630

- Qian, J., Galitovskiy, V., Chernyavsky, A. I., Marchenko, S., & Grando, S. A. (2011). Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naive CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. *Genes and immunity*, 12(3), 222-230.
- 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.
- Reda, R. M., Mahmoud, R., Selim, K. M., & El-Araby, I. E. (2016). Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunology*, 50, 255-262.
- Reite, O. B., & Evensen, Ø. (2006). Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish & shellfish immunology*, 20(2), 192-208.
- Rico, E. P., Rosemberg, D. B., Seibt, K. J., Capiotti, K. M., Da Silva, R. S., & Bonan, C. D. (2011). Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicology and teratology*, 33(6), 608-617.
- Roe, K. (2021). An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scandinavian journal of immunology*, 93(2), e12970. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/sji.12970>
- Roshchina, V. V. (2010). Evolutionary considerations of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells. In *Microbial endocrinology* (pp. 17-52). Springer New York.
- Sakai, M., Hikima, J. I., & Kono, T. (2021). Fish cytokines: current research and applications. *Fisheries Science*, 87(1), 1-9.
- Salinas, I. (2015). The mucosal immune system of teleost fish. *Biology*, 4(3), 525-539.
- Sayed, R. K., Zaccone, G., Capillo, G., Albano, M., & Mokhtar, D. M. (2022). Structural and Functional Aspects of the Spleen in Molly Fish *Poecilia*

- sphenops (Valenciennes, 1846): Synergistic Interactions of Stem Cells, Neurons, and Immune Cells. *Biology*, 11(5), 779.
- Scacchi, R., Ruggeri, M., & Corbo, R. M. (2011). Variation of the butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE) genes in coronary artery disease. *Clinica Chimica Acta*, 412(15), 1341-1344.
- Schäfer, M., Koppe, F., Stenger, B., Brochhausen, C., Schmidt, A., Steinritz, D., ... & Pohl, C. (2013). Influence of organophosphate poisoning on human dendritic cells. *Chemico-biological interactions*, 206(3), 472-478.
- Schetinger, M. R., Porto, N. M., Moretto, M. B., Morsch, V. M., da Rocha, J. B. T., Vieira, V., ... & Zanatta, N. (2000). New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPDase activities. *Neurochemical research*, 25(7), 949-955.
- Schlenk, D. (2005). Pesticide biotransformation in fish. *Biochemistry and molecular biology of fishes*, 6, 171-190.
- Seo, J. S., Kim, M. S., Park, E. M., Ahn, S. J., Kim, N. Y., Jung, S. H., ... & Chung, J. K. (2009). Cloning and characterization of muscarinic receptor genes from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecules and cells*, 27(3), 383-390.
- Skok, M. V., Grailhe, R., Agenes, F., & Changeux, J. P. (2007). The role of nicotinic receptors in B-lymphocyte development and activation. *Life sciences*, 80(24), 2334-2336.
- Soltani, M., & Pourgholam, R. (2007). Lysozyme activity of grass carp (*Ctenopharingodon idella*) following exposure to sublethal concentrations of organophosphate, diazinon. *Veterinary Research*, 62, 50-52.
- Somamoto, T., & Nakanishi, T. (2022). Fish immunology. In *Aquaculture Pathophysiology* (pp. 95-119). Academic Press.
- Steele, S., Li, V., Lo, A., Cheng, H., & Perry, S. (2007). The role of the M2 muscarinic receptor in the development of hypoxic bradycardia in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), S182.
- Sunyer, J. O. (2013). Fishing for mammalian paradigms in the teleost immune system. *Nature immunology*, 14(4), 320-326.



- Tellez-Bañuelos, M. C., Santerre, A., Casas-Solis, J., Bravo-Cuellar, A., & Zaitseva, G. (2009). Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. *Fish & shellfish immunology*, 27(2), 105-111.
- Tigges, J., Worek, F., Thiermann, H., & Wille, T. (2022). Organophosphorus pesticides exhibit compound specific effects in rat precision-cut lung slices (PCLS): mechanisms involved in airway response, cytotoxicity, inflammatory activation and antioxidative defense. *Archives of toxicology*, 96(1), 321-334.
- Tigner A, Ibrahim SA & Murray I (2020) Histology, White Blood Cell. Treasure Island: StatPearls Publishing
- 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*, 2013.
- 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*). *Veterinary immunology and immunopathology*, 176, 58-63.
- Toledo-Ibarra, G. A., Resendiz, K. D., Ventura-Ramón, G. H., González-Jaime, F., Vega-López, A., Becerril-Villanueva, E., ... & Girón-Pérez, M. I. (2016). Oxidative damage in gills and liver in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 200, 3-8.
- Toledo-Ibarra, G. A., Giron-Perez, M. I., Covantes-Rosales, C. E., Ventura-Ramon, G. H., Pérez-Sánchez, G., López-Torres, A., ... & Pavón, L. (2021). Alterations in the non-neuronal cholinergic system induced by in-vitro exposure to diazoxon in spleen mononuclear cells of Nile tilapia (*O. niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*, 108, 134-141.
- Uribe, C., Folch, H., Enríquez, R., & Moran, G. J. V. M. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni medicina*, 56(10), 486.
- Van der Zanden, E. P., Snoek, S. A., Heinsbroek, S. E., Stanisor, O. I., Verseijden, C., Boeckxstaens, G. E., ... & De Jonge, W. J. (2009). Vagus nerve activity

- augments intestinal macrophage phagocytosis via nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 4\beta 2$ . *Gastroenterology*, 137(3), 1029-1039.
- Vega-Villasante, F., del Carmen Cortés-Lara, M., 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?-Small scale culture of tilapia (*Oreochromis niloticus*), alimentary alternative for rural and peri-urban families in Mexico?. *REDVET*.
- Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., ... & Al-Abed, Y. (2003). Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*, 421(6921), 384-388.
- Wang, T., & Secombes, C. J. (2013). The cytokine networks of adaptive immunity in fish. *Fish & shellfish immunology*, 35(6), 1703-1718.
- Wang, T., Husain, M., Hong, S., & Holland, J. W. (2014). Differential expression, modulation and bioactivity of distinct fish IL-12 isoforms: implication towards the evolution of Th1-like immune responses. *European journal of immunology*, 44(5), 1541–1551. <https://doi.org/10.1002/eji.201344273>
- Weis, G. C. C., Assmann, C. E., Mostardeiro, V. B., de Oliveira Alves, A., da Rosa, J. R., Pillat, M. M., ... & Costabeber, I. H. (2021). Chlorpyrifos pesticide promotes oxidative stress and increases inflammatory states in BV-2 microglial cells: A role in neuroinflammation. *Chemosphere*, 278, 130417.
- Wessler, I. K., & Kirkpatrick, C. J. (2001). The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 14(6), 423-434.
- Wessler, I., & Kirkpatrick, C. J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology*, 154(8), 1558-1571.
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Unger, R., & Kirkpatrick, C. J. (2003). The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life sciences*, 72(18), 2055-2061.

- Wessler, I., Kirkpatrick, C. J., & Racke, K. (1999). The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26(3), 198-205.
- Wilson, A. B. (2017). MHC and adaptive immunity in teleost fishes. *Immunogenetics*, 69(8), 521-528.
- Xie, H. Q., Ma, Y., Fu, H., Xu, T., Luo, Y., Liu, Y., ... & Zhao, B. (2021). New perspective on the regulation of acetylcholinesterase via the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Neurochemistry*, 158(6), 1254-1262.
- Xing, J., Ma, J., Tang, X., Sheng, X., & Zhan, W. (2017). Characterizations of CD4-1, CD4-2 and CD8 $\beta$  T cell subpopulations in peripheral blood leucocytes, spleen and head kidney of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Immunology*, 85, 155-165.
- Zaitseva GP, Santerre-Lucas A, Casas-Solís J, Peregrina-Sandoval J, León-Sánchez R. En: Tilapia: Aspectos Biológicos y Productivos. 1<sup>a</sup> ed. Editado por Universidad de Guadalajara, Coordinación Editorial, México: 2006.
- Zhang, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, C., Deng, H., Si, C., & Xiong, H. (2019). Interleukin-35 in immune-related diseases: protection or destruction. *Immunology*, 157(1), 13–20. <https://doi.org/10.1111/imm.13044>
- Zhang, X. Y., Cui, Z. W., Wu, N., Lu, X. B., Lu, L. F., Chen, D. D., Geng, H., & Zhang, Y.A. (2019). Investigating the potential immune role of IL-35 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Developmental and comparative immunology*, 93, 78–88.
- Zhang, X., Li, S., Wang, C., Tian, H., Wang, W., & Ru, S. (2017). Effects of monocrotophos pesticide on cholinergic and dopaminergic neurotransmitter systems during early development in the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 328, 46-53.
- Zirger, J. M., Beattie, C. E., McKay, D. B., & Boyd, R. T. (2003). Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Gene expression patterns*, 3(6), 747-754.

- Zou, J., & Secombes, C. J. (2016). The function of fish cytokines. *Biology*, 5(2), 23.
- Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E., & Kaattari, S. (2005). B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney. *The Journal of Immunology*, 174(11), 6608-6616.

## 11. ANEXOS

### ANEXO 1: Viabilidad celular

Se realizó un seguimiento de la viabilidad del cultivo a 0, 24 y 48 h para el grupo basal (únicamente con medio de cultivo y sin ningún tipo de estímulo). Los resultados muestran que las condiciones de cultivo después son favorables para las células (tabla 14).

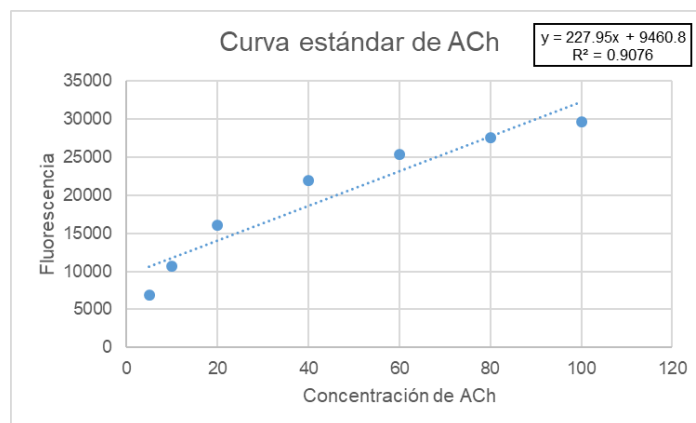
**Tabla 14.** Viabilidad de cultivo basal durante diferentes tiempos de incubación

	Inicial (0 h)	24 h	48 h
Viable	98.7 ± 0.5	95.5 ± 2.8	90.3 ± 3.8
No viable	1.2 ± 0.4	3.9 ± 2.6	7.4 ± 1.8

\*n=6 por cada tratamiento

### ANEXO 2: Curva de ACh

Inicialmente, para calcular la concentración de ACh en las muestras de CMB, se realizó una curva estándar de ACh (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µM) de acuerdo a las instrucciones del kit, mediante la cual se interpolaron los resultados y se calculó la concentración de ACh en las CMB (figura 30).



**Figura 30.** Curva estándar de ACh (5 – 100 µM)

### ANEXO 3: Curvas de disociación y eficiencia

Se realizaron curvas de eficiencia de la amplificación usando 0.5, 1, 5, 25, 50 y 100 ng de cDNA para los genes de interés. A continuación, se muestran las curvas de disociación y eficiencia para los genes: EFL-1 (figura 31), mAChR M2 (figura 32), M3 (figura 33), M4 (figura 34) y M5 (figura 35), nAChR  $\beta$ 2 (figura 36), IL-1 $\beta$  (figura 37), IL-6 (figura 38), IL-10 (figura 39) y TNF- $\alpha$  (figura 40).

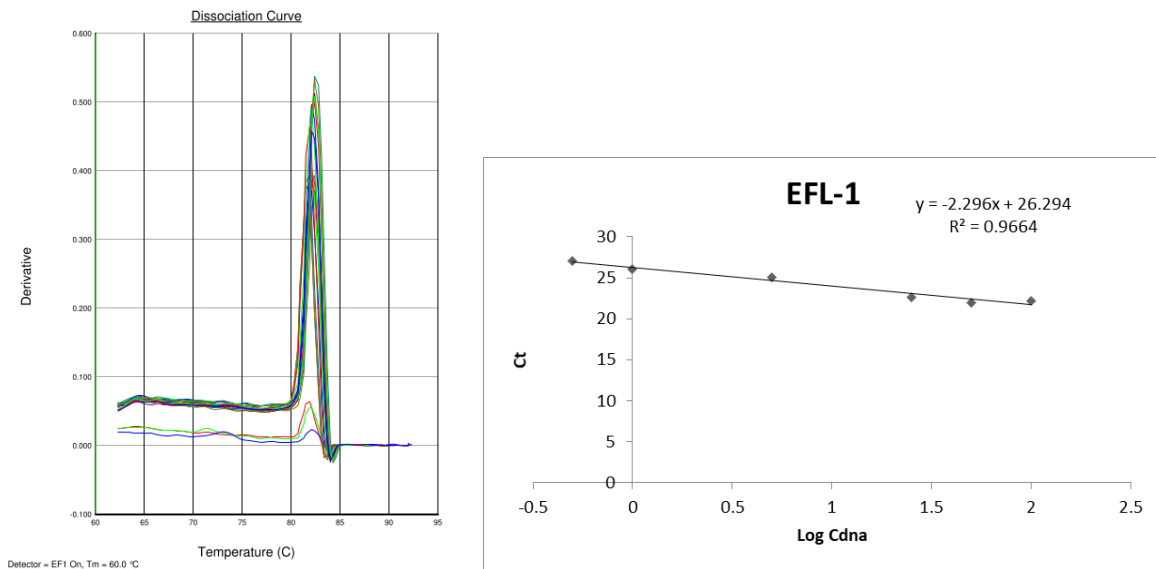


Figura 31. Curvas de disociación y eficiencia de la amplificación de EFL-1.

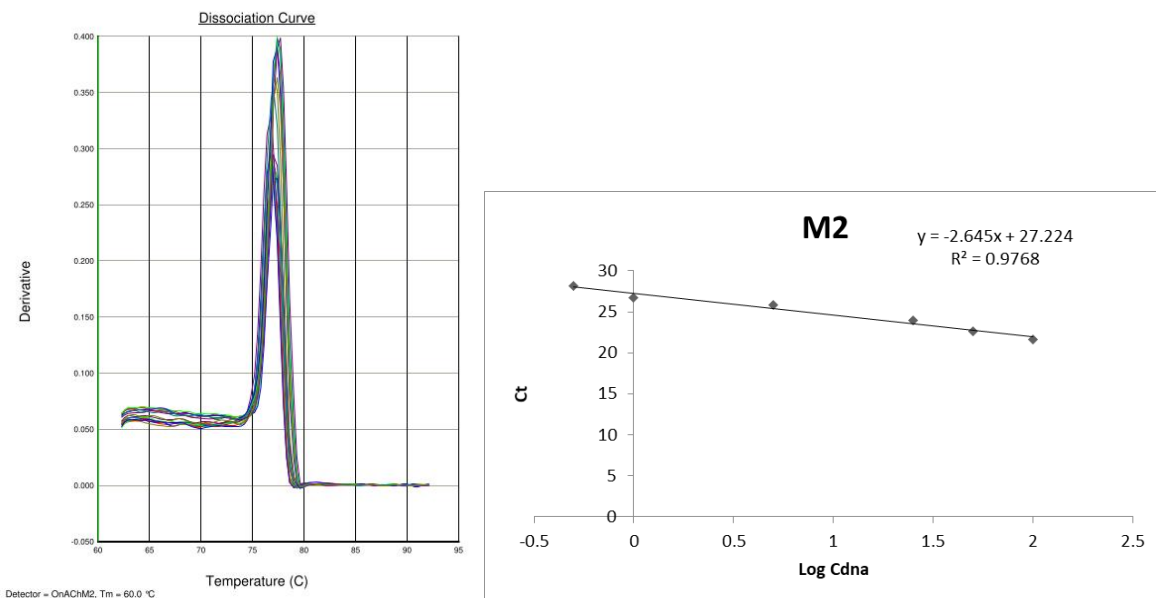
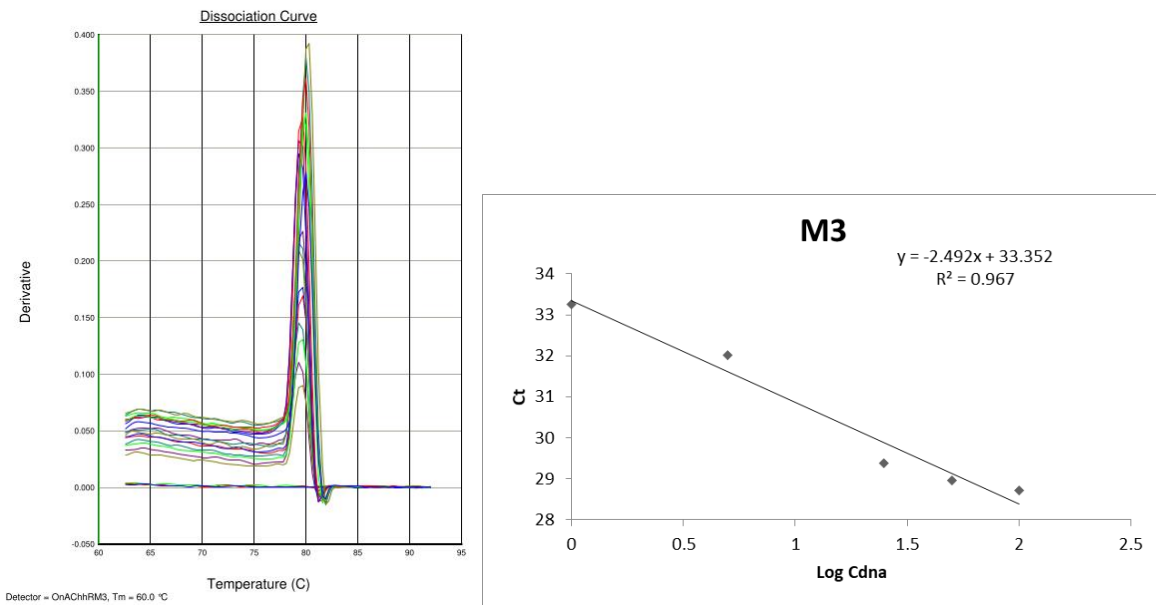
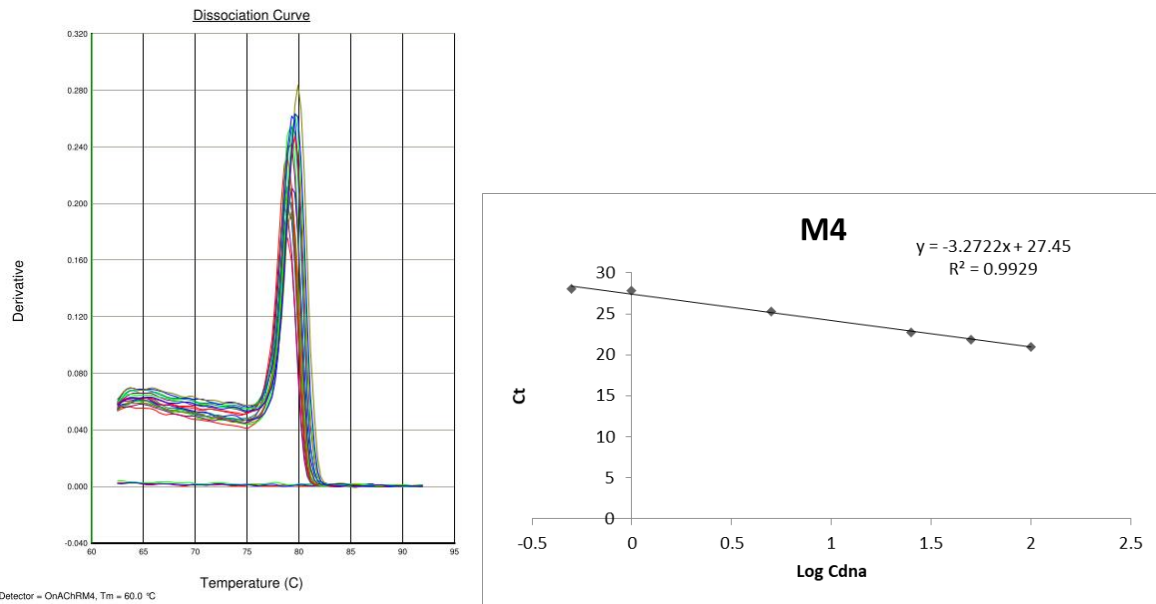


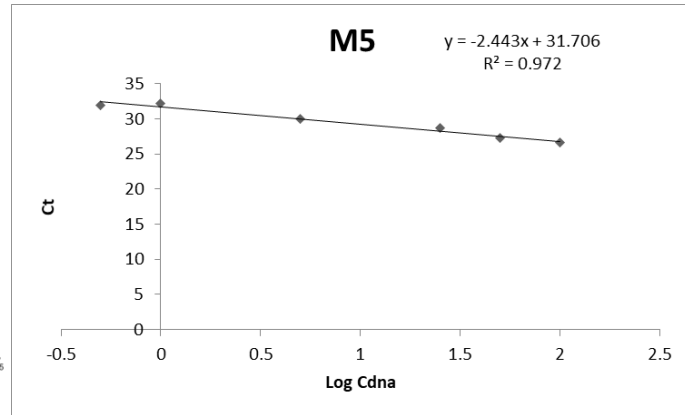
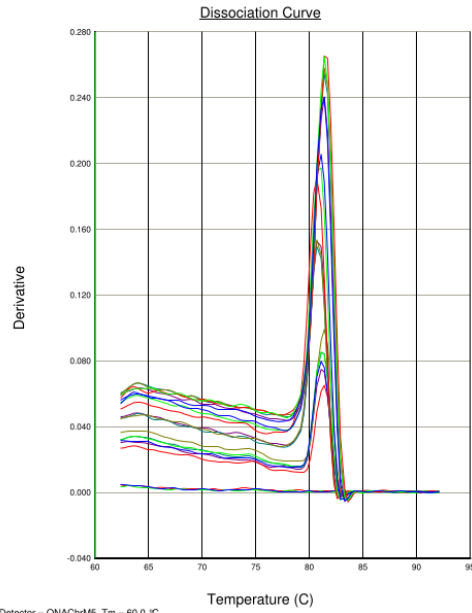
Figura 32. Curvas de disociación y eficiencia de la amplificación de mAChR M2.



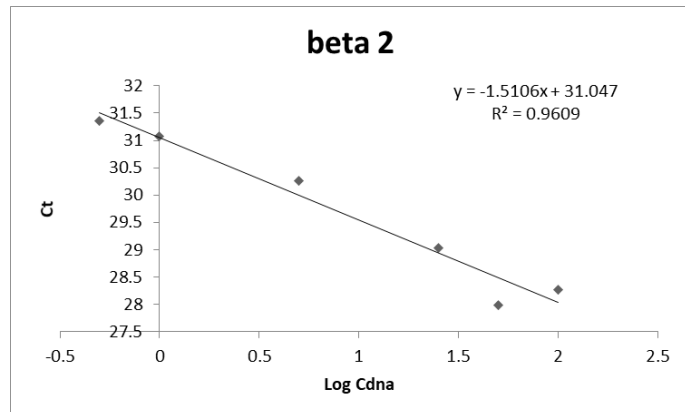
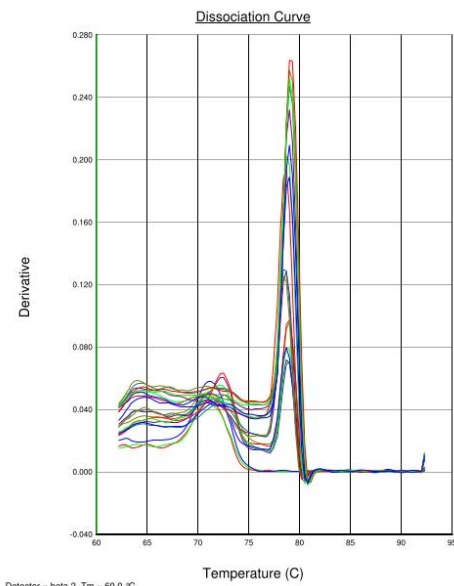
**Figura 33.** Curvas de disociación y eficiencia de la amplificación de mAChR M3.



**Figura 34.** Curvas de disociación y eficiencia de la amplificación de mAChR M4.

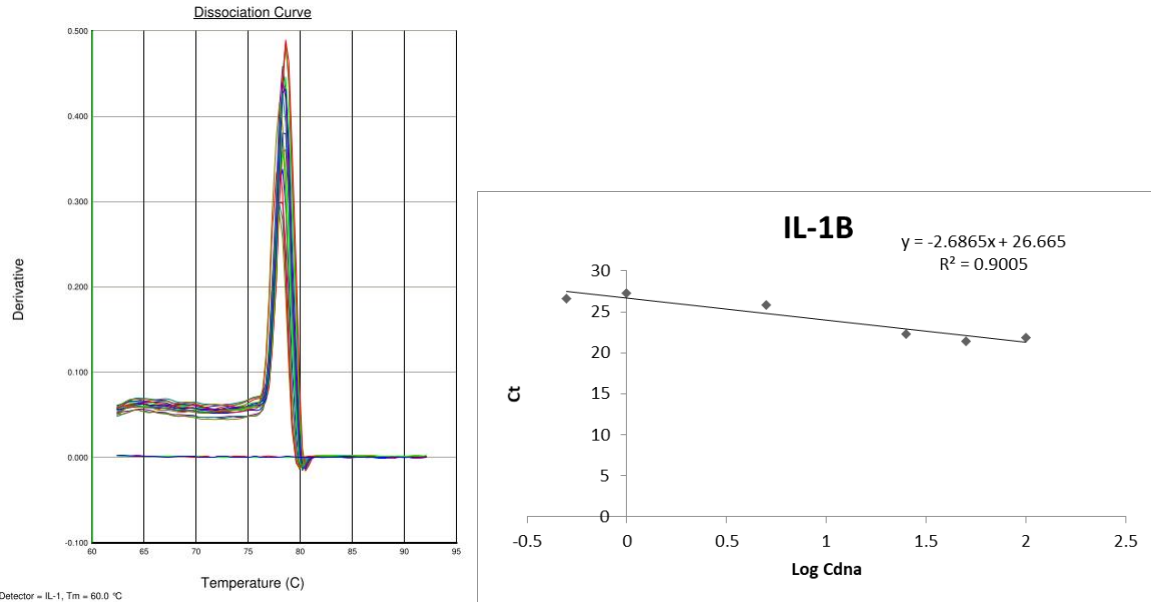


**Figura 35.** Curvas de disociación y eficiencia de la amplificación de mAChR M5.

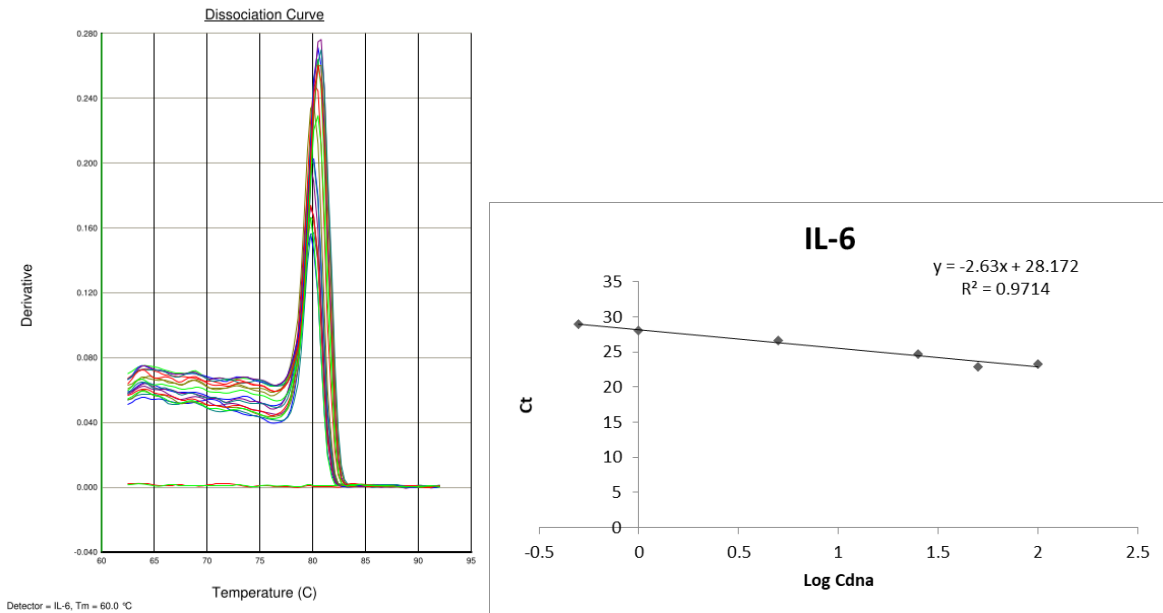


**Figura 36.** Curvas de disociación y eficiencia de la amplificación de nAChR  $\beta$ 2.

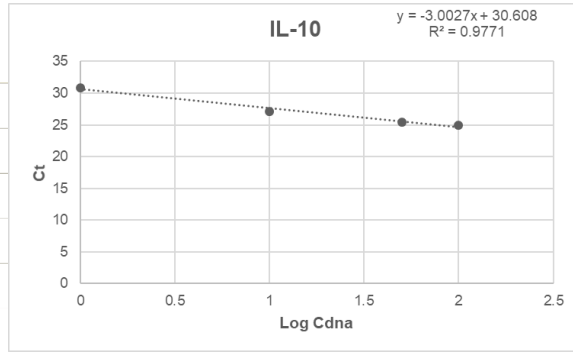
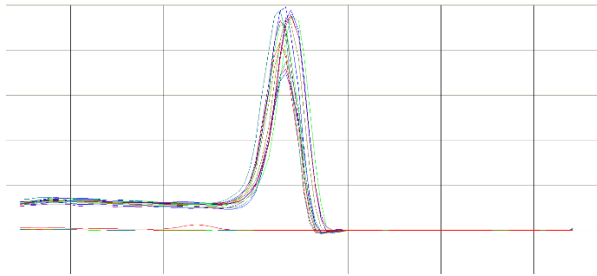




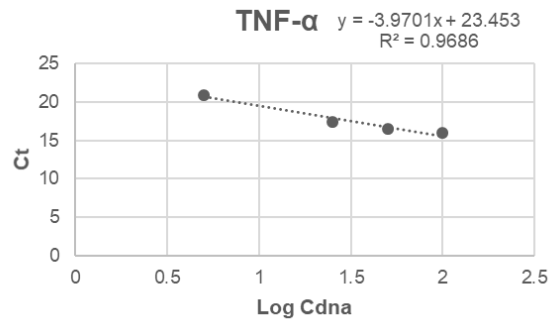
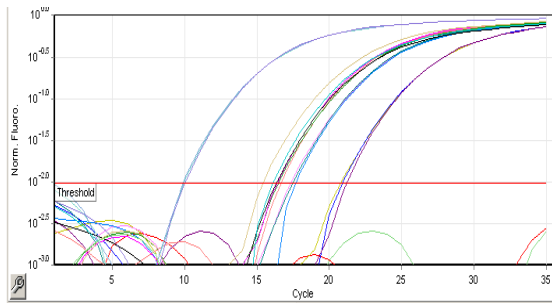
**Figura 37.** Curvas de disociación y eficiencia de la amplificación de interleucina 1β.



**Figura 38.** Curvas de disociación y eficiencia de la amplificación de interleucina 6.



**Figura 39.** Curvas de disociación y eficiencia de la amplificación de IL-10.



**Figura 40.** Curvas de disociación y eficiencia de la amplificación de TNF-α.