

Effect of chlorpyrifos on the immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Efecto de clorpirifos sobre la respuesta inmune de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*).

Díaz-Resendiz, K.J.G., Girón-Pérez, M.I.*

Universidad Autónoma de Nayarit, Secretaría de Investigación y Posgrado, Laboratorio de Inmunotoxicología, Cd. de la Cultura Amado Nervo s/n. C.P. 63190, Tepic, Nayarit, México.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of chlorpyrifos, an organophosphate pesticide, on immune response parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The results indicated that chlorpyrifos (0.051, 0.102 and 0.255 mg L⁻¹) did not provoke significant changes in the proliferation capacity of lymphocytes of tilapia; however, at 0.051 mg L⁻¹, this pesticide induced a diminishment in concentration of IgM in plasma. On the other hand, organisms exposed to high concentration of the pesticide showed an increase in the lysozyme activity compared to control fish.

KEY WORDS

Chlorpyrifos, immunotoxicity, Nile tilapia.

Introduction

Fishes immune system is susceptible to be affected by pesticides that are present in bodies of water (Bols *et al.*, 2001). A group of pesticides frequently

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: January 14th 2014.

Accepted/Aceptado: May 15th 2014.

*Corresponding Author:

M.I. Girón-Pérez. Universidad Autónoma de Nayarit, Secretaría de Investigación y Posgrado, Laboratorio de Inmunotoxicología, Cd. de la Cultura Amado Nervo s/n., C.P. 63190, Tepic Nayarit, México. Phone: +52(311) 211 8800 ext.8922. E-mail: ivan_giron@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de clorpirifos, un plaguicida organofosforado, sobre parámetros de la respuesta inmune de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Los resultados indicaron que clorpirifos (0.051, 0.102 y 0.255 mg L⁻¹) no provocó cambios significativos en la capacidad de proliferación de linfocitos de tilapia; sin embargo, a la concentración de 0.051 mg L⁻¹, este plaguicida indujo una disminución de la concentración de IgM en plasma. Por otra parte, los organismos expuestos a altas concentraciones del plaguicida, mostraron un incremento en la actividad de lisozima en comparación con peces control.

PALABRAS CLAVE

Clorpirifos, inmunotoxicidad, Tilapia nilótica.

Introducción

El sistema inmune de peces es susceptible de ser afectado por plaguicidas presentes en los cuerpos de agua (Bols *et al.*, 2001). Un grupo de plaguicidas frecuentemente utilizado alrededor del mundo son los plaguicidas organofosforados (POF), los cuales son inhibidores irreversibles de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Clorpirifos (O,O-dietil O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato) es un POF utilizado para el control de gusanos que afectan

used around the world are organophosphate pesticides (OPs), which are irreversible inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). Chlorpyrifos (O,O-dyethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate) is a widely used OPs for worm control that might affect the growth of cotton, corn, fruit and ornamental plants (ATSDR, 1997). Nowadays, there are fishes studies that show that exposition to chlorpyrifos cause effects on the immune response of these organisms (Harford *et al.*, 2005; Girón-Pérez *et al.*, 2006; Soltani and Pourgholam, 2007; Ali *et al.*, 2009; Eder *et al.*, 2009).

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a teleost fish that shows resistance to diseases and high capacity to tolerate biotic and antibiotic stress, which makes it a rentable species for aquaculture (Casas-Solis *et al.*, 2007). Therefore, tilapia is the freshwater fish most widely distributed in tropical and subtropical regions around the world (Fitzimons, 2000). Nevertheless, the tilapia's resistance to diseases and environmental stress can be affected by the presence of OPs, such as chlorpyrifos (Galloway and Handy, 2003). Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on parameters of immune response (lymphoproliferation, lysozyme activity and IgM concentration) of *O. niloticus*.

Methods and Materials

Male fish of the species *O. niloticus*, in juvenile state (2 months old and 80 g) were obtained from a fish farm in Nayarit, Mexico. Organisms were kept in glass fish tanks of 40-L with constant oxygenation, under optimal temperature conditions 25 ± 2 °C, dissolved oxygen 7.0 ± 0.2 mg L⁻¹, and oxygen saturation 85.4 ± 2.4 %, during a 10 day term for acclimatization.

A commercial formula of chlorpyrifos ethyl (Lorsban*480EM) was used in this study. Previous data obtained by our group work (Girón-Pérez *et al.*, 2006) showed that in a static bioassay of 96 h, lethal concentration 50 (LC₅₀) of chlorpyrifos ethyl for *O. niloticus* was 1.023 mg L⁻¹. Hence, pesticide concentrations used for this study were made based on a 1/4, 1/10 and 1/20 of the reported LC₅₀, which correspond to 0.255, 0.102, 0.051 mg L⁻¹ of chlorpyrifos. Bioassays were made under static conditions for a 96 h period.

Mononuclear cells were isolated from the spleen of Nile tilapia (n=10) through histopaque-1077. 1×10^6 ; cells collo-

el cultivo de algodón, maíz, frutas y plantas ornamentales (ATSDR, 1997). Actualmente existen estudios en peces que muestran que la exposición a clorpirifos, causan efectos sobre la respuesta inmune de estos organismos (Harford *et al.*, 2005; Girón-Pérez *et al.*, 2006; Soltani y Pourgholam, 2007; Ali *et al.*, 2009; Eder *et al.*, 2009).

Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*,) es un pez teleosteo que presenta resistencia a enfermedades y alta capacidad de tolerar el estrés biótico y abiótico; lo que lo hace una especie rentable para la acuicultura (Casas-Solis *et al.*, 2007). Por esta razón, tilapia es el pez dulceacuícola ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Fitzimons, 2000). No obstante, la alta resistencia a enfermedades y estrés ambiental de tilapia, esta especie puede ser afectado por la presencia de POF, como clorpirifos (Galloway y Handy, 2003). Por lo que, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de concentraciones subletales de clorpirifos sobre parámetros de la respuesta inmune (proliferación de linfocitos, actividad de lisozima y concentración de IgM) de *O. niloticus*.

Materiales y Métodos

Peces macho de la especie *O. niloticus*, en estadio juvenil (2 meses de edad y 80 g), fueron obtenidas de una granja acuícola en Nayarit, México. Los organismos se mantuvieron en peceras de vidrio de 40-L con oxigenación constante, bajo condiciones óptimas de temperatura 25 ± 2 °C, oxígeno disuelto 7.0 ± 0.2 mg L⁻¹, y saturación de oxígeno 85.4 ± 2.4 %, por un periodo de 10 días para aclimatación.

Una formulación de clorpirifos-etil comercial (Lorsban*480EM) fue utilizado en el presente estudio. Datos previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo (Girón-Pérez *et al.*, 2006) mostraron que en un bioensayo estático de 96 h la concentración letal 50 (LC₅₀) de clorpirifos etil para *O. niloticus*, fue de 1.023 mg L⁻¹. Por lo que las concentraciones del plaguicida utilizadas para el presente estudio se realizaron en base a 1/4, 1/10 y 1/20 de la LC₅₀ ya reportada, los cuales corresponden a 0.255, 0.102, 0.051 mg L⁻¹ de clorpirifos. Los bioensayos se realizaron bajo condiciones estáticas durante un periodo de 96 h.

Las células mononucleares fueron aisladas del bazo de tilapia nilótica (n=10) mediante la utilización de histopaque-1077. 1×10^6 células colocadas en una placa de 96

cated in a 96 well plate were stimulated with 20 ng mL⁻¹ PMA and 1 µg mL⁻¹ ionomycin. Afterwards, cells were incubated for 72 h at 28 °C and 5 % CO₂. Once incubation time passed by, cell proliferation was determined through MTT [3-(4,5-diamethyl-2-thiazolyl) 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium] according to Mosman technique (1983).

IgM concentration in the tilapia plasma in groups exposed to chlorpyrifos and control groups (n=10) were analyzed through ELISA using purified tilapia IgM, rabbit antibody anti-IgM of tilapia (a-IgM) and anti-IgM marked with radish peroxidase (a-IgM HRP) (Takemura, 1993; Dominguez *et al.*, 1993).

The lysozyme assay was determined in plasma, following the technique of Parry *et al.*, (1965) with some modifications. 25 µL of *O. niloticus* plasma was mixed with 175 µL of *Micrococcus lysodeikticus* in PBS, pH 5.8. The optical density was determined immediately by interpolating the results in a standard curve of lysozyme of hen egg (41,800 U mL⁻¹).

The average (± S.D.) was determined for each group of study in each experiment. Data were analyzed using a one way ANOVA and Tukey *post hoc* test (Sigma Stat 2.0), the statistical difference was determined with level p<0.05 among groups of study.

Results and Discussion

The results of this study indicate that exposition to chlorpyrifos in *O. niloticus* did not provoke significant changes in the lymphoproliferation, compared to the non-exposure group (control) (Figure 1A). However, fish exposed to a concentration of 0.051 mg L⁻¹ of the pesticide showed a reduction in the levels of IgM. In contrast, fish exposed to 0.102 and 0.255 mg L⁻¹ showed similar concentrations of IgM compared to the control group (Figure 1B). On the other hand, the results of the lysozyme activity showed an increase in this parameter, when organisms were exposed to 0.255 mg L⁻¹ compared to control group. Yet, organisms exposed to different evaluated concentrations showed an increase dependent-doses in this parameter (Figure 1C).

There are studies about immunotoxicity or immunomodulatory effects of chlorpyrifos in fishes, however, they remain to be scarce. In this sense, Harford *et al.*, (2005)

pozos, fueron estimuladas con 20 ng mL⁻¹ PMA y 1 µg mL⁻¹ ionomycin. Posteriormente las células se incubaron por 72 h a 28 °C y 5 % CO₂. Pasado el tiempo de incubación se determinó la proliferación celular mediante MTT [3-(4,5-diamethyl-2-thiazolyl) 2,5-diphenyl-2H-tetrazolium] de acuerdo a la técnica de Mosman (1983).

La concentración de IgM en el plasma de tilapia en grupos expuestos a clorpirifos y grupos control (n=10) fueron analizados mediante ELISA utilizando IgM de tilapia purificado, anticuerpo de conejo anti-IgM de tilapia (a-IgM) y anti-IgM marcado con peroxidasa de rábano (a-IgM-HRP) (Takemura, 1993; Dominguez *et al.*, 1993).

El ensayo de lisozima se determinó en plasma, siguiendo la técnica de Parry *et al.*, (1965) con algunas modificaciones. 25 µL de plasma de *O. niloticus* fue mezclado con 175 µL de *Micrococcus lysodeikticus* en PBS, pH 5.8. La densidad óptica se determinó inmediatamente y después de 15 min a 450 nm. La actividad de lisozima en plasma de tilapia se determinó interpolando los resultados en una curva estándar de lisozima de huevo de gallina (41,800 U mL⁻¹).

La media (± S.D.) se determinó para cada grupo de estudio en cada experimento. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y prueba de Tukey *post hoc* (Sigma Stat 2.0), la diferencia estadística se determinó con nivel de p<0.05 entre los grupos de estudio.

Resultados y Discusión

Los resultados del presente estudio indican que la exposición de *O. niloticus* a clorpirifos, no provocó cambios significativos en la proliferación de linfocitos, comparada con el grupo no expuesto (control) (Figure. 1A). Sin embargo peces expuestos a una concentración de 0.051 mg L⁻¹ del plaguicida mostraron una reducción en los niveles de IgM. En contraste, a los peces expuestos a 0.102, y 0.255 mg L⁻¹, que mostraron similares concentraciones de IgM comparado con el grupo control (Figure 1B). Por otra parte, los resultados de la actividad de lisozima mostraron un incremento en este parámetro, cuando los organismos se expusieron a 0.255 mg L⁻¹ comparado con el control. No obstante, los organismos expuestos a las diferentes concentraciones evaluadas, mostraron un incremento dosis-dependiente en este parámetro (Figure 1C).

Existen estudios sobre inmunotoxicidad o efectos inmunomoduladores de clorpirifos en peces, no obstante estos

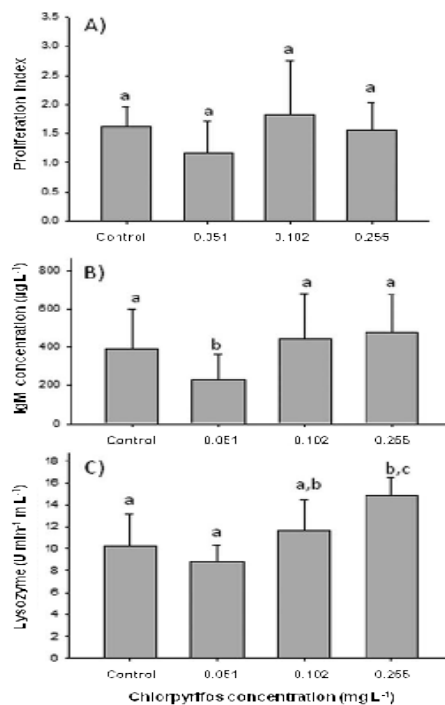


Figure 1. A) Proliferation of lymphocytes, B) Concentration of IgM, C) Activity of Lysozyme in Nile tilapia (n=10) exposed to chlorpyrifos during 96 h and control group. Results are represented as the average \pm SD. Bars with different letters are statistically different ($p < 0.05$).

Figura 1. A) proliferación de linfocitos, B) concentración de IgM, C) Actividad de lisozima en tilapia nilótica (n=10) expuesto a clorpirifos por 96 h y grupo control. Los resultados son representados como la media \pm SD. Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

reported that *in vitro* exposition to chlorpyrifos in Australian Cod (*Maccullochella peelii*) did not cause serious immunotoxic effects. Still, the pesticide diminished the number of lymphocytes in this fish. On the other hand, a previous research made by our group work showed that exposition to a 0.422 and 0.211 mg L⁻¹ of chlorpyrifos during 96 h did not modify hematological parameters of *O. niloticus*; however, it did cause a significant decrease in the phagocytic capacity and in the percentage of phagocytic cells present in blood of *O. niloticus* (Girón-Pérez *et al.*, 2006). In addition, in 2009, Eder *et al.*, showed an increase in the synthesis of heat shock protein 60, 70 and 90 kDa in muscle/liver and in the TGF- β and IL-1 β expressions in kidneys of salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to chlorpyrifos (1.2 and 7.2 mg L⁻¹) for 96 h. There were, however, no changes detected in the transcription of these genes in splenocytes.

According to what has been reported, there are no studies of the effect of chlorpyrifos in the proliferation of

siempre siendo escasos. En este sentido, Harford *et al.*, (2005) reportaron que la exposición *in vitro* a clorpirifos en Bacalao australiano (*Maccullochella peelii*), no ocasionó efectos inmunotóxicos graves. Sin embargo, el plaguicida disminuyó el número de linfocitos en este pez. Por otra parte, una investigación previa realizada por nuestro grupo de trabajo, mostró que la exposición a 0.422 y 0.211 mg L⁻¹ de clorpirifos durante 96 h. no modificó parámetros hematológicos de *O. niloticus*. Sin embargo, provocó una disminución significativa en la capacidad fagocítica y en el porcentaje de células fagocíticas presentes en sangre de *O. niloticus* (Girón-Pérez *et al.*, 2006). Además, en el 2009, Eder *et al.*, mostraron un incremento en la síntesis de proteínas de choque térmico 60, 70 y 90 kDa en músculo/hígado y en la expresión de TGF- β e IL-1 β en riñón de salmón (*Oncorhynchus tshawytscha*) expuestos a clorpirifos (1.2 and 7.2 mg L⁻¹) por 96 h. Sin embargo, no se detectaron cambios en la transcripción de estos genes en esplenocitos.

De acuerdo a lo reportado, no existen estudios del efecto de clorpirifos en la proliferación de linfocitos de peces. Por

lymphocytes of fishes. Hence, the results of this study are the first ones to show that this pesticide did not affect the response capability to mitogens in Nile tilapia. These results contrast with Thrasher *et al.*, (2002), who reported that humans chronically exposed to chlorpyrifos showed a decrease in the proliferative capacity of lymphocytes in response to phytohaemagglutinin and concanavalin (Thrasher *et al.*, 2002). In contrast, Ali *et al.*, (2009) showed that exposition to chlorpyrifos induces alterations in DNA of lymphocytes (comet assay and micronucleus) in fish *Channa punctatus*.

Regarding the effect of organophosphate pesticides on the activity of lysozyme, very few studies have been made. Soltani and Pourgholam (2007) reported that exposition to 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ of diazinon during seven days in carp (*Ctenopharyngodon idella*) provoked a significant increase in the lysozyme activity present in kidneys and spleen of this fish. Authors suggested that at sublethal concentrations, diazinon stimulated some unspecific defense mechanisms. Nevertheless, lysozyme, which is an unspecific defense mechanism, can also be altered by physical stress. Demers *et al.*, (1997), reported that the animal management stimulated an increase in the activity of the lysozyme in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), which was correlated with the increase in the levels of cortisol and adrenaline.

The results in this study suggest that the chlorpyrifos in the assayed concentrations had a low immunotoxic effect in Nile tilapia. Still, under assayed conditions, it induced an increase in the lysozyme activity. Yet, further research is needed in order to understand the immunomodulation mechanisms of this type of pesticide in Nile tilapia.

Acknowledgments

The first author of the paper receives a grant from CONACYT-México (number 265138) and She is student of "Posgrado en Ciencias Biológico-Agropecuarias y Pesqueras (CBAP)" of Universidad Autónoma de Nayarit (Mexico).

lo que los resultados del presente estudio son los primeros que muestran que este plaguicida no afectó la capacidad de respuesta a mitógenos en tilapia nilótica. Estos resultados contrastan con los de Thrasher *et al.*, (2002), quienes reportaron que humanos expuestos crónicamente a clorpirifos, mostraron una disminución en la capacidad proliferativa de los linfocitos en respuesta a la fitohemaglutinina y concanavalina (Thrasher *et al.*, 2002). Por otro lado, Ali *et al.*, (2009), mostró que la exposición a clorpirifos induce alteraciones en el ADN de linfocitos (ensayo de cometa y de micronúcleos) en el pez *Channa punctatus*.

En lo que respecta al efecto de plaguicidas organofosforados sobre la actividad de lisozima son poco los estudios que se han realizado. Así, Soltani y Pourgholam (2007), reportaron que la exposición a 2.0 y 4.0 mg L⁻¹ de diazinón durante siete días en carpa (*Ctenopharyngodon idella*), provocó un aumento significativo en la actividad de la lisozima presente en riñones y bazo de este pez. Los autores sugirieron que diazinón a concentraciones subletales estimuló algunos mecanismos de defensa inespecíficos. Sin embargo, la lisozima, la cual es un mecanismo de defensa inespecífica, también puede ser alterada por estrés físico. Demers *et al.*, (1997), reportaron que el sólo manejo de animales estimuló un incremento en la actividad de la lisozima en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), el cual se correlacionó con el aumento de los niveles de cortisol y adrenalina.

Los resultados del presente estudio sugieren que el clorpirifos en las concentraciones evaluadas, tuvo un efecto poco inmunotóxico en tilapia nilótica. Sin embargo, bajo condiciones ensayadas, indujo un incremento en la actividad de la lisozima. No obstante, se necesitan más investigaciones para entender los mecanismos de inmunomodulación de este tipo de plaguicida en tilapia nilótica.

Agradecimientos

El primer autor del artículo recibe beca de CONACYT-México (número 265138) y es estudiante de posgrado en el Programa de Ciencias Biológico-Agropecuarias y Pesqueras (CBAP) de la Universidad Autónoma de Nayarit.

References

- Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B. and Lakra, W.S. 2009. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food and Chemical Toxicology* 47(3): 650-656.
- ATSDR 1997. Agency for Toxic Substances & Disease Registry. En: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp84.html>, última consulta: marzo de 2014.
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C. and Lee LE. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25(8-9): 853-73.
- Casa-Solis, J., Santerre, A., Girón-Pérez, M.I., Reynoso-Orozco, R. and Zaitseva, G.A. 2007. Comparative study of phagocytic activity and lymphoproliferative response in five varieties of tilapia *Oreochromis* spp. *Journal of Fish Biology* 71: 1541-1545.
- Demers, N. and Bayne, C. 2007. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology* 21: 363-373.
- Dominguez, M., Takemura, A., Tsuchiya, M. and Nakamura, S. 1993. Impact of different environmental factors on the circulating immunoglobulin levels in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 241: 491-500.
- Eder, K., Leutenegger, C., Köhler, H. and Werner, I. 2009. Effects of neurotoxic insecticides on heat-shock proteins and cytokine transcription in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(1): 182-90.
- Fitzimons, K. 2000. Future trends of tilapia aquaculture in the Americas. University of Arizona. En: <http://www.bio-nica.info/biblioteca/FitzsimmonsTilapia>, última consulta: enero de 2014.
- Galloway, T. and Handy, R. 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. *Ecotoxicology* 12(1-4): 345-63.
- Girón-Pérez, M.I., Barcelos-García, R., Vidal-Chavez, Z.G., Romero-Bañuelos, C.A. and Robledo-Marengo, M.L. 2006. Effect of chlorpyrifos on the hematology and phagocytic activity of Nile tilapia cells (*Oreochromis niloticus*). *Toxicology Mechanisms and Methods* 6: 495-499.
- Harford, A.J., O'Halloran, K. and Wright, P.F. 2005. The effects of in vitro pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aquatic Toxicology* 75(4): 330-42.
- Mosman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Parry, R.M., Chandan, R.C. and Shahani, K.M. 1965. A rapid and sensitive assay of uranimidase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 119: 384-386.
- Soltani, M. and Pourgholam, R. 2007. Lysozyme activity of grass carp (*Ctenopharingodon idella*) following exposure to sublethal concentrations of organophosphate, diazinon. *Veterinary Research* 62: 50-52.
- Takemura, A. 1993. Changes in an immunoglobulin M (Igm)-like protein during larval stages in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Aquaculture* 115: 223-241.
- Thrasher, J.D., Heuser, G. and Broughton, A. 2002. Immunological abnormalities in humans chronically exposed to chlorpyrifos. *Archives of Environmental Health* 57(3): 181-7.

Cite this paper/Como citar este artículo: Díaz-Resendiz, K.J.G., Girón-Pérez, M.I. (2014). Effect of chlorpyrifos on the immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Revista Bio Ciencias* 3(1): 59-64. <http://editorial.uan.edu.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/117/92>

