



Efecto del Temephos sobre la respuesta inmune innata y adaptativa de *Mus musculus* BALB/c inoculado con *Candida albicans*

Effect of Temephos on the innate and adaptive immune response of *Mus musculus* BALB/c inoculated with *Candida albicans*

Manuela Luján Velásquez, Raúl Anhuamán Azabache, Jaime Agreda Callirgos, Jaime Agreda Gaitán, Eduardo José Muñoz Ganoza y Gerardo Alayo Espinoza

Laboratorio de Inmunología. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

RESUMEN

Se determinó el efecto de tres concentraciones de Temephos sobre la respuesta inmune innata y adaptativa del ratón, *Mus musculus* BALB/c, inoculados con *Candida albicans*. Para ello, se trabajó con cuatro grupos de animales: tres experimentales, a los cuales se les administró Temephos en dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg de peso por tres días consecutivos y un grupo control, al cual se le administró buffer fosfato salino estéril, en el tercer día los ratones fueron inoculados con una suspensión de *C. albicans* a una concentración de 9×10^8 . A las 24 horas de la inoculación se realizó el recuento diferencial de leucocitos en sangre periférica, se evaluó el peso de órganos linfoides como timo y bazo, así como, la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales y la producción de anticuerpos. Se detectó que conforme aumenta la concentración de Temephos disminuyen el porcentaje de neutrófilos y linfocitos en sangre, el peso de órganos linfoides como el timo y el bazo y la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales; sin embargo, no se encontró variación en los títulos de anticuerpos producidos por los ratones de los cuatro grupos. Se concluye que, a concentraciones elevadas, el Temephos afecta al sistema inmunológico de *M. musculus* BALB/c.

Palabras clave: Plaguicidas, Temephos, Sistema inmune, Recuento Diferencial de Leucocitos sanguíneos, Fagocitosis, Timo, Bazo.

ABSTRACT

Effect of three concentrations of Temephos on the innate and adaptive immune response of *Mus musculus* BALB/c inoculated with *Candida albicans* was determined. For this, the animals were distributed in four groups: three experimental groups, to which they was administered Temephos in doses of 0.1, 1 and 10 mg/kg of weight for three consecutive days and a control group inoculated with sterile phosphate buffer saline. On the third day, the mice were inoculated with a suspension of *C. albicans* to a concentration of 9×10^8 . After 24 hours of inoculation, was a differential count of leukocytes in peripheral blood, it was determined the weight of lymphoid organs such as thymus, spleen, and evaluated the phagocytic activity of peritoneal macrophages and production of antibodies. It was determined that increases with the concentration of Temephos decrease the percentage of neutrophils and lymphocytes in the blood, the weight of lymphoid organs such as the thymus and spleen, and the phagocytic activity of the peritoneal macrophages and that was not found variation in the titles of antibodies produced by the mice of the four groups. Elevated concentrations of Temephos, in conclusion, affects the *Mus musculus* BALB/c immune system.

Keywords: Pesticides, Temephos, Immune System, Differential count of blood Leukocytes, phagocitosis, Thymus, Spleen, antibody.

INTRODUCCIÓN

Debido a su alta actividad biológica y en algunos casos de su persistencia en el ambiente, el uso de plaguicidas puede causar efectos adversos a la salud humana y al ambiente^{1,2,3}. La exposición a ciertos plaguicidas puede deprimir el sistema inmunológico, cuyas evidencias se basan en estudios experimentales de cultivos de células inmunes humanas, en pruebas con animales de laboratorio, estudios con animales silvestres como peces, aves y mamíferos marinos, en algunos estudios epidemiológicos, y en observaciones clínicas de reacciones alérgicas en el ser humano⁴.

Los insecticidas organoclorados: lindano, aldrín, dieldrín, clordano y heptacloro; los organofosforados: diclorvos, malatión, paratión etílico y clorpirifos; así como, los carbamatos: carbofuran, aldicarb y carbarilo, han sido registrados dentro de las sustancias que alteran el sistema inmunológico de diversas especies animales⁵.

En efecto, se ha descrito que la exposición a muchos plaguicidas produce cambios significativos en la estructura y función del sistema inmunitario, incluidas: la reducción y alteración de la actividad de linfocitos T, reducción de la respuesta proliferativa de linfocitos, reducción de la actividad de las células agresoras y alteración de los niveles de anticuerpos en la circulación. Ejemplo de ello, es que la exposición a los plaguicidas organoclorados aldrín y dieldrín, reduce la resistencia de los ratones a las infecciones virales, mientras que el DDT disminuye la producción de anticuerpos en especies tanto de mamíferos como de aves^{5,6}.

Investigaciones epidemiológicas han ligado los disolventes con la esclerodermia, otras han asociado sustancias como el mercurio y algunos pesticidas como factor de riesgo ocupacional en el desarrollo del lupus eritematoso sistémico⁶, un moderado incremento del riesgo de la misma enfermedad por cosas tales como la exposición a productos del tratamiento del pelo (tintes, permanentes)⁷, el uso de anticonceptivos orales⁸. En ratones, han mostrado posibles efectos ligados a la enfermedad en el disolvente tricloroetileno. La terapia hormonal sustitutiva ha sido asociada moderadamente al desarrollo del lupus y de la esclerodermia, la esclerosis múltiple, a sustancias como el clordano, los pesticidas (como los organofosforados) o disolventes⁹.

En relación a los plaguicidas organofosforados y los carbamatos, estudios clínicos han determinado la posibilidad de que estos se unan con las esterases y alteren esas proteínas vitales unidas a las membranas que ayudan a las células del sistema inmunitario a interactuar con los organismos extraños y destruirlos. En efecto, el paratión retrasa la generación de anticuerpos y suprime la respuesta de la célula-T en los cultivos celulares, mientras que una exposición crónica de baja intensidad al malatión puede debilitar varias respuestas diferentes del sistema inmunológico; por su parte, el larvicida batex, que es usado en el control de vectores, ha mostrado tener poco efecto nocivo sobre el sistema inmune, aunque, constituyen alto riesgo para niños y ancianos con sistema inmune deficiente^{10,11}.

En el Perú, para el control del vector transmisor del dengue se emplea el Temefos (Fosforotionato de o, o, o, o'-tetrametil-o, o'-tio-di-p-fenileno) o Abate que es un larvicida organofosforado usado a nivel mundial en campañas de salud pública para el control de larvas de mosquitos en sus criaderos, especialmente de los géneros *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Simulium*, *Mansonía*, *Psorophora* y *Culiseta*, vectores de enfermedades que afectan al ser humano, tales como paludismo o malaria, dengue, tifo y oncocercosis^{12,13}. En la provincia de Trujillo se ha usado intensamente temefós a partir del 2000, cuando se presentaron los primeros casos de dengue en los distritos de esta provincia, llegando a presentar un índice aéxico de 23%; en la actualidad, la enfermedad se ha extendido a otras zonas del país^{14,15}.

La toxicidad de temefos es moderada a extremadamente tóxico para aves, en ellas se han observado los siguientes síntomas de intoxicación: lagrimeo, miosis, salivación, erizamiento de las plumas, congestión traqueal, debilidad muscular, astenia, ataxia, inmovilidad, taquicardia, taquipnea, temblores y muerte. El faisán, paloma y gorrión se encuentran entre las especies de pájaros más susceptibles al Temefos; sin embargo bajo condiciones de uso recomendado este plaguicida no constituye un riesgo para las aves silvestres. Para los organismos acuáticos muestra una toxicidad variable, en insectos y crustáceos es moderada a extremadamente alta, en peces de ligera a extremadamente alta, la toxicidad depende del tipo de formulación; el compuesto grado técnico es moderadamente tóxico, mientras que el concentrado emulsionable y el polvo humectable son alta a extremadamente tóxicos^{12,13}.

Debido al intenso uso de insecticidas, existe un creciente interés de las agencias regulatorias internacionales de evaluar sus efectos sobre el sistema inmune, basado en observaciones de

poblaciones expuestas, que han presentado diferentes alteraciones inmunológicas manifestadas como alergias y grados variables de inmunosupresión, manifestaciones que han sido corroboradas en estudios con animales de laboratorio, en los cuales se ha podido identificar en algunos casos las células y muchas de las vías afectadas^{16,17}. Se sabe, por ejemplo, que los organofosforados paratión, malatión, diclorvos, dimetoato afectan la inmunidad humoral, celular y los mecanismos inespecíficos, así como, una reducción y alteración en las poblaciones de células T, reducción de la respuesta de los linfocitos, disminución de la actividad de las células agresoras naturales y reducción de las concentraciones de anticuerpos circulantes¹⁸. Hay evidencia también que estos cambios pueden ir acompañados por incremento en el riesgo de enfermedades infecciosas y cánceres asociados con la inmunosupresión; aunque la evidencia no es concluyente, sí es suficiente para provocar una preocupación seria y tomar medidas que prevengan la exposición⁵.

Teniendo en cuenta la importancia que reviste el conocimiento de los efectos adversos de los plaguicidas, en particular de aquellos que el MINSA utiliza con elevada intensidad en la zona norte del Perú, se realizó una investigación tendiente a evaluar el efecto del Temephos sobre la respuesta inmune innata y adaptativa de *Mus musculus* BALB/c inoculados con *C. albicans*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio

- 20 ejemplares de *Mus musculus* BALB/c “ratón” obtenidos en el Instituto Nacional de Salud y divididos para el estudio, en cuatro grupos de igual número
- Cultivo en medio Sabouraud de *Candida albicans* proporcionado por la Cátedra de Micología de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú)
- Temephos (Fosforotionato de o, o, o, o'-tetrametil-o, o'-tio-di-p-fenileno) en polvo proporcionado por el MINSA

Siembra de *Candida albicans* y Preparación del antígeno.

Se sembró *Candida albicans* en Agar Sabouraud y se incubó a 37°C por 24 horas. Luego de ese tiempo se procedió a cosechar en solución salina fisiológica, se le dio tratamiento térmico de 100°C por 30 minutos. Posteriormente se estandarizó a una concentración de 9×10^8 cel/mL.

Evaluación del efecto del Temephos sobre la respuesta inmune innata y adaptativa de *Mus musculus* BALB/c.

Para la evaluación del efecto de Temephos, el tratamiento se realizó de la siguiente manera durante tres días:

- Grupo control, no se administrará Temephos, únicamente PBS.
- Grupo 1: Se le aplicó 0.1 mg/Kg de Temephos en PBS vía oral Grupo 2: Se le aplicó 1 mg/ Kg del Temephos en PBS vía oral Grupo 3: Se le aplicó 10 mg/ Kg de Temephos en PBS vía oral

A los cuatro grupos de ratones, luego de la dosificación con Temephos, en el día 3 fueron inoculados vía intramuscular con 1 mL de antígeno de *C. albicans* previamente preparado a una concentración de 9×10^8 cel/mL¹⁸.

Evaluación del efecto de Temephos

A las 24 hs luego de la inoculación con *C. albicans*, se evaluaron los siguientes parámetros: Conteo global de leucocitos, conteo diferencial de leucocitos, peso relativo de timo y bazo, estudio de función opsonofagocítica de macrófagos peritoneales y determinación de los niveles de anticuerpos anti-*C. albicans*¹

• Recuento diferencial de leucocitos

- Para la realización del recuento diferencial de los leucocitos, se tomaron muestras de sangre de cada uno de los ratones correspondientes a los cuatro grupos de trabajo, se realizaron frotis los cuales fueron coloreados mediante tinción Wright¹⁹. Luego, se realizó el conteo de cada tipo de leucocito, estableciendo el porcentaje en base a un total de 100 leucocitos
- Estudio de la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales.
- A dos ratones de cada grupo, se les inoculó, 0,5 mL de suspensión de *C. albicans* con una concentración de 4×10^6 bact. /mL por vía intraperitoneal, luego de 6 horas se sacrificó a los ratones obteniéndose con una torunda líquido peritoneal posteriormente para la realización de los

frotis que fueron coloreados mediante la técnica de Giemsa. El porcentaje de fagocitosis se determinó en base al número total de células que han fagocitado²⁰.

- **Determinación del peso de timo y bazo.**
- Los ratones restantes fueron sacrificados, a los cuales se les extirpó el timo y bazo para determinar el peso de cada uno de estos órganos¹¹.
- **Determinación de la producción de anticuerpos anti- *C. albicans***
- Para la producción de anticuerpos, luego de la primera inoculación, a los 7 días se realizó una nueva inoculación de los ratones con *C. albicans*
- **Evaluación de la producción de anticuerpos**
- Para la evaluación de la producción de anticuerpos se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero, a los 7 días después de cada inoculación. Luego, se determinó la producción mediante la prueba de aglutinación cualitativa y posteriormente se determinó los títulos de anticuerpos anti-*C. albicans*.

Tratamiento estadístico.

El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas de Análisis de Varianza “ANOVA” y pruebas de Tukey, empleando el paquete estadístico MINITAB versión 14²¹.

RESULTADOS

En la evaluación del efecto de tres concentraciones de Temephos sobre la respuesta inmune innata de *Mus musculus* BALB/C inoculados con *C. albicans*, se observó que el número de leucocitos, en los animales dosificados con las dosis de Temephos, presentan tendencia a la disminución de neutrófilos y linfocitos conforme aumenta la concentración de Temephos dosificada, mientras que el número de monocitos se mantuvo constante (Tabla 1). En el análisis de varianza y en la prueba de Tukey se encontró que existe diferencia significativa entre los porcentajes de neutrófilos y de linfocitos de los diferentes grupos. En el análisis de varianza y en la prueba de Tukey no se encontró diferencia significativa entre los grupos para los porcentajes de monocitos.

En relación al efecto de Temephos sobre los órganos linfoides como el timo y el bazo, se encontró que el peso de estos órganos disminuyeron levemente en los ratones que fueron dosificados con Temephos respecto a los ratones del grupo control conforme aumenta la concentración de este plaguicida (Tabla 2). En el análisis de varianza no se encontró diferencia significativa entre el tamaño de estos órganos evaluados, sin embargo, en la prueba de Tukey, de comparación entre grupos se observa diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental 3 y entre los grupos experimentales 1 y 3.

En la evaluación de la actividad fagocítica, se observó que en los animales tratados con las dosis de Temephos, los macrófagos peritoneales experimentaron una disminución en la actividad fagocítica conforme aumenta la concentración de Temephos, tal como se aprecia en la Tabla 3. Lo cual se confirma con el análisis de varianza donde se encontró diferencia significativa entre los grupos evaluados, excepto en los grupos 2 y 3 de acuerdo a la prueba de Tukey.

En la evaluación del efecto de las tres concentraciones de Temephos sobre la producción de anticuerpos anti-*C. albicans* por *M. musculus*, se encontró que los títulos de anticuerpos obtenidos en los grupos experimentales fueron semejantes que los del grupo control (Tabla 4), no existiendo diferencia estadística significativa.

DISCUSIÓN

Desde la Segunda Guerra Mundial los insecticidas químicos han sido ampliamente difundidos en la prevención de enfermedades transmitidas por vectores y en la agricultura para el control de plagas. Un estudio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) mostró que la mayor demanda de plaguicidas para el control de vectores de enfermedades de importancia en salud pública en áreas urbanas, fue la de insecticidas en las formas de concentrado emulsionable o concentrados de volumen ultra bajo¹⁰. En estas áreas los organoclorados han sido progresivamente reemplazados por piretrinas, piretroides y organofosforados (clorpirifos, diclorvos, fenitrotión, fentión, malatión y temefós)²².

Tabla 1. Porcentaje promedio de leucocitos en sangre de *Mus musculus* BALB/c dosificados con diferentes concentraciones de Temephos

Leucocitos	Porcentaje promedio (%) de leucocitos de <i>Mus musculus</i> BALB/C según la concentración de Temephos			
	Grupo Control	Grupo experimental		
		1 0.1mg/Kg	2 1mg/Kg	3 10mg/Kg
Monocitos	11	12	10	12
Neutrófilos	48	45	36	29
Linfocitos	40	43	38	29
Eosinófilos	1	0	1	0

Tabla 2. Peso relativo del timo y del bazo de *Mus musculus* BALB/C dosificados con diferentes concentraciones de Temephos

Grupos de tratamiento con Temephos	Peso promedio (mg) del timo y del bazo de <i>Mus musculus</i> BALB/c	
	Timo	Bazo
Control	0.25	0.4
Experimental 1 (0.1mg/Kg)	0.22	0.38
Experimental 2 (1mg/Kg)	0.21	0.35
Experimental 3 (10mg/Kg)	0.19	0.29

Tabla 3. Porcentaje promedio de macrófagos peritoneales de *Mus musculus* BALB/c dosificados con diferentes concentraciones de Temephos, con actividad fagocítica y sin actividad fagocítica frente a *Candida albicans* en la prueba de actividad fagocítica, In vivo

Grupos de tratamiento con Temephos	Porcentaje de macrófagos peritoneales	
	Con actividad fagocítica	Sin actividad fagocítica
Control	62.2	37.8
Experimental 1 (0.1mg/Kg)	45.6	54.4
Experimental 2 (1mg/Kg)	42.8	57.2
Experimental 3 (10mg/Kg)	37.9	62.1

Tabla 4. Porcentaje promedio del título de anticuerpos anti-*Candida albicans* producidos por *Mus musculus* BALB/c, de acuerdo a la concentración de Temephos

Grupos de Trabajo según Concentración de Temephos (mg/ Kg)	Título de anticuerpos anti- <i>C.albicans</i>
Control (0 mg/Kg)	80
Experimental 1 (0.1mg/Kg)	80
Experimental 2 (1mg/Kg)	80
Experimental 3 (10mg/Kg)	40

Actualmente, existe un creciente interés de las agencias regulatorias internacionales de evaluar sus efectos sobre el sistema inmune, basado en observaciones de poblaciones expuestas, que han presentado diferentes alteraciones inmunológicas manifestadas como alergias y grados variables de inmunosupresión¹⁶.

Numerosas investigaciones reportan afectaciones de la inmunidad humoral, celular y los mecanismos inespecíficos, producidas por organofosforados como: paratión, malatión, diclorvos, dimetoato¹⁸. Lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación en la que la administración del organofosforado Temephos, demostró que la disminución en los porcentajes promedios de leucocitos, adquiere importancia a medida que se aumenta la concentración de Temephos, tal como lo demuestra la evaluación estadística en la prueba de análisis de varianza que indica diferencia significativa entre los porcentajes promedios de neutrófilos y linfocitos en los ratones administrados con 1 y 10 mg/Kg de Temephos en relación con los ratones del grupo control que no fueron administrados con esta sustancia. Resultado que difiere de Aportela y cols¹¹ quienes al utilizar Batex encontraron un aumento de neutrófilos a concentraciones mayores de esta sustancia, pero concuerda con los porcentajes de monocitos que no mostraron alteración en los grupos de ratones evaluados.

En relación al peso del timo y del bazo, el análisis de varianza indica que no hay diferencia significativa entre los pesos de los órganos evaluados de los ratones administrados con diferentes concentraciones de Temephos y el grupo control que no fueron administrados con esta sustancia.

En los ratones administrados con las dosis de Temephos, se produjo una disminución evidente en el porcentaje de fagocitosis (actividad fagocítica) por los macrófagos peritoneales, el análisis estadístico establece una diferencia significativa entre los ratones que no fueron administrados con Temephos con los administrados con 10 mg/kg. Estas células fagocíticas presentan gran capacidad de generación de radicales libres, razón por la cual cuentan con eficaces defensas como la enzima glutatión peroxidasa y catalasa y cuando existe una sobreproducción, como puede suceder luego de la exposición a Temephos, se saturan los mecanismos enzimáticos defensivos que disminuyen la capacidad de protección y producen daños importantes que pueden afectar su función como células presentadoras de antígenos y por consiguiente la subsecuente activación de linfocitos *T* y *B*²³.

Los mecanismos a través de los cuales las sustancias organofosforados producen inmunosupresión no han sido totalmente definidos, pero si se han demostrado los daños a nivel celular y en menor medida a nivel bioquímico tal como los indican^{24,25,26}.

Sin embargo, en la evaluación del efecto del Temephos sobre la inmunidad humoral en relación a la producción de anticuerpos anti- *C.albicans* no se encontró diferencia entre el título de anticuerpos producidos por los ratones del grupo control que no fueron dosificados con Temephos y los títulos de anticuerpos producidos por los ratones de los grupos experimentales que fueron dosificados con Temephos. Este resultado puede deberse a que el Temephos únicamente fue dosificado en tres oportunidades y los ratones no estuvieron expuestos por mucho tiempo a esta sustancia, por lo que no afectó su sistema inmunológico.

En esta investigación los resultados obtenidos deben ser considerados de importancia ya que dan indicio del daño producido a nivel del sistema inmunológico, por lo que las investigaciones deben ser

ampliadas y establecer una mayor exposición al Temephos y evaluar su efecto sobre el sistema inmunológico.

CONCLUSIONES

- No se encontró variación en el título de anticuerpos anti-*C.albicans* producidos por *Mus musculus* BALB/c dosificados con tres diferentes concentraciones de Temephos empleadas.
- Por lo que se concluye que a concentraciones elevadas de Temephos se afecta al sistema inmunológico

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vega, S. Toxicología I: evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS, OMS, 69 pp. 1985.
2. Benerjee B. The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemical. *Toxicol Letters* 1999; 107: 21-31.
3. Maroni M, Fait A, Colosio C. Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides. *Toxicol Letters* 1999; 107: 145-153.
4. Committee of the environmental and occupational health assembly of the American Thoracic Society. Health effects of outdoor air pollution. State of the art. Part 1. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 3-50
5. Repetto R, Baliga S. Pesticides and the Immune System: The Public Health Risks. World Resources Institute: Washington, D.C., 1996.
6. Cooper GS. Occupational risk factors for the development of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004; 31: 1928-1933.
7. Cooper GS. Smoking and use of hair treatments in relation to risk of developing systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001; 28 (12): 2653-2656.
8. Mayes MD. Epidemiologic studies of environmental agents and systemic autoimmune diseases. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107 (55).
9. Parks CG, Cooper GS. Occupational exposures and risk of systemic lupus erythematosus: a review of the evidence and exposure assessment methods in population and clinic based studies. *Lupus* 2006; 15 (11): 728-736
10. Hill EF. Organophosphorus and carbamates pesticides, In: D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton Jr. and J. Cairns Jr. (Eds), *Handbook of Ecotoxicology*, CRC Press, Inc., Florida, 243-274 . 1995.
11. Aportella P, Batista A, Betancourt E, Font O, Colón M, Urdaneta L. Efecto de dosis única Batex sobre el sistema inmune en ratones B6D2FI. *Anuario Toxicol* 2001; 1(1): 78-84.
12. Cabezas C. Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. *Rev peru med exp salud pública* 2005; 22 (3): 24-28.
13. Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*. Documento propuesto por la Red Latinoamericana de Control de Vectores. Ciudad de Iguazú, 23 de octubre de 2005. Disponible en: www.mundosano.org/documentos.
14. Chávez J, Córdova O, Vargas F. Niveles de susceptibilidad de temefos en el vector transmisor del dengue en Trujillo, Perú. *An Fac Med Lima*. 2005;66 (1):53-56.
15. Pereira E. Resistencia de *Aedes aegypti* a temefos en comunas del estado de Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(3): 259-263.
16. WHO. Environmental Health Criteria 93: Chlorophenols other than pentachlorofenol. World Health Organization. 1989. Geneva, 207 pp.
17. Desi I, Varga L, Farkas L. Studies on immunosuppressive effect of organochlorine and organophosphoric pesticides in subacute experiment. *J Hyg Epidem. Microbiol Immunol*. 1978; 22:115-22.
18. Alzamora L, Galván P, Alvarez E, Torres D, Colona E, Aliaga M, Marcelo A. Producción de IFN γ en cultivos de linfocitos humanos por efecto de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (Brassicaceae). *Rev peru biol* 2007; 13(3): 207-209.
19. Rose N, Friedman H. *El Laboratorio en Inmunología Clínica*. 2da ed. Edit. Médica Panamericana. Bs. As. Argentina. 1984.
20. Bellanti JA. *Inmunología II*. 3era. ed. Edit. Panamericana. 1986.
21. Córdova Z. *Estadística Inferencial -Aplicaciones*. Lima – Perú. Edit. Moshera.S.R.L. 1999.
22. WHO. Urban vector and pest control: eleventh report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. Geneva, World Health Organization (WHO Technical Report Series No. 767), 1988.

23. Abbas AK, Lichtman AH. *Inmunología Celular y Molecular*. 5ta ed. Edit. GEA Consultoría. Madrid – España. 2006.
24. Rodgers K. The immunotoxicity of pesticides in rodents. *Human and Experimental. Toxicology*. 1995; 14: 111-3.
25. Wiltout RW, Ercogivich CD, Ceglowski WS. Humoral immunity in mice following oral administration of selected pesticides. *Bull Environm Contam Toxicol* 1978;20: 423-31.
26. World Health Organization (WHO). *Environmental Health Criteria 180: Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals*. Geneva 1996;110-2.