



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

EFFECTO EN EL ESTRÉS OXIDATIVO DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*) CON EXPOSICIÓN DIETARIA A GLIFOSATO

Por:

Osiel David Olivas Muñoz

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE FISIOLÓGÍA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA ZONA
TEMPLADA

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Osiel Olivas Muñoz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en ciencias.



Dra. Guadalupe Isela Olivas Orozco
Directora de tesis



Dra. Beatriz Yañez Rivera
Integrante de comité de tesis



Dr. Miguel Betancourt Lozano
Integrante de comité de tesis



M.C. Francisco Javier Molina Corral
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Efecto en el Estrés Oxidativo de Pez Cebra (*Danio rerio*) con Exposición Dietaria a Glifosato" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Osiel Olivas Muñoz, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al-CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Gracjela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias primeramente al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo económico que se me brindó durante la jornada de mi maestría sin el cual no habría sido posible llevar a cabo con la dedicación y tiempos necesarios.

Con la misma gratitud, agradezco al Centro en Investigación en Alimentación y desarrollo, A.C. (CIAD), ya que cada uno de los miembros de la organización me brindaron de su tiempo, paciencia, ayuda y sobre todo conocimiento, durante esta jornada de mi vida.

Agradezco a dios por ser un guía durante toda mi vida y brindarme la fuerza necesaria para realizar esta tarea tan importante y la fuerza de cada día seguir adelante para ser mejor persona.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Guadalupe Isela Olivas Orozco, mi directora de tesis, por su invaluable apoyo y guía durante todo este proceso. Su experiencia, paciencia y dedicación han sido fundamentales para la realización de este trabajo. Aprecio enormemente cada consejo y comentario que me brindó, los cuales no solo mejoraron esta investigación, sino que también me ayudaron a crecer como profesional. Su compromiso con la excelencia académica y su enfoque detallado fueron una fuente constante de inspiración. Gracias por creer en mí y por acompañarme en este importante capítulo de mi vida.

Agradezco al miembro de comité y maestro M.C. Francisco Javier Molina Corral por el constante apoyo y la enseñanza para realizar las metodologías correctamente, además de ser una gran persona y amigo durante este periodo de mi vida.

Agradezco al miembro de comité y maestro Dr. David Roberto Sepúlveda Ahumada por estar ahí siempre disponible para ayudarme en cualquier duda, con todo su conocimiento y paciencia.

Agradezco a mis queridos padres, quienes han sido mi mayor fuente de apoyo y fortaleza. Gracias por su amor incondicional, su comprensión y por todos los sacrificios que han hecho para que yo pudiera alcanzar este logro. Su fe en mí me ha dado la confianza para enfrentar cada desafío con determinación. Este logro es tan suyo como mío, y les estaré eternamente agradecido/a por todo lo que han hecho por mí.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, quienes han sido el pilar fundamental en mi vida. Su amor, sacrificio y apoyo incondicional me han permitido llegar hasta aquí. Gracias por enseñarme la importancia de la perseverancia, el esfuerzo y la humildad. Este logro es una muestra de todo lo que me han dado, y es para ustedes, con todo mi amor y gratitud.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Plaguicidas	15
2.1.1. Herbicidas	17
2.2. Glifosato.....	17
2.2.1. El Glifosato y sus Posibles Daños a la Salud.....	21
2.2.2. El Glifosato en México	23
2.2.3. Residualidad de Glifosato en Alimentos	24
2.3. El Estrés Oxidativo	27
2.3.1. Efecto de los Compuestos Xenobióticos en el Estrés Oxidativo	29
2.3.2. Daños Causados por el Estrés Oxidativo	31
2.3.3. Efecto del Glifosato en el Estrés Oxidativo	33
2.4. Sistemas Antioxidantes	36
2.4.1. Enzimas Antioxidantes	37
2.4.1.1. Superóxido dismutasa (SOD)	37
2.4.1.2. Catalasa (CAT)	38
2.4.1.3. Glutatión Peroxidasa (GPx)	38
3. HIPÓTESIS	40
4. OBJETIVOS	40
4.1. Objetivo General	41
4.2. Objetivos Específicos	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1. Determinación de Concentraciones Experimentales	42
5.2. Incorporación de Glifosato en la Dieta del pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	43
5.3. Mantenimiento y Selección de pez cebra	44
5.4. Determinación del Escenario de Exposición	44
5.5. Estrategia “Pellet por Pellet”	44

CONTENIDO (continuación)

5.6. Estrategia “Porcentaje por Peso Corporal Promedio”	45
5.7. Exposición a Glifosato Vía Dietaría y Recolección de Muestras	45
5.8. Análisis de Actividad Enzimática	46
5.8.1. Obtención del Extracto Enzimático Crudo (EEC) del Pez Cebra	46
5.8.2. Determinación de Proteína (Método de Bradford)	46
5.8.3. Actividad de la Enzima Superóxido Dismutasa (SOD)	47
5.8.4. Actividad de la Enzima Catalasa (CAT)	48
5.8.5. Actividad de la Enzima Glutación Peroxidasa (GPx)	48
5.9. Análisis Estadístico	49
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	50
6.1. Actividad de la Enzima Superóxido Dismutasa (SOD)	51
6.2. Actividad de la Enzima Catalasa (CAT)	57
6.3. Actividad de la Enzima Glutación Peroxidasa (GPx)	62
7. CONCLUSIONES	68
8. RECOMENDACIONES	70
9. REFERENCIAS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química del glifosato	18
2	Mecanismo de acción del glifosato en plantas, inhibiendo la síntesis de los aminoácidos aromáticos esenciales por inhibición competitiva de la enzima EPSPS.....	19
3	Residualidad de glifosato	27
4	Las principales especies reactivas al oxígeno, sus posibles orígenes y vías de desintoxicación	29
5	Agentes externos causantes de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en órganos activando la señalización para la respuesta contra el estrés oxidativo	30
6	Enfermedades que han sido relacionadas con el estrés oxidativo	32
7	Actividad de la enzima SOD en cerebro de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días.)	53
8	Actividad de la enzima SOD en músculo de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días.)	55
9	Actividad de la enzima SOD en hígado de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días.	56
10	Actividad de la enzima CAT (μ moles/min mg proteína) en cerebro de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días.	59
11	Actividad de la enzima CAT (μ moles/min mg proteína) en músculo de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días.....	60
12	Actividad de la enzima CAT (μ mol/min mg proteína) en hígado de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días.....	61
13	Actividad de la enzima GPx (nmol/min mg proteína) en cerebro de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días.....	64
14	Actividad de la enzima GPx (nmol/min mg proteína) en cerebro de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días.....	65
15	Actividad de la enzima GPx (nmol/min mg proteína) en cerebro de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días.....	66

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación de los plaguicidas según el organismo a controlar.	15
2	Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad.....	16
3	Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad.....	17
4	Plantas resistentes de glifosato.....	20
5	Efectos negativos en la salud asociados al glifosato.....	22
6	Coeficientes de Pearson entre enfermedades y aplicación de glifosato	23
7	Principales especies reactivas al oxígeno (ROS).....	28
8	Estudios que muestran efecto de la exposición a glifosato en el estrés oxidativo de diversos organismos.....	35
9	Concentración de proteína soluble (mg/g peso fresco) en cerebro, músculo e hígado de pez cebra expuesto a glifosato a través del alimento.....	51
10	Actividad de la enzima SOD (U/g de tejido) a los 0.7, 7 y 21 días de exposición a glifosato a través de la alimentación; pendiente y coeficiente de correlación....	52
11	Actividad de la enzima CAT (U/g de tejido) a los 0.7, 7 y 21 días de exposición a glifosato a través de la alimentación; pendiente y coeficiente de correlación....	58
12	Actividad de la enzima GPx (U/g de tejido) a los 0.7, 7 y 21 días de exposición a glifosato a través de la alimentación; pendiente y coeficiente de correlación....	63

RESUMEN

Existe una preocupación por el efecto a la salud que el glifosato puede ocasionar en el humano; al momento no existe un consenso al respecto entre la comunidad científica a nivel mundial. Siendo el glifosato el herbicida más ampliamente usado en México, el presente trabajo tiene como objetivo de determinar el efecto en el estrés oxidativo por exposición dietaria a glifosato, en una concentración permitida por la OMS/FAO y la EPA, 1mg/Kg de peso del individuo/día, utilizando al pez cebrá como modelo. El pez cebrá se alimentó diariamente con fórmula balanceada conteniendo glifosato en tres concentraciones, 0, 100 y 1000 μg de glifosato/g alimento/día (en una cantidad de alimento equivalente al 1% de su peso), por 21 días (equivalente a 1 y 10 g/Kg peso corporal/día). Se evaluó el efecto en el estrés oxidativo del pez cebrá, a través de la medición de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Estas enzimas fueron analizadas en cerebro, hígado y músculo, a las 16 horas de iniciado el tratamiento, a los 7 días y a los 21 días. A las 16 horas de iniciado el experimento, las actividades de CAT en hígado y de GPx en músculo incrementaron en el tratamiento con la concentración máxima permitida por la FAO/OMS y EPA, 1mg/Kg de peso del individuo (100 μg /g de alimento/día). En CAT y GPx, la exposición a glifosato en la concentración alta (1,000 μg /g alimento/día) se observaron actividades menores, sugiriendo una inhibición. A los 7 días, hubo incremento en la actividad de SOD en músculo para ambas concentraciones (100 y 1,000 μg /g alimento/día) y en SOD y CAT en cerebro para la concentración baja, 100 μg /g alimento al día (máxima concentración permitida por FAO/OMS), mientras que la concentración alta (1,000 μg /g alimento/día) mostró menor actividad, similar al control, sugiriendo una inhibición de SOD y CAT. Al final del experimento (día 21) la actividad de GPx disminuyó en cerebro y músculo expuestos a glifosato en ambas concentraciones 100 y 1,000 μg /g alimento/día, sugiriendo una inhibición de la actividad de GPX por efecto del glifosato. Los resultados indican que la exposición a glifosato en la concentración máxima permitida para consumo humano, y la mitad de la dosis permitida por la EPA (1mg/Kg de peso/día) causa estrés oxidativo usando el pez cebrá como modelo.

Palabras clave: glifosato, estrés oxidativo, exposición dietaria, *Danio rerio*, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa.

ABSTRACT

There is a concern about the health effects that glyphosate may have on humans. There has yet to be a consensus among the scientific community worldwide. Glyphosate is the most widely used herbicide in Mexico; the objective of this work is to determine the effect on oxidative stress due to dietary exposure to glyphosate in concentrations permitted in consensus by the FAO and WHO, 1 mg/Kg of individual weight, using zebrafish as a model. Zebrafish are fed daily with a balanced formula containing glyphosate in three concentrations, 0 $\mu\text{g/g}$, 100 $\mu\text{g/g}$, and 1000 $\mu\text{g/g}$ of glyphosate/g feed/day (in an amount of feed equivalent to 1% of their weight), for 21 days. The effect on oxidative stress in zebrafish was evaluated by measuring the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). These enzymes were analyzed in the brain, liver, and muscle 16 hours after starting treatment, seven days, and 21 days. At 16 hours after starting the experiment, the activities of CAT in the liver and GPx in the muscle increased in the treatment that consisted of dietary exposure at the maximum concentration allowed by the FAO/WHO, 1 mg/Kg of individual weight, equivalent at 100 $\mu\text{g/g}$ of food/day. In both enzymes, exposure to glyphosate at the high concentration (1,000 $\mu\text{g/g}$ food/day) lower activities were observed, suggesting an inhibition of CAT and GPx because of glyphosate exposure. At seven days, there was an increase in SOD activity in muscle for both concentrations (100 and 1,000 $\mu\text{g/g}$ food/day) and SOD and CAT in the brain for the lowest concentration, 100 $\mu\text{g/g}$ food per day (maximum concentration allowed by FAO/WHO), while the high concentration (1,000 $\mu\text{g/g}$ food/day) showed lower activity, similar to the control, suggesting inhibition of SOD and CAT due to the effect of glyphosate. At the end of the experiment (day 21), GPx activity decreased in the brain and muscles exposed to glyphosate at both concentrations of 100 and 1,000 $\mu\text{g/g}$ food/day, suggesting inhibition of GPX activity because of glyphosate exposure. The results indicate that exposure to glyphosate at the maximum concentration allowed for human consumption (1 mg/kg body weight/day) causes oxidative stress using zebrafish as a model.

Key words: glyphosate, oxidative stress, dietary exposure, *Danio rerio*, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de las actividades agronómicas ha llevado al incremento del uso de plaguicidas y herbicidas para asegurar los cultivos, quedando residuos en el suelo, agua, aire y en la superficie de los alimentos; de esta manera la humanidad ha entrado en contacto con estos contaminantes, los cuales pueden causar alteraciones en el metabolismo de los organismos vivos (Bhilwadikar et al., 2019). México es un alto consumidor de agroquímicos consumiendo en el año 2009 el 21.6% del total del consumo mundial (Salazar-López and Madrid, 2011). Dentro de los agroquímicos más utilizados en México se encuentra el glifosato, un herbicida no selectivo utilizado para la eliminación de las plantas no deseadas tanto en zonas de cultivo, como en zonas residenciales. El uso del glifosato se ha visto incrementado en las últimas décadas hasta llegar a ser el herbicida más utilizado a nivel mundial, esto debido al cultivo de plantas genéticamente modificadas (GM) resistentes al glifosato y a su uso como agente secante para la cosecha de alimentos como el frijol, la avena y el trigo (Samsel and Seneff, 2015a).

El glifosato inhibe el crecimiento de las plantas a través de la interferencia con la producción de aminoácidos aromáticos esenciales mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa. Esta enzima es responsable de la biosíntesis del corismato, un intermediario en la producción de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano. Aunque esta vía no se encuentra en organismos animales, existen diversos estudios en los que se sugiere la toxicidad del glifosato causando diversas enfermedades (Lushchak et al., 2001, Samsel and Seneff, 2013c, Samsel and Seneff, 2015a, Samsel and Seneff, 2015b, Samsel and Seneff, 2016).

Estudios previos indican que compuestos xenobióticos como el glifosato, pueden inducir el estrés oxidativo, favoreciendo la generación de especies reactivas al oxígeno (ROS) con la consecuente generación de daño a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Velasques et al., 2016b), lo que se ha relacionado con el desarrollo de una variedad de enfermedades, entre ellas la aterosclerosis, la diabetes, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades inflamatorias crónicas, el cáncer y el envejecimiento (Elejalde Guerra, 2001). Las células contienen un número de defensas antioxidantes para mantener un estado estable de ROS, entre éstas se encuentran las enzimas superóxido dismutasa SOD, glutatión peroxidasa GPX, y catalasa CAT. Estas enzimas constituyen un buen bioindicador del estrés oxidativo y pueden revelar la magnitud de la respuesta a ciertos

contaminantes. La enzima SOD elimina la actividad corrosiva del radical superóxido O_2^- antes de que éste reaccione con moléculas biológicas susceptibles u origine otros agentes tóxicos, catalizando la conversión de O_2^- en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), (Lopes et al., 2001). Este H_2O_2 generado por la SOD es eliminado por la enzima catalasa CAT y la enzima glutatión peroxidasa GPx. (García Triana et al., 1995). La catalasa convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2 , mientras que la glutatión peroxidasa (GPx) convierte el glutatión en glutatión oxidado haciendo uso de la H_2O_2 (Dorval et al., 2005). Por su lado la enzima GST cataliza la conjugación del xenobiótico activado con glutatión reducido (GSH), convirtiendo al xenobiótico en una molécula más fácilmente eliminable (Lopes et al., 2001, Sheehan et al., 2001).

Se ha registrado que el glifosato genera una respuesta en el estrés oxidativo de ratas, a través del incremento en la oxidación lipídica, cuando se utilizan concentraciones del herbicida subletales ($269.9\mu\text{g/g}$) (El-Shenawy, 2009). Resultados sobre el efecto del glifosato en la actividad de las enzimas antioxidantes en animales son contradictorios. Yousefi y col. (2021) encontraron un incremento en la actividad de las enzimas SOD y glutatión peroxidasa (GPx) en pez carpa cuando fue sometido a glifosato en concentraciones subletales. Bali y col. (2019) encontraron una disminución en la actividad de la enzima SOD en ratones cuando son sometidos a concentraciones altas de glifosato ($250\mu\text{g/g}$). Al momento no hay estudios que determinen el efecto de el glifosato a niveles encontrados en los alimentos o a niveles actualmente permitidos en los alimentos.

Las investigaciones biomédicas han requerido a través de los años del uso de animales como modelos para entender la patología de diversas enfermedades o compuestos que podrían dañar la salud. El pez cebra, *Danio rerio*, se ha constituido como una especie modelo en la comprensión de los mecanismos moleculares de vertebrados. Este tiene la ventaja de ser pequeño, con un ciclo reproductivo corto y con la característica de compartir un alto grado de similitud con el genoma humano (Lieschke and Currie, 2007). En términos de aplicación, se utiliza como modelo para entender enfermedades en humanos, y en ecotoxicología los datos generados a partir de ensayos de toxicidad con el pez cebra han demostrado su utilidad para entender mecanismos de afectación provocados por metales pesados, disruptores endocrinos y contaminantes orgánicos (Dai et al., 2014).

2. ANTECEDENTES

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a los plaguicidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, que está destinada a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales que son perjudiciales para el hombre, incluyendo los vectores de organismos causantes de enfermedades humanas, y las especies que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, madera, entre otros, también aquellas otras sustancias destinadas a utilizarse como regulador del crecimiento de la planta, defoliante o desecante, asimismo aquellas que pueden administrarse a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos (OMS/FAO, 2010), (Cuadro 1). México es un alto consumidor de agroquímicos consumiendo en el año 2009 el 21.6% del total del consumo mundial (Salazar-López and Madrid, 2011). De acuerdo con la OMS y la FAO, entre los años 2009 y 2010, México aplicó aproximadamente 4.55 toneladas de plaguicidas por cada 1,000 hectáreas (Arellano-Aguilar and Rendón, 2017).

Cuadro 1. Clasificación de los plaguicidas según el organismo a controlar. Fuente: Díaz y Betancourt (2018)

Clasificación	Organismo a combatir
Insecticida	Insectos
Herbicida	Hierbas (malezas)
Rodenticida	Roedores
Acaricida	Ácaros
Fungicida	Hongos
Bactericida	Bacterias
Molusquicida	Babosas y caracoles
Nematicida	Nemátodos
Regulador del crecimiento vegetal	Crecimiento de cultivos
Conservador de la madera	Organismos destructores de la madera
Defoliante y desecante	Follaje

Los plaguicidas poseen un elemento tóxico que es conocido como principio activo. La toxicidad

de los plaguicidas se calcula a través de la medición de la dosis letal media (DL₅₀), es decir la concentración necesaria para matar al 50% de la población de una muestra. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece una clasificación de los plaguicidas basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda (Cuadro 2), definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto (Díaz y Betancourt, 2018).

Cuadro 2. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad. Fuente: Díaz y Betancourt, (2018).

Clase	Toxicidad	DL50 (mg/kg) oral	DL50 (mg/kg) dermal	Ejemplos	Etiqueta
Clase IA	Extremadamente peligrosos	< 5	< 50	Paratión, dieldrín	PELIGRO
Clase IB	Altamente peligrosos	5-50	50 a 200	Eldrín, diclorvos	PELIGRO
Clase II	Moderadamente peligrosos	>50 a 2000	>200 a 2000	DDT, clordano	PELIGRO
Clase III	Poco peligrosos	> 2000 a 5000	> 2000 a 5000	Malatión	PRECAUCIÓN
Clase IV	No ofrecen peligro	> a 5000	> a 5000	Glifosato	PRECAUCIÓN

De acuerdo con la clasificación de plaguicidas según su toxicidad, el glifosato está considerado como un plaguicida de clase IV, es decir, normalmente no ofrece peligro (Nivia, 2000), (Cuadro 1). Es importante señalar que estos indicadores no proporcionan información sobre los efectos crónicos, ni sobre la citotoxicidad de algún compuesto (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Por su vida media, los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (Cuadro 3). La persistencia se refiere a la capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó. La persistencia se mide según la cantidad de días necesarios para que un plaguicida se reduzca a la mitad de su concentración inicial. De acuerdo con Sterren y cols. (2016) el glifosato se degrada relativamente rápido en el suelo, considerándose no persistente.

Cuadro 3. Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad.

Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín, glifosato
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lanato
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

Fuente: Ramírez y Lacasaña (2001)

2.1.1. Herbicidas

Uno de los grupos de plaguicidas de mayor uso a nivel mundial son los herbicidas que son utilizados para el control de plantas, especialmente aquellas conocidas como malezas, que crecen asociadas a los cultivos y que compiten por agua, espacio, luz y nutrientes (Muñoz, 2021). La presencia de maleza ocasiona un incremento en los costos de producción, así como una disminución en el rendimiento y la calidad en los productos cosechados y los herbicidas son una importante herramienta para combatir este problema de manera química (Nicholls et al., 1997, Rosales and Esqueda, 2006). Estos han sido utilizados desde los años 40's, y con el paso de los años han sido cada vez más complejos con respecto al espectro del control de la maleza, a la duración del periodo de control y a la selectividad de los cultivos (Rosales and Esqueda, 2006). Los herbicidas también son utilizados en sistemas donde se desea eliminar la vegetación después de la cosecha o antes de la siembra, o a orillas de caminos y carreteras.

2.2 Glifosato

El glifosato es el herbicida más utilizado a nivel mundial (en kilogramos por año) (Duke, 2020); y aún más, el glifosato, es la sustancia química más rociada y distribuida en la historia de la humanidad (Muñoz, 2021). Fue sintetizado por Henri Martin en 1950, un trabajador de una compañía farmacéutica suiza. Su capacidad como herbicida fue descubierta por el químico John E.

Franz (Gill et al., 2017), iniciando su comercialización como herbicida en el año 1974 patentado por la compañía Monsanto (Muñoz et al., 2021). A partir de 2002, al vencimiento de la patente, distintas compañías y países ha realizado formulaciones genéricas que se ofertan en el mercado con distintos nombres. Desde su introducción al mercado mundial, ha sido uno de los plaguicidas con mayor tasa de incremento en su uso y en su producción (Giesy et al., 2000). Actualmente tiene ventas globales por alrededor de 8,000 millones de dólares al año (Muñoz, 2021).

El glifosato, N-fosfometilglicina (Figura 1), es un herbicida de amplio espectro no selectivo (tiene la capacidad de matar todo tipo de plantas), sistémico (se transporta internamente desde el punto de contacto hasta otras de sus partes), controla plantas anuales y perenes, herbáceas o leñosas, y en diversos estados de crecimiento (Muñoz, 2021). Expresa su acción herbicida más efectivamente a través del contacto directo con el follaje y la subsiguiente translocación por toda la planta, la entrada al sistema radical es insignificante en plantas terrestres.

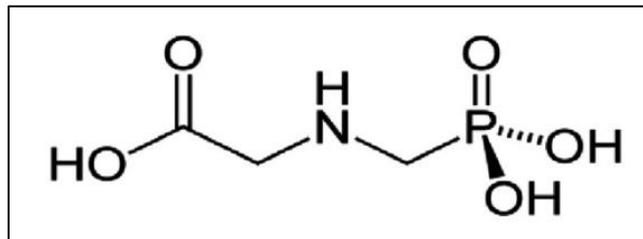


Figura 1. Estructura química del glifosato.

El glifosato pertenece al grupo de los herbicidas organofosforados, es un compuesto polar y anfotérico que se une fuertemente a los suelos, pero también es muy soluble en agua (más de 10g/L a 25 °C); tiene una vida media en el suelo que varía entre 2 a 215 días, y una vida media en el agua entre 2 a 91 días, dependiendo de la temperatura y la composición microbiana, entre otros factores (Sterren et al., 2016). En el medio ambiente, y debido principalmente a procesos microbianos, el glifosato se degrada a su metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA por sus siglas en inglés). Este metabolito es también muy soluble en agua, pero se degrada más lentamente que el glifosato (Sterren et al., 2016).

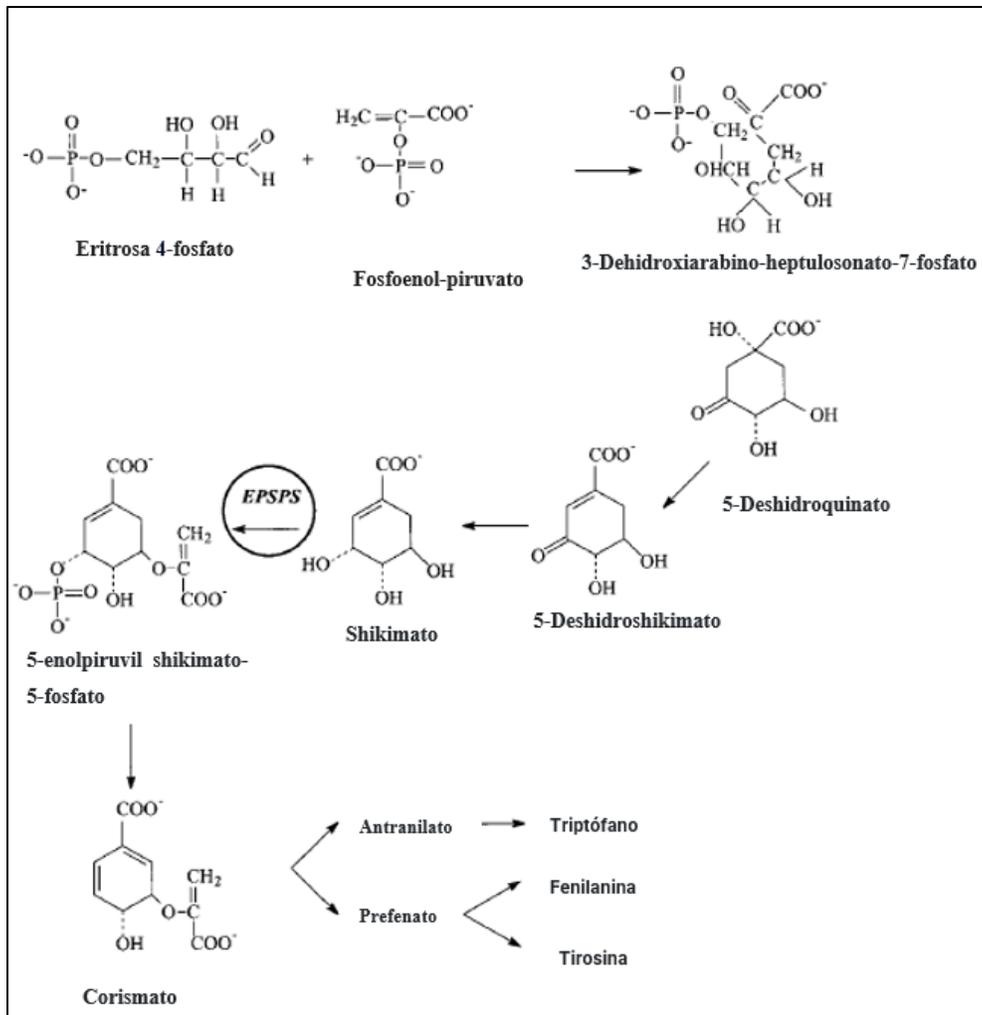


Figura 2. Mecanismo de acción del glifosato en plantas, inhibiendo la síntesis de los aminoácidos aromáticos esenciales por inhibición competitiva de la enzima EPSPS. Fuente: Williams y cols., (2000).

El glifosato ejerce su acción por inhibición del crecimiento vegetal a través de la interferencia en la producción de aminoácidos aromáticos esenciales mediante la inhibición de la enzima enolpiruvil shikimato fosfato sintasa EPSPS, que es responsable de la biosíntesis de corismato, un intermediario de la biosíntesis de fenilalanina, tirosina, y triptófano, esenciales para la formación de otros productos como ligninas, alcaloides y ácidos benzoicos que son necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Figura 2) (Williams et al., 2000). Esta vía para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos no es compartida por los organismos del reino animal, por lo que el bloqueo de esta vía es un efectivo inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos exclusivo para plantas, aunque algunos microorganismos también la presentan y pueden verse afectados por

este compuesto (Shehata et al., 2013).

Además de ser utilizado para acabar con la maleza, desde 1980 se tiene nota de que el glifosato se usa como agente desecante, aplicándolo al final de la temporada de crecimiento para acelerar las operaciones de cosecha, especialmente en cultivos de granos pequeños como el trigo, cebada, avena, frijol, papa, lenteja, garbanzo, maíz y amaranto, entre otros; acelerando y sincronizando la muerte de las plantas para apresurar así la cosecha (Benbrook, 2016, González-Ortega and Hagman-Aguilar, 2018). Se utiliza también para el control de plantas en jardines domiciliarios y zonas urbanas, en la silvicultura, e incluso en la acuicultura.

A través de los años, se han creado cultivos genéticamente modificados (GMO) para resistir al glifosato; su comercialización inició en 1996 y actualmente el 80 % de los cultivos modificados genéticamente están dirigidos específicamente a la introducción de genes resistentes al glifosato permitiendo eliminar malezas sin dañar el crecimiento de los cultivos (Cuadro 4) (Swanson et al., 2014). El uso de cultivos biotecnológicos ha aumentado desde el inicio de su comercialización en 1996. El área global de cultivos biotecnológicos plantados aumentó más de 80 veces durante el período de 1996 a 2007; de 1.7 millones de hectáreas en seis países en 1996, a 143 millones de hectáreas en 23 países en 2007. Los principales productores mundiales son Estados Unidos, Argentina, Brasil, Canadá, India y China, los cuales representan más de 90% de la producción global de GMO, con más del 50% siendo producido solo en los Estados Unidos. El principal cultivo GMO es la soya, la cual ocupó el 51% del área mundial en 2007, seguido por de maíz (31%), el algodón (13%) y la canola (5%) (Rao et al., 2014).

Cuadro 4. Plantas resistentes de glifosato.

Planta	Año de lanzamiento
Soya	1996
Canola	1996
Algodón	1997
Maíz	1998
Betabel	1999
Alfalfa	2005

2.2.1 El Glifosato y sus Posibles Daños a la Salud

El glifosato está ampliamente difundido en el medio ambiente, agua, suelo y alimentos, dado que es el herbicida más utilizado en el mundo y ha estado en uso por alrededor de 50 años, por lo que el glifosato ha sido extensamente estudiado por investigadores de todo el mundo, siendo un importante centro de debate científico.

Hasta el momento, la toxicidad del glifosato sigue siendo sumamente controversial y actualmente no se ha llegado a un consenso sobre su efecto a la salud. Mientras se encuentra clasificado en la Clase IV indicando que no ofrece peligro, se encuentra también incluido en la lista de plaguicidas altamente peligrosos de PAN (Pesticide Action Network International) y está clasificado como posible carcinógeno en humanos por Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC), órgano intergubernamental que forma parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Arellano-Aguilar Omar, 2017, Bejarano González, 2017). No ha sido posible llegar a un consenso porque las distintas posiciones se ven alimentadas por la existencia de informes científicos con conclusiones dispares en cuanto a la toxicidad del glifosato para la salud humana (Torres González and Rodríguez Martínez, 2022). Mientras que unos investigadores concluyen que el glifosato es menos tóxico que el cloruro de sodio y que la aspirina, y que dosis de glifosato de 2g/Kg de peso corporal no son un riesgo genotóxico en humanos (Gill et al., 2017), existen alrededor de 160,000 demandas por las cuales las Compañías Monsanto y Bayer han tenido que pagar miles de millones de dólares a individuos con problemas de salud y aún se enfrentan alrededor de 50,000 demandas pendientes (Martín-Rossi, 2020).

El número de publicaciones en relación con el efecto del glifosato es enorme y muchos de estos trabajos reportan efectos negativos en la salud (Cuadro 5). Una compilación de información científica sobre el efecto del glifosato en la salud muestra 127 artículos científicos relacionados con efectos en la salud pública; 9 artículos en relación con encefalopatía; 6 en autismo, 5 en Parkinson, 23 en cáncer, 8 en linfoma no Hodgkin, 28 en malformaciones (teratogénesis), 27 en estrés oxidativo, 13 en mutagenicidad, 39 en genotoxicidad, 41 en trastornos del sistema endócrino, 44 en trastornos en el sistema reproductivo, 11 en hepatotoxicidad, 9 en trastornos del sistema inmunitario, 5 en trastornos del sistema digestivo, 26 en trastornos en el sistema nervioso, 8 en trastornos en el sistema renal, 8 en trastornos en el sistema cardiovascular. Aunque es importante

aclarar que estas enfermedades son multifactoriales, es decir, que están por múltiples factores, como factores genéticos, el estilo de vida, el ejercicio, la dieta, y la exposición a otros contaminantes. Con respecto al efecto de la exposición al glifosato en diferentes sistemas organismos animales, Martín-Rossi reporta haber encontrado 90 artículos en toxicidad en peces, 44 en anfibios, 1 en tortugas, 32 en crustáceos, 22 en moluscos, 24 en lombrices, 2 en insectos benéficos, 5 en arácnidos, 2 en aves, 17 en mamíferos, y 1 en reptiles (Martín-Rossi, 2020). Se debe hacer notar que muchos de estos estudios están realizados exponiendo a los organismos a concentraciones subletales de glifosato y que es necesario realizar experimentos que evalúen el efecto de la exposición a glifosato en concentraciones reales, así como en las concentraciones permitidas por las entidades encargadas del control en el uso de plaguicidas.

Cuadro 5. Efectos negativos en la salud asociados al glifosato (Samsel and Seneff, 2013a, Samsel and Seneff, 2013b, Bernardi et al., 2015, Samsel and Seneff, 2015a, Samsel and Seneff, 2015b, Samsel and Seneff, 2016, Cai et al., 2017, Cattani et al., 2017, Martín-Rossi, 2020).

Encefalopatía	Linfoma no Hodkin	Apoptosis celular	Trastorno del sistema reproductivo	Disrupción hormonal	Celiaquía
Trastorno del sistema inmunitario	Malformaciones	Trastornos del sistema endócrino	Cáncer	Reducción de esperma	Depresión
Estrés oxidativo	Genotoxicidad	Autismo	Trastornos en el sistema nervioso	Trastorno del sistema digestivo	Interferencia nutricional
Parkinson	Trastorno del sistema renal	Mutagenicidad	Trastorno del sistema cardiovascular	Quelación de minerales	Permeabilidad intestinal

Swanson y colaboradores realizaron un estudio de correlación entre la aplicación de glifosato y el desarrollo de diversas enfermedades, o muerte por enfermedad en los Estados Unidos, con datos de 20 años (de 1990 a 2010) utilizando las bases de datos del gobierno. Para el caso de enfermedades, los datos fueron ajustados por edad, para eliminar la posibilidad de incremento en prevalencia de cierta enfermedad derivado del incremento en la expectativa de vida, es decir, que la gente viva más tiempo con la enfermedad. Los coeficientes de correlación de Pearson son altamente significativos como se puede observar en el Cuadro 6, aunque es importante aclarar que un alto grado de correlación no implica una relación causa efecto. Incluso puede existir otro factor

o factores involucrados, que no hayan sido evaluados y que pudieran manifestar la misma velocidad de incremento a través de los años que el uso del glifosato. Los autores citan lo siguiente: “No damos a entender que todas estas enfermedades tengan una causa única, ya que existen muchas sustancias tóxicas y patógenos que pueden contribuir a las enfermedades crónicas. Sin embargo, ninguna sustancia tóxica ha aumentado su ubicuidad en los últimos 20 años como lo ha hecho el glifosato. La alteración de las vías de desintoxicación del cuerpo humano por parte del glifosato puede intensificar el efecto de otras sustancias químicas tóxicas”.

Cuadro 6. Coeficientes de Pearson entre enfermedades y aplicación de glifosato (correlación con datos de 1990 a 2010), (Swanson et al., 2014)

Enfermedad	Coefficiente R	R2 * 100	Probabilidad (p)
Cáncer de tiroides	0.988	97.6	0.000000007
Cáncer de hígado	0.960	92.1	0.000000046
Cáncer de vejiga	0.981	96.2	0.000000004
Cáncer pancreático	0.918	84.2	0.000000460
Cáncer de riñón	0.973	94.8	0.000000002
Leucemia mieloide	0.878	77.1	0.000001500
Muerte por hipertensión	0.923	85.2	0.00000016
Muerte por paros cardíacos	0.925	85.5	0.00000015
Obesidad	0.962	92.5	0.000000017
Incidencia de diabetes	0.935	87.4	0.000000083
Fallo renal	0.978	95.6	0.000000006
Muerte por Alzheimer´s	0.917	84.1	0.00000022
Muerte por Parkinson´s	0.875	76.6	0.0000016
Muerte por demencia	0.994	98.8	0.000000018
Muerte por esclerosis múltiple	0.828	68.5	0.000011
Muerte por infección intestinal	0.974	94.8	0.0000000076

2.2.2 El Glifosato en México

En México el glifosato es el plaguicida más consumido por su bajo costo y por su capacidad de controlar casi cualquier tipo de cultivo. Según la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), el glifosato se considera un herbicida grado IV de toxicidad, con

un DL50 en ratas superior a 5000 mg/Kg, ingesta diaria admisible (IDA) de 0.3 mg/Kg y límite máximo residual (LMR) en maíz y frijol, de 0.1 y 0.2 Mg/Kg respectivamente.

En México se ha permitido sembrar cultivos genéticamente modificados como algodón y soya, desde hace más de 20 años. El permiso se otorga bajo el principio de caso por caso y paso por paso (CONAHCYT, 2024).

El 31 de diciembre del 2020 se publicó en el Diario Oficial de la Federación el decreto presidencial que prohibiría el glifosato y el maíz transgénico, estableciendo un proceso para reducir de manera gradual el uso del glifosato hasta su eliminación en enero de 2024. Las compañías nacionales y multinacionales que producen y comercializan este herbicida han respondido en contra del decreto, negando la posibilidad de alternativas a este herbicida; aunado a esto el gobierno de los E.U.A. apoyó los intereses de estas compañías argumentando que este decreto infringe los acuerdos del Tratado de Libre Comercio entre su país, México y Canadá, indicando además que el decreto afectaría grandemente la economía de sus productores de maíz amarillo genéticamente modificado. El gobierno de México respondió publicando un nuevo Decreto el 13 de febrero de 2023 abrogando el decreto anterior, posponiendo tres meses la entrada en vigor de la eliminación total del glifosato (CONAHCYT, 2023).

Ante las advertencias de organizaciones campesinas y fabricantes de agroquímicos de que la restricción ponía en riesgo la producción de maíz, granos básicos, verduras y hortalizas, el Gobierno mexicano dio marcha atrás en su prohibición para importar y fabricar glifosato a partir del 1 de abril del 2024 en un nuevo decreto publicado el 6 de marzo de 2024 en la Gaceta parlamentaria, anunciando que se permitirá el uso del glifosato como herbicida hasta nuevo aviso; dado que la prohibición estaba condicionada a que se pudiera mantener la producción agrícola contando con alternativas agroecológicas y saludables que permitieran prescindir completamente del glifosato, lo que no se ha cumplido.

2.2.3 Residualidad de Glifosato en Alimentos

Es importante destacar que la mayoría de los alimentos pueden contener trazas de herbicidas, pero los niveles suelen estar por debajo de los límites establecidos por las autoridades reguladoras. Sin

embargo, la presencia residual de herbicidas en alimentos sigue siendo una preocupación importante para la salud humana y el medio ambiente. La organización de agricultura y comida (FAO por sus siglas en inglés) reportó que la exposición al glifosato resulta peligrosamente tóxica como resultado de la acumulación en la cadena alimenticia (Bai et al., 2016).

Los consumidores están cada vez más expuestos al glifosato a través de los alimentos, un considerable número de artículos científicos han reportado la presencia de glifosato en alimentos para consumo humano. Una recopilación de referencias científicas sobre el glifosato, publicada en 2020 incluye 17 artículos científicos que analizan glifosato en alimentos y bebidas, de 1994 a 2019 (Martín-Rossi, 2020).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés) propuso un umbral considerado seguro de 0.5 mg/Kg de peso corporal; mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en la reunión conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas (JMPR) concluyeron que es improbable que la exposición dietaria a glifosato conlleve un riesgo de desarrollo de cáncer en humanos; indicando que una exposición de hasta 1 mg/Kg de peso corporal no ha sido asociado con efectos genotóxicos (Torretta et al., 2018). En Estados Unidos, la Agencia de Protección para el medio ambiente en 2013 incrementó el límite máximo permitido de glifosato en alimentos a 2mg/Kg de peso corporal.

La residualidad de glifosato en alimentos es una consecuencia directa del uso del producto en árboles y cultivos, especialmente en aquellos alimentos producidos a partir de cultivos genéticamente modificados para soportar el glifosato, donde los cultivos se rocían directamente con el herbicida; en frutos donde se aplica el producto para el control de la maleza, llegando a estar en contacto con los árboles frutales, los cuales no se ven afectados por el herbicida; en cultivos donde el herbicida es utilizado como desecante de la planta para una rápida cosecha. En todos los casos, el glifosato puede llegar al alimento al ser asperjado directamente al mismo o al ser rociado a las hojas del árbol o la planta pudiendo posteriormente transportarse internamente hasta el alimento. “Esto implicaría que los niveles actuales de residuos permitidos en los alimentos podrían estar causando múltiples problemas de salud que, según se ha documentado en la literatura científica, son causados por sustancias químicas que alteran el sistema endocrino” (Swanson et al., 2014).

En México no hay legislación específica para glifosato en agua potable, pero la NOM-201-SSA1-

2015, establece que los compuestos orgánicos no halogenados, donde se incluye el glifosato, no deben exceder 10 µg/L. Además de encontrar glifosato en la orina de las personas que viven y trabajan dentro de las áreas agrícolas con una concentración de 0.47 µg/L y las que viven en la ciudad de Campeche 0.22 µg/L. (Polanco y Araujo 2018). Leyva-Soto y cols. (2018) (2018) analizaron el riesgo para los agricultores expuestos a agua contaminada con glifosato y AMPA, en Valle de Mayo, Sonora, concluyeron que las concentraciones de ingesta diarias ponen en riesgo la salud y el consumo de agua de un pozo cerca de canales donde ha sido aplicado, consideran que está correlacionado con la cantidad de personas con diabetes e hipertensión. Rendón-von Osten y Dzul-Caamal (2017) evaluaron aguas subterráneas, agua embotellada y orina de granjeros de localidades agrícolas de Campeche. Encontrando concentraciones de hasta 1.42µg/L en agua subterránea. 0.6 µg/L en agua embotellada y 0.47 µg/L en orina, evidenciando una exposición excesiva a glifosato en estas comunidades agrícolas. Ruiz-Toledo y cols. (2014) encontraron hasta 36.7 µg/L de glifosato en aguas de ríos en el estado de Chiapas. Así mismo, en la cuenca Ayuquila-Armería, en los estados de Jalisco y Colima, se ha encontrado una concentración promedio de 0.29 mg/L en aguas superficiales (Rodríguez Aguilar et al., 2019).

En CIAD Cuauhtémoc se analizó la residualidad de glifosato en alimentos a la venta en la región (Olivas-Muñoz, 2020). Se analizaron un total de 25 muestras de productos adquiridos en los centros comerciales de la ciudad de Cuauhtémoc, Chih. (Figura 3). Entre los productos alimenticios se encuentran, cereales de mesa, totopos, tortillas harinas, granos y avena mexicana e importada de E.U., galletas frijol y amaranto. Todos los alimentos analizados mostraron glifosato en su contenido. Aquellos conteniendo avena en sus ingredientes mostraron una mayor concentración de glifosato. El cereal para el desayuno de avena en forma de donitas presentó una concentración de hasta 0.17 mg/Kg de alimento, las hojuelas de maíz presentaron una concentración de 0.01 mg/Kg, las donitas de colores presentaron valores de 0.1 mg/Kg, las barras de avena presentaron hasta 0.16 mg/Kg, la avena importada presentó 0.75 mg/Kg, mientras que la avena mexicana presentó valores de 0.27 mg/Kg. El amaranto presentó valores de 0.022 mg/Kg, el frijol 0.0033 mg/Kg, la harina de trigo 0.006 mg/Kg, mientras que la harina de maíz nixtamalizada 0.006 mg/Kg. Torreta y cols. (2018) mencionan que productos adquiridos en Italia presentaron las siguientes concentraciones de glifosato, 0.14 mg/Kg en hojuelas de maíz y 0.023 mg/Kg de alimento en harina de trigo.

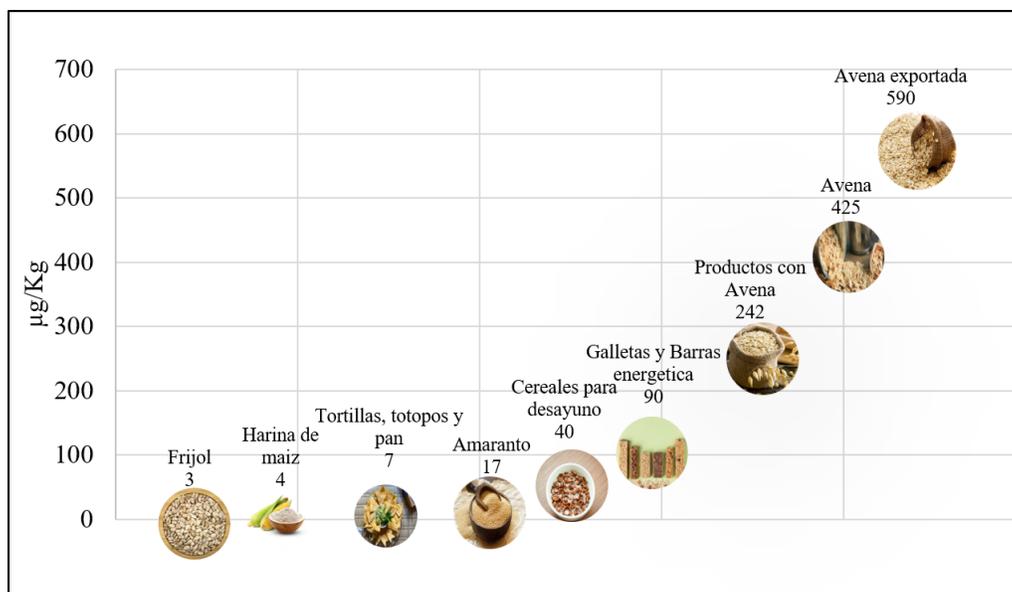


Figura 3. Residualidad de glifosato (Olivas-Muñoz, 2020).

2.3 El Estrés Oxidativo

Los organismos vivos se desarrollan en condiciones aeróbicas y expuestos a agentes oxidantes. Cuando hay un desbalance entre la producción de agentes oxidantes, es decir, entre la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), y su eliminación a través de diferentes mecanismos defensores, el organismo entra en un estado de estrés oxidativo (Qiao et al., 2013). El termino de estrés oxidativo como daño a las células fue introducido por primera vez en el capítulo introductorio de un libro publicado en 1985 titulado Estrés Oxidativo como “una alteración en el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor del anterior” (Ha, 1985).

El oxígeno es una molécula imprescindible para la vida, ya que tiene una alta reactividad e importancia en los procesos de oxidación-reducción lo que le permite participar en la cadena de transferencia de electrones y en la generación de adenosina-5-trifosfato (ATP) a través de la fosforilación oxidativa. Estos procesos resultan esenciales para la vida; sin embargo las especies reactivas al oxígeno (moléculas conteniendo oxígeno) son altamente tóxicas para el organismo (Finaud et al., 2006). El oxígeno, a través de las especies reactivas al oxígeno, se ve ligado al daño en lípidos, proteínas y el ADN, de aquí la importancia que tienen las especies reactivas al oxígeno (Burton and Jauniaux, 2011).

El término ROS refiere a moléculas conteniendo oxígeno con alta reactividad química, metabolitos del oxígeno parcialmente reducidos con una fuerte capacidad oxidante. Los electrones en los átomos ocupan orbitales y cada orbital alberga un máximo de dos electrones. Cuando una especie contiene electrones no apareados (es decir un electrón que se encuentra solo en su orbital), se le considera un radical libre, con fuerte tendencia a formar pares de electrones para llegar a una configuración más estable. Este radical tratará de donar su electrón a otra molécula o robar un electrón de otra molécula, consiguiendo así que la otra molécula se transforme en un radical libre. Por lo que los radicales libres tienen la característica de causar reacciones en cadena (un radical generará otro radical sucesivamente), (Carvajal, 2019). El anión superóxido $O_2^{\cdot-}$ es el principal ROS producido, y la mitocondria el principal órgano celular que lo produce (Cadenas et al., 2000). El anión superóxido puede dar origen a los demás ROS. El Cuadro 7 muestra las principales especies reactivas al oxígeno ROS.

Cuadro 7. Principales especies reactivas al oxígeno (ROS)

Formula	Nombre
$O_2^{\cdot-}$	Superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
HO^{\cdot}	Hidroxil
O_3	Ozono
1O_2	Oxígeno singulete
HOO^{\cdot}	Hidroperoxil
$ROOH$	Hidroperóxido de alquilo
ROO^{\cdot}	Peroxil
RO^{\cdot}	Alcoxil
ClO^{\cdot}	Ion hipoclorito

El superóxido se detoxifica mediante las enzimas superóxido dismutasa SOD, que lo convierten en peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno no es un radical libre, por lo que es menos reactivo que el radical $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, se incluye en el término de ROS ya que está íntimamente involucrado en la generación y detoxificación de radicales libres. Al ser no polar, puede difundirse a través de las membranas celulares y de los orgánulos y, por lo tanto, actúa ampliamente como segundo mensajero en las vías de transducción de señales. A su vez, el peróxido de hidrógeno se detoxifica a agua mediante las enzimas catalasa CAT y glutatión peroxidasa GPx como se muestra en la Figura 4.

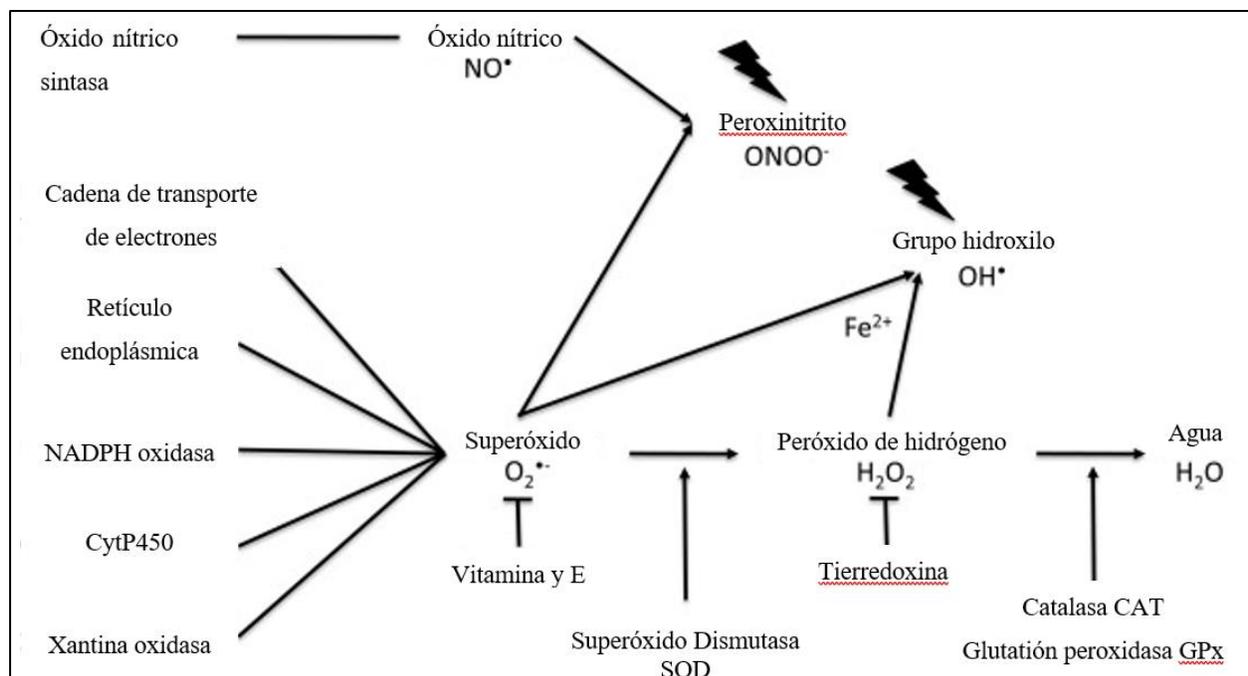


Figura 4. Las principales especies reactivas al oxígeno, sus posibles orígenes y vías de desintoxicación.

Es importante que las enzimas antioxidantes actúen en conjunto, ya que un desequilibrio en las concentraciones de $O_2^{\bullet-}$ y peróxido de hidrógeno puede resultar en la formación del ion hidroxilo ($OH\bullet$) mucho más peligroso. Esta reacción está catalizada por iones férricos libres en la reacción de Fenton. El ion hidroxilo tiene una vida estimada de 10^{-9} s, y reacciona con cualquier molécula biológica en su vecindad inmediata de manera limitada por la difusión. Debido a su alta reactividad, no se conoce ningún eliminador de $OH\bullet$. La generación excesiva de superóxido también puede dar lugar a interacciones con el óxido nítrico ($NO\bullet$) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). El peroxinitrito es un poderoso prooxidante. Dado que es capaz de difundirse hasta $5\ \mu m$, puede afectar a las células vecinas (Pacher et al., 2007).

2.3.1 Efecto de los Compuestos Xenobióticos en el Estrés Oxidativo

La exposición a pesticidas puede causar un incremento en el estrés oxidativo de los organismos vivos ya que actúan como prooxidantes y provocan efectos en múltiples órganos (Sinhorin et al.,

2014). La Figura 5 muestra como agentes externos como la contaminación del aire, la radiación ionizante, la luz UV, los metales pesados, los metaloides, los pesticidas y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros, inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tejidos objetivo, activando vías de señalización que se ponen en marcha en respuesta al estrés oxidativo.

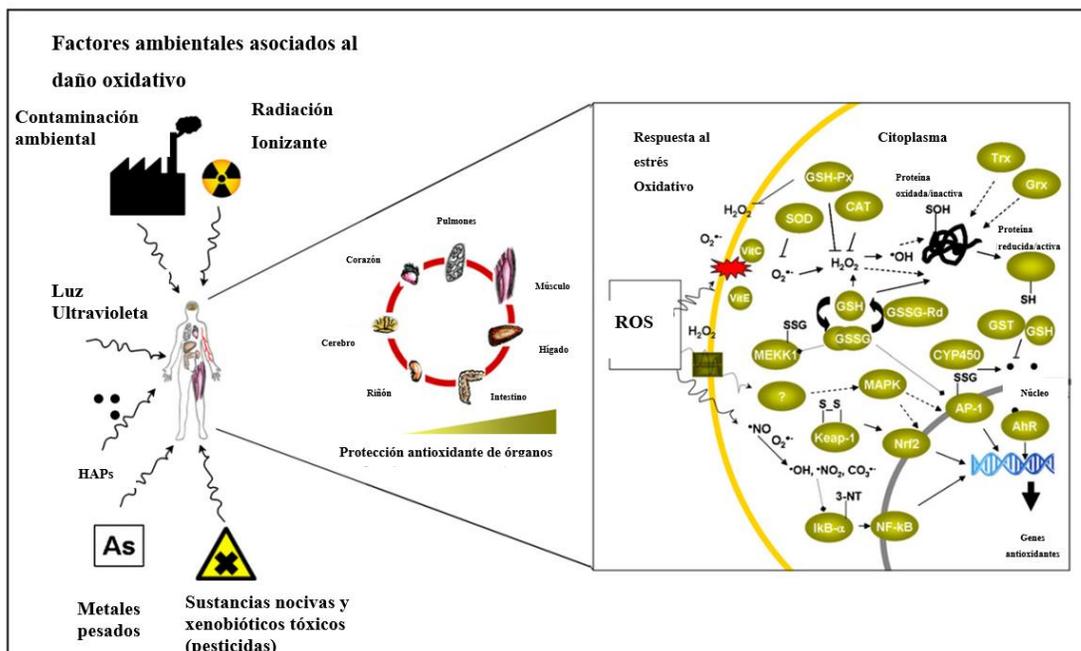


Figura 5. Agentes externos causantes de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en órganos activando la señalización para la respuesta contra el estrés oxidativo (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009).

Enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), y la catalasa (CAT), sistemas antioxidantes redox como GSH-GPx y la tiorredoxina (Trx); y la acción de las vitaminas E y C colaboran en la neutralización de los ROS. El paraquat ha sido ampliamente estudiado como inductor de estrés oxidativo, y se cree que la toxicidad del paraquat se debe principalmente a la generación de ROS y a alteraciones en el ciclo redox (Dinis-Oliveira et al., 2008). En ratas, el paraquat induce alteraciones en los sistemas antioxidantes en muchos tejidos (por ejemplo, hígado, sangre, riñón, pulmón), y sus objetivos incluyen el GSH, el glutatión reductasa (GSSG-Rd), la catalasa (CAT), el superóxido dismutasa (SOD), el glutatión peroxidasa (GPx) y el glutatión S-

transferasas (GST) (Tomita et al., 2005, Ray et al., 2007). El malatión, un compuesto organofosforado, es otro ejemplo de un pesticida que induce estrés oxidativo, lo que conduce a la generación de radicales libres y alteraciones en los sistemas antioxidantes en varios órganos en ratas. Varios estudios han reportado desarrollo de estrés oxidativo en diversos organismos causado por la exposición a glifosato, Martín-Rossi (2020) reporta haber encontrado 27 artículos científicos en este tema.

2.3.2 Daños Causados por el Estrés Oxidativo

Cuando el organismo entra en un estado de oxidación inducido por el estrés oxidativo, por diversos factores tanto internos como externos al cuerpo, existe un exceso de ROS, moléculas altamente reactivas que pueden causar daño a diversas biomoléculas, como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. Según (Storz and Imlay, 1999) diversos estudios sugieren que el daño causado puede irse acumulando desencadenado a la contribución a otros problemas de salud. El daño causado por el estrés oxidativo puede tener consecuencias a nivel celular y contribuir al envejecimiento, así como a diversas enfermedades, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, y cáncer. Aquí se describen los posibles efectos del estrés oxidativo en cada una de estas categorías:

El estrés oxidativo puede conducir a la peroxidación lipídica, un proceso en el cual los radicales libres atacan los ácidos grasos insaturados de los lípidos, provocando la formación de productos de oxidación. La peroxidación lipídica puede comprometer la integridad de las membranas celulares y afectar la función de las estructuras celulares. El estrés oxidativo puede causar la oxidación de residuos de aminoácidos, la formación de enlaces cruzados y la fragmentación de las cadenas proteicas. La oxidación de proteínas puede afectar su actividad biológica, su plegamiento y su capacidad para desempeñar funciones específicas en las células. Aunque los carbohidratos en sí mismos no son tan susceptibles al estrés oxidativo como los lípidos y las proteínas, las especies reactivas de oxígeno pueden afectar a las moléculas de carbohidratos unidos a las proteínas (glucosilación). La alteración de la glucosilación puede influir en la función de las proteínas glicosiladas y contribuir a problemas metabólicos.

El estrés oxidativo también puede causar daño a los ácidos nucleicos, que son las moléculas que componen el material genético de las células (ADN y ARN). Estos daños pueden tener importantes implicaciones para la integridad genética y la capacidad de las células para funcionar correctamente. Las bases nitrogenadas que forman parte de las moléculas de ADN y ARN pueden ser oxidadas por especies reactivas de oxígeno (ROS), esto puede incluir la oxidación de adenina, guanina, citosina y timina en el ADN. La oxidación de estas bases puede alterar la información genética almacenada en el ADN y afectar la capacidad de replicación y transcripción.

El estrés oxidativo puede inducir roturas en las cadenas de ADN. Las roturas de cadena pueden ocurrir de manera sencilla o pueden ser más complejas, como las roturas de doble cadena. Las roturas de cadena pueden dar lugar a mutaciones genéticas y, en casos extremos, a la pérdida de información genética importante. Las enzimas encargadas de reparar el ADN también pueden ser afectadas por el estrés oxidativo. Si estas enzimas no funcionan correctamente, la capacidad de la célula para reparar los daños en su material genético se ve comprometida. El daño a los ácidos nucleicos por estrés oxidativo puede contribuir al desarrollo de enfermedades como el cáncer. Existen proteínas antioxidantes, como la oxoguanina glicosilasa y otras enzimas implicadas en la reparación del ADN dañado por oxidación, que desempeñan un papel clave en la protección del material genético contra el estrés oxidativo.

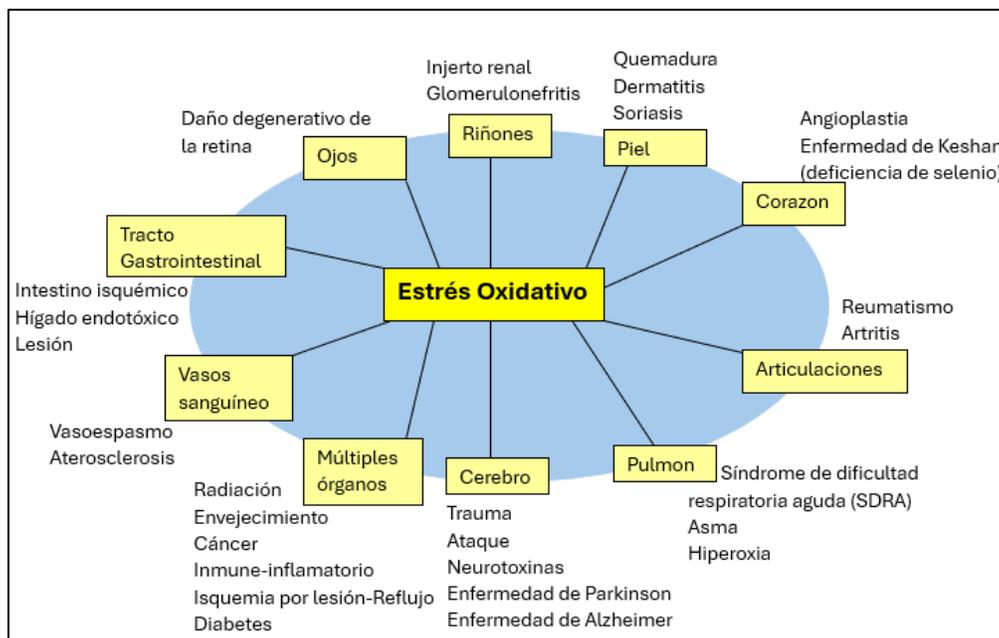


Figura 6. Enfermedades que han sido relacionadas con el estrés oxidativo (Azzi, 2022)

Los daños a lípidos, proteínas, carbohidratos, y a ácidos nucleicos ocasionan el desencadenamiento de diversas enfermedades (Pisoschi et al., 2021), en la Figura 6 se muestran las enfermedades que han sido relacionadas con el estrés oxidativo. Existe evidencia de que el glifosato es un probable carcinógeno para humanos, sin embargo más investigación es necesaria (Kogevinas, 2019).

2.3.1 Efecto del Glifosato en el Estrés Oxidativo

Numerosos estudios han sugerido que el efecto toxicológico del glifosato es mediado vía la inducción del estrés oxidativo. El estrés oxidativo mediado por el glifosato rompe el balance de oxidación y antioxidación, dañando lípidos, ADN y proteínas y conduciendo a la muerte celular y apoptosis (Wang et al., 2022). El glifosato causa peroxidación lipídica, la cual depende de la cual es dependiente de la concentración del glifosato y del tiempo de exposición (Burella et al., 2018, Hong et al., 2018, Zhong et al., 2018). El ADN puede ser dañado por exposición a glifosato (Hong et al., 2018, Santo et al., 2018). Ratas macho expuestas a 0.1, 0.5, 1.75 y 10 mg/Kg de glifosato mostraron un daño primario a ADN en hepatocitos y leucocitos, el glifosato indujo un daño en ADN en camarón expuesto por 48 y 96 h en la concentración LC₅₀ (Hong et al., 2018).

El glifosato ha mostrado causar daño a las enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, entre otras) incrementando su actividad cuando la exposición no es tan severa, e inhibiendo su actividad cuando la exposición a glifosato es mayor y/o por un periodo de tiempo prolongado (Beuret et al., 2005, Astiz et al., 2009, Lushchak et al., 2009, Zhong et al., 2018, Turkmen et al., 2019, Yousefi et al., 2021). La exposición a glifosato en altas concentraciones inhibe la actividad de las enzimas antioxidantes, tal vez por exceso de radicales libres ROS. Hong y cols. (2018) encontró que el glifosato incrementa la concentración de los biomarcadores del estrés oxidativo (oxidación de lípidos) mientras inhibe la actividad de las enzimas antioxidantes, y esto es dependiente directamente de la concentración del glifosato. Burella y cols. (2018) explican la inhibición de enzimas antioxidantes como una consecuencia a la alta producción de ion superóxido. Turkmen y cols. (2019) observaron que la actividad de las enzimas antioxidantes, inhibidas por la exposición a glifosato, es recuperada si se suplementa al organismo expuesto (en este caso rata) con N-acetilcisteína. Zhong y cols. (Zhong et al., 2018) Consiguieron aumentar la actividad de las enzimas

antioxidantes inhibida por la exposición a glifosato, en plantas de agua *Hydrocharis dubia*, al aplicar fósforo, nutriente esencial en la planta, ellos concluyen que esto es debido a que el fosforo inhibe la absorción de glifosato, dado que el glifosato y el fosfato pueden usar el mismo sistema de transporte. Yousefi y cols. (2021) expusieron a peces carpa a glifosato en concentraciones subletales, encontrando valores menores de SOD y GPx, después de la exposición a glifosato (estadísticamente similares al control). Incrementando significativamente después de suplementar a los peces con comino negro. El Cuadro 8 muestra algunos estudios enfocados en la exposición a glifosato de diferentes organismos y su efecto en el estrés oxidativo.

Cuadro 8. Estudios que muestran efecto de la exposición a glifosato en el estrés oxidativo de diversos organismos.

Organismo estudiado	Método de exposición y concentración	Efectos encontrados en relación con el control	Referencia
Ratas preñadas y sus fetos	Exposición vía oral en alimentos y líquidos, 1% de glifosato	Hígado de ratas: Excesiva ox. lip. No hay diferencia en los valores de SOD, CAT y GPx Fetos: Incremento en GPx	(Beuret et al., 2005)
Ratas	Vía inyección 10mg gly/Kg pc, tres veces/sem/5 sem	Hígado: Disminuyó la actividad de SOD. No hay diferencias en CAT y GPx. Incremento en la ox. lip. Testículos: Disminución en la actividad de CAT, no hay diferencia en SOD y GPx	(Astiz et al., 2009)
Peces	Vía agua ambiental. 2.5-20mg/L, por 96 h	Cerebro: reducción en SOD 51-68% Hígado: reducción en SOD 33-53%	(Lushchak et al., 2009)
Peces <i>Rhamdia quelen</i>	Vía agua ambiental, 0.45 o 0.95 mg/L por 8 días	Músculo: Incremento en la ox. lip a 0.95mg/L Hígado: Incremento en la ox. lip. en ambas concentraciones. SOD y CAT no mostraron diferencias en ambas concentraciones. Cerebro: Incremento en la ox. lip. en ambas concentraciones	(de Menezes et al., 2011)
Ratas	375mg/Kg pc/día por 8 semanas en agua de beber	Incremento en ox. lip. en sangre, hígado, riñón, corazón y cerebro; el cual disminuyó al suplementar con N-acetil cisteína. Disminución de la actividad de CAT y SOD en sangre, aumentando nuevamente al suplementar con N-acetil cisteína	(Turkmen et al., 2019)
Planta de agua <i>Hydrocharis dubia</i>	1,5 y 15 mg/L en agua ambiental por 14 días	Incremento en ox. lip., actividad de SOD, CAT, APX, POD, PPO. Todo esto disminuyó al aplicar el nutriente esencial fósforo	(Zhong et al., 2018)
Camarón	La concentración LC ₅₀ por 48 horas	Incremento en la ox. lip. y disminución en SOD y CAT, así como en la capacidad antioxidante	(Hong et al., 2018)
Caimán	Aplicación tópica en huevos (500, 750, 1000 µg Roundup/huevo)	Incremento en la ox. lip. en sangre de caimanes recién eclosionados, mientras no se observó incremento en SOD ni CAT	(Burella et al., 2018)
Peces	14 días de exposición (0.122 mg/L)	No hay diferencia en SOD y GPx, sin embargo, al suplementar con <i>N. Sativa</i> (comino negro) estas enzimas se activaron	(Yousefi et al., 2021)

Gly: glifosato, pc: peso corporal, ox. lip.: peroxidación lipídica, semana: sem; CAT: catalasa; SOD: superóxido dismutasa; GPx: glutatión peroxidasa; APX: ascorbato peroxidasa; PPO: polifenol oxidasa; POD: peroxidasa

2.4 Sistemas Antioxidantes

El cuerpo humano tiene varios sistemas de defensa antioxidantes unos sintetizados en vivo y otros provenientes de la dieta. Los antioxidantes son cualquier sustancia que retrasa, previene o remueve el daño oxidativo a una molécula objetivo (Halliwell and Gutteridge, 2015). Los principales mecanismos de defensa están conformados por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que trabajan en conjunto para neutralizar las ROS y proteger las células contra la oxidación, más sin embargo no son la única defensa que el organismo tiene contra la oxidación en el cuerpo.

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos se encuentran la vitamina E, la vitamina C, los compuestos fenólicos, el glutatión, el ácido úrico, la bilirrubina, la biliverdina, el selenio, la transferrina y la lactoferrina entre otros (Birben et al., 2012). Algunas proteínas contienen metales que pueden tener propiedades antioxidantes y ayudar a neutralizar los ROS. Un ejemplo es la metalotioneína, que contiene zinc y puede actuar como antioxidante. Los micronutrientes dietéticos también contribuyen al sistema de defensa antioxidante. Estos incluyen el β -caroteno, la vitamina C y la vitamina E (la familia de la vitamina E comprende tanto tocoferoles como tocotrienoles, siendo el α -tocoferol la forma predominante y más activa) (Alli et al., 2014). Las moléculas solubles en agua, como la vitamina C, son agentes potentes de captación de radicales en la fase acuosa del citoplasma, mientras que las formas liposolubles, como la vitamina E y el β -caroteno, actúan como antioxidantes en entornos lipídicos. Además, el selenio, el cobre, el zinc y el manganeso son elementos importantes, ya que actúan como cofactores para las enzimas antioxidantes. Se considera que el selenio es particularmente importante en la protección del entorno lipídico contra lesiones oxidativas, ya que sirve como cofactor para la GSH-Px. El antioxidante celular más abundante es el tripéptido glutatión, GSH (l- γ -glutamyl-l-cisteína glicina) que se encuentra en el citosol, la mitocondria y el núcleo. El GSH se sintetiza a partir de los aminoácidos el ácido glutámico, la cisteína, y la glicina (Carvajal, 2019). El GSH previene la oxidación de los grupos tiol de las proteínas, ya sea directamente reaccionando con especies reactivas o indirectamente a través de glutatión transferasas.

De acuerdo con Limón-Pacheco y Gonsebatt (2009) los mecanismos de defensa contra el daño oxidativo inducido por radicales libres incluyen lo siguiente: (i) eliminación catalítica de radicales libres y especies reactivas por factores como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), la

peroxidasa y antioxidantes específicos de tiol; (ii) unión de proteínas (por ejemplo, transferrina, metalotioneína, haptoglobina, ceruloplasmina) a iones metálicos prooxidantes, como hierro y cobre; (iii) protección contra el daño macromolecular por proteínas como las proteínas de choque térmico o de estrés; y (iv) reducción de radicales libres mediante donadores de electrones, como GSH, vitamina E (tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), bilirrubina y ácido úrico como se puede observar en las Figuras 5 y 6.

2.4.1 Enzimas Antioxidantes

El sistema considerado como defensa antioxidante de primera línea incluye a la superóxido dismutasa (SOD), a la catalasa (CAT) y a la glutatión peroxidasa (GPx), las cuales eliminan de forma integral, primero el ion superóxido y enseguida el peróxido de hidrógeno (Qiu et al., 2020, Sarikaya et al., 2020). Sin embargo, las propiedades señalizadoras del peróxido de hidrógeno pueden ser suprimidas por su catabolismo excesivo (Azzi, 2022)

La superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y el glutatión peroxidasa trabajan juntas para convertir los ROS en sustancias menos dañinas. Estas enzimas tienen la función específica de neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y prevenir el daño oxidativo en las células. Un vistazo general a la conectividad de las enzimas es que la superóxido dismutasa (SOD) convierte el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mientras que catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) trabajan el producto de SOD convirtiéndolo en agua H_2O . A continuación, se describe a detalle el funcionamiento de estas enzimas antioxidantes y su forma de transformar los ROS en compuestos menos reactivos y que no generen daño al organismo.

2.4.1.1. Superóxido dismutasa (SOD). Las SOD son proteínas que contienen metal y catalizan la eliminación del superóxido, generando peróxido de hidrógeno como producto final de la dismutación. Se han identificado tres isoformas, y todas están presentes en todas las células eucariotas. La isoforma de SOD de cobre y zinc SOD1 está presente en el citoplasma, núcleo y plasma. Por otro lado, la isoforma de SOD de manganeso SOD2 se encuentra principalmente en

las mitocondrias y SOD3 (extracelular).

Esta enzima cataliza la conversión del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El superóxido es una especie altamente reactiva que puede causar daño celular, y la acción de la SOD ayuda a neutralizarlo. La forma en que SOD actúa es la siguiente $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. El anión peróxido de hidrógeno sigue siendo un ROS, aunque menos tóxico, que otras enzimas se encargan de descomponer.

Dado que el superóxido es la principal especie reactiva de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) producida desde diversas fuentes, su dismutación por la superóxido dismutasa (SOD) es de importancia primordial para cada célula. Las tres formas de SOD, es decir, CuZnSOD, Mn-SOD y EC-SOD, están ampliamente expresadas en el pulmón humano. La Mn-SOD se localiza en la matriz mitocondrial (Birben et al., 2012). En general, se considera que CuZnSOD y Mn-SOD actúan como eliminadores generales de radicales superóxidos. El nivel relativamente alto de EC-SOD en el pulmón, con su unión específica a los componentes de la matriz extracelular, puede representar un componente fundamental de la protección de la matriz pulmonar (Zelko et al., 2002). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producido por la acción de las SOD o la acción de oxidasas, como la xantina oxidasa, se reduce a agua por la enzima catalasa y la enzima glutatión peroxidasa.

2.4.1.2. Catalasa (CAT). Las enzimas catalasa son enzimas que convierten el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y O_2 , y se localizan principalmente en organelos subcelulares como los peroxisomas. La catalasa es una enzima que se encuentra en casi todas las células del organismo, especialmente en aquellas que se encuentran con altos niveles de oxígeno, como los glóbulos rojos y el hígado. Su función principal es descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno molecular (O_2), la reacción es la siguiente $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. El peróxido de hidrógeno es otro ROS y puede ser tóxico para las células si se acumula en grandes cantidades. El agua producida no es tóxica y puede ser utilizada en otros procesos celulares. La enzima catalasa es una de las que presentan mayor actividad al ser el organismo expuesto a diversos xenobióticos como lo son los plaguicidas.

2.4.1.3. Glutatión Peroxidasa (GPx). El conjunto de enzimas glutatión peroxidasas (GPx) tiene

como función eliminar el H_2O_2 acoplado su reducción con la oxidación de GSH. La reacción es la siguiente $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$ (Margis et al., 2008). El agua producida no es tóxica y puede ser utilizada en otros procesos celulares. GPx también puede reducir otros peróxidos, como los hidroperóxidos de ácidos grasos. Estas enzimas están presentes en el citoplasma a concentraciones milimolares y también en la matriz mitocondrial. La mayoría de los tejidos animales contienen actividad de CAT y GPx. Esta enzima utiliza el glutatión, un antioxidante celular esencial, para reducir y neutralizar el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos. El caso de CAT y GPx es muy similar ya que se cuenta con estudios que demuestran que estas dos enzimas reaccionan con la liberación de ROS generada por la presencia de xenobióticos que son compuestos externos al cuerpo, es decir que no son nativos del mismo por lo que entran en contacto con el organismo gracias a las condiciones ambientales a las que nos vemos expuestos. Es importante destacar que las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx trabajan de manera coordinada y se complementan entre sí, y que el exceso de ROS afecta su función causando su inhibición (Modesto and Martínez, 2010, Burella et al., 2018, dos Santos Teixeira et al., 2018, Turkmen et al., 2019).

3. HIPÓTESIS

La exposición dietaria a glifosato en una concentración permitida por las entidades encargadas de regular el uso de plaguicidas causa un efecto en el estrés oxidativo del pez cebra (*Danio rerio*)

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

El objetivo de este estudio fue analizar el estrés oxidativo por efecto de la exposición dietaria a glifosato en una concentración permitida por las entidades encargadas de regular el uso de pesticidas, utilizando al pez cebra como modelo.

4.2 Objetivos Específicos

1. Llevar a cabo una exposición dietaria a glifosato del pez cebra (*Danio rerio*), en tres diferentes concentraciones 0, 100 y 1,000 $\mu\text{g/g}$ alimento/día, por un periodo de 21 días.
2. Determinar la actividad de la enzima superóxido dismutasa SOD en cerebro, músculo e hígado de pez cebra a las 16 horas, a los 7 días y a los 21 días de exposición.
3. Determinar la actividad de la enzima catalasa CAT en cerebro, músculo e hígado de pez cebra a las 16 horas, a los 7 días y a los 21 días de exposición.
3. Determinar la actividad de la enzima glutatión peroxidasa GPx en cerebro, músculo e hígado de pez cebra a las 16 horas, a los 7 días y a los 21 días de exposición.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se evaluó el efecto de la exposición dietaria a glifosato en el estrés oxidativo utilizando como organismo modelo al pez cebra (*Danio rerio*). La fase experimental de mantenimiento y alimentación de los peces, así como el muestreo y disección de estos se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán bajo la supervisión de la doctora Beatriz Yáñez Rivera y la estudiante de doctorado Beatriz Ibarra Mendoza. Peces cebra adultos fueron obtenidos de una tienda de peces; estos fueron mantenidos de acuerdo con la guía para peces cebra (Díaz-Martín et al., 2021); aclimatados por 7 días alimentándolos diariamente una cantidad proporcional al 1% de su peso corporal/día. Después del periodo de aclimatación los peces fueron sometidos a una exposición a glifosato a través de la dieta, utilizando tres concentraciones: control 0 µg/g de alimento, concentración baja (100 µg glifosato/g de alimento) y concentración alta (1000 µg de glifosato/g de alimento).

El efecto de la exposición a glifosato en el estrés oxidativo del pez cebra fue evaluado en el CIAD unidad Cuauhtémoc, a través de la medición de la actividad enzimática de las enzimas del estrés oxidativo superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Para este estudio se recibieron por parte del CIAD Mazatlán un total de tres tejidos de pez cebra (músculo, hígado y cerebro), con 4 unidades por cada nivel de glifosato (0, 100 y 1000 µg/g), las cuales se manejaron como 2 repeticiones con un pool de 2 unidades por repetición. Las muestras fueron tomadas a las 16 horas, a los 7 y a los 21.

5.1. Determinación de Concentraciones Experimentales

Las concentraciones de glifosato se determinaron mediante una revisión bibliográfica de residuos de este plaguicida en diferentes productos alimenticios (ver Figura 1). Además, se consideraron las dosis de referencia propuestas por entidades regulatorias internacionales: a) la autoridad europea de seguridad alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés) (0.5 mg/Kg de peso del individuo/día); b) reunión conjunta FAO/OMS sobre residuos de plaguicidas (JMPR por sus siglas en inglés) (1

mg/Kg de peso del individuo/día); y c) Agencia de protección del medio ambiente (EPA por sus siglas en inglés) (2 mg/Kg de peso del individuo/día). Con base en estos valores, se seleccionó la concentración de 1 mg/Kg de peso de pez cebrado/día (1 µg/g de pez) y una concentración 10 veces mayor (10 µg/g). Para conseguir esto se alimentó a cada pez cebrado con alimento equivalente a 1% de su peso/día conteniendo 100 µg de glifosato/g de alimento, esto significa que 100 g de peso de pez cebrado se alimentaron con 1 g de alimento/día, es decir, 100 g de pez se expusieron a través de la dieta a 100 µg de glifosato por día. De esta manera se obtuvo la concentración de 100 µg de glifosato/g de alimento por día (equivalente a 1 mg/Kg de peso de pez cebrado/día) y una concentración 10 veces más alta, 1,000 µg/g de alimento (equivalente a 10 mg/kg de peso de pez cebrado/día), para compararse con el control 0 µg/g de alimento.

5.2. Incorporación de Glifosato en la Dieta del pez cebrado (*Danio rerio*)

Se utilizó un lote único de alimento comercial Zeigler® para pez cebrado adulto compuesto por 55% de proteína cruda, 15% de grasa cruda, 1.5% de fibra cruda, 12% de cenizas y 12% de humedad. Los pellets de alimento se homogeneizaron mediante tamizado y pesaje para garantizar pellets con un peso de 0.0005 g ± 0.0001 g. A continuación, se pesaron 0.1 g de glifosato (ingrediente activo, Sigma Aldrich®) y se disolvieron en 100 ml de agua destilada, obteniendo así una solución madre de glifosato con una concentración de 1000 µg/ml. Posteriormente, se tomó una alícuota de 10 ml de esta solución y se aforó a 100 ml para obtener la segunda concentración de 100 µg/ml.

Para preparar los lotes de alimento adicionado con glifosato, se llevaron a cabo ciclos de aspersion homogénea y secado durante 24 horas, considerando una proporción de absorción de 1 ml de solución por gramo de alimento. Se prepararon dos lotes de alimento, cada uno con una concentración diferente de glifosato, estos se almacenaron en condiciones de oscuridad a -40 °C. Las concentraciones realistas de glifosato se determinaron mediante espectrometría de masas y cromatografía líquida en el Laboratorio de Plaguicidas de CIAD Unidad Culiacán, de acuerdo con el protocolo descrito por Moguso et al., 2015.

5.3. Mantenimiento y Selección de pez cebra

Se seleccionaron peces macho adultos de aproximadamente 6 meses de edad y un peso de 0.8 ± 0.2 g de una granja de peces ornamentales localizada en “El Quelite, Sinaloa”. Los peces se mantuvieron en recipientes de 9.5 L con agua de clorinada a 28 ± 0.5 °C y con aireación continua. Los organismos se alimentaron dos veces al día ad libitum con dieta comercial Zeigler® y se mantuvieron en un ciclo de fotoperíodo 14:10 h (luz: oscuridad). La purificación y los parámetros del agua se ajustaron siguiendo lo descrito por Lawrence (2011). Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos establecidos por el comité de ética de CIAD (CEI-CIAD, COBIOETICA-26-CEI-001-20200122).

5.4. Determinación del Escenario de Exposición

Se llevaron a cabo bioensayos preliminares para determinar una estrategia de alimentación que permitiera una ingesta homogénea de glifosato.

5.5. Estrategia “Pellet por Pellet”

Se pesaron individualmente organismos que posteriormente se colocaron en acuarios independientes de 2 L para un período de aclimatación, durante el cual se alimentaron dos veces al día de acuerdo con la dieta basal para pez cebra descrita por Navarro-Barrón et al., 2018. Una vez finalizado el período de aclimatación, se aplicó un enfoque de alimentación “pellet por pellet” durante 5 minutos, dos veces al día, para determinar la cantidad de alimento que cada organismo ingirió diariamente.

5.6. Estrategia “Porcentaje por Peso Corporal Promedio”

Se pesaron de forma grupal organismos (~20) para obtener el peso promedio por grupo. Posteriormente, los organismos fueron separados en tanques de 6 L, y después del período de aclimatación, se les ofreció alimento correspondiente al 1% del peso corporal promedio, dividido dos veces por día, durante 5 minutos. Al finalizar cada sesión de alimentación, se pesaron los pellets restantes para determinar la ingesta real diaria por tanque.

5.7. Exposición a Glifosato Vía Dietaria y Recolección de Muestras

Se seleccionaron organismos con un peso promedio de 0.6 g. Posteriormente, se realizó la aleatorización de la distribución de los organismos en tres tratamientos (0 µg/g, 100 µg/g y 1000 µg de glifosato/g de alimento), utilizando la función “RAND()” de Excel.

Los primeros organismos fueron alimentados como se mencionó anteriormente y después de 15 horas de exposición a los tres tratamientos, las primeras muestras fueron recolectadas y posteriormente los organismos se aclimataron durante 7 días y después continuó el período de exposición durante 21 días más. Durante este tiempo, los organismos fueron alimentados dos veces al día, durante 5 minutos, con dieta control o dieta adicionada con glifosato según el tratamiento correspondiente, al 1% de peso corporal por día. Al finalizar cada sesión de alimentación, el alimento restante fue sifoneado cuidadosamente y pesado para determinar la ingesta total diaria por unidad.

Los muestreos se realizaron semanalmente en los días 0, 7, 14, 21 del bioensayo. Se recolectaron aleatoriamente dos organismos por unidad experimental, los cuales fueron anestesiados con triclaína al 0.05% (E10521-10G Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate, Sigma Aldrich®) y decapitados. Se realizó la medición del peso y la longitud de cada organismo con una balanza analítica y un calibrador vernier, respectivamente. Posteriormente, se extirparon el cerebro, el hígado y el músculo para hacer las mediciones correspondientes.

5.8. Análisis de Actividad Enzimática

5.8.1. Obtención del Extracto Enzimático Crudo (EEC) del Pez Cebra

El extracto enzimático se realizó haciendo pools de dos cerebros, dos hígados o dos músculos de pez cebra, por repetición. Para la extracción de las enzimas se utilizó un buffer de fosfato de sodio 0.5 M el cual se preparó tomando un alícuota de 4.25 ml de fosfato de sodio monobásico 0.1 M y una alícuota de 45.75 ml de fosfato de sodio dibásico 0.1 M, ambas alícuotas se colocaron en un matraz de 100 ml aforando con agua destilada, por último, se ajustó el pH a 7.8 a una temperatura de 4 grados centígrados. La homogeneización se realizó utilizando 50mg de músculo por cada 500 µl de buffer de extracción, para el hígado se utilizaron 20.87 mg en 500 µl y para cerebro se utilizaron 26.81 mg en 500 µl agregando 25 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF por sus siglas en inglés) según indica Lushchak y col. (2005a) para la inhibición de las proteasas que pudieran degradar la proteína en el EEC, se colocaron estas proporciones en un Vaso Potter-Elvehjem y se trituró cada tejido utilizando un homogeneizador (Glas-Col de velocidad variable, reversible) durante 2 minutos, posteriormente se procedió a su centrifugación utilizando una centrifuga 5804 R, Eppendorf, a 20,600 g durante 10 minutos a una temperatura de 4 grados centígrados, recuperando el sobrenadante para ser utilizado en las mediciones de actividad enzimática.

5.8.2. Determinación de Proteína (Método de Bradford)

El método de Bradford es una técnica de cuantificación de proteína mediante la unión de un colorante (Azul de Coomassie G-250) a la proteína, contrastando con una curva de calibración realizada con el estándar de proteína (Albumina de suero bovino (BSA)). La metodología utilizada para la determinación de proteína fue de acuerdo al método de Bradford descrito por Lushchak y col., en 2005. Para la lectura de las muestras se colocaron 20 µl del EEC y 1ml del reactivo de

Bradford, se procedió a su agitación en vortex y a un posterior reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. La lectura se llevó a cabo a 595nm utilizando un espectrofotómetro modelo Thermo scientific, evolución 201 UV/Visible (E.U.A.).

5.8.3. Actividad de la Enzima Superóxido Dismutasa (SOD)

Para la medición de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se utilizó la metodología propuesta por Misra y cols., (1972), la cual está basada en la detección del radical superóxido, donde una unidad de SOD es definida como la cantidad de enzima que inhibe la velocidad de la oxidación de la epinefrina (adrenalina) en un 50%. Para realizar la medición se colocaron en celdas de cuarzo, alícuotas de concentraciones: 0, 10, 50 y 100 μ l de extracto enzimático en una dilución 1:20 para cada repetición, aforando a 1ml con de buffer de carbonato de sodio 50 mM (pH ajustado a 10 a una temperatura de 4 grados centígrados), 10 μ l de EDTA 0.1M y por último 0.1 ml de epinefrina (4.58 mg epinefrina a 10 ml de agua destilada pH 2). Posteriormente las muestras se llevaron a incubación durante 3 minutos a temperatura ambiente para luego medir la tasa de oxidación de la epinefrina a 406 nm durante 10 minutos con lecturas cada 10 segundos utilizando un espectrofotómetro modelo Thermo scientific, evolución 201 UV/Visible (E.U.A.).

Para el cálculo de la actividad de SOD se determina el porcentaje de inhibición de la oxidación de epinefrina obtenido con cada una de las alícuotas de EEC utilizadas (0, 10, 50 y 100 μ l), posteriormente se grafican los porcentajes de inhibición en función del volumen utilizado de EEC y se obtiene una ecuación de regresión que se emplea para calcular el volumen de EEC necesario para inhibir la oxidación de epinefrina en un 50%, el cual será equivalente a una Unidad de SOD. Tomando en cuenta la cantidad de tejido utilizado y la cantidad de proteína en este tejido se obtienen las unidades de SOD por cada miligramo de proteína.

5.8.4. Actividad de la Enzima Catalasa (CAT)

La determinación de la actividad de la enzima catalasa se realizó mediante la técnica propuesta por Samanta y cols. (2014). En una celda de cuarzo se colocaron 1.98 ml de buffer de fosfato de sodio 50 mM (pH 7.0), 1 ml de peróxido de hidrogeno 30 mM y 20 μ l de extracto enzimático EEC, enseguida se determinó el cambio de absorbancia a 240nm cada 5 segundos durante 5 minutos, utilizando un espectrofotómetro modelo Thermo scientific, evolución 201 UV/Visible (E.U.A.). el cambio de absorbancia indica la velocidad de desaparición del H_2O_2 . Los cálculos se realizaron dividiendo la pendiente (absorbancia/min) entre el coeficiente de extinción de $43.6 M^{-1}$, convirtiendo los mililitros de EEC en miligramos de proteína y expresando los resultados como μ moles/min mg proteína.

5.8.5. Actividad de la enzima Glutación Peroxidasa (GPx)

El fundamento sobre el que se basa el cálculo de la actividad de GPx es la medición de la oxidación de NADPH por la reacción del glutati3n reductasa (GR) a 340nm en un espectrofotómetro (Flohé and Günzler, 1984, Blahová et al., 2013). Para ello se procedió de acuerdo al ensayo de Sigma Aldrich (EC 1.11.1.9) (Sigma-Aldrich, 2020) el cual consta de los siguientes reactivos: buffer de fosfato de sodio 50mM con 0.4mM EDTA (pH 7 a 25°C, reactivo A), azida de sodio 1 mM preparada en el reactivo A (reactivo B), Fosfato dinucleótido de β -nicotinamida y adenina, 1 mg en un tubo de 15 ml (NADPH, reactivo C), glutati3n reductasa, 100 unidades/ml (reactivo D), glutati3n reducido (GSH), 200 mM (reactivo E), búfer de fosfato de sodio 10 mM con ditioneitol (DTT), 1 mM, pH 7 (reactivo F), extracto enzimático crudo (reactivo G), y peróxido de hidrogeno al 0.042% (reactivo H). Se preparó un coctel de reacción con 9.2 ml del reactivo B, 0.1 ml del reactivo D y 0.05 ml del reactivo E, se ajustó el pH a 7 a 25 grados centígrados. En una celda de cuarzo se agregaron 3 ml del coctel de reacción, 0.05ml del reactivo G (EEC), se mezclaron por inversión y observando el cambio de absorbancia a 340 nm hasta ser constante, agregando enseguida 0.05ml del reactivo H, mezclando inmediatamente por inversión de la celda y anotando

el cambio de absorbancia durante 5 minutos. De forma similar se corrió un blanco con 0.05 ml del reactivo F. Para el cálculo de la actividad e GPx se utilizó la ecuación indicada más adelante, en donde 2 son los μmol de GSH producidos por 1 μmol de NADPH oxidado, 3.1 es el volumen total del ensayo. 6.22 el coeficiente de extinción (milimolar) de NADPH a 340 nm y 0.05 volumen en mililitros de enzima o extracto enzimático utilizado.

$$\frac{\text{unidades}}{\text{ml enzima}} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{340\text{nm}}}{\text{min test}} - \frac{\Delta A_{340\text{nm}}}{\text{min blanco}}\right)(2)(3.1)(\text{factor de dilucion})}{(6.22)(0.05)} \quad (1)$$

5.9. Análisis Estadístico

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar (D.E.) ($n = 2$), los cuales fueron analizados mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA), seguido por la prueba de Duncan. Se realizó la prueba de Duncan para comparar la homogeneidad de las varianzas entre los grupos. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si $P < 0.08$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico IBM SPSS versión 27.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el presente estudio se utiliza al pez cebra como modelo para determinar el efecto en el estrés oxidativo de una exposición dietaria a glifosato. Se alimentó al pez cebra con fórmula balanceada conteniendo glifosato (ingrediente activo, Sigma Aldrich®) en tres concentraciones, 0 $\mu\text{g/g}$ (control), 100 $\mu\text{g/g}$ y 1000 $\mu\text{g/g}$ de alimento. Diariamente se alimentó al pez cebra con una cantidad de alimento equivalente al 1% de su peso. La exposición a glifosato a través de la alimentación se llevó a cabo por 21 días. Se evaluó el efecto de esta alimentación en el estrés oxidativo del pez cebra, a través de la medición de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), principales enzimas para la desintoxicación de especies reactivas al oxígeno (Slaninova et al., 2009) ya que constituyen la primera defensa celular contra las especies reactivas al oxígeno (ROS), neutralizando de manera activa los ROS generados durante el metabolismo celular (Velasques et al., 2016a). Estas enzimas fueron analizadas en el cerebro, el hígado y el músculo del pez, a las 16 horas de iniciado el tratamiento, a los 7 días y a los 21 días (la enzima CAT en hígado solo pudo ser analizada a las 16 horas, debido a que no se contó con suficiente muestra). Para determinar la actividad de la enzima SOD en U/mg proteína, CAT y GPx en los resultados se presentan en unidades por gramo de tejido en los Cuadros 10, 11, 12. Dado que los resultados son presentados generalmente para la enzima SOD en U/mg de proteína, para la enzima CAT en nmol/min mg proteína y para la enzima GPx en nmol/min mg proteína. Se llevó a cabo la determinación de proteína. Los resultados de proteína se muestran en el Cuadro 9, donde se puede observar que el hígado presenta la cantidad más alta de proteína, seguido por el cerebro y al final el músculo. El Cuadro 9 muestra como la cantidad de proteína en hígado en cada tratamiento, incrementa conforme avanza el tiempo de estudio. El efecto es menos pronunciado a mayor exposición al glifosato. La proteína en hígado control incrementó en un 60.5% mientras que en el tratamiento 100 $\mu\text{g/g}$ alimento el incremento fue de 38% mientras que en el tratamiento de exposición más alta el incremento fue de 6.8% (Cuadro 9).

Cuadro 9. Concentración de proteína soluble (mg/g peso fresco) en cerebro, músculo e hígado de pez cebra expuesto a glifosato a través del alimento.

Órgano	Glifosato µg/kg	Tiempo de alimentación (días)		
		0.7	7	21
Cerebro	0	23.1	24.5	27.9
	100	30.0	14.8	23.8
	1000	26.8	22.6	20.9
Músculo	0	6.0	6.7	6.3
	100	7.2	6.0	9.1
	1000	7.1	7.9	7.9
Hígado	0	124.0	176.2	199.0
	100	132.2	160.5	209.2
	1000	168.7	177.4	180.2

6.1. Actividad de la Enzima Superóxido Dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa SOD es la primera enzima desintoxicante y el antioxidante más poderoso de la célula. Es una importante enzima antioxidante endógena que actúa como componente del sistema de defensa de primera línea contra las especies reactivas de oxígeno (ROS). Cataliza la dismutación de dos moléculas de anión superóxido ($^{\bullet}\text{O}_2$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2), lo que hace que el anión superóxido, potencialmente dañino, sea menos peligroso (Ighodaro and Akinloye, 2018a).

El Cuadro 10 muestra los resultados de la actividad de la enzima SOD en unidades por gramo de tejido, en cerebro, músculo e hígado. Los valores obtenidos se encuentran dentro de la misma magnitud a los reportados por Lushchak y cols. (2005a) en hígado y músculo de pez dorado expuesto a hiperoxia. En el presente trabajo, el hígado fue el órgano con mayor actividad de SOD de los tres tejidos, seguido del cerebro y el músculo. Esto no se observa en cuando la actividad enzimática está dada tomando en cuenta la proteína (Figuras 7 a 9), dado que el hígado es el órgano que presentó mayor concentración de proteína (Cuadro 9). Lushchak y cols., en 2009, estudiaron la actividad de la enzima SOD en pez dorado por efecto de la exposición a glifosato (Lushchak et al., 2009) encontrando una actividad 5.4 veces mayor en hígado con respecto a cerebro; Lushchak y cols., 2005 estudiaron SOD en pez dorado con exposición a hiperoxia, encontrando que la enzima presentó valores de 16 veces mayores en hígado que en músculo. En el presente trabajo se llegaron

a observar valores de SOD en hígado hasta 8 veces mayores en comparación con el músculo (control al día 21; Cuadro 10) y 4 veces mayores en comparación con el cerebro (control y 100 $\mu\text{g/g}$ alimento al día 21).

Cuadro 10. Actividad de la enzima SOD (U/g de tejido fresco) a los 0.7, 7 y 21 días de exposición a glifosato a través de la alimentación; pendiente y coeficiente de correlación.

Órgano	Glifosato $\mu\text{g/g}$ alimento	Tiempo de alimentación (días)			Pendiente	R
		0.7	7	21		
Cerebro	0	6201.9	5846.7	5299.8	-44	0.99
	100	5072.3	7050.6	4483.4	-57	0.43
	1000	5227.8	4382.1	5103.8	4	0.09
Músculo	0	2210.2	1572.4	2739.1	37	0.64
	100	2043.7	3398.6	3436.4	58	0.75
	1000	1385.5	3412.5	2877.0	55	0.53
Hígado	0	8651.7	8787.7	22663.9	752	0.96
	100	14343.8	10685.3	18726.4	282	0.72
	1000	9528.9	10041.3	12996.6	180	0.99

Los resultados de la actividad de la enzima SOD, en U/g de tejido (Cuadro 10), en el tratamiento control (0 $\mu\text{g/g}$ tejido), en los órganos cerebro e hígado muestran pendientes con un coeficiente de correlación cercano a 1. Lo que indica que el comportamiento de la enzima SOD del pez cebra sin exposición a glifosato es lineal en el tiempo. Las pendientes de SOD en hígado presentan los más altos valores, además de un alto coeficiente de correlación (0.96, 0.72 y 0.99 para control, 100 y 1,000 $\mu\text{g/g}$ alimento) en comparación con músculo y cerebro; sin embargo, la pendiente va disminuyendo conforme incrementa la concentración de glifosato (752, 282 y 180 para control, 100 y 1,000 $\mu\text{g/g}$ alimento), (Cuadro 10). Este decremento en la pendiente podría indicar que la exposición dietaria a glifosato suprime la actividad de la SOD, el cual es más pronunciado a mayor concentración de glifosato; 62% y 76% de disminución en SOD para 100 y 1,000 $\mu\text{g/g}$ alimento, respectivamente. De acuerdo con Lushchak y cols. (2009), la exposición a Roundup, cuyo ingrediente activo es el glifosato, suprimió la actividad de la superóxido dismutasa en un 58-67% en hígado de pez dorado (96 h de exposición 2.5-20 mg/L agua ambiental).

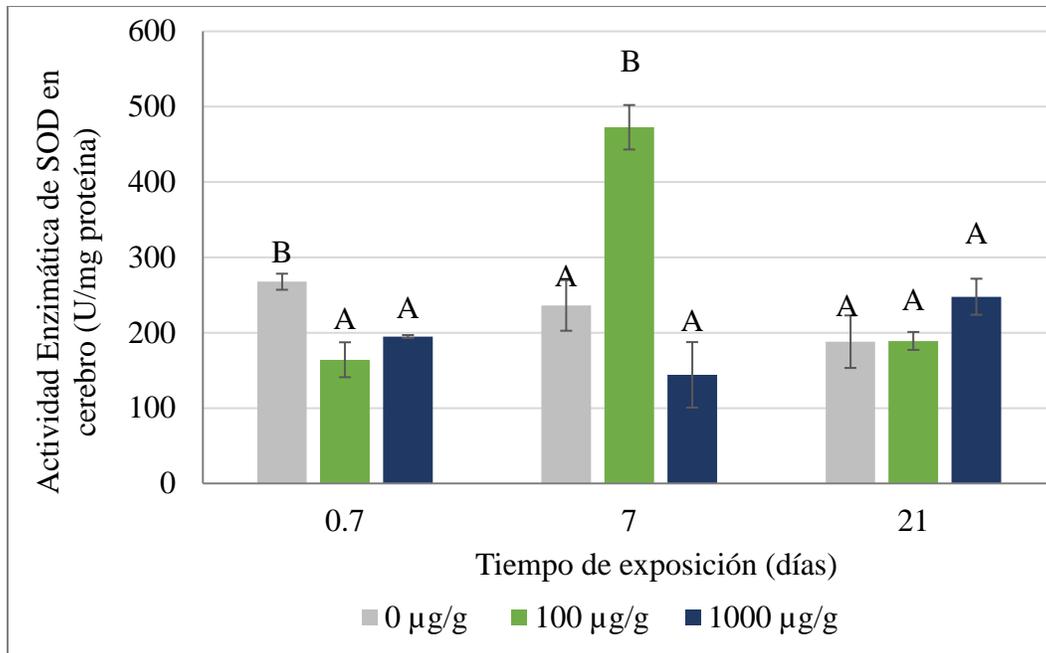


Figura 7. Actividad de la enzima SOD en cerebro de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días. Los resultados representan la media de dos repeticiones \pm SD. Diferentes letras entre tratamientos indican diferencia significativa, para cada tiempo evaluado ($p \leq 0.08$).

La Figura 7 muestra la actividad de la enzima superóxido dismutasa en cerebro, en U/mg de proteína. Se puede observar que el cerebro muestra un considerable incremento en la actividad de SOD en exposición dietaria de 100µg/g al día 7 del estudio, 150% mayor que el tratamiento con exposición alta a glifosato, 1,000µg/g de alimento. Esto sugiere un incremento en el estrés oxidativo en el cerebro del pez cebra a 100µg/g al día y una posible inhibición de la actividad de SOD al día 7 en una concentración 10 veces más alta de glifosato (no observándose diferencia significativa entre este tratamiento y el control). Es interesante observar que para el día 21 de exposición dietaria a glifosato, 100µg/g ya no mostró incremento en la actividad de SOD, mostrando valores estadísticamente semejantes a 1,000µg/g y al control, lo que nuevamente sugiere una inhibición de SOD en los tratamientos con exposición a glifosato 100µg/g y 1,000µg/g al final de la exposición. Algunos autores reportan la inhibición de SOD por exposición al glifosato indicando que esta inhibición incrementa a medida que incrementa el tiempo de exposición y/o la concentración (El-Shenawy, 2009, Modesto and Martinez, 2010, Sinhörin et al., 2014, Bali et al., 2019). De acuerdo con Modesto y cols. (2010), un exceso del producto de la enzima SOD, peróxido de hidrógeno, podría estar causando la reducción de la actividad de SOD. Sinhörin y cols. (2009)

atribuyen la inhibición de SOD por exposición a glifosato a un incremento en H_2O_2 y a un incremento en la proteína carbonilo que es responsable de cambiar la proteína y reducir la actividad de las enzimas. Bali y cols. (2019) encontraron una reducción significativa en la actividad de SOD en el cerebro de ratones con exposición dietaria (en agua ingerida) en concentraciones de 250 $\mu\text{g/g}$ y 500 $\mu\text{g/g}$ de peso del ratón por día, en ratones expuestos por un periodo de 6 (sub crónico) o 12 semanas (crónico), exposiciones en proporciones 25 a 500 veces mayor 250 y 500 $\mu\text{g/g}$ de peso del ratón/día vs ~ 1 y ~ 10 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal/día (100 y 1,000 $\mu\text{g/g}$ de alimento); y un periodo de exposición superior, 6 y 12 semanas vs 3 semanas. Efecto que fue más marcado a mayor concentración de glifosato y a mayor tiempo de exposición. Estos tratamientos mostraron disminuir la actividad de la acetil colin esterasa AChE, afectar al proceso de memoria y reconocimiento de los ratones, así como a la memoria de corto y largo plazo (Bali et al., 2019). Sinhodin y cols. (2014) encontraron una disminución en la actividad de SOD en cerebro de pez surubí con exposición aguda a glifosato a través del agua ambiental en concentraciones de 2.25, 4.5, 7.5 y 15 mg/L por 96 h; la disminución de la actividad de SOD con respecto al control fue de 29.7, 30 y 27.8%, respectivamente.

La Figura 8 muestra la actividad de la enzima superóxido dismutasa en músculo, en U/mg de proteína. Se puede observar al tiempo 7 un incremento estadísticamente significativo ($P \leq 0.08$) en la actividad de SOD en el músculo de pez cebra por exposición a glifosato, en ambas concentraciones, 100 $\mu\text{g/g}$ alimento (equivalente a 1mg/Kg de peso de pez cebra/día) y 1,000 $\mu\text{g/g}$ de alimento; dos semanas después, al día 21 del estudio, estos valores disminuyeron, no mostrando diferencia significativa con el control, sugiriendo una inhibición de la enzima SOD al final del tratamiento, (Figura 8). En pez cebra entero expuesto a concentraciones subcrónicas de atrazina (pesticida ampliamente usado a nivel mundial) 0.3, 3, 30, 60 o 90 $\mu\text{g/L}$ por 28 días, mostró mayor actividad de SOD en la concentración de 30 $\mu\text{g/L}$, mientras que en la concentración superior, 90 $\mu\text{g/L}$, la actividad de SOD fue inhibida, los autores concluyeron que la exposición a 90 $\mu\text{g/L}$ de atrazina causó una regulación negativa del sistema de defensa antioxidante (Blahová et al., 2013). Sinhodin y cols. (2014) encontraron un incremento en TBARS (especies reactivas al ácido tiobarbitúrico) en músculo de pez surubí con exposición aguda a glifosato a través del agua ambiental. De acuerdo con Slaninova y cols. (2009), el músculo es un órgano más sensible al estrés oxidativo, con un sistema antioxidante más deficiente, en comparación con el hígado. Esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo ya que mientras SOD incrementó al

día 7 en el músculo de los peces expuestos a glifosato, en hígado no se observaron diferencias significativas entre tratamientos a ningún tiempo evaluado (Figura 9).

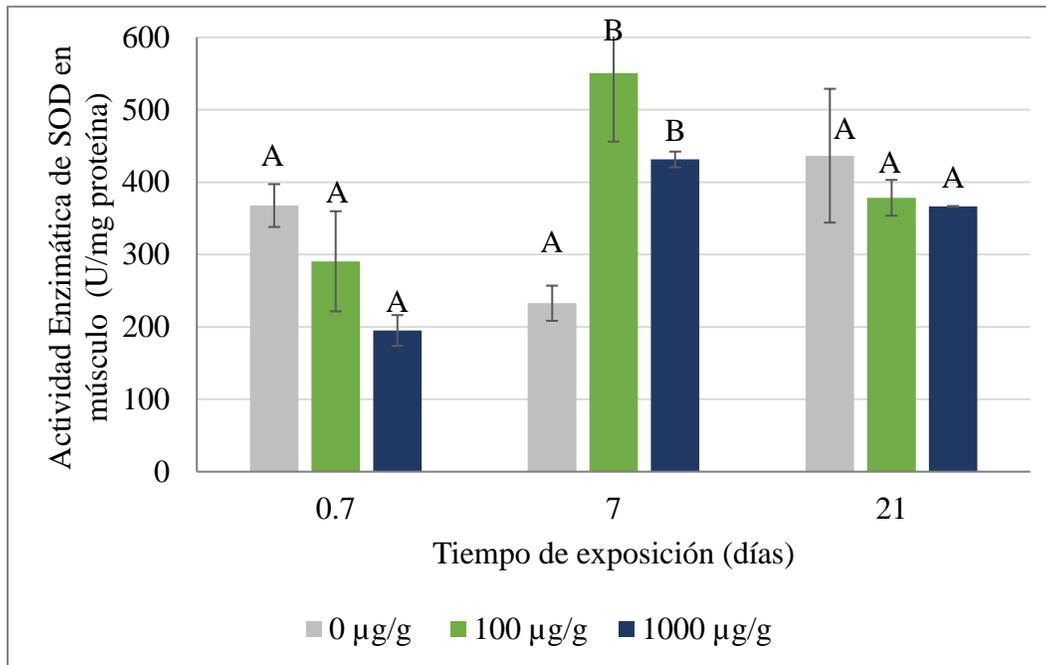


Figura 8. Actividad de la enzima SOD en músculo de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días. Los resultados representan la media de dos repeticiones \pm SD. Diferentes letras entre tratamientos indican diferencia significativa, para cada tiempo evaluado ($p \leq 0.08$).

La Figura 9 muestra la actividad de la enzima superóxido dismutasa en hígado, en U/mg de proteína. La absorción de glifosato vía oral es relativamente alta; en ratas se ha observado una vida media de absorción de glifosato de 2.29 h y una vida media de eliminación de 14.38 h (Anadón et al., 2009). Al mostrar una lenta eliminación, el glifosato puede distribuirse a todos los tejidos causando daño (Wang et al., 2022). A las 16 horas de iniciado el experimento, se observa un incremento en la actividad de SOD en la concentración de 100µg/g, mientras que la concentración de 1,000µg/g fue ligeramente inferior al control; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos al día 7 ni al final del experimento, día 21. Menezes y cols. (2011) evaluaron el efecto de la exposición ambiental en agua, de Roundup en concentraciones de 0.45 y 0.95mg/L en pez bagre negro, encontrando en hígado un incremento en TBARS (especies reactivas al ácido

tiobarbitúrico), pero no encontrando incremento en la actividad de SOD. Esto indica que a pesar de que la exposición a Roundup si causó estrés oxidativo (incremento en TBARS), la actividad de SOD no incrementa; los autores sugieren que el glifosato genera una toxicidad que impide la acción de SOD (de Menezes et al., 2011).

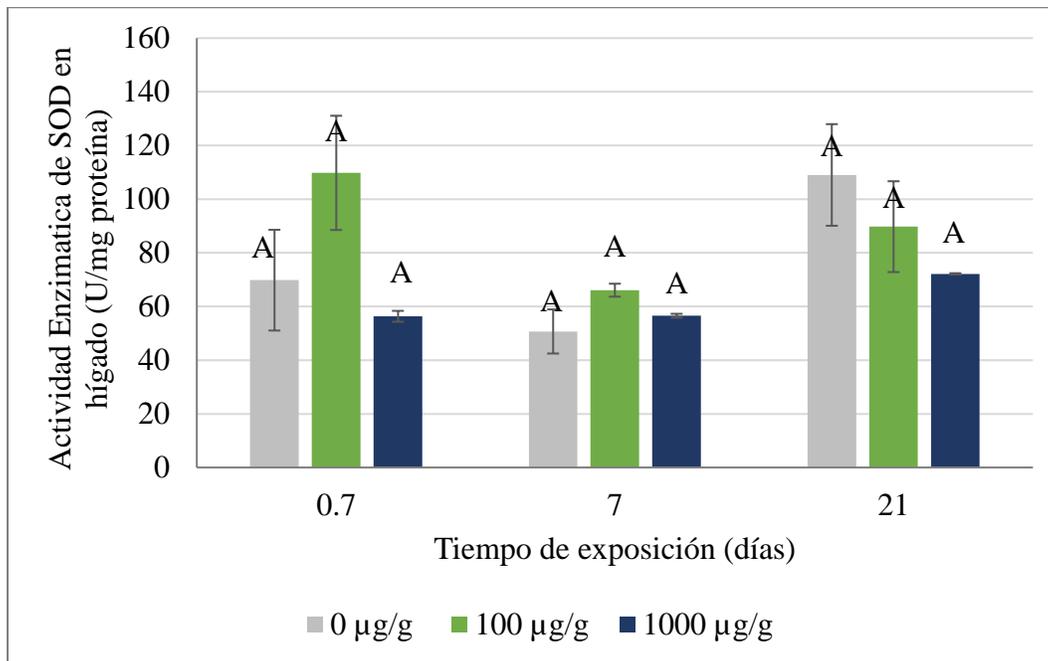


Figura 9. Actividad de la enzima SOD en hígado de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días. Los resultados representan la media de dos repeticiones \pm SD. Diferentes letras entre tratamientos indican diferencia significativa, para cada tiempo evaluado ($p \leq 0.08$).

Al final del experimento, día 21, la actividad de SOD en 100 $\mu\text{g/g}$ y en 1,000 $\mu\text{g/g}$ peso de alimento disminuyó en un 17.6% y un 33.8% con respecto al control. El hígado es un órgano que puede presentar una mayor concentración de ROS por la exposición a glifosato, y esta gran cantidad de ROS podría estar causando la inhibición de la actividad de la SOD en el presente estudio. Sinhorin y cols. (2014) encontraron una disminución en la actividad de SOD en hígado de pez surubí con exposición aguda a glifosato a través del agua ambiental en concentraciones de 2.25, 4.5, 7.5 y 15 mg/L por 96 h. Dos Santos y cols. (2018) aplicaron exposiciones subletales de glifosato (0.75mg/L) y encontraron que la actividad de SOD en el hígado de pez pintado de Amazonas decrementaba en un 22.6% en comparación con el control, mientras a su vez la carbonilación de la proteína

(alteración del metabolismo normal de la proteína causado por la acumulación de moléculas dañadas por el estrés oxidativo) incrementaba. Ellos sugieren que la disminución en la actividad de SOD en hígado, por exposición a glifosato es causado por un exceso de sustancias oxidantes, es decir, la actividad de la enzima SOD se pierda a mayor cantidad de ROS. Modesto y cols. (2010) también observaron una disminución en la actividad de SOD a 6 h de exposición a la mayor concentración de glifosato estudiada, sugiriendo que esto puede estar relacionado con la producción de sustancias oxidantes. Es decir, un exceso de peróxido de hidrógeno puede reducir la actividad de SOD.

6.2. Actividad de la Enzima Catalasa (CAT)

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2). Esta reacción es crucial para proteger las células contra el daño causado por el peróxido de hidrógeno, que es un subproducto tóxico del metabolismo celular y puede generar especies reactivas de oxígeno. Esta enzima se encuentra principalmente en los peroxisomas de las células (Ighodaro and Akinloye, 2018a).

El sistema SOD-CAT es considerado la primera línea de defensa en contra de la toxicidad del oxígeno, inhibiendo la formación de oxirradicales; por lo que estas enzimas han sido usadas como biomarcadores de la producción de ROS (Pandey et al., 2003).

El presente estudio analizó la actividad de la enzima CAT en pez cebra, como efecto de la exposición de glifosato a través de la dieta. Los resultados muestran que, para CAT la mayor actividad enzimática (en unidades por gramo de tejido) se encuentra en el hígado (Cuadro 11). Para la enzima CAT el segundo órgano con mayor actividad enzimática, fue el músculo. Esto no se observa en cuando la actividad enzimática está dada tomando en cuenta la proteína (Figura 10, Figura 11 y Figura 12), dado que el hígado es el órgano que presentó mayor concentración de proteína (Cuadro 9). Lushchak y cols. (2005), estudiaron CAT en pez dorado con exposición a hiperoxia, encontrando que el hígado es el tejido con mayor actividad enzimática, seguido del riñón, cerebro y musculo (Lushchak et al., 2005a). Lushchak y cols., en 2009, estudiaron la actividad de la enzima y CAT en pez dorado por efecto de la exposición a glifosato (Lushchak et

al., 2009) encontraron una actividad de CAT 11.7 veces mayor en hígado en comparación con cerebro. Lushchak y cols. (2005) encontraron valores de CAT en hígado 48 veces mayores que en cerebro y 64 veces mayores que en el músculo. En el presente trabajo se encontraron valores de CAT hasta 7 veces mayores en comparación con el cerebro (100 µg/g alimento a las 16 horas; Cuadro 11), y hasta 3 veces mayores en comparación con el músculo (100 µg/g alimento a las 16 horas; Cuadro 11).

Cuadro 11. Actividad de la enzima CAT (U/g de tejido) a los 0.7, 7 y 21 días de exposición a glifosato a través de la alimentación; pendiente y coeficiente de correlación.

Órgano	Glifosato µg/kg	Tiempo de alimentación (días)			Pendiente	R
		0.7	7	21		
Cerebro	0	179.7	232.0	217.9	1.40	0.29
	100	128.8	326.9	184.4	0.60	0.00
	1000	216.8	198.2	87.3	-6.62	0.97
Músculo	0	358.1	236.1	216.1	-6.07	0.67
	100	303.8	170.6	235.7	-2.03	0.10
	1000	331.9	206.6	264.6	-2.08	0.12
Hígado	0	425.7	462.7	-	-	-
	100	893.2	-	-	-	-
	1000	558.1	-	-	-	-

El cuadro 11 muestra la actividad de la enzima catalasa en cerebro, en µmoles/min mg proteína. Se observa al día 7 del experimento un incremento considerable en la actividad de SOD ($P \leq 0.08$), de 129% en comparación con el control en el tratamiento con exposición baja a glifosato, ~1 mg/Kg (100 µg/g de alimento), concentración sugerida como dosis máxima segura en la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas, y menor que la sugerida por la EPA (2mg/Kg); sin embargo, el tratamiento con exposición 10 veces superior, 1,000µg/g alimento, no mostró incremento y se comportó estadísticamente similar al control. Esto sugiere la presencia de oxidantes que podrían conducir a la inactivación de la actividad enzimática. De acuerdo con Modesto y cols. (2010), un exceso de peróxido de hidrógeno es responsable de la reducción de la actividad de SOD, y una disminución en la actividad de CAT puede ser debida a iones superóxido que podrían no estar siendo neutralizados eficientemente por SOD. Esto puede ser confirmado por el hecho de que la actividad de SOD también tuvo el mismo comportamiento, una inhibición en cerebro al tiempo 7 en la exposición a glifosato más alta (Figura 10). Sinhörin y cols. (2014)

encontraron una disminución en la actividad de CAT en hígado de pez surubí con exposición aguda a glifosato a través del agua ambiental en concentraciones de 4.5, 7.5 y 15 mg/L por 96 h en comparación con el control (68.4, 55.8 y 65%, respectivamente).

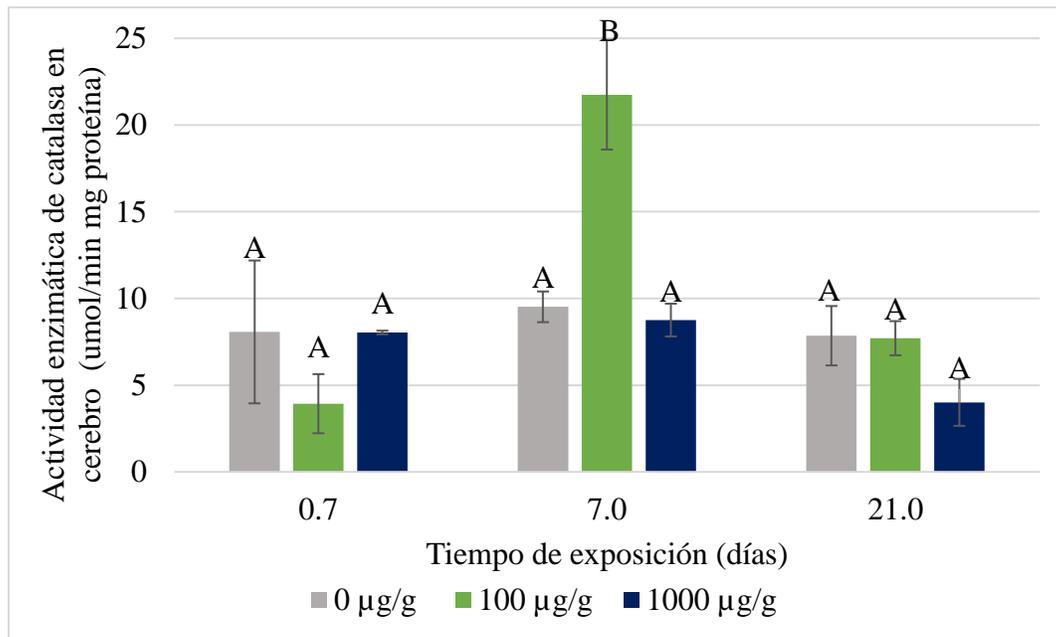


Figura 10. Actividad de la enzima CAT ($\mu\text{moles}/\text{min mg prote\u00edna}$) en cerebro de pez cebra con exposici\u00f3n dietaria a glifosato por 21 d\u00edas. Los resultados representan la media de dos repeticiones \pm SD. Diferentes letras entre tratamientos indican diferencia significativa, para cada tiempo evaluado ($p \leq 0.08$).

La Figura 11 muestra la actividad de la enzima catalasa en m\u00fasculo, en $\mu\text{moles}/\text{min mg prote\u00edna}$. Escasos estudios fueron encontrados en relaci\u00f3n con el efecto de la exposici\u00f3n a glifosato la actividad de CAT en el m\u00fasculo del pez cebra u otro organismo. En pez cebra entero, expuesto a atrazina en concentraciones subcr\u00f3nicas de 0.3, 3, 30, 60 o 90 $\mu\text{g/L}$ por 28 d\u00edas, Blahova y cols. (2013) observaron una inhibici\u00f3n significativa en la actividad de CAT en todos los grupos experimentales en comparaci\u00f3n con el grupo de control. Los autores sugieren que la disminuci\u00f3n de la actividad de CAT refleja una falla del sistema antioxidante del pescado despu\u00e9s de la exposici\u00f3n a la atrazina. En el presente trabajo se observan diferencias significativas entre los tratamientos con exposici\u00f3n a glifosato y el tratamiento control. A las 16 horas de exposici\u00f3n a glifosato los valores de CAT en m\u00fasculo fueron menores en un porcentaje de 30% y 21%

respectivamente para 100 y 1,000 $\mu\text{g/g}$ alimento, sin embargo, esta diferencia no fue significativa. Al día 7 y al día 21 tampoco se observaron diferencias significativas entre la actividad de CAT en músculo de peces expuestos a glifosato y el control ($p \leq 0.08$).

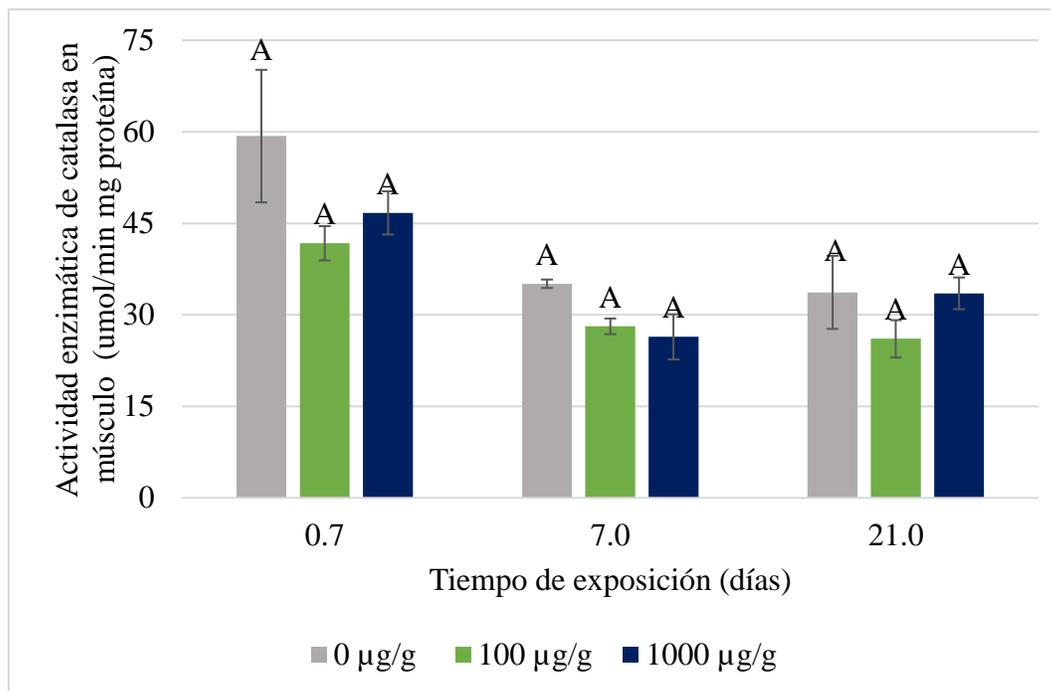


Figura 11. Actividad de la enzima CAT ($\mu\text{moles}/\text{min mg proteína}$) en músculo de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días. Los resultados representan la media de dos repeticiones \pm SD. Diferentes letras entre tratamientos indican diferencia significativa, para cada tiempo evaluado ($p \leq 0.08$).

La Figura 12 muestra la actividad de la enzima catalasa en hígado, en $\mu\text{moles}/\text{min mg proteína}$. Se puede observar que a las 16 horas de exposición dietaria a glifosato, hay un incremento en CAT en el tratamiento con exposición baja a glifosato ($100\mu\text{g}$ de alimento) en comparación con el control (109%), sin embargo, la concentración alta de exposición ($1,000\mu\text{g/g}$ alimento) presenta valores estadísticamente semejantes al control, lo que sugiere que esta concentración de glifosato pudiera estar causando una inhibición de la actividad de CAT, debido a un exceso de ROS. Turkmen y cols. (2019) indican que el glifosato causa daño oxidativo inhibiendo la actividad de las enzimas antioxidantes. Burella y cols. (2018) sugieren que la inhibición de CAT es debido al exceso de ROS por exposición a una alta concentración de glifosato. De acuerdo con Modesto y cols. (2010) encontraron resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo, la actividad hepática de

CAT se redujo después de 6 horas de exposición a Roundup Transorb del pez *Prochilodus lineatus* en una concentración de 5mg/L agua ambiental y después de 24 horas ya no solo en la concentración 5mg/L sino también en la concentración baja, 1 mg/L. Se sabe que existe una compleja vía de interacción entre las enzimas implicadas en el sistema antioxidante del animal y que la actividad de una enzima influye en la actividad de otras enzimas, igualmente el sustrato o producto de algunas de las enzimas antioxidantes también puede influir en la actividad de otras (Modesto and Martinez, 2010); es decir, las enzimas pueden ser inactivadas por un exceso de sustancias oxidantes, por un exceso de sustrato o de producto de éstas (Modesto and Martinez, 2010).

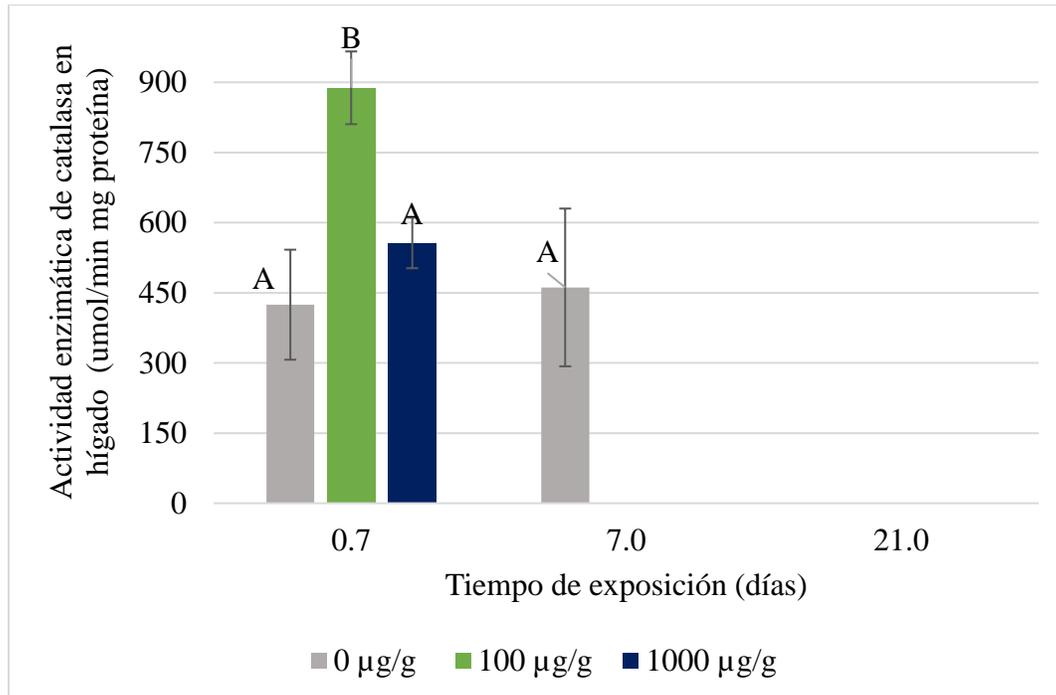


Figura 12. Actividad de la enzima CAT ($\mu\text{mol}/\text{min mg proteína}$) en hígado de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días. Los resultados representan la media de dos repeticiones \pm SD. Diferentes letras entre tratamientos indican diferencia significativa, para cada tiempo evaluado ($p \leq 0.08$).

Dos Santos y cols. (2018) aplicaron exposiciones subletales de glifosato (0.75mg/L) y encontraron que la actividad de CAT en el hígado de pez pintado de Amazonas era similar al control. Ellos concluyeron que el aumento en la actividad de CAT es una respuesta frente a la producción de

ROS, sin embargo, altos niveles de sustancias oxidantes pueden provocar un de este mecanismo compensatorio (dos Santos Teixeira et al., 2018). Sinhoin y cols. (2014) encontraron una disminución en la actividad de CAT en hígado de pez surubí con exposición aguda a glifosato a través del agua ambiental en concentraciones de 4.5, 7.5 y 15 mg/L por 96 h en comparación con el control (32, 36.9 y 36.3%, respectivamente) en comparación con el control. De igual manera Murussi y cols. (2016) encontraron una disminución en la actividad de CAT en hígado en pez bagre expuesto a glifosato en concentraciones de 2.5 y 5 mg/L por 96 h.

6.3. Actividad de la Enzima Glutación Peroxidasa (GPx)

La enzima glutatión peroxidasa GPx cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos utilizando glutatión reducido (GSH) como cofactor. Está involucrada en la protección celular contra el estrés oxidativo al eliminar peróxidos dañinos, además de H₂O₂, algunas formas de glutatión peroxidasa pueden descomponer otros peróxidos, como los lípidos peroxidados (Ighodaro and Akinloye, 2018b). GPx tiene un rango más amplio de acción que la CAT, ya que no solamente actúa sobre el peróxido de hidrogeno sino también sobre otros tipos de hidroperóxidos, como los lipoperóxidos (Sarıkaya et al., 2020).

En términos generales durante la experimentación la tendencia de GPx fue a inhibir su actividad en los organismos expuestos a glifosato con respecto al control, más sin embargo en el caso del cerebro al final de la experimentación, es decir a los 21 días.

El presente estudio analizó la actividad de la enzima GPx en pez cebrá, como efecto de la exposición de glifosato a través de la dieta. Cuando existe estrés oxidativo en el organismo, hay por consecuencia efecto en la actividad de las enzimas antioxidantes en los diferentes órganos (Slaninova et al., 2009). Los resultados de GPx en unidades por gramo de tejido muestran la mayor actividad enzimática en el hígado (Cuadro 12). Lushchak y cols. (2005), estudiaron GPx en pez dorado con exposición a hiperoxia, encontrando que el hígado es el tejido con mayor actividad enzimática, seguido del riñón, cerebro y musculo (Lushchak et al., 2005a). Lushchak y cols. (2005) encontraron valores de GPx en hígado 32 veces más altos en comparación con cerebro; en el presente trabajo se encontraron valores de GPx en hígado hasta 12 veces más altos que en cerebro

(1000 µg/g alimento al día 21; Cuadro 12), y hasta 17 veces más alto que en músculo (1000 µg/g alimento a las 16 horas).

Cuadro 12. Actividad de la enzima GPx (U/g de tejido) a los 0,7, 7 y 21 días de exposición a glifosato a través de la alimentación; pendiente y coeficiente de correlación.

Órgano	Glifosato µg/kg	Tiempo de alimentación (días)			Pendiente	R
		0.7	7	21		
Cerebro	0	0.86	1.00	1.26	0.02	1.00
	100	0.94	0.57	0.86	0.00	0.00
	1000	1.03	1.16	0.70	-0.02	0.69
Músculo	0	0.74	0.60	0.68	0.00	0.06
	100	1.49	0.39	0.62	-0.03	0.35
	1000	0.46	0.63	0.76	0.01	0.92
Hígado	0	6.28	6.96	8.46	0.11	1.00
	100	5.77	4.83	9.61	0.21	0.77
	1000	7.78	6.66	8.26	0.04	0.24

Los resultados de la actividad de la enzima GPx, presentados en U/g de tejido (Cuadro 12), en el tratamiento sin glifosato (0 µg/g tejido), en los órganos cerebro e hígado muestran pendientes con un coeficiente de correlación cercano a 1. Lo que sugiere que el comportamiento de las enzimas SOD y GPx del pez cebra control, sin exposición a glifosato, es lineal en el tiempo.

La Figura 13 muestra la actividad de la enzima catalasa en cerebro, en nmoles/min mg proteína. A 16 horas de iniciado el experimento, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p \leq 0.08$); a los 7 días de exposición a glifosato se observa un incremento en la actividad de GPx en el tratamiento con la concentración más alta, 1,000 µg/g alimento día (24% en comparación al control), la diferencia no fue significativa. Beuret y cols. (2005) encontraron un incremento en GPx en fetos de ratas expuestas a glifosato mientras que el hígado de las madres no mostró diferencia en el valor de GPx, con respecto al control. Al final del experimento (día 21) se observó una disminución en la actividad de la GPx en cerebro en comparación con el control, en los tratamientos con exposición a glifosato 100 µg/g alimento día y 1,000 µg/g alimento día ($p \leq 0.08$), equivalente a una disminución del 20% y 26%, respectivamente (Figura 13). Yousefi y cols. (2021) no encontraron diferencias en GPx de peces expuestos a glifosato, sin embargo, al suplementar con comino negro, la enzima se activó. El-Shenawy y cols. (2009) observaron un

aumento en el estrés oxidativo de ratas expuestas a glifosato (234.95 y 269.9 mg/kg) a través de un incremento en la oxidación de lípidos y una disminución en el glutatión reducido GSH. Esta disminución fue mayor a mayor tiempo de exposición a glifosato.

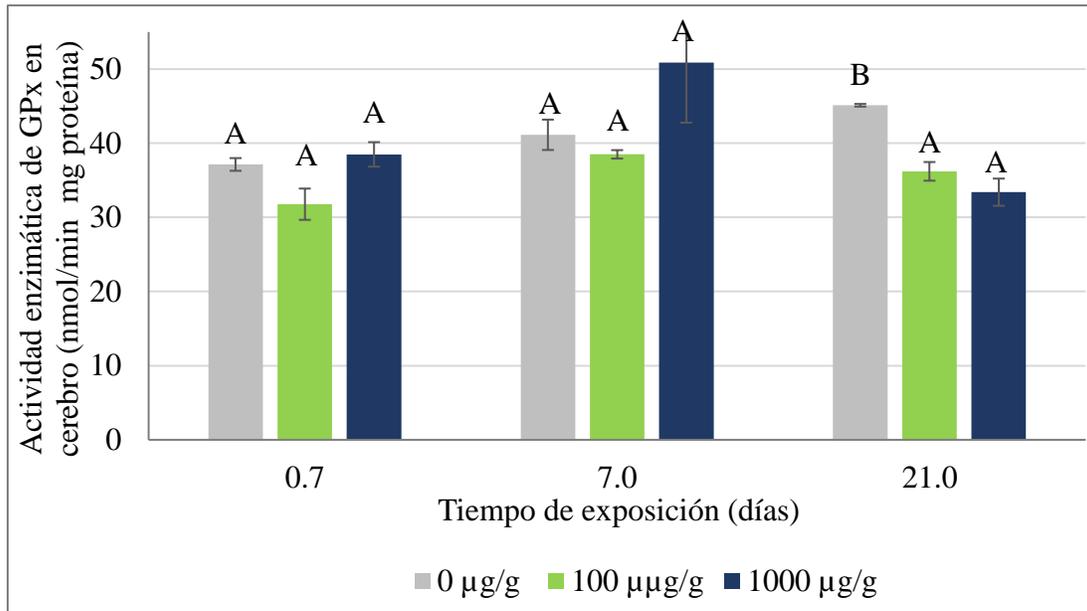


Figura 13. Actividad de la enzima GPx (nmol/min mg proteína) en cerebro de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días. Los resultados representan la media de dos repeticiones \pm SD. Diferentes letras entre tratamientos indican diferencia significativa, para cada tiempo evaluado ($p \leq 0.08$).

La Figura 14 muestra la actividad de la enzima catalasa en músculo, en nmoles/min mg proteína. Se puede observar que a las 16 horas de exposición dietaria a glifosato, hay un incremento en GPx en el tratamiento con exposición baja a glifosato (100µ/g de alimento) en comparación con el control (64.5%) ($p \leq 0.08$), sin embargo, la concentración alta de exposición (1,000µg/g alimento) presenta valores estadísticamente semejantes al control, lo que sugiere que esta concentración de glifosato pudiera estar causando una inhibición de la actividad de GPx. Oruc y cols. (2004) encontraron un incremento en la actividad de GPx así como en la concentración de malonaldehído en músculo de pez carpa por exposición a diazinon (compuesto organofosforado). Zivna y cols. (2013) evaluaron el efecto del ácido acetilsalicílico sobre el estrés oxidativo en pez cebra entero utilizando concentraciones de 0.004, 0.04, 40 y 120 mg/L, obteniendo un incremento en la actividad de GPx. Bartoskova y cols. (2013) observaron un incremento en GPx en pez cebra entero

expuesto a ibuprofeno. Isik y Celik estudiaron trucha arcoíris expuesta a metilparatióon encontrando un incremento en la oxidación de lípidos en músculo, así como un incremento en la actividad de GSH (la enzima GPx es capaz de reducir los peróxidos mediante la utilización de GSH como agente reductor, el cual es oxidado y convertido en glutatión disulfuro). En el presente trabajo encontramos un mayor efecto del estrés oxidativo (GPx) en músculo en comparación con el hígado (Figura 14 y Figura 15). Slaninova y cols. (2009) sugieren que el músculo es un órgano más sensible al estrés oxidativo en comparación con el hígado, ya que estos dos órganos difieren en la velocidad de generación de radicales libres y el potencial antioxidante, siendo el sistema antioxidante del hígado más eficiente que el del músculo.

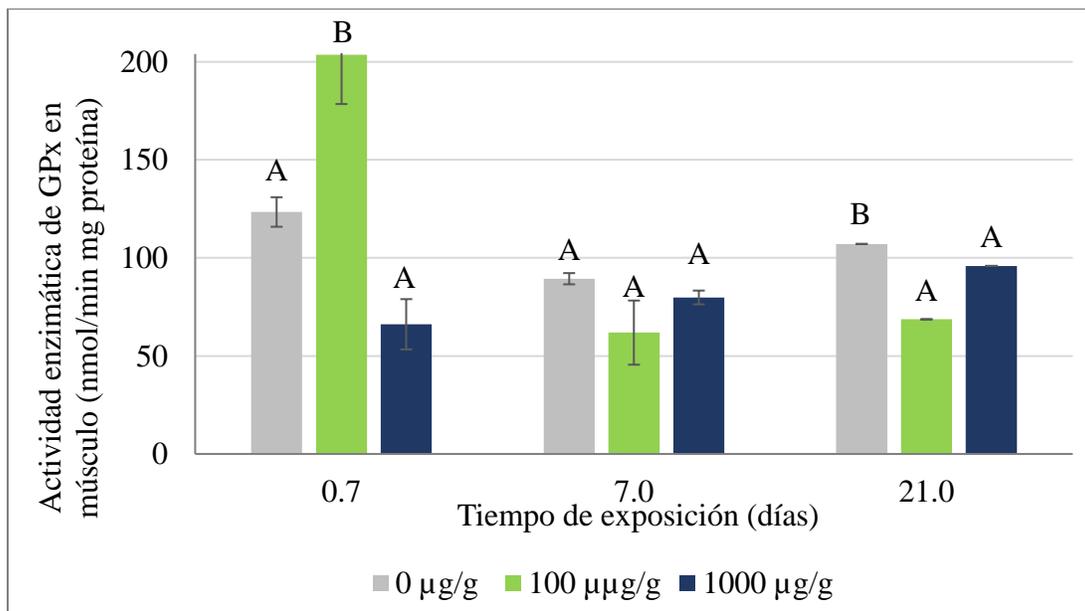


Figura 14. Actividad de la enzima GPx (nmol/min mg proteína) en cerebro de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días. Los resultados representan la media de dos repeticiones \pm SD. Diferentes letras entre tratamientos indican diferencia significativa, para cada tiempo evaluado ($p \leq 0.08$).

Al final del experimento (día 21) los dos tratamientos con exposición a glifosato muestran una inhibición de la actividad enzimática de GPx, con valores estadísticamente menores al control ($p \leq 0.08$), (Figura 14). Monteiro y cols. (Monteiro et al., 2006) estudiaron el estrés oxidativo del pez capitán (*Brycon cephalus*) expuesto a metilparatióon (2 mg/L por 96 h), observando que a pesar de haber un incremento en la actividad de la lipoxigenasa (incremento en la peroxidación de

lípidos), la actividad de GPx decreció; esto lo relacionan con la producción de $\cdot O_2^-$. Blahová y cols. (2013) evaluaron el estrés oxidativo de pez cebra entero expuesto a atrazina (pesticida ampliamente usado a nivel mundial) en concentraciones subletales de 30 y 90 $\mu g/L$ por un periodo de 28 días encontrando un incremento en GPx en concentración de 30 $\mu g/L$, mientras que al incrementar la concentración a 90 $\mu g/L$ la actividad de GPx disminuye, concluyendo que altas concentraciones de atrazina inhiben a GPx.

La Figura 15 muestra la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en hígado, en nmol/min mg proteína. Se puede observar que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos a ningún tiempo estudiado ($p \leq 0.08$).

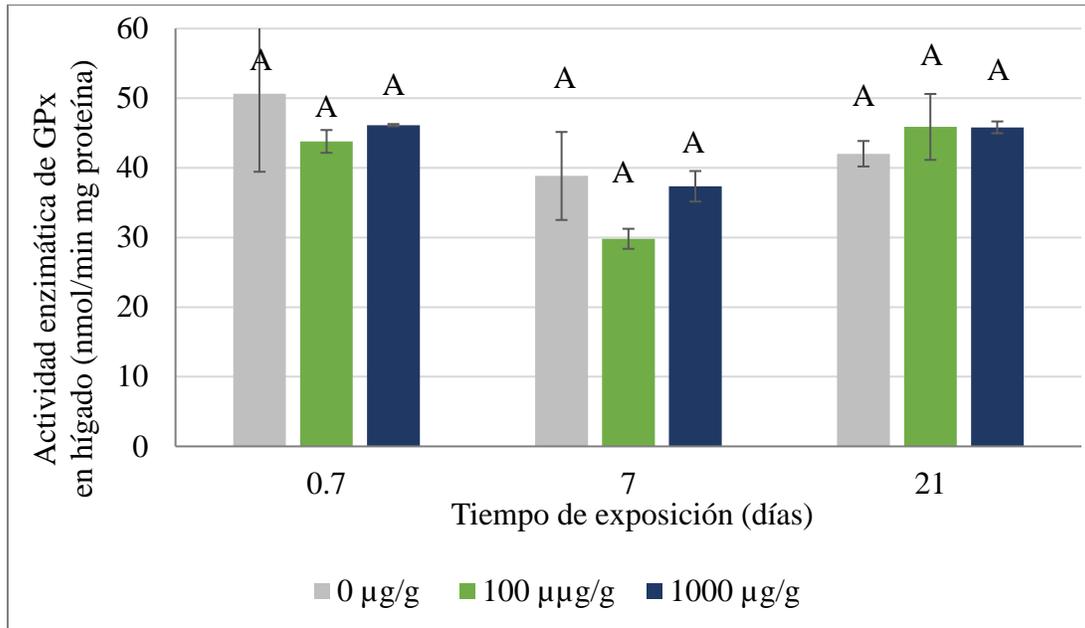


Figura 15. Actividad de la enzima GPx (nmol/min mg proteína) en cerebro de pez cebra con exposición dietaria a glifosato por 21 días. Los resultados representan la media de dos repeticiones \pm SD. Diferentes letras entre tratamientos indican diferencia significativa, para cada tiempo evaluado ($p \leq 0.08$).

En el presente trabajo encontramos un menor efecto de la enzima GPx por exposición a glifosato en hígado (Figura 15) en comparación con el músculo (Figura 14). Al tener el hígado la función de desintoxicación de sustancias xenobióticas, se puede inferir que la cantidad de ROS presente en este órgano sea considerablemente mayor a la encontrada en el cerebro y el músculo. Este exceso de ROS podría estar causando la inhibición de la enzima GPx en el presente trabajo, razón por la

cual no se observan diferencias estadísticas significativas entre el control y los tratamientos con exposición a glifosato. Burella y cols. (2018) que la actividad de las enzimas antioxidantes es inhibida por una alta cantidad de ROS. Velasques y cols. (Velasques et al., 2016a) observaron una reducción en la expresión del gen *gpx1a* en pez cebra expuesto a glifosato menor concentración. Ünner y cols. (2001) encontraron que la actividad de GPx en hígado por exposición a cipermetrina (piretroide) disminuía en pez carpa. El-Shenawy y cols. (2009) encontraron un incremento en los niveles de peroxidación lipídica en el hígado de ratas expuestas a glifosato en concentraciones subletales, sin embargo observaron una reducción en la actividad de GSH en hígado. La enzima GSH es necesaria para la reducción de peróxidos por parte de GPx, funcionando como agente reductor siendo oxidado y convertido en glutatión disulfuro, concluyendo que el glifosato es un probable disruptor del sistema antioxidante.

7. CONCLUSIONES

Actualmente no hay un consenso entre la comunidad científica sobre si la exposición al glifosato genera o no un efecto negativo a la salud. Para contribuir a dilucidar esta polémica, en el presente estudio se trabajó con la dosis máxima permitida por la OMS/FAO, que es a su vez la mitad de la dosis permitida por la EPA, 1mg/Kg de peso corporal (100 µg/g de alimento). Se investigó el efecto de esta dosis de glifosato en el estrés oxidativo de pez cebra, estudiando las principales enzimas del estrés oxidativo, superóxido dismutasa SOD, catalasa CAT, y glutatión peroxidasa GPx. Debido a que el modo de acción del glifosato es a través de la inhibición de la síntesis de aminoácidos en plantas, se espera que no tenga efecto dañino en organismos animales. No obstante, los resultados presentados en este estudio muestran que una concentración de glifosato permitida por los organismos reguladores OMS, FAO, EPA, 1 mg/Kg de peso corporal (100 µg/g de alimento) puede causar efectos adversos en su estatus antioxidante.

De manera general existe un incremento en la actividad de SOD, CAT y GPx, en órganos de aquellos peces expuestos a la concentración menor de glifosato (100 µg/g de alimento) mientras que la concentración mayor muestra valores menores que el control (sin exposición a glifosato), o sin diferencia significativa con el control, sugiriendo una inhibición de las enzimas antioxidantes por efecto del glifosato.

Específicamente, la exposición de glifosato en pez cebra a través del alimento incrementó la actividad de la SOD al día 7 en cerebro y músculo; avanzado el tiempo de exposición, al día 21, se sugiere una inhibición de esta enzima, por la exposición de glifosato, en cerebro, músculo e hígado. La enzima CAT mostró un incremento en el día 7 en cerebro y a las 16 horas en hígado, en la concentración más baja de glifosato (100 µg/g de alimento), se sugiere una inhibición de CAT en fechas posteriores, así como en los órganos expuestos a glifosato en la concentración alta (1,000 µg/g de alimento). La enzima GPx incrementó en músculo a las 16 horas de exposición a glifosato en la concentración baja; GPx disminuyó al día 21 en ambas concentraciones (100 y 1,000 µg/g de alimento), en comparación al control, esto ocurrió tanto en cerebro como en músculo, sugiriendo una inhibición enzimática por la exposición a glifosato.

Los resultados de este trabajo muestran que la exposición a glifosato en una concentración sugerida como dosis máxima segura en la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas

(JMPR), ~1 mg/Kg de peso corporal (100 µg/g de alimento) y menor que la sugerida por la EPA (2mg/Kg de peso corporal), causa estrés oxidativo a un grado que incrementa la actividad de las enzimas antioxidantes, mientras que la concentración alta ~10 mg/Kg (1,000 µg/g de alimento), la cual excede 10 veces la concentración máxima recomendada por la FAO/OMS y 5 veces la concentración sugerida por la EPA, conduce a una inhibición de las enzimas antioxidantes indicando un exceso de sustancias oxidantes (ROS).

8. RECOMENDACIONES

Se sugiere complementar este estudio con análisis que proporcionen más información acerca del estrés oxidativo, como la oxidación de lípidos y el daño a proteínas y DNA.

La capacidad antioxidante de fitoquímicos ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, poca es la información sobre el efecto protector de estos compuestos en organismos sometidos a estrés oxidativo por exposición a glifosato; se recomienda estudios sobre el potencial uso de compuestos fitoquímicos para proteger contra el daño oxidativo causado por el glifosato.

Estudios previos han sugerido la importancia de evaluar el efecto del glifosato en el sistema endócrino. Un estudio encontró menor concentración de hormonas tiroideas T3 y T4 en peces habitando sitios contaminados, y asoció esta disrupción al estrés oxidativo causado por los contaminantes; otro estudio in vitro encontró que el glifosato podría causar disrupción del sistema endócrino. Se sugiere estudiar en posteriores investigaciones el efecto del glifosato en el sistema endócrino a través del análisis de las hormonas tiroideas T3 y T4.

La disrupción del sistema endócrino con la concomitante disminución de las hormonas tiroideas T3 y T4 puede estar relacionada con enfermedades autoinmunes como el Hashimoto. Estudios han asociado las enfermedades autoinmunes con la disfunción intestinal, específicamente el incremento en la permeabilidad intestinal, generada por la secreción de zonulina, lo que conduce a que moléculas grandes entren al torrente sanguíneo causando una activación del sistema de defensa autoinmune. Se sugiere estudiar al glifosato como posible promotor de la secreción de zonulina y, por lo tanto, causante de la disrupción del sistema endócrino a través del desarrollo de enfermedades autoinmunes.

9. REFERENCIAS

- Alli, J. A., A. O. Kehinde, A. M. Kosoko, and O. G. J. J. o. t. r. Ademowo. 2014. Oxidative stress and reduced vitamins C and E levels are associated with multi-drug resistant tuberculosis. 2014.
- Anadón, A., M. R. Martínez-Larrañaga, M. A. Martínez, V. J. Castellano, M. Martínez, M. T. Martín, M. J. Nozal, and J. L. Bernal. 2009. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicology Letters* 190(1):91-95.
- Arellano-Aguilar, O. and J. Rendón. 2017. *La huella de los plaguicidas en México*. Greenpeace, ed, Cd. de México.
- Arellano-Aguilar Omar, R. J. v. O. 2017. *La huella de los plaguicidas en México*.
- Astiz, M., M. J. T. de Alaniz, and C. A. Marra. 2009. The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 94(2):93-99.
- Azzi, A. 2022. Oxidative Stress: What Is It? Can It Be Measured? Where Is It Located? Can It Be Good or Bad? Can It Be Prevented? Can It Be Cured? *Antioxidants* 11(8):1431.
- Bai, S. H., S. M. J. E. S. Ogbourne, and P. Research. 2016. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. 23(19):18988-19001.
- Bali, Y. A., N.-e. Kaikai, S. Ba-M'hamed, and M. Bennis. 2019. Learning and memory impairments associated to acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress following glyphosate based-herbicide exposure in mice. *Toxicology* 415:18-25.
- Bartoskova, M., R. Dobsikova, V. Stancova, D. Zivna, J. Blahova, P. Marsalek, L. Zelnickova, M. Bartos, F. C. Di Tocco, and C. Faggio. 2013. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuro Endocrinology Letters* 34(2):102-108.
- Bejarano González, F. 2017. *Los plaguicidas altamente peligrosos en México*. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, A. C. (RAPAM)
- Benbrook, C. M. J. E. S. E. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. 28(1):3.
- Bernardi, N. G., N. E. Gentile, F. J. Mañas, Á. Méndez, N. B. M. Gorla, and D. E. Aiassa. 2015. Assessment of the level of damage to the genetic material of children exposed to pesticides in the province of Córdoba. *Archivos Argentinos de Pediatría*:126-132.
- Beuret, C. J., F. Zirulnik, and M. S. Giménez. 2005. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reproductive Toxicology* 19(4):501-504.
- Bhilwadikar, T., S. Pounraj, S. Manivannan, N. Rastogi, and P. Negi. 2019. Decontamination of Microorganisms and Pesticides from Fresh Fruits and Vegetables: A Comprehensive Review from Common Household Processes to Modern Techniques. *Comprehensive Reviews in*

Food Science and Food Safety 18(4):1003-1038.

- Birben, E., U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, and O. J. W. a. o. j. Kalayci. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. 5:9-19.
- Blahová, J., L. Plhalová, M. Hostovský, L. Divišová, R. Dobšíková, I. Mikulíková, S. Štěpánová, and Z. Svobodová. 2013. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *Journal Food Chemical and Toxicology* 61:82-85.
- Burella, P. M., L. M. Odetti, M. F. Simoniello, and G. L. Poletta. 2018. Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) exposed in ovo to pesticide formulations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 161:437-443.
- Burton, G. J. and E. Jauniaux. 2011. Oxidative stress. *Best practice research Clinical obstetrics gynaecology* 25(3):287-299.
- Cadenas, E., K. J. J. F. r. b. Davies, and medicine. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. 29(3-4):222-230.
- Cai, W., Y. Ji, X. Song, H. Guo, L. Han, F. Zhang, X. Liu, H. Zhang, B. Zhu, and M. Xu. 2017. Effects of glyphosate exposure on sperm concentration in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Environmental toxicology pharmacology* 55:148-155.
- Carvajal, C. 2019. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Revista Medicina Legal de Costa Rica* 36(1):91-100.
- Cattani, D., P. A. Cesconetto, M. K. Tavares, E. B. Parisotto, P. A. De Oliveira, C. E. H. Rieg, M. C. Leite, R. D. S. Prediger, N. C. Wendt, and G. Razzera. 2017. Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Toxicology* 387:67-80.
- CONAHCYT. 2023. Si hay alternativas al glifosato. No. 22. in *Gaceta MEIA, Manejo Ecológico Integral de Arvenses*. Vol. 2024, https://alimentacion.conahcyt.mx/glifosato/descargables/alternativas/materiales/meia_22_documento-presidencial-sobre-la-eliminacion-gradual-del-glifosato-del-2020-al-2023.pdf.
- CONAHCYT. 2024. CONAHCYT, preguntas frecuentes. Vol. 2024. G. d. México, ed, <https://conahcyt.mx/cibiogem/index.php/cibiogem/preguntas-frecuentes#:~:text=En%20M%C3%A9xico%20si%20se%20ha,tomate%20y%20papa%20entre%20otros>.
- Dai, Y. J., Y. F. Jia, N. Chen, W. P. Bian, Q. K. Li, Y. B. Ma, Y. L. Chen, and D. S. Pei. 2014. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environmental toxicology and chemistry* 33(1):11-17.
- de Menezes, C. C., M. B. Da Fonseca, V. L. Loro, A. Santi, R. Cattaneo, B. Clasen, A. Pretto, and V. M. Morsch. 2011. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen*. *Archives of environmental contamination and toxicology* 60(4):665-671.
- Díaz-Martín, R. D., J. D. Valencia-Hernández, M. Betancourt-Lozano, and B. Yáñez-Rivera. 2021. Changes in microtubule stability in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after glyphosate exposure. *Heliyon* 7(1):e06027.
- Díaz, O. and C. R. Betancourt Aguilar. 2018. Los pesticidas; clasificación, necesidad de un manejo integrado y alternativas para reducir su consumo indebido: una revisión. *Revista Científica*

Agroecosistemas 6(2):14-30.

- Dinis-Oliveira, R., J. Duarte, A. Sánchez-Navarro, F. Remiao, M. Bastos, and F. J. C. r. i. t. Carvalho. 2008. Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment. 38(1):13-71.
- Dorval, J., V. Leblond, C. Deblois, and A. Hontela. 2005. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(5):1273-1280.
- dos Santos Teixeira, J. M., V. da Silva Lima, F. R. de Moura, P. da Costa Marisco, A. P. Sinhoin, and V. D. G. Sinhoin. 2018. Acute toxicity and effects of Roundup Original® on pintado da Amazônia. *Environmental Science and Pollution Research* 25(25):25383-25389.
- Duke, S. O. 2020. Glyphosate: environmental fate and impact. *Weed Science* 68(3):201-207.
- El-Shenawy, N. S. 2009. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28(3):379-385.
- Elejalde Guerra, J. I. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna* 18:50-59.
- Finaud, J., G. Lac, and E. J. S. m. Filaire. 2006. Oxidative stress. Pages 327-358 in *Sports medicine* Vol. 36.
- Flohé, L. and W. A. Günzler. 1984. [12] Assays of glutathione peroxidase. Pages 114-120 in *Methods in enzymology*. Vol. 105. Elsevier.
- García Triana, B., O. García Morales, S. Clapes Hernández, L. Rodes Fernández, and J. C. García Piñeiro. 1995. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 14(1):0-0.
- Giesy, J. P., S. Dobson, and K. R. Solomon. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. Pages 35-120 in *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer.
- Gill, J. P. K., N. Sethi, and A. Mohan. 2017. Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents. *Environmental Chemistry Letters* 15(1):85-100.
- González-Ortega, E. and E. Hagman-Aguilar. 2018. El herbicida glifosato y su uso en la agricultura con organismos genéticamente modificados. I. N. d. E. y. C. Climático, ed, https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/425676/Informe_Glifosato_Agricultura_OGMs_24.12.2018_agg.pdf.
- Ha, S. J. O. S., Academic Press, London. 1985. Oxidative stress: introductory remarks.1-8.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge. 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford university press, USA.
- Hong, Y., X. Yang, Y. Huang, G. Yan, and Y. Cheng. 2018. Assessment of the oxidative and genotoxic effects of the glyphosate-based herbicide roundup on the freshwater shrimp, *Macrobrachium nipponensis*. *Chemosphere* 210:896-906.
- Ighodaro, O. and O. Akinloye. 2018a. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alejadria Journal of Medicine* 54(4):287-293.

- Ighodaro, O. and O. J. A. j. o. m. Akinloye. 2018b. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. 54(4):287-293.
- Kogevinas, M. 2019. Probable carcinogenicity of glyphosate. *BMJ* 365:l1613.
- Leyva-Soto, L., A. Balderrama-Carmona, E. Moran-Palacio, L. Diaz-Tenorio, and P. Gortares-Moroyoqui. 2018. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid in population of agricultural fields: health risk assessment overview. *Applied Ecology and Environmental Research* 16(4):5127-5140.
- Lieschke, G. J. and P. D. Currie. 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics* 8:353.
- Limón-Pacheco, J. and M. E. Gonsebatt. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674(1):137-147.
- Lopes, P. A., T. Pinheiro, M. C. Santos, M. da Luz Mathias, M. J. Collares-Pereira, and A. M. Viegas-Crespo. 2001. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides* complex) to inorganic pollutants exposure. *Science of the total environment* 280(1-3):153-163.
- Lushchak, V., O. I. Kubrak, J. M. Storey, K. B. Storey, and V. Lushchak. 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76(7):932-937.
- Lushchak, V. I., T. V. Bagnyukova, V. V. Husak, L. I. Luzhna, O. Lushchak, and K. B. Storey. 2005a. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The International Journal of Biochemistry Cell Biology* 37(8):1670-1680.
- Lushchak, V. I., T. V. Bagnyukova, V. V. Husak, L. I. Luzhna, V. Lushchak, K. B. J. T. i. j. o. b. Storey, and c. biology. 2005b. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. 37(8):1670-1680.
- Lushchak, V. I., L. P. Lushchak, A. A. Mota, M. J. A. J. o. P.-R. Hermes-Lima, Integrative, and C. Physiology. 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. 280(1):R100-R107.
- Margis, R., C. Dunand, F. K. Teixeira, and M. J. T. F. j. Margis-Pinheiro. 2008. Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. 275(15):3959-3970.
- Martín-Rossi, E. 2020. *Antología toxicológica del glifosato*. 5a ed. N. d. Derechos, ed, Argentina.
- Misra, H. P. and I. J. J. o. B. c. Fridovich. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. 247(10):3170-3175.
- Modesto, K. A. and C. B. R. Martinez. 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81(6):781-787.
- Monteiro, D. A., J. A. de Almeida, F. T. Rantin, and A. L. Kalinin. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143(2):141-149.

- Muñoz, F. 2021. El herbicida glifosato y sus alternativas. in Serie Informes Técnicos IRET N° 44. U. N. d. C. Rica, ed. Universidad Nacional de Costa Rica.
- Muñoz, J. P., T. C. Bleak, and G. M. Calaf. 2021. Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. *Chemosphere* 270.
- Murussi, C. R., M. D. Costa, J. W. Leitemperger, L. Guerra, C. C. Rodrigues, C. C. Menezes, E. S. Severo, F. Flores-Lopes, J. Salbego, and V. L. Loro. 2016. Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. *Fish physiology and biochemistry* 42(2):445-455.
- Nicholls, C. I., M. A. J. T. I. J. o. S. D. Altieri, and W. Ecology. 1997. Conventional agricultural development models and the persistence of the pesticide treadmill in Latin America. 4(2):93-111.
- Nivia, E. 2000. Efectos sobre la salud y el ambiente de herbicidas que contienen glifosato.
- Olivas-Muñoz, O. 2020. Detección de glifosato en productos alimenticios comerciales. Vol. Ingeniero en Industrias Alimentarias. Instituto Tecnológico de Cd. Cuauhtémoc.
- OMS/FAO. 2010. Código internacional de conducta sobre la distribución y utilización de plaguicidas : directrices para el registro de plaguicidas. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
- Oruc, O., Y. Sevgiler, and N. Uner. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 137(1):43-51.
- Pacher, P., J. S. Beckman, and L. J. P. r. Liaudet. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. 87(1):315-424.
- Pandey, S., S. Parvez, I. Sayeed, R. Haque, B. Bin-Hafeez, and S. Raisuddin. 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Science of The Total Environment* 309(1):105-115.
- Pisoschi, A. M., A. Pop, F. Iordache, L. Stanca, G. Predoi, and A. I. Serban. 2021. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry* 209:1128-1180.
- Qiao, Y., J. Sun, Y. Ding, G. Le, and Y. Shi. 2013. Alterations of the gut microbiota in high-fat diet mice is strongly linked to oxidative stress. *Applied microbiology and biotechnology* 97(4):1689-1697.
- Qiu, S., H. Fu, R. Zhou, Z. Yang, G. Bai, and B. Shi. 2020. Toxic effects of glyphosate on intestinal morphology, antioxidant capacity and barrier function in weaned piglets. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 187:109846.
- Rao, C. S., V. S. Bhushan, H. Reddy, R. Darsi, M. Aruna, and B. Ramesh. 2014. Risk mitigation methods for removal of pesticide residues in brinjal for food safety. *Universal Journal of Agricultural Research* 2(8):279-283.
- Ray, S., A. Sengupta, and A. Ray. 2007. Effects of paraquat on anti-oxidant system in rats.
- Rendon-von Osten, J. and R. Dzul-Caamal. 2017. Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in

Hopelchén, Campeche, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. doi:10.3390/ijerph14060595.

- Rodríguez Aguilar, B. A., L. M. Martínez Rivera, A. A. Peregrina Lucano, C. I. Ortiz Arrona, and O. G. Cárdenas Hernández. 2019. Análisis de residuos de plaguicidas en el agua superficial de la cuenca del río Ayuquila-Armería, México. *Terra Latinoamericana* 37(2):151-161.
- Rosales, E. and V. Esqueda. 2006. Clasificación y uso de los herbicidas por su modo de acción. SAGARPA.
- Ruiz-Toledo, J., R. Castro, N. Rivero-Pérez, R. Bello-Mendoza, and D. Sánchez. 2014. Occurrence of glyphosate in water bodies derived from intensive agriculture in a tropical region of southern Mexico. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 93(3):289-293.
- Salazar-López, N. J. and M. L. A. J. B. Madrid. 2011. Herbicida glifosato: usos, toxicidad y regulación. *BIOtecnia* 13(2):23-28.
- Samanta, P., S. Pal, A. K. Mukherjee, and A. R. Ghosh. 2014. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicology and environmental safety* 107:120-125.
- Samsel, A. and S. Seneff. 2013a. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. *Interdisciplinary toxicology* 6(4):159-184.
- Samsel, A. and S. J. E. Seneff. 2013b. Glyphosate's suppression of cytochrome P450 enzymes and amino acid biosynthesis by the gut microbiome: pathways to modern diseases. 15(4):1416-1463.
- Samsel, A. and S. J. I. t. Seneff. 2013c. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. 6(4):159.
- Samsel, A. and S. J. J. B. P. C. Seneff. 2015a. Glyphosate, pathways to modern diseases IV: cancer and related pathologies. 15:121-159.
- Samsel, A. and S. J. J. B. P. C. Seneff. 2016. Glyphosate pathways to modern diseases V: amino acid analogue of glycine in diverse proteins. 16(6):9-46.
- Samsel, A. and S. J. S. n. i. Seneff. 2015b. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. 6.
- Santo, G. D., A. Grotto, A. A. Boligon, B. Da Costa, C. L. Rambo, E. A. Fantini, E. Sauer, L. M. V. Lazzarotto, K. T. Bertencello, O. T. Júnior, S. C. Garcia, A. M. Siebel, D. B. Rosemberg, J. D. Magro, G. M. M. Conterato, and L. Zanatta. 2018. Protective effect of *Uncaria tomentosa* extract against oxidative stress and genotoxicity induced by glyphosate-Roundup® using zebrafish (*Danio rerio*) as a model. *Environmental Science and Pollution Research* 25(12):11703-11715.
- Sarikaya, E., S. Doğan, and disease. 2020. Glutathione peroxidase in health and diseases. Pages 49-63 in *Glutathione system oxidative stress in health*. Vol. 17. M. D. Bagatini, ed.
- Sheehan, D., G. Meade, V. M. Foley, and C. A. Dowd. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* 360(1):1-16.

- Shehata, A. A., W. Schrödl, A. A. Aldin, H. M. Hafez, and M. J. C. m. Krüger. 2013. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *66(4):350-358*.
- Sigma-Aldrich. 2020. Enzymatic Assay of glutathione peroxidase EC 1.11.1.9).
- Sinhorin, V. D. G., A. P. Sinhorin, J. M. dos Santos Teixeira, K. M. L. Miléski, P. C. Hansen, P. S. A. Moreira, N. H. Kawashita, A. M. Baviera, and V. L. Loro. 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotoxicology and environmental safety 106:181-187*.
- Slaninova, A., M. Smutna, H. Modra, and Z. Svobodova. 2009. REVIEWS Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinology Letters 30(1):2*.
- Sterren, M. A., W. Urich, and S. Benintende. 2016. Residualidad de glifosato en suelos de Entre Ríos y su efecto sobre los microorganismos del suelo. *Ecología austral 26(3):246-255*.
- Storz, G. and J. A. J. C. o. i. m. Imlay. 1999. Oxidative stress. *2(2):188-194*.
- Swanson, N., A. Leu, J. Abrahamson, and B. Wallet. 2014. Genetically engineered crops, glyphosate and the deterioration of health in the United States of America. *Journal of Organic Systems 9(2):6-37*.
- Tomita, M., H. Katsuyama, T. Okuyama, K. Hidaka, and Y. Minatogawa. 2005. Changes in gene expression level for defense system enzymes against oxidative stress and glutathione level in rat administered paraquat. *International journal of molecular medicine 15(4):689-693*.
- Torres González, O. and C. E. Rodríguez Martínez. 2022. El debate sobre el glifosato en Colombia: controversia científico-tecnológica y ciencia regulativa. *Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad 17(49)*.
- Torretta, V., I. A. Katsoyiannis, P. Viotti, and E. C. Rada. 2018. Critical review of the effects of glyphosate exposure to the environment and humans through the food supply chain. *Sustainability 10(4):950*.
- Turkmen, R., Y. O. Birdane, H. H. Demirel, H. Yavuz, M. Kabu, and S. Ince. 2019. Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environmental Science and Pollution Research 26(11):11427-11437*.
- Üner, N., E. Ö. Oruç, M. Canli, and Y. Sevgler. 2001. Effects of cypermethrin on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in liver and kidney of the freshwater fish, *Oreochromis niloticus* and *Cyprinus carpio* (L.). *Bulletin of environmental contamination and toxicology 67(5):657-664*.
- Velasques, R. R., J. Z. Sandrini, and C. E. da Rosa. 2016a. Roundup® in zebrafish: Effects on oxidative status and gene expression. *Zebrafish 13(5):432-441*.
- Velasques, R. R., J. Z. Sandrini, and C. E. J. Z. da Rosa. 2016b. Roundup® in zebrafish: effects on oxidative status and gene expression. *13(5):432-441*.
- Wang, X., Q. Lu, J. Guo, I. Ares, M. Martínez, M.-R. Martínez-Larrañaga, X. Wang, A. Anadón, M.-A. J. A. r. o. p. Martínez, and toxicology. 2022. Oxidative stress and metabolism: a mechanistic insight for glyphosate toxicology. *62(1):617-639*.

- Williams, G. M., R. Kroes, and I. C. Munro. 2000. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31(2):117-165.
- Yousefi, M., H. Adineh, M. Reverter, M. Khademi Hamidi, Y. A. Vatnikov, E. V. Kulikov, S. H. Hoseinifar, and H. Van Doan. 2021. Protective effects of black seed (*Nigella sativa*) diet supplementation in common carp (*Cyprinus carpio*) against immune depression, oxidative stress and metabolism dysfunction induced by glyphosate. *Fish & Shellfish Immunology* 109:12-19.
- Zelko, I. N., T. J. Mariani, R. J. J. F. R. B. Folz, and Medicine. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. 33(3):337-349.
- Zhong, G., Z. Wu, N. Liu, and J. Yin. 2018. Phosphate alleviation of glyphosate-induced toxicity in *Hydrocharis dubia* (Bl.) Backer. *Aquatic Toxicology* 201:91-98.
- Zivna, D., L. Plhalova, E. Praskova, S. Stepanova, Z. Siroka, M. Sevcikova, J. Blahova, M. Bartoskova, P. Marsalek, and M. Skoric. 2013. Oxidative stress parameters in fish after subchronic exposure to acetylsalicylic acid. *Neuroendocrinology Letters* 34(Suppl. 2):116-122.