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

MECANISMOS DE CARDIOTOXICIDAD POR EXPOSICIÓN A CONCENTRACIONES BAJAS DE GLIFOSATO EN UN SISTEMA *Ex vivo*

Por:

Eunice Abigail Barraza Ortega

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

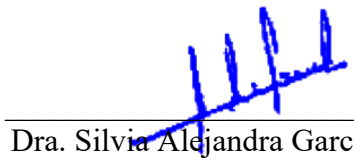
Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

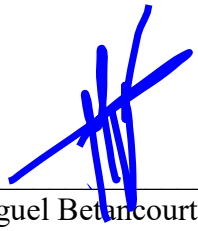
Mazatlán, Sinaloa Octubre 2020

APROBACIÓN

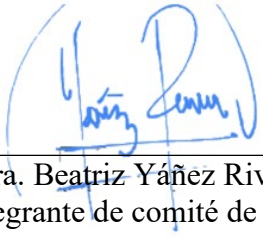
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Eunice Abigail Barraza Ortega, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Directora de tesis



Dr. Miguel Betancourt Lozano
Integrante de comité de tesis



Dra. Beatriz Yáñez Rivera
Integrante de comité de tesis

Dr. Anaguiven Ávalos Soriano
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Mecanismos de Cardiotoxicidad por Exposición a Concentraciones Bajas de Glifosato en un Sistema *Ex vivo*" 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 de la autora Eunice Abigail Barraza Ortega, 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 manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CIAD

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

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de maestría otorgada durante el posgrado.

También, agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad Mazatlán, por permitirme realizar este posgrado y hacer uso de sus laboratorios, equipos y materiales.

Al proyecto CB 2016 288306 "¿Toxicidad transgeneracional del glifosato en el pez cebra (*Danio rerio*)?: efectos moleculares, reproductivos y poblacionales", a cargo del Dr. Miguel Betancourt Lozano, por el apoyo otorgado en la realización del trabajo.

Me siento muy agradecida con mi directora de tesis, la Dra. Silvia Alejandra García-Gasca por darme la oportunidad de trabajar con ella. Ale, gracias por ser una excelente mentora e ir más allá de una enseñanza. Por tenerme paciencia, por ayudarme y creer en mi incluso cuando yo no lo hacía. Gracias por sacarme de mi zona de confort y recordarme que siempre debo esforzarme más. Siento que no terminaría nunca de agradecerte todo lo bueno que has hecho por mí y todo el apoyo que me has dado. Gracias por abrirme las puertas de tu hogar y tratarme tan bonito. El conocerte impactó mi vida en muchas maneras y para bien. Te voy a querer siempre, y estaré eternamente agradecida contigo. Espero algún día llegar a ser un poquito más como tú, tener tu constancia, dedicación y tu sencillez.

A M.C. Rubí Hernández Cornejo por toda tu paciencia y siempre enseñarme detalladamente. Rubí, te convertiste en una buena amiga, muchas gracias por todo.

A mi comité de tesis, al Dr. Anaguiven, por sus enseñanzas e instruirme en el camino del cultivo celular. Gracias por tu confianza, por las pláticas y las risas… también gracias por todos los dulces. Muchas gracias al Dr. Miguel (también por enseñarme a tomar fotos) y la Dra. Bety, por siempre cuestionarme y hacerme dudar, agradezco mucho todo su apoyo y sus consejos.

A la Dra. Nayeli, por prestarme su lector de placas y por todo su apoyo.

Muchas gracias Julio Castro, por ser la pareja perfecta, por entender todo y siempre apoyarme. Mi amor, eres una pieza clave en todo este camino, gracias por todas las porras, por toda la comida, todas las risas y todos los abrazos. Te amo.

A mis amigos, los que siempre han estado (Liz, Joss, Alesita, Inid, Mon, Cit, Mau, Ana, Deni, Erick, Rodo y Andrés) y los que adquirí en el camino (Bety, Alo, Eli, Blanquita, Mariany, jefe y

Anita).

A mi familia, especialmente a mis abuelitos; Papá David y Mamá Esthela, los amo.

DEDICATORIA

Esta tesis va dirigida a mi yo del futuro, como recordatorio de que siempre debo seguir esforzándome, nunca dejar de aprender, dar aún más cada vez y no tomar nada por sentado. Quiero que sea un recordatorio de que debo seguir adaptándome, ser más constante día con día, respetar los cambios y aprender que no todo está en mi control y eso está bien.

La maestría me enseñó de todo, tanto lo que estaba haciendo bien, como lo que estaba haciendo mal (que al principio era casi todo). Una vez me dijeron que debía salir de mi zona de confort, ya que eso requería un posgrado. A partir de eso, comencé a exigirme un poco más un día a la vez y ponerme pequeñas metas. Aún me queda mucho por aprender y eso me emociona más porque quiere decir que seguiré cambiando y a la misma vez descubriéndome.

Así que Abi, nunca dejes de cambiar, de aprender y de mejorar. Sigue siendo positiva y no tomes nada por sentado. Se constante y no te des por vencida nunca. Recuerda que lo único imposible, es aquello que no intentas.

CONTENIDO

APROBACIÓN……..2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL……..3
AGRADECIMIENTOS…….4
DEDICATORIA……6
CONTENIDO…….7
LISTA DE FIGURAS……9
LISTA DE CUADROS……. 10
RESUMEN……11
ABSTRACT……..12
1. INTRODUCCIÓN……. 13
2. ANTECEDENTES……..16
2.1. Mecanismos de Muerte Celular…….....17
2.1.1. Autofagia……. 18
2.1.2. Apoptosis……..19
2.1.3. Necrosis……..21
2.2. Corazón de Pez Cebra en un Sistema *Ex vivo*…….....22
3. HIPÓTESIS……..24
3.1. Preguntas de Investigación…….....24
4. OBJETIVOS……...25
4.1. Objetivo General……. 25
4.2. Objetivos Específicos……25
5. MATERIALES Y MÉTODOS…….. 26
5.1. Cultivo de Corazón de Pez Cebra *Ex vivo* para Medir Ritmo Cardiaco y Proliferación Celular (Expresión de *pcna*)…… 26
5.2. Cultivo de Corazón de Pez Cebra *Ex vivo* para Medir Expresión Génica de Marcadores de Muerte Celular…….28
5.3. Expresión Génica……..29
5.3.1. Extracción de RNA y Síntesis de cDNA…….....29
5.3.2. Amplificación por PCR Punto Final……...29
5.3.3. Amplificación por PCR Cuantitativo (RT-qPCR)……..29
5.4. Cultivo de Corazón de Pez Cebra *Ex vivo* para Medir la Actividad de Caspasa3……..31
5.5. Actividad de Cas3……...31
5.5.1. Curva Bradford……...31
5.5.2. Actividad de Cas3……...32
5.6. Cultivo de Corazón de Pez Cebra *Ex vivo* para Medir la Liberación de LDH (Lactato deshidrogenasa)……. 33

CONTENIDO (continuación)

5.7. Liberación de Lactato Deshidrogenasa……..…….....34
5.8. Análisis Estadísticos……...35

6. RESULTADOS.……36
6.1. Ritmo Cardiaco en Cultivo *Ex vivo*…….……...36
6.2. Ritmo Cardiaco *Ex vivo* en Corazones Expuestos a Glifosato a 24hrs de Cultivo…….37
6.3. Expresión Génica……...…….38
6.3.1. Proliferación y Muerte Celular en Corazones Expuestos a Glifosato *Ex vivo*.....38
6.3.2. Expresión de *pcna*…….. 40
6.4. Autofagia...……...……..41
6.4.1. Expresión de *ulk1b*……41
6.5. Apoptosis…….... 42
6.5.1. Expresión de *cas-3*……. 42
6.5.2. Expresión de *cas-9*……43
6.5.3. Expresión de *bax*…….... 44
6.5.4. Expresión de *bcl-2*……44
6.5.5. Expresión de *apaf-1*…….. 45
6.6. Actividad de Cas3……..... 46
6.7. Liberación de Lactato Deshidrogenasa…….....47

7. DISCUSIÓN…… 49

8. CONCLUSIONES……55

9. RECOMENDACIONES……..56

10. BIBLIOGRAFÍA……57

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Corazón de pez cebra *ex vivo*……	15
2	Esquematización del mecanismo de autofagia…….	19
3	Mecanismos de muerte celular por apoptosis dependiente de caspasas……	21
4	Liberación de LDH durante la necrosis…….	22
5	Cultivo de corazón de pez cebra *ex vivo* y ritmo cardiaco……	27
6	Diseño experimental aleatorizado (expresión génica)……..	28
7	Diseño experimental aleatorizado (actividad de Cas3)……	31
8	Concentración de proteína……	32
9	Actividad de Cas3……	33
10	Diseño experimental aleatorizado (liberación de LDH)……..	33
11	Liberación de LDH……..	34
12	Ritmo cardiaco en corazones de pez cebra en cultivo *Ex vivo*……	36
13	Ritmo cardiaco en corazones de pez cebra con glifosato en cultivo *Ex vivo*……..	37
14	Curva estándar y “melt peak” de los genes de referencia……	38
15	Curva estándar y “melt peak” de los genes experimentales……	39
16	Curva estándar y “melt peak” de los genes experimentales añadidos…….	39
17	Expresión de *pcna*……	40
18	Expresión de *ulk1b*……..	41
19	Expresión de *cas-3*……..	42
20	Expresión de *cas-9*……..	43
21	Expresión de *bax*…….	44
22	Expresión de *bcl-2*……...	45
23	Expresión de *apaf-1*…….	46
24	Actividad de Cas3……	47
25	Liberación de LDH……..	48
26	Esquema de muerte celular a la concentración de 0.01 ug/L de glifosato……...	53
27	Esquema de muerte celular a la concentración de 1 ug/L de glifosato……	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características principales de los mecanismos de muerte celular a evaluar……	18
2	Secuencias y temperatura de amplificación de genes……..	30
3	Parámetros de amplificación de genes…….	40

RESUMEN

El glifosato es un herbicida muy utilizado en la agricultura. Este compuesto actúa inhibiendo la ruta del Shikimato, la cual es importante para la supervivencia de las plantas y por no estar presente en animales se asume que no es tóxico; sin embargo, diversos estudios han demostrado que el glifosato induce efectos tóxicos en varias especies animales y algunos estudios sugieren efectos cardiotóxicos. En este estudio, se utilizó el pez cebra como modelo animal en un sistema *ex vivo* para estudiar el efecto cardiotóxico del glifosato por exposición a concentraciones ambientalmente relevantes. En un primer ensayo, los corazones de pez cebra se diseccionaron y se expusieron 24 horas a un intervalo de concentraciones de glifosato (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 y 1.0 ug/L) que se asemeja a las concentraciones reportadas en el ambiente. Se midió la frecuencia cardíaca en el momento de la disección, una hora después de la disección y 24 horas después de la aplicación de glifosato. Los resultados muestran que a una hora de cultivo la frecuencia cardíaca disminuye alrededor de un 50%, y después de 24 horas la frecuencia cardíaca disminuye casi un 70%. Se observó una relación negativa entre la actividad cardíaca (%) y la concentración de glifosato. Adicionalmente se midió un marcador de proliferación y viabilidad celular (*pcna* por sus siglas en inglés), mismo que presentó disminuciones significativas en las concentraciones de 0.01 y 1.0 ug/L. Dichas concentraciones fueron seleccionadas para evaluar muerte celular en los siguientes ensayos. Los marcadores de muerte celular considerados fueron la expresión de *ulk1b* para autofagia; la expresión de *cas-9, cas-3, bax, apaf-1, bcl-2* y la actividad de Cas3 para apoptosis y la liberación de LDH para necrosis. Los resultados permitieron identificar dos escenarios diferentes: 1) 0.01 ug/L, no propició muerte celular por autofagia, necrosis o apoptosis, pero el arresto del ciclo celular y el incremento en la expresión de *bcl-2* y *apaf-1* sugieren una posible activación de los mecanismos de reparación por daño al DNA; 2) 1 ug/L, no indujo muerte celular por autofagia o apoptosis; sin embargo los niveles de LDH aumentaron significativamente indicando muerte celular accidental por necrosis.

Palabras clave: Cardiotixicidad, Glifosato, Apoptosis, Autofagia, Necrosis

ABSTRACT

Glyphosate is a heavily used herbicide in agriculture. This compound acts by inhibiting the Shikimato route in plants, which is not present in animals and thus it is assumed that is not toxic; nevertheless, different studies have shown that glyphosate induces toxic effects in several animal species, and some studies suggest a cardiotoxic effect. In this study, zebrafish was used as animal model in an *ex vivo* system to study the cardiotoxic effect of glyphosate by exposure to low environmental concentrations. In a first assay, zebrafish hearts were dissected and exposed for 24 hours to a range of glyphosate concentrations (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, and 1.0 ug/L) that resembles concentrations reported in the environment. Heart rate was measured at the time of dissection, one hour after the dissection, and 24 hours after the application of glyphosate. The results show that at one hour of culture the heart rate decreases about 50%, and after 24 hours the heart rate decreases almost 70%. A negative relationship was observed between cardiac activity (%) and glyphosate concentration. Additionally, a cell proliferation and viability marker (*pcna*) was measured, which presented significant decreases in concentrations of 0.01 and 1.0 ug/L. These concentrations were selected to evaluate cell death in the following assays. The cell death markers considered were the expression of *ulk1b* for autophagy; the expression of *cas-9, cas-3, bax, apaf-1, bcl-2* and Cas3 activity for apoptosis, and LDH release for necrosis. The results allowed the identification of two different scenarios: 1) 0.01 ug/L, did not lead to cell death due to autophagy, necrosis or apoptosis. Furthermore, the arrest of the cell cycle and the increase in the expression of *bcl-2* and *apaf-1*, suggest a possible activation of the repair mechanisms as a DNA damage response. 2) 1 ug/L, did not induce cell death by autophagy or apoptosis, however LDH levels increased significantly indicating accidental cell death by necrosis.

Key words Cardiotoxicity · Glyphosate · Apoptosis · Autophagy · Necrosis

1. INTRODUCCIÓN

El glifosato (N-fosfonometil glicina) es un herbicida de amplio espectro, no selectivo y generalmente usado en la agricultura para eliminar maleza (Alonzo y Correa, 2008) que actúa como inhibidor de la enzima 5-enolpyruvylshikimate-3-fosfato sintasa, la cual es intermediaria en la biosíntesis de diferentes aminoácidos aromáticos en las plantas (Costa, 2008). A pesar que dicha ruta no está presente en animales, diferentes estudios han demostrado que el glifosato induce efectos tóxicos en varias especies (Giesy *et al.,* 2000; Uren Webster *et al.,* 2014).

En los programas de monitoreo ambiental rara vez se incluye el glifosato, ya que es un herbicida polar y soluble en agua, que puede transportarse a través del suelo y llegar al manto freático (U.S. Department of Agriculture, 2011), dificultándose la cuantificación a concentraciones bajas (Skark *et al*., 1998; Sanchis *et al*., 2011). Dadas estas características, el glifosato prolonga su vida media en el suelo y puede ser transportado a capas más profundas contaminando fácilmente la escorrentía superficial, las tierras de cultivo y el agua subterránea (Salazar López et al., 2016; Jin *et al*., 2013). Se han reportado anomalías cardiovasculares relacionadas a la intoxicación por glifosato, las cuales incluyen arritmia ventricular, taquicardia, bradicardia, shock y se ha sugerido que el glifosato contribuye a la hipotensión a través de la depresión miocárdica (Tai *et al*., 1990, Talbot *et al*., 1991). La Asociación Estadounidense de Centros de Control por Envenenamiento informó que el glifosato es el herbicida más común al cual la población humana está expuesta (Bronstein *et al*., 2012). Dadas las anomalías cardiovasculares debidas a intoxicación por glifosato, en este trabajo se pretende evaluar si la exposición a glifosato a bajas concentraciones causa muerte celular en tejido cardiaco.

Se han caracterizado 19 tipos de muerte celular, de los cuales 12 están relacionados con enfermedades cardiacas y solo tres (autofagia, apoptosis y necrosis) se dan por exposición a químicos. Las primeras dos son muertes programadas, mientras que la última es una muerte accidental e inflamatoria (Baeza, 2014).

La muerte celular programada desempeña un papel importante en diferentes procesos, como es el mantenimiento de la homeostasis, en la eliminación de células dañadas y durante el desarrollo embrionario (Fuchs y Steller, 2011). Por otro lado, la muerte celular no programada o accidental forma parte de un amplio espectro de patologías humanas y animales (Baeza, 2014).

La importancia del pez cebra como modelo experimental en comparación con otros organismos modelo es que su desarrollo es similar al de los vertebrados de orden superior, incluidos los mamíferos (Rocha *et al*., 2001). La fisiología cardiaca de los humanos y los peces es similar. Por ejemplo, el potencial de acción cardiaco de los peces y humanos, se caracterizan por una larga duración y una fase 2 o "plateau" larga (donde el potencial de membrana permanece constante, ya que la membrana celular se está repolarizando lentamente y hay un equilibrio de carga), a diferencia de otros organismos modelo, como los ratones (Hu *et al*., 2001).

Si bien los experimentos de exposición existentes en pez cebra se han llevado a cabo *in vivo*, los modelos *ex vivo* presentan algunas ventajas respecto a modelos *in vitro* y modelos *in vivo*, ya que se conserva la estructura tridimensional del tejido y al mismo tiempo es posible controlar todas las variables ambientales eliminando el factor estrés (por liberación de cortisol *in vivo*), aunado a que de esta manera se trabaja específicamente con el órgano de interés. Adicionalmente se sabe que en el pez cebra, el corazón adulto mantiene su capacidad regenerativa después de una amputación ventricular o de daño farmacológico a partir de cardiomiocitos preexistentes, los cuales sufren un proceso de desdiferenciación limitada antes de reingresar al ciclo celular (Poss *et al*., 2002, Poss 2007; Jopling *et al*., 2010). Este proceso de desdiferenciación permite a las células proliferar antes de rediferenciarse para poder reemplazar el tejido dañado o perdido. Esta característica hace del pez cebra un excelente modelo para estudiar daño cardiaco. Sin embargo, a diferencia de los mamíferos que presentan cuatro cámaras cardiacas, el corazón del pez cebra es más simple y está formado tan sólo por dos cámaras cardiacas; un ventrículo (V) y un atrio (A), además de un bulbo arterioso (BA) y un seno venoso (Figura 1).

Figura 1. Corazón de pez cebra. El atrio (A) recibe la sangre por el seno venoso. El corazón bombea la sangre hacia el bulbo arterioso (BA) pasando por el atrio y el ventrículo (V). El ventrículo (V) lleva la sangre hacia la aorta ventral, la cual está conectada a las branquias.

2. ANTECEDENTES

El glifosato ha sido promovido como un herbicida que no presenta riesgos para la salud humana. Sin embargo, estudios epidemiológicos en humanos (De Roos *et al.,* 2003; McDuffie *et al*., 2001) y en animales (Kruger *et al*., 2014; Shehata *et al*., 2013) sugieren que el glifosato podría ser un factor que contribuye a defectos congénitos observados en poblaciones humanas que viven en o cerca de regiones agrícolas con cultivos transgénicos tolerantes a glifosato (Paganelli *et al.,* 2010; Laborde *et al*., 2014).

En un estudio realizado en Estados Unidos, se tomaron muestras en estanques, lagunas, ríos, lagos, humedales y drenajes, encontrando concentraciones de glifosato de hasta 476 ug/L. En México se han encontrado concentraciones de glifosato que van desde 0.026 hasta 1.7056 ug/L en cuerpos de agua de Áreas Nacionales Protegidas (Battaglig *et al.,* 2014). Además, se han encontrado concentraciones de glifosato en agua embotellada (0.0355 – 0.7883 ug/L) (Rendon-Von y Dzul-Caamal, 2017), así como en comidas procesadas y alimentos (Myers *et al*., 2016). En 2009, Monsanto declaró que los herbicidas que contenían glifosato eran usados en más de 130 países.

En cuanto a la cardiotoxicidad inducida por glifosato, en el año 2016, Roy y colaboradores expusieron embriones de pez cebra a concentraciones de 50 ug/L de glifosato, encontrando anomalías estructurales cardiacas y toxicidad cardiovascular. Por su parte, Costa y colaboradores (2007), expusieron renacuajos de rana toro a una concentración de glifosato de 1ppm (1000 ug/L), induciendo estrés oxidativo y afectando la función cardiaca. Por otro lado, en 2012, Gui y colaboradores utilizaron células PC12 (células de la médula adrenal de rata, originarias de la cresta neural) y las expusieron a una concentración de 44 mM (14 ug/L) de glifosato por 72h, sugiriendo que el glifosato podría inducir muerte celular por el mecanismo de autofagia y apoptosis.

Se ha reportado que altas concentraciones de glifosato reducen la funcionalidad mitocondrial (Lopes *et al.,* 2014), afectando la bioenergética mitocondrial e induciendo una permeabilización no selectiva de la membrana (Peixoto, 2005). Las mitocondrias son fundamentales para la función de los cardiomiocitos, puesto que en la contracción cardiaca se requiere energía en forma de ATP, y para garantizar un suministro continuo de ATP, los cardiomiocitos contienen gran cantidad de mitocondrias (Chen y Zweier, 2014).

Las mitocondrias son organelos presentes en las células eucariotas y son las encargadas de generar

energía en forma de ATP para un buen funcionamiento celular, por medio de la fosforilación oxidativa (Alberts *et al*., 2002). Además, las mitocondrias participan en el proceso de muerte celular programada y las alteraciones en sus membranas tienen consecuencias en la función y sobrevivencia de la célula (Geydan *et al*., 2006; Grimm y Brdiczka, 2007). Cuando ocurre un daño celular externo o intrínseco, o algún daño en el DNA, el ciclo celular se ve comprometido.

El ciclo celular es un proceso biológico bien controlado y cronometrado por el cual la célula se divide. Este proceso consta de cuatro pasos, Fase G1, las células crecen y reúnen nutrientes; Fase S, el DNA se duplica; Fase G2, se comprueba que el DNA se haya duplicado de manera correcta y se detectan posibles errores de replicación; Fase M, la célula se divide creando dos nuevas células (Kostoglou *et al*., 2015).

Este mecanismo de proliferación celular es un proceso cuidadosamente regulado. Uno de los marcadores de proliferación celular comúnmente utilizado es Antígeno Nuclear de Proliferación (PCNA), el cual es una proteína de 29-kDa que participa en la fase S (síntesis) del ciclo celular. PCNA juega un papel importante en el metabolismo de ácidos nucleicos, es esencial en la replicación de DNA y se expresa en células que se encuentran en proliferación activa (Kelman, 1997).

2.1. Mecanismos de Muerte Celular

Cuando existe daño, ya sea en la célula o en el DNA, y éste no puede ser reparado, la célula muere. Los mecanismos que controlan la muerte celular son diversos, se han identificado diferentes formas de muerte celular en respuesta a tóxicos entre los que destacan autofagia, necrosis y apoptosis (Leist *et al*., 2001) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características principales de los mecanismos de muerte celular a evaluar.

Mecanismo de muerte celular	Principales características
Autofagia	Muerte celular programada. Las células degradan sus propios componentes y los envuelven en vesículas para proceder a una degradación lisosomal.
Apoptosis	Muerte celular programada mediada por caspasas. Sólo se afectan las células que requieren ser eliminadas. La membrana celular no se destruye y el contenido se libera en cuerpos apoptóticos, siendo un proceso de muerte celular silencioso, ya que no genera una respuesta inflamatoria.
Necrosis	Muerte celular accidental, no programada. Es tóxica, afecta células vecinas y genera una respuesta inflamatoria.

2.1.1. Autofagia

La autofagia es un proceso catabólico complejo en el que las células degradan sus propios componentes y los envuelven en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas para proceder a una degradación lisosomal (Debnath *et al*., 2005; Kroemer y Levine, 2008). La autofagia juega un papel crucial en diferentes procesos bioquímicos, como sobrevivencia celular, estrés oxidativo, resistencia a la infección de patógenos y la eliminación de orgánulos y proteínas redundantes (Klionsky *et al*., 2016).

La regulación del mecanismo de autofagia es mediado por las modificaciones postraduccionales de proteínas autofágicas; un ejemplo son mTORC1 (mammalian Target Of Raoamycin Complex 1) y AMPK (AMP-activated protein Kinase), que regulan de manera opuesta y coordinada la actividad del Complejo ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase) (Mathai *et al*., 2017). La proteína AMPK promueve la activación de la autofagia (regulador positivo). El papel que juega AMPK es complejo y altamente dependiente del tipo celular y condiciones metabólicas (Klionsky *et al*., 2016). Una alta actividad de mTORC1 (regulador negativo) previene la activación de Ulk1 e interrumpe la interacción AMPK-Ulk1 (Shang *et al*., 2011). También, una menor producción de ATP inhibiría la activación de AMPK (ya que esta activación requiere un alto consumo de ATP), inhibiendo la autofagia (Carling *et al*., 2011).

Ulk1 podría ser la isoforma más predominante en el proceso de la autofagia (Chan *et al*., 2007). En el 2016, Fodor y colaboradores, evaluaron la expresión de genes relacionados con el mecanismo de autofagia en pez cebra, donde Ulk1b demostró ser estable durante el desarrollo embrionario.

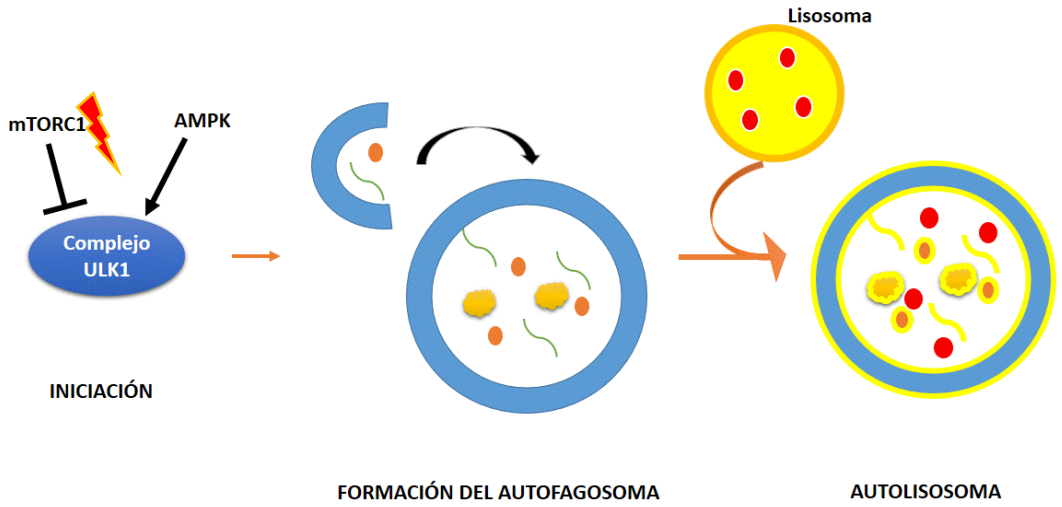


Figura 2. Esquematización del mecanismo de autofagia, en el cual el complejo ULK1 está regulado negativamente por mTORC1 y se activa por AMPK al provocarse un estrés o daño celular, iniciando el proceso de degradación lisosomal.

2.1.2. Apoptosis

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que se caracteriza por una pérdida en la adherencia de una célula a su matriz extracelular y a las células vecinas, reflejando cambios morfológicos (Taylor *et al*., 2008). Este mecanismo es dependiente de proteasas de cisteína (caspasas), las cuales se pueden dividir en caspasas iniciadoras (como Cas-8 o Cas-9) y caspasas efectoras (como Cas-3 o Cas-7) (Gordy y He Y-W, 2012).

En el proceso de apoptosis solo se afectan las células que requieran ser eliminadas, sin necesidad de afectar las células vecinas. La membrana celular no se destruye y el contenido se libera en cuerpos apoptóticos, siendo un proceso de muerte celular silencioso, ya que no genera una respuesta inflamatoria (Susin *et al*., 1999). La apoptosis puede ser inducida desde la superficie celular (apoptosis extrínseca) o mediante la estimulación de proteínas receptoras dependientes de

las mitocondrias (apoptosis intrínseca o mitocondrial) (Ashkenazi and Ditix, 1999; Green and Reed, 1998) (Figura 3).

La apoptosis extrínseca se inicia a partir de la unión de receptores de muerte a sus ligandos afines en la membrana celular, como Fas, TNFR1 o TRAIL (Gordy y He Y-W, 2012), dando como resultado la formación de DISC (Complejo de Señalización Inductor de Muerte), nucleado por FADD (proteína asociada a FAS con dominio de muerte) e incluyendo a procaspasa-8. Este reclutamiento resulta en la escisión y activación de Cas-8 (caspasa iniciadora en la ruta extrínseca), la cual inicia la cascada de señalización celular de apoptosis (Thome y Tschopp, 2001; Wilson *et al*., 2009) activando las caspasas efectoras.

Por otro lado, en la apoptosis intrínseca, también conocida como apoptosis mitocondrial, los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Bax y Bak) permeabilizan la membrana externa mitocondrial, lo cual permite una liberación de citocromo c, mientras que los miembros de la familia Bcl-2 anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x y Mcl-1) inhiben éstas proteínas pro-apoptóticas (Zhang *et al.,* 2005). Se ha comprobado que Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2gene) puede prolongar la sobrevivencia celular (Vaux et al., 1988). Además, se demostró que la sobre-expresión de Bcl-2 suprimía parcialmente la inducción de la apoptosis por p53 (Wang *et al*., 1993) (Reed, 1994).

La liberación de citocromo c de la mitocondria se considera un paso clave y de no retorno que inicia el proceso apoptótico. Una vez que el citocromo c es liberado al citoplasma se une a Apaf-1 (Apoptosis protease–activating factor 1). Apaf-1 es una molécula adaptadora y reguladora, que participa en la formación del apoptosoma. Al unirse Apaf-1 y citocromo c, reclutan y procesan a procaspasa-9 activándola en presencia de ATP, lo cual desencadena la cascada apoptótica, activando a caspasas efectoras como Cas-3 y Cas-7 (Zou *et al.,* 1999).

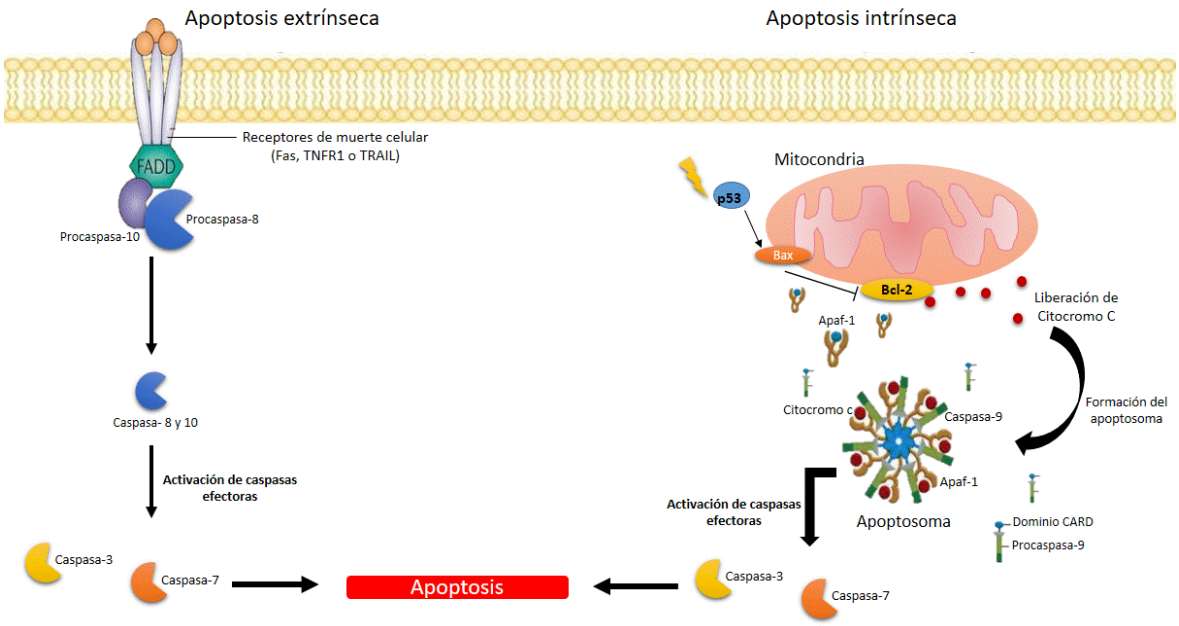


Figura 3. Mecanismos de muerte celular por apoptosis dependiente de caspasas. La ruta extrínseca se inicia mediante la unión de receptores de muerte celular (como Fas, TNFR1 o TRAIL), lo que resulta en la formación de DISC, reclutando a pro-caspasa 8 y activándola como caspasa-8, la cual desencadena la cascada apoptótica. En la ruta intrínseca, p53 activa a Bax, inactivando a Bcl-2 y liberando citocromo c, para dar lugar a la formación del Apoptosoma activando a Apaf-1 y Cas-9, iniciando la cascada proteolítica para que ocurra la muerte celular programada mediada por caspasas efectoras (Cas-3 y Cas-7).

2.1.3. Necrosis

La necrosis es un mecanismo de muerte celular no programada, tóxica, que afecta células vecinas y genera una respuesta inflamatoria; ésta se puede diferenciar de la apoptosis fácilmente, ya que los factores que se desencadenan en la necrosis son de carácter tóxico, hipóxico y patológico (Figura 4). Una de las características en la necrosis, es la disminución de ATP. Esta inhibición en la producción de ATP se produce por un aumento en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial, el cual causa una sobrecarga y despolariza la membrana mitocondrial interna de manera irreversible. Esto produce una hinchazón y un rompimiento de la membrana mitocondrial externa (Baeza, 2014).

En la necrosis, la membrana celular se destruye y esto permite que elementos tóxicos escapen y provoquen un proceso inflamatorio nocivo en el organismo; la desintegración celular es independiente de ATP (Arboleda *et al*., 2008).

En la necrosis celular hay un incremento de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (DHL), que es una proteína que actúa en lactatos y piruvatos con una conversión de NAD (dinucleótido de anenina-nicotinamida) reducido a NADH (Aranda, 2010).

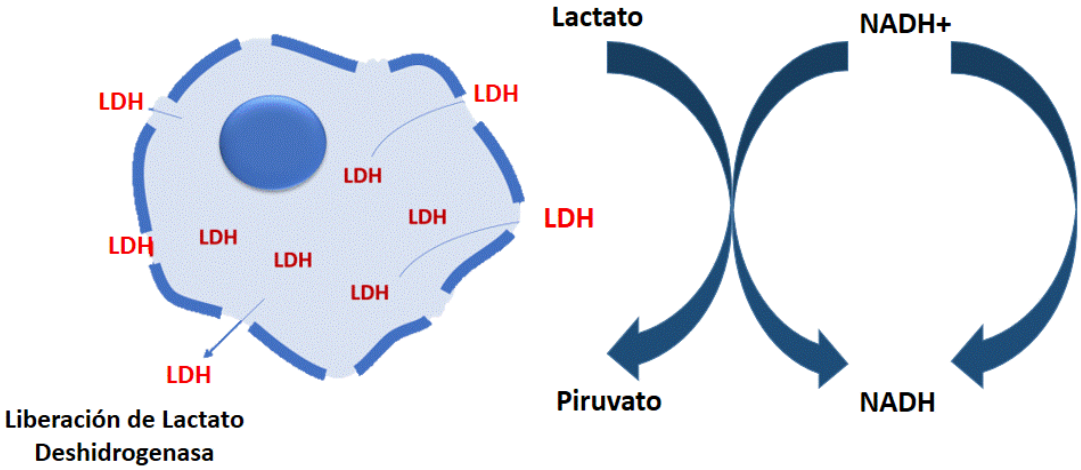


Figura 4. Liberación de LDH durante la necrosis celular por daño celular, donde el piruvato se reduce a lactato, esto por la oxidación de NADH a NAD+, aumentando los niveles de LDH, produciendo muerte celular no programada (accidental).

2.2. Corazón de Pez Cebra en un Sistema *Ex vivo*

Se ha demostrado que el corazón completo de un pez cebra adulto se puede mantener en buenas condiciones hasta por tres días en cultivo, ya que la estructura y el patrón de estriación cruzada de los cardiomiocitos permanece sin cambios. Después del día cuatro, el corazón sufre un deterioro significativo tanto en la función ventricular, como en el latido cardiaco con la pérdida de estriación, núcleos picnóticos e hinchazón celular. Estos cambios se pueden observar a nivel histológico como muerte celular y pérdida de la integridad celular de los cardiomiocitos (Pieperhoff *et al.,* 2014).

El sistema *ex vivo* puede ser útil en el estudio de mecanismos de acción y procesos celulares particulares; una desventaja es que pierde la interconexión sistémica y por tanto la señalización celular a distancia, por lo que los resultados deben interpretarse en el contexto en el que se lleva a cabo el experimento. En este sentido, este trabajo pretende estudiar el efecto cardiotóxico del

glifosato en bajas concentraciones, utilizando como organismo modelo al pez cebra en un sistema *ex vivo*, con particular interés en los procesos de muerte celular.

Existen algunos estudios sobre la toxicidad del glifosato en el pez cebra, la mayoría en peces adultos; por ejemplo, el efecto del glifosato en la calidad del esperma (Lopes *et al*., 2014), o alteraciones estrogénicas en ovarios de hembras adultas (Armiliato *et al*., 2014).

Los estudios realizados a la fecha indican que el glifosato es cardiotóxico; sin embargo, la cardiotoxicidad del glifosato no ha sido evaluada a concentraciones ambientalmente relevantes. Además, estas concentraciones son difíciles de detectar dado a la alta solubilidad del glifosato, el cual se encuentra disperso en el medio ambiente.

Las concentraciones ambientales bajas de glifosato pueden causar daño cardiaco a nivel sub-clínico que con el tiempo podría desarrollar cardiopatías. De acuerdo con la Organización mundial de la salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo; más del 80% de las defunciones se debe a cardiopatías. Por este motivo es importante evaluar el daño cardiaco por exposición a glifosato en concentraciones bajas presentes en el ambiente

3. HIPÓTESIS

Dado que 1) el glifosato es un herbicida ampliamente utilizado en la industria agrícola, se encuentra disperso en el medio ambiente y se ha encontrado en comidas procesadas, 2) los mecanismos de muerte celular por exposición a tóxicos incluyen apoptosis, autofagia y necrosis, los dos primeros son procesos programados, mientras que el tercero es accidental e inflamatorio y 3) existen estudios que indican cardiotoxicidad por exposición a glifosato, se plantea la hipótesis de que la exposición a bajas concentraciones de glifosato en un sistema *ex vivo* causará muerte celular en el corazón sin provocar paro cardiaco.

3.1 Preguntas de Investigación

1. ¿Cuál es la mínima concentración de glifosato que causa muerte celular en el corazón en un sistema *ex vivo*?
2. ¿Cuál es el mecanismo de muerte celular en el corazón causada por exposición a bajas concentraciones de glifosato?

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Entender el mecanismo de muerte celular en el corazón causado por exposición a concentraciones bajas de glifosato

4.2. Objetivos Específicos

1) Establecer la concentración cardiotóxica experimental de glifosato en corazones de pez cebra bajo condiciones *ex vivo*.
    a. Determinar la concentración más baja que cause cardiotoxicidad mediante un ensayo de exposición que permita medir:
        - El ritmo cardiaco (latidos por minuto) en corazones expuestos a diferentes concentraciones de glifosato.
        - La proliferación celular mediante la expresión génica de PCNA.
2) Determinar el mecanismo de muerte celular por exposición a bajas concentraciones de glifosato utilizando marcadores de apoptosis, autofagia y necrosis

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se realizaron cuatro bioensayos diferentes. El primero para medir ritmo cardiaco y 4 concentraciones bajas de glifosato (0.001, 0.01, 0.1 y 1 ug/L) de acuerdo al objetivo 1, para evaluar proliferación celular. El segundo, se realizó para para medir expresión génica de los marcadores de muerte celular, con las dos concentraciones de glifosato (0.01 y 1 ug/L) seleccionadas a partir del primer bioensayo. El tercer bioensayo se realizó para medir la actividad de Cas3, como marcador de apoptosis. Finalmente, el cuarto ensayo se realizó para medir la liberación de Lactato Deshidrogenasa como marcador de necrosis.

5.1. Cultivo de Corazón de Pez Cebra *Ex vivo* para Medir Ritmo Cardiaco y Proliferación Celular (Expresión de *pcna*)

Los peces cebra (20-25 mm longitud total) se sumergieron en solución salina estéril 0.9% estéril. Posteriormente, se anestesiaron por medio de inmersión en solución de tricaína estéril al 2% durante 30 segundos y se realizó eutanasia (Pieperhoff *et al*., 2014). Inmediatamente se procedió con la disección de corazón (n=24). Los corazones fueron lavados en solución PBS 1X (Gibco), suplementados con antibióticos-antimicóticos (Estreptomicina, Penicilina y Fungizona) (Gibco) al 1% esterilizados por filtración, aproximadamente por 3 minutos. Durante este periodo se midió el ritmo cardiaco por 1 minuto y después, los corazones fueron transferidos a medio de cultivo DMEM (Gibco) (suplementado con 10% FBS (Suero Fetal Bovino) y antibióticos-antimicóticos al 1%), durante una hora.

Posteriormente, una hora después de la siembra, se tomó el ritmo cardiaco de cada corazón por 1 minuto nuevamente y se colocaron en una placa de 24 pozos (Thermo-Fisher), que contenían de manera aleatorizada 500 uL de tratamiento de glifosato (0.001, 0.01, 0.1 y 1 ug/L), con una réplica de 4 corazones por tratamiento + 8 controles. Fueron incubados bajo atmósfera humidificada y CO_2 al 5%, a una temperatura de 28°C por 24 horas.

Al término de las 24 horas, se tomó el ritmo cardiaco de cada corazón por 1 minuto, e

inmediatamente se realizó la cosecha y se colocaron en RNAlater y se almacenaron en frío, para la posterior extracción de RNA (Figura 5).

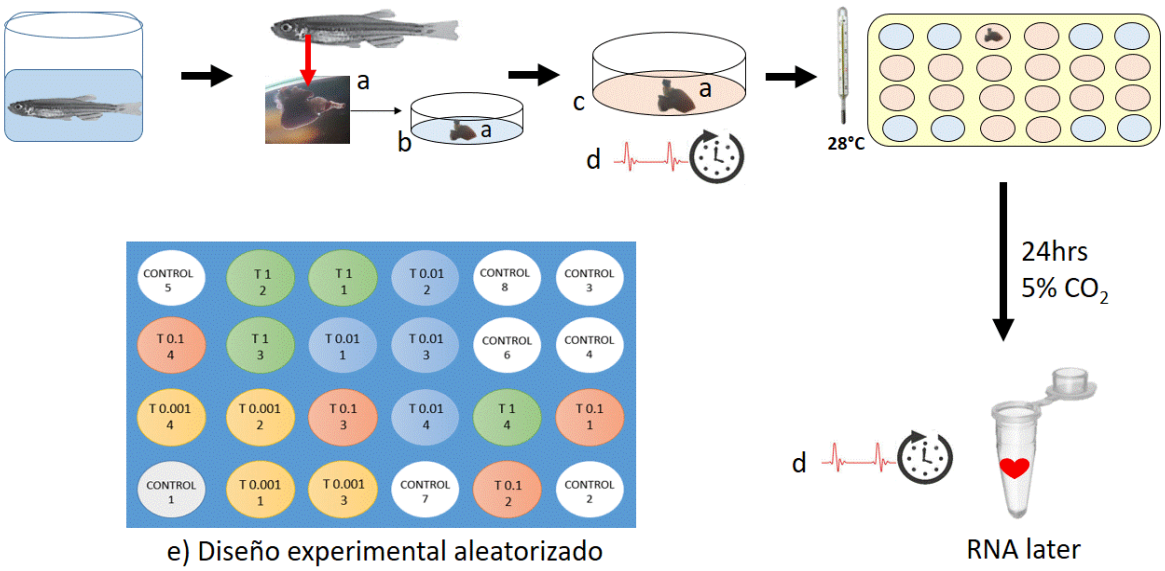


Figura 5. Cultivo de corazón de pez cebra *ex vivo* y ritmo cardiaco. Se anestesiaron los peces cebra por inmersión en tricaína al 2%. Se removió el corazón (a) y se colocó en una placa de Petri que contenía medio PBS 1X (b) adicionado con 1% de antibióticos-antimicóticos (anti-anti), durante tres minutos. Después, el corazón (a) se colocó en una placa Petri que contenía medio de cultivo DMEM (c) adicionado con 10% de FBS y 1% de anti-anti, durante 1 hora y se midió el ritmo cardiaco (d). Inmediatamente después, se colocaron los corazones en una placa de cultivo celular, previamente llenada con las diferentes concentraciones de glifosato, durante 24 horas a 28ºC y 5% CO_2. Al finalizar el bioensayo, se volvió a medir el ritmo cardiaco (b), se realizó la cosecha de corazones y se colocaron en RNAlater. e) Diseño experimental utilizado en el bioensayo. n=24; 8 réplicas por control y 4 por tratamiento.

Con base a los resultados obtenidos en el primer bioensayo (Figura 5), se realizó un segundo bioensayo, para el cual se eligieron solamente dos concentraciones de glifosato (0.01 y 1 ug/L), como se explica a continuación.

5.2. Cultivo de Corazón de Pez Cebra *Ex vivo* para Medir Expresión Génica de Marcadores de Muerte Celular

Los peces cebra (20-25 mm longitud total) se anestesiaron por medio de inmersión en tricaína al 2% durante 30 segundos y se realizó eutanasia. Inmediatamente se procedió con la disección de corazón (n=18). Se lavaron los corazones en medio PBS (Gibco) adicionado con antibióticos-antimicóticos (Estreptomicina, Penicilina y Fungizone) (Gibco) al 1%, aproximadamente por 3 minutos. Después, los corazones fueron transferidos a medio de cultivo DMEM (Gibco) (adicionado con 10% FBS y antibióticos-antimicóticos al 1%), durante una hora. Posteriormente, cada corazón fue transferido a una placa de 24 pozos (Thermo-Fisher), llenada previamente de manera aleatorizada con las concentraciones de glifosato seleccionadas (0, 0.01 y 1 ug/L), utilizando 6 réplicas por tratamiento. Las condiciones de incubación fueron: 28°C adicionado de 5% CO_2, durante 24 horas. Al término de las 24 horas, los corazones se transfirieron a RNA-later (Figura 6).

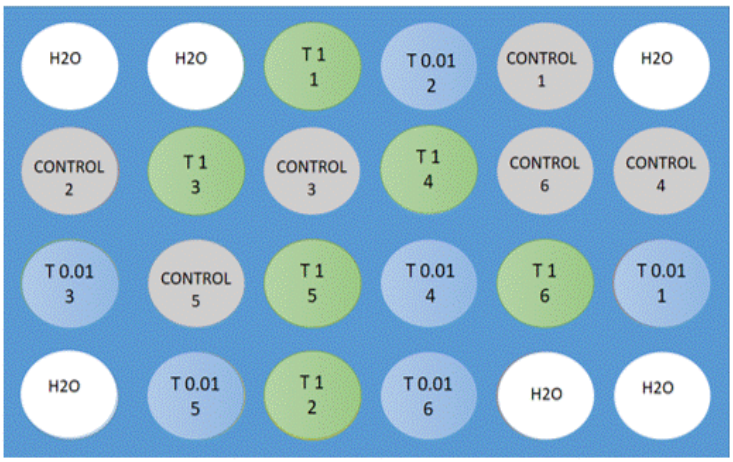


Figura 6. Diseño experimental aleatorizado utilizado en el cultivo de corazón de pez cebra *ex vivo* para expresión génica.

5.3. Expresión Génica

5.3.1. Extracción de RNA y Síntesis de cDNA

Se realizó la extracción de RNA con el reactivo TRIsure (Bioline) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La digestión de DNA genómico total se llevó a cabo con el kit TURBO DNA free (Invitrogen) según el protocolo del fabricante, esto para eliminar la contaminación por DNA genómico. La síntesis de cDNA se realizó a partir del RNA con la adición de random primers (Promega), se incubó a 70°C por 10 minutos e inmediatamente se colocó en hielo y se centrifugó. La transcriptasa reversa utilizada en la síntesis de cDNA fue ImProm-II (Promega), en presencia de Ribolock Inhibidor de RNAsa (Thermo Fisher Scientific), Buffer 5x M-MLV y dNTPs 10mM (Promega).

5.3.2. Amplificación por PCR Punto Final

Para las reacciones confirmativas de PCR punto final se utilizó el gen de referencia 18S rRNA. Las reacciones de PCR consistieron en la preparación de la mezcla (según reacciones a realizar), la cual contiene $MgCl_2$ 1.5mM, dNTPs 0.2mM, Buffer 1x, Primer forward y reverse 0.1 uM y Taq Polimerasa 5U (Promega). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo por 30 segundos a 95°C, 40 ciclos por 20 segundos a 95°C y 20 segundos dependiendo la temperatura de amplificación para cada gen (Tabla 1).

5.3.3. Amplificación por PCR Cuantitativo (RT-qPCR)

Para medir la expresión de los genes experimentales por RT-qPCR tiempo real, se utilizaron *β*-

actin, *ef1α* y *rpl13α* como genes de referencia (Tang *et al*., 2007); con el kit Luna qPCR Unirversal (New Enlgand BioLabs) en el termociclador CFX96 (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo por 30s a 95°C, 40 ciclos por 20s a 95°C y 20s a la temperatura de amplificación para cada gen (Cuadro 2).

Se calculó la media geométrica de acuerdo con los genes referenciales para calcular la expresión génica con el método $E=10^{(-1/slope)}$ de acuerdo a Pffafl, 2004.

Cuadro 2. Secuencias y temperatura de amplificación (Ta) de los genes de referencia y los genes experimentales.

Genes	Referencia	Secuencia 5' -3'	Ta (Cº)
ef1α	**Tang *et al*., 2007**	Forward CTGGAGGCCAGCTCAAACAT Reverse ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC	60
rpl13α	**Tang *et al*., 2007**	Forward TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC Reverse AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	60
β-actin	**Tang *et al*., 2007**	Forward CGAGCTGTCTTCCCATCCA Reverse TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG	60
pcna	**Torres-Velarde *et al*., 2018**	Forward CTCGCCATGGGAGTCAACCT Reverse GGCATCTTCACCACACAGCTGT	60
ulk1b	**Fleming, 2011**	Forward GGCATCTAGAGTCGTGTGGCAGT Reverse ACATGCTGGAGATCCATCAGAGC	60
cas-3	**Deng *et.al.*, 2009**	Forward CCGCTGCCCATCACTA Reverse ATCCTTTCACGACCATCT	54
cas-9	**Luzio *et.al.*, 2013**	Forward CTGAGGCAAGCCATAATCG Reverse AGAGGACATGGGAATAGCGT	58
bax	**Deng *et.al.*, 2009**	Forward GGCTATTTCAACCAGGGTTCC Reverse TGCGAATCACCAATGCTGT	60
bcl-2	**Deng *et.al.*, 2009**	Forward TCACTCGTTCAGACCCTCAT Reverse ACGCTTTCCACGCACAT	60
apaf-1	**Deng *et.al.*, 2009**	Forward TTCTACAGTAAACGCCCACC Reverse TATCTAGTATTTCCCCATATTCC	60

5.4. Cultivo de Corazón de Pez Cebra E*x vivo* para Medir la Actividad de Cas3

Al término de las 24 horas en tratamiento (Figura 7), se cosecharon los corazones y se colocaron en 50 uL de Buffer de lisis (BioVision). Se homogenizó durante 10 minutos, después, se centrifugó por 2 minutos a 10000 rpm y el sobrenadante (extracto citosólico) se transfirió a un tubo nuevo. La muestra se congeló a -20°C (Figuras 8).

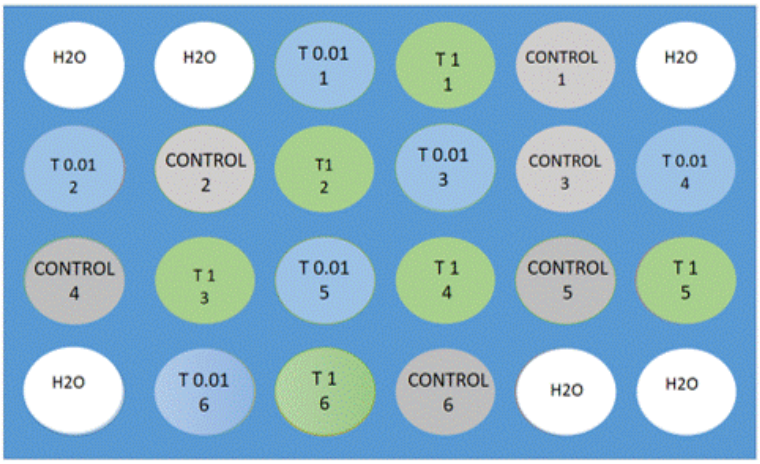


Figura 7. Diseño experimental aleatorizado utilizado en el cultivo de corazón de pez cebra *ex vivo* para medir la actividad de Cas3.

5.5. Actividad de Cas3

5.5.1. Curva Bradford

Se preparó un stock de Albúmina Bovina Sérica (ABS) al 20% y se realizaron diluciones (20-200 ug) para la curva de calibración. En una placa de 96 pozos, se agregaron 10 uL de cada dilución por triplicado. Un minuto antes de leer la absorbancia en el lector de placas, se agregaron 200 uL de reactivo Bradford 1x (Bio-Rad). La absorbancia se midió por 5 minutos a 400 nm en un lector

de microplacas Epoch 2 (Biotek).

Para determinar la concentración de proteína de cada corazón, se tomaron 10 uL de muestra (diluida 1:20), se le agregraron 200 uL de reactivo Bradford 1x y se midió la absorbancia por 5 minutos a 400 nm (Figura 8).

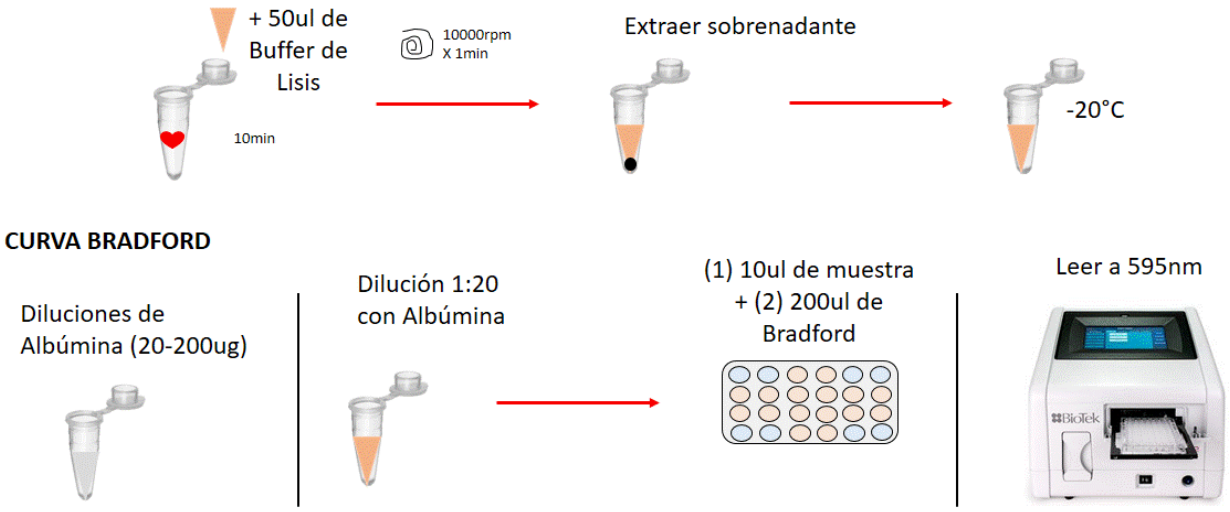


Figura 8. Concentración de proteína. Se realizó la lisis de los corazones de pez cebra con buffer de lisis, se extrajo el sobrenadante y la muestra se congeló a -20ºC. Para la curva Bradford, se realizaron diluciones de albúmina al 20% (20-200 uL) y se ordenaron de menor a mayor en una placa de 96 pozos. Se agregó la muestra respectivamente a cada dilución, por triplicado y se midió la absorbancia a 595 nm.

5.5.2. Actividad de Cas3

La actividad de Cas3 se realizó por método colorimétrico con el Kit Caspase 3/CPP32 Colorimetric Assay (catálogo #K106). Una vez conocida la concentración de proteína por corazón; se diluyeron 60 ug de proteína en 50 uL de buffer de lisis para cada ensayo. Se agregó 50 uL de Buffer 2x (adicionado con DTT 1:10) a cada muestra. Se adicionaron 5 uL del sustrato DEVD-pNA (4 mM) a cada muestra y se incubaron a 37°C durante 1 hora en una placa de 96 pozos. Al término del ensayo, las muestras se leyeron a 400 nm en un lector de microplacas Epoch 2 (Biotek) (Figura 9).

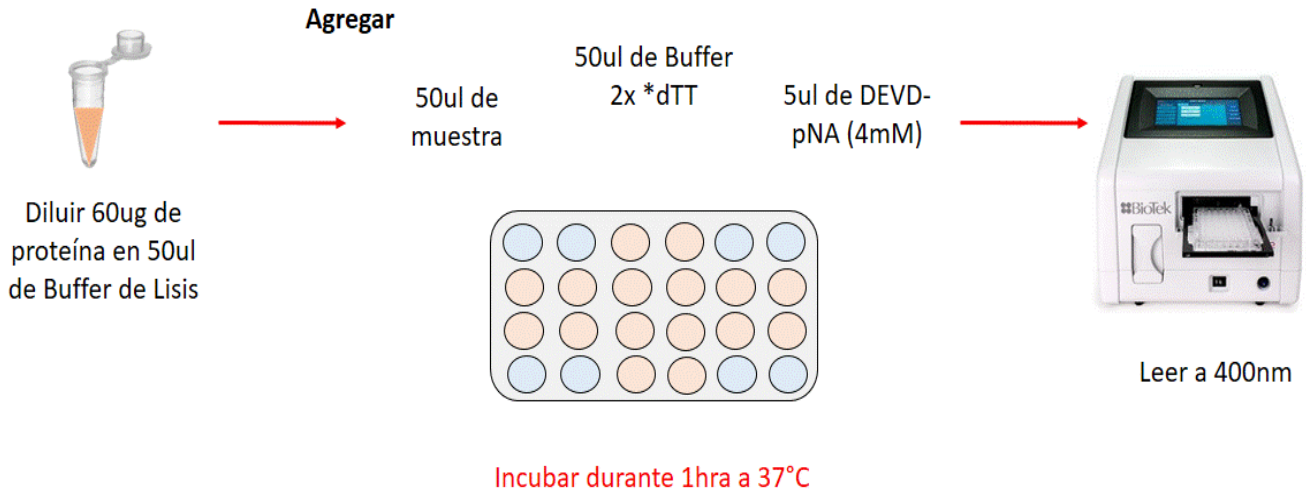


Figura 9. Actividad de Cas3. Se diluyó la proteína en buffer de lisis y se agregó a una placa de 96 pozos previamente llenada con la solución mix. Se incubó durante 1 hora a 37ºC y se midió la absorbancia a 400 nm.

5.6. Cultivo de Corazón de Pez Cebra E*x vivo* para Medir la Liberación de LDH (Lactato Deshidrogenasa)

Al término de las 24 horas en tratamiento, se cosecharon los corazones y se colocaron en 400 uL de albúmina al 20%. Se homogenizó durante 2 minutos y se congeló a -80°C (Figuras 10 y 11).

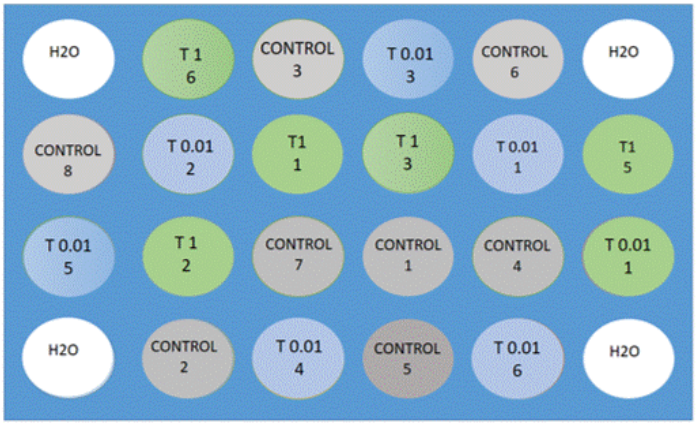


Figura 10. Diseño experimental aleatorizado utilizado para el cultivo de corazón de pez cebra *ex vivo* para medir liberación de LDH.

5.7. Liberación de Lactato Deshidrogenasa

La liberación de Lactato Deshidrogenasa se realizó por método colorimétrico mediante el kit LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay de BioVision (catálogo #K313). Se necesitaron de 3 controles para el ensayo; 1) Control normal (albúmina al 20%), 2) Control bajo (muestra control) y 3) Control alto (muestra control + Triton x-100 al 1%). Con una n=20; 6 réplicas por control y tratamiento + 1 control alto + 1 control bajo (normal). En el control alto, se agregaron 4 uL de Triton x-100 (1%) en 400 uL de albúmina al 20%. En una placa de 96 pozos, se añadieron 50 uL de muestra por triplicado (controles + tratamientos). Inmediatamente, se preparó el mix, el cual consistió en 0.0875 uL de solución Catálisis + 3.9375 mL de solución Dye. Se agregaron 50 uL de la solución mix a cada muestra (por triplicado). Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la luz y se midió la absorbancia a 495 nm en un lector de de microplacas Epoch 2 (Biotek) (Figura 11).

Figura 11. Liberación de LDH. Se homogenizaron los corazones de pez cebra con albúmina al 20% y se almacenaron a -80ºC. Se agregaron los controles y la muestra a una placa de 96 pozos previamente llenada con solución mix. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 495 nm.

5.8. Análisis Estadísticos

Para determinar el número de muestra utilizado en los bioensayos, se realizó una prueba de poder utilizando los datos obtenidos en un bioensayo preliminar, con ayuda del programa estadístico Rstudio.

Para conocer la normalidad de los valores de cada marcador de muerte celular analizado, se llevó a cabo una prueba Shapiro-Wilk; a los marcadores que no cumplieron con el supuesto de normalidad (*cas-9*, *ulk1b* y LDH) se les realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Después se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Para el marcador de proliferación celular (*pcna*) se llevó a cabo una prueba de comparaciones múltiples "all pairwise" Holm-Sidak, esto para determinar las concentraciones con menor proliferación celular. En los marcadores de muerte celular se realizaron pruebas de comparaciones múltiples contra el control (Holm-Sidak), esto para deducir si existían diferencias significativas entre los tratamientos de glifosato. Los análisis se realizaron con ayuda del programa estadístico SigmaPlot.

6. RESULTADOS

6.1. Ritmo Cardiaco en Cultivo *Ex vivo*

Los datos de latido cardiaco en condiciones *ex vivo* fueron tomados a las 0, 1 y 24 horas (Figura 12), donde se observa que el ritmo cardiaco disminuye significativamente a la primera hora respecto al control (p=0.001). A las 24 horas se observa que vuelve a disminuir, pero sin diferencias significativas respecto a 1 hora.

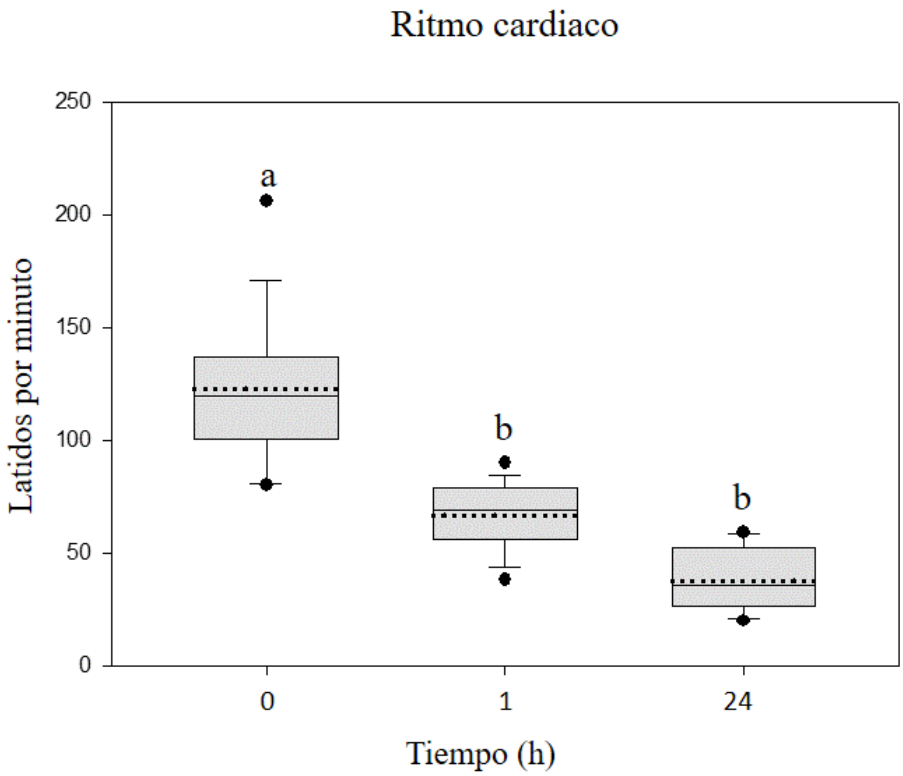


Figura 12. Ritmo cardiaco (latidos por minuto) en corazones de pez cebra en cultivo *ex vivo.* El tiempo 0 se refiere a los corazones recién diseccionados; 1 y 24 representan el tiempo post-disección de los corazones cultivados en condiciones *ex vivo*. Letras diferentes indican diferencias significativas en el ritmo cardiaco entre los tiempos. La línea sólida representa la mediana y la línea punteada representa la media, p<0.05

6.2. Ritmo Cardiaco *Ex vivo* en Corazones Expuestos a Glifosato a 24 Horas de Cultivo

Los datos de latido cardiaco en corazones expuestos a glifosato por 24 horas se muestran en la Figura 13. Se observa un decremento en el ritmo cardiaco en todas las concentraciones sin mostrar diferencias significativas ni entre ellas ni respecto al control (p=0.452).

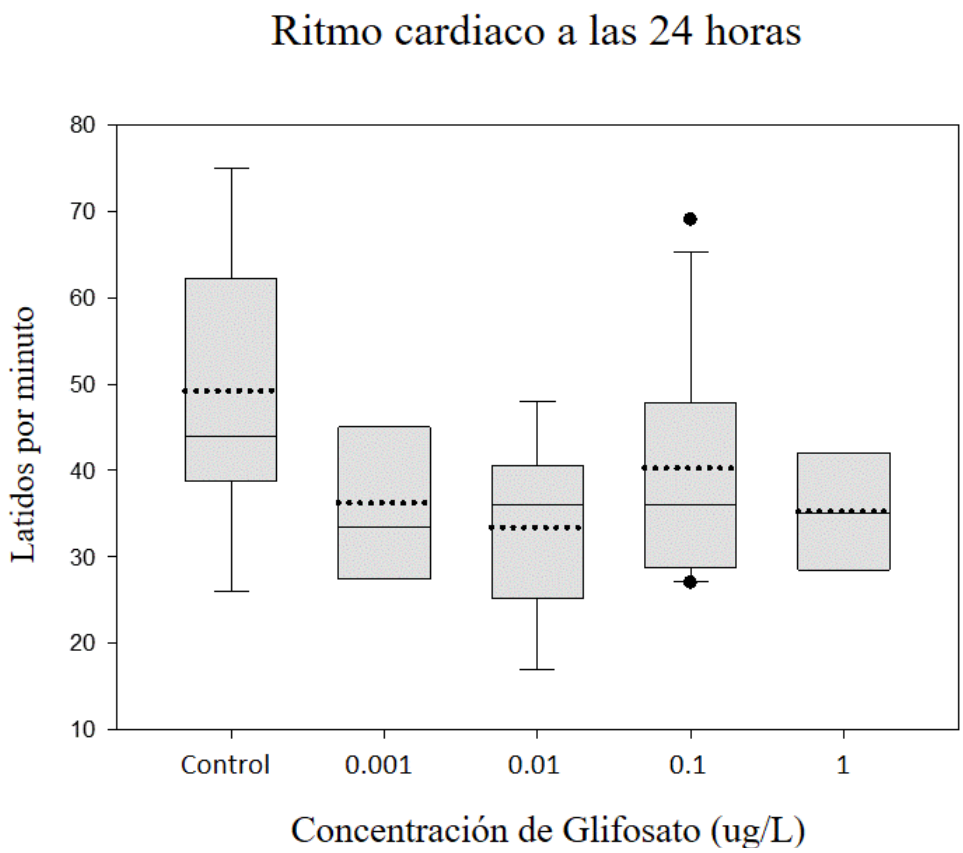


Figura 13. Ritmo cardiaco (latidos por minuto) en corazones de pez cebra expuestos a glifosato. La línea sólida representa la mediana y la línea punteada representa la media.

6.3. Expresión Génica

6.3.1. Proliferación y Muerte Celular en Corazones Expuestos a Glifosato *Ex vivo*

Como primer paso, se realizaron las curvas estándar de cada gen referencial (*β-actin, ef1α* y *rpl13α*) (Tang *et al*., 2007) para evaluar especificidad y eficiencia de amplificación, los resultados se muestran en la Figura 14.

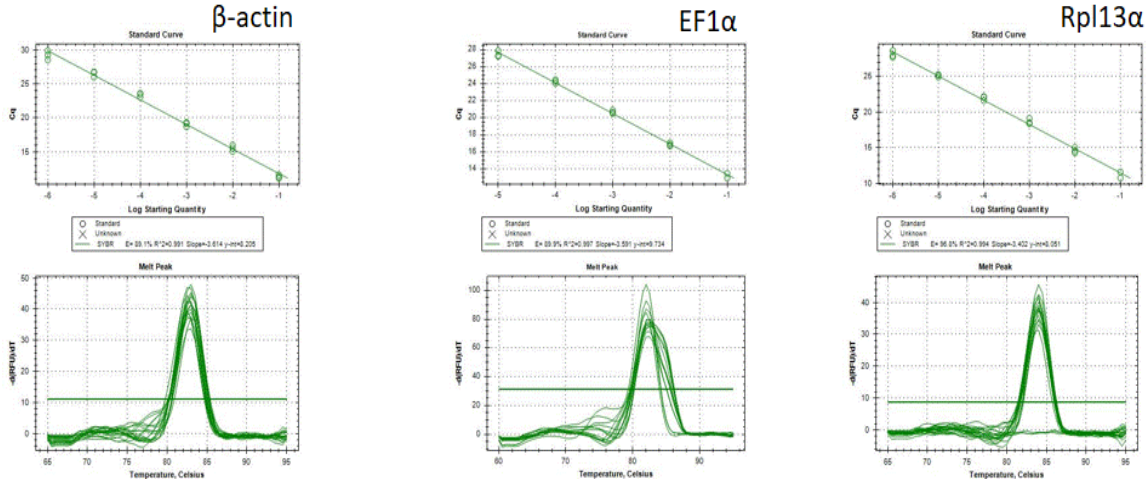


Figura 14. Curva estándar y "melt peak" de los genes de referencia (*β-actin, ef1α y rpl13α*).

Posteriormente, se realizaron las curvas estándar de cada gen experimental (*ulk1b, cas3, apaf-1, bax, bcl-2, cas9 y pcna*) (Fleming, 2011; Deng *et al.,* 2009; Luzio et al., 2013; Torres-Velarde et al., 2018), los resultados se muestran en la Figuras 15 y 16.

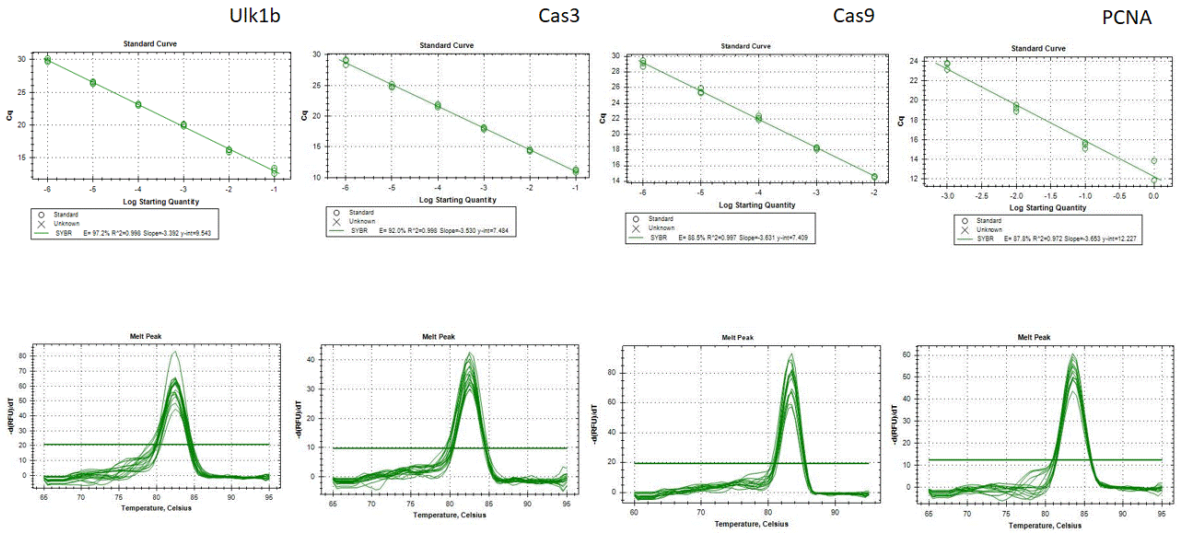


Figura 15. Curva estándar y "melt peak" de los genes experimentales (*ulk1α, cas3, cas9* y *pcna*).

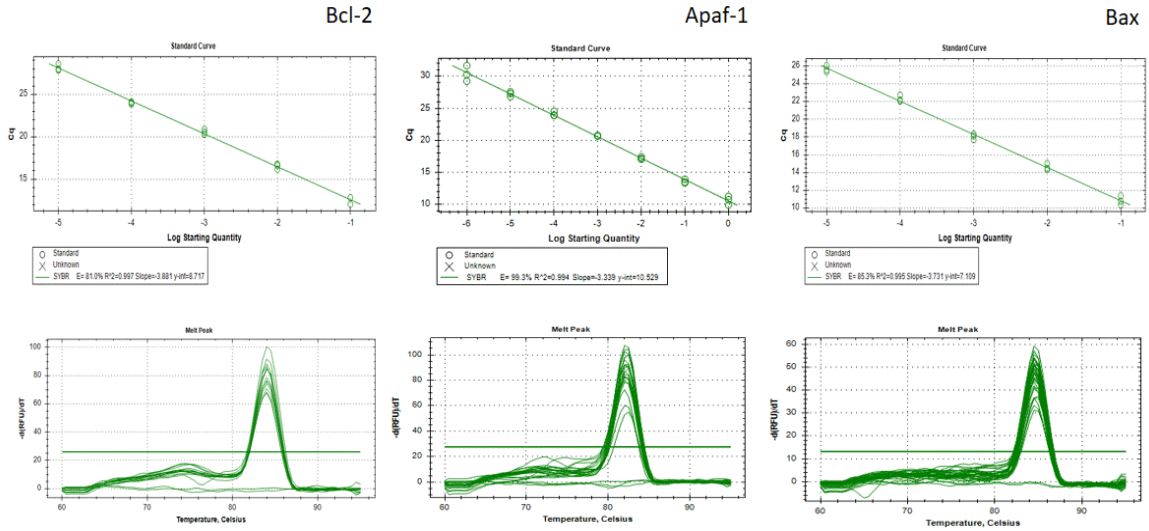


Figura 16. Curva estándar y "melt peak" de los genes experimentales (*bcl-2, apaf1* y *bax*).

El cuadro 3 muestra los datos de amplificación de los tres genes de referencia y los genes experimentales. Se calculó tanto la eficiencia de amplificación como el factor de amplificación mediante la ecuación $E=10^{(-1/slope)}$. La expresión génica se calculó utilizando las eficiencias de amplificación de acuerdo al método de Pffafl (2004).

Cuadro 3. Parámetros de amplificación de los genes de referencia y los genes experimentales.

Genes	Pendiente	R^2	Eficiencia (%)	Factor de Amplificación
β-actin	-3.614	0.991	89.1	1.89
ef1α	-3.591	0.997	89.9	1.90
rpl13α	-3.402	0.994	96.8	1.97
pcna	-3.653	0.972	87.8	1.88
ulk1b	-3.392	0.998	97.2	1.97
cas-3	-3.530	0.998	92	1.92
cas-9	-3.631	0.997	88.5	1.89
apaf-1	-3.339	0.994	99.3	1.99
bax	-3.731	0.995	85.3	1.85
bcl-2	-3.881	0.997	81	1.81

6.3.2. Expresión de *pcna*

Para evaluar la proliferación celular se midió la expresión de *pcna*, obteniendo diferencias significativas (p=0.003) en las concentraciones 0.01 y 1 ug/L (Figura 17).

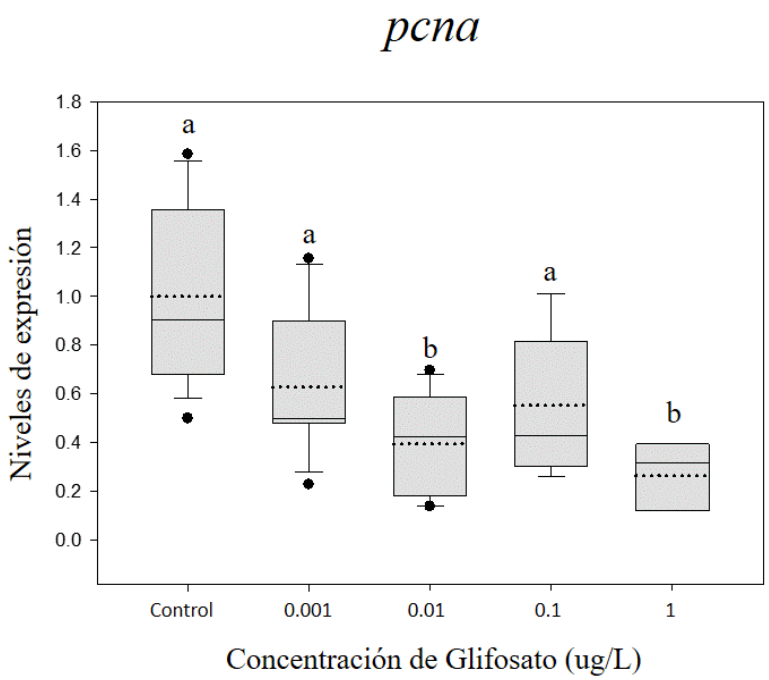


Figura 17. Expresión de *pcna* (marcador de proliferación celular) en corazones de pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de glifosato (0.001, 0.01, 0.1 y 1 ug/L). Letras diferentes indican diferencias significativas en la expresión de *pcna*. La línea sólida representa la mediana y la línea punteada representa la media. El área dentro de la caja representa percentiles de 25 y 75, las barras de error representan percentiles de 5 y 95, los puntos representan "outliers", p<0.05

Para medir muerte celular por apoptosis, autofagia y necrosis, se eligieron las dos concentraciones de glifosato que mostraron diferencias significativas en la expresión de *pcna* (0.01 y 1 ug/L).

6.4. Autofagia

6.4.1. Expresión de *ulk1b*

Para evaluar la muerte celular por autofagia, se midió la expresión de *ulk1b* (complejo de iniciación del autofagosoma) sin observarse diferencias significativas en los tratamientos 0.01 y 1 ug/L, respecto al control (Figura 20).

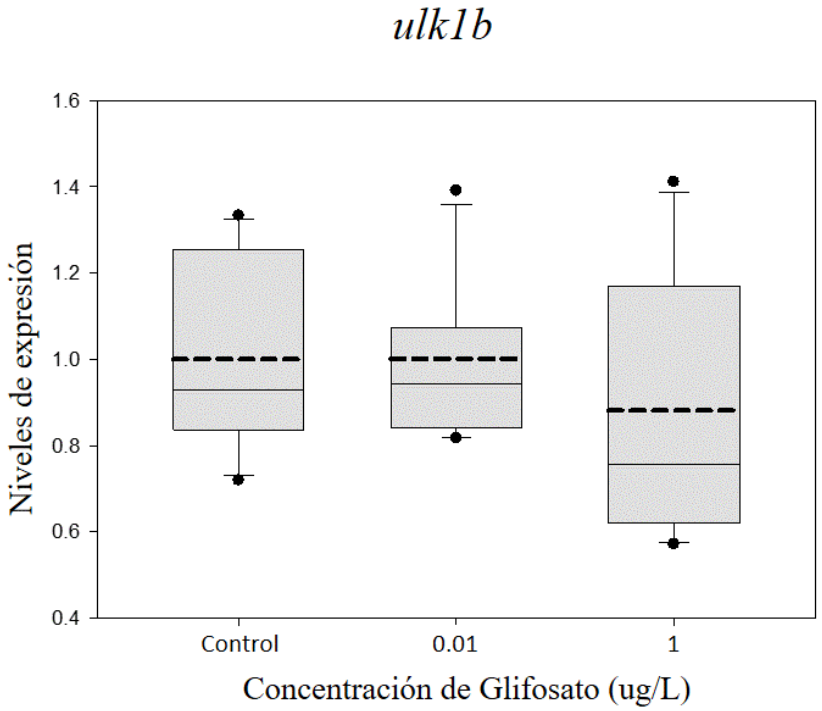


Figura 18. Expresión de *ulk1b* (marcador de Autofagia) en corazones de pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de glifosato (0.01 y 1 ug/L). La línea sólida representa la mediana y la línea punteada representa la media.

En los resultados se puede observar que la expresión de *ulk1b* (que participa en el complejo iniciador de la autofagia) no presenta diferencias significativas, esto sugiere que no hay una activación inicial del mecanismo de autofagia por exposición a bajas concentraciones de glifosato.

6.5. Apoptosis

Para evaluar la muerte por apoptosis se midió la expresión de *cas-3, cas-9, apaf-1, bax y bcl-2* y la actividad de Cas3.

6.5.1. Expresión de *cas-3*

Se midió la expresión de c*as-3* (caspasa efectora), sin observarse diferencias significativas entre las concentraciones y el control (Figura 18).

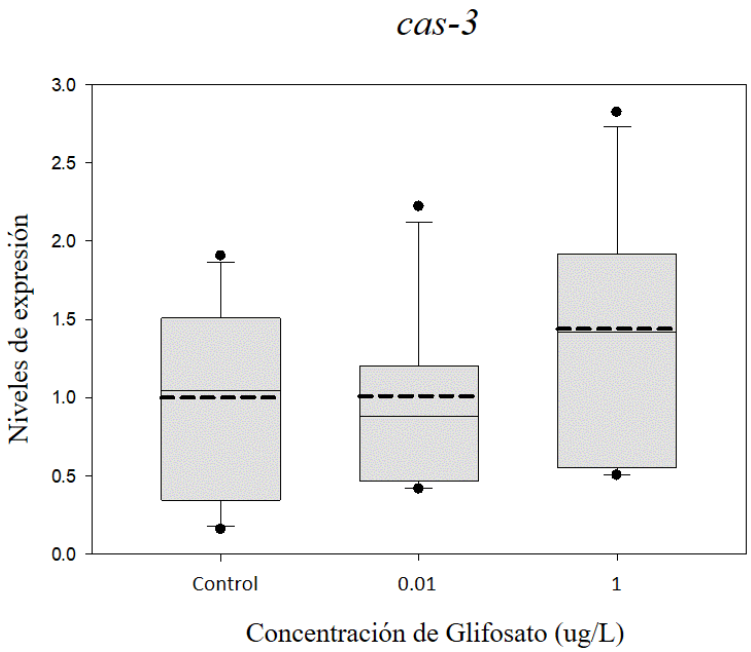


Figura 19. Expresión génica de c*as-3* (marcador de apoptosis) en corazones de pez cebra expuestos a dos concentraciones de glifosato (0.01 y1 ug/L). La línea sólida representa la mediana y la línea punteada representa la media.

6.5.2. Expresión de *cas-9*

Se midió la expresión de *cas-9* (caspasa iniciadora, forma parte del apoptosoma) observándose diferencias significativas (p=0.008) en ambos tratamientos (0.01 y 1 ug/L) (Figura 19).

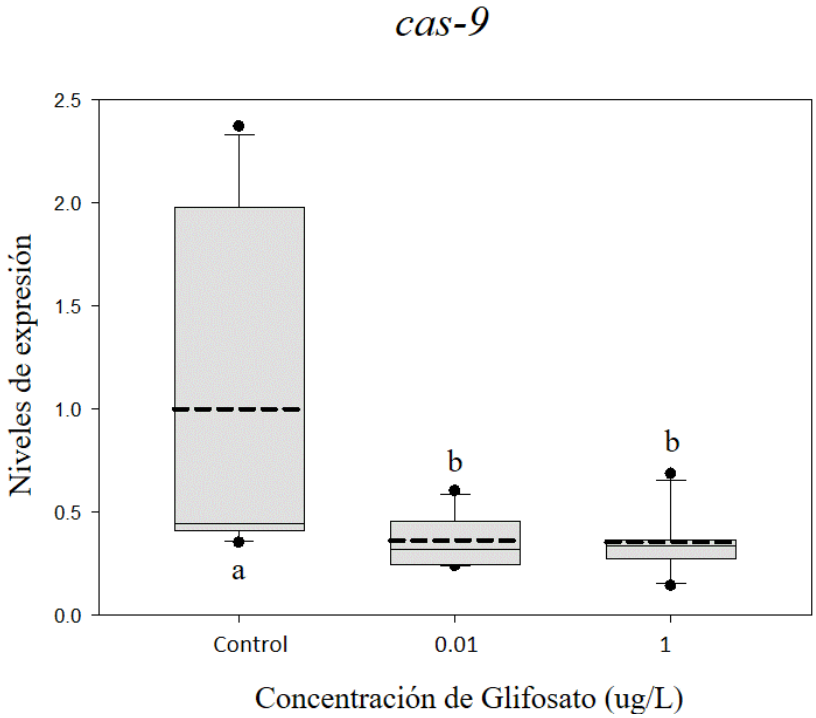


Figura 20. Expresión de c*as-9* (marcador de apoptosis) en corazones de pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de glifosato (0.01 y 1 ug/L). Las letras diferentes indican diferencias significativas en la expresión de *cas-9*. La línea sólida representa la mediana y la línea punteada representa la media, p <0.05

En los resultados se observa que la expresión de *cas-3* no presenta diferencias significativas, lo cual sugiere que no hay una activación de la etapa efectora de la apoptosis.

Por su parte, la expresión de c*as-9* presenta un decremento significativo por exposición a las concentraciones de 0.01 y 1 ug/L de glifosato. Esto sugiere una inhibición de la formación del apoptosoma, el cual depende de la liberación de citocromo c mitocondrial. Este resultado es relevante porque puede ser indicativo de daño mitocondrial afectando la ruta intrínseca de la apoptosis (apoptosis mitocondrial). A partir de estos resultados se decidió medir la expresión de otros genes como *bax, bcl-2* y *apaf-1,* que participan en el mecanismo de apoptosis intrínseca.

6.5.3. Expresión de *bax*

Se midió la expresión de *bax* (proteína pro-apoptótica), observándose diferencias significativas (p=0.036) en la concentración de 1 ug/L, respecto al control (Figura 21).

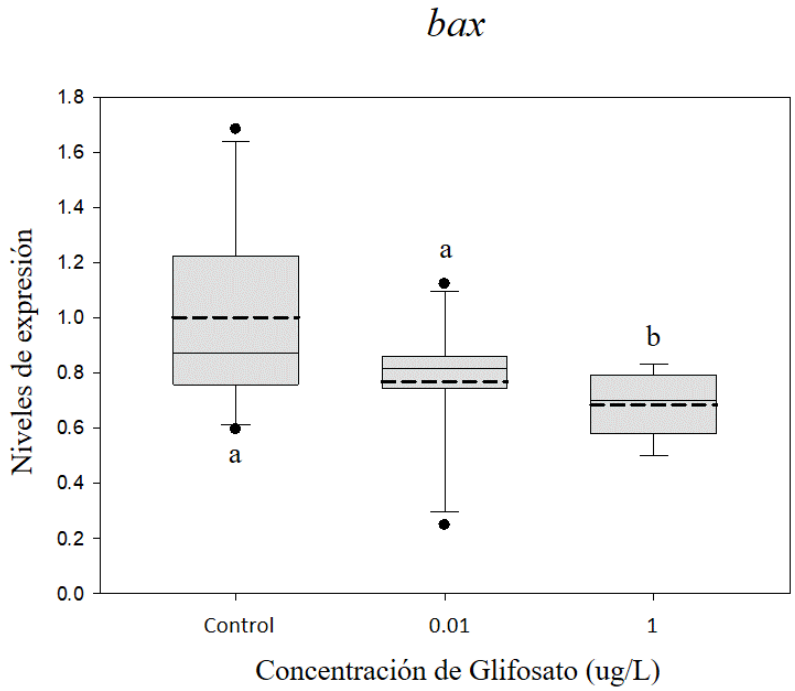


Figura 21. Expresión de *bax* (marcador de apoptosis intrínseca) en corazones de pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de glifosato (0.01 y 1 ug/L). Las letras diferentes indican diferencias significativas en la expresión de *bax*. La línea sólida representa la mediana y la línea punteada representa la media, p<0.05

6.5.4. Expresión de *bcl-2*

Se midió la expresión de *bcl-2* (proteína anti-apoptótica) y se observaron diferencias significativas (p=0.018) en el tratamiento 0.01 ug/L respecto al control (Figura 22).

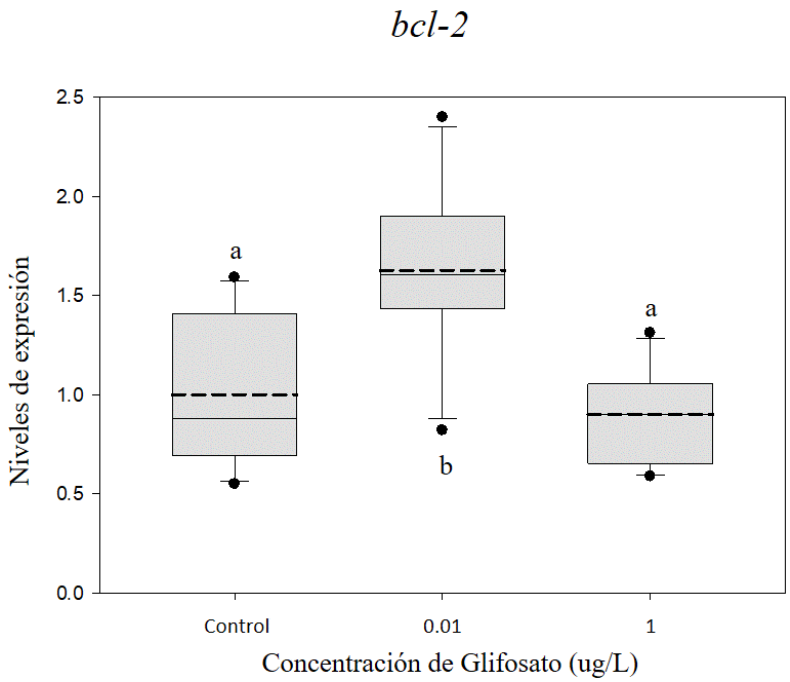


Figura 22. Expresión de *bcl-2* (marcador de apoptosis intrínseca) en corazones de pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de glifosato (0.01 y 1 ug/L). Las letras diferentes indican diferencias significativas en la expresión de *bcl-2*. La línea sólida representa la mediana y la línea punteada representa la media, $p<0.05$

6.5.5. Expresión de *apaf-1*

Se midió la expresión de a*paf-1* (proteína pro-apoptótica) observándose diferencias significativas ($p=0.006$) en la concentración de 0.01 ug/L, respecto al control (Figura 23).

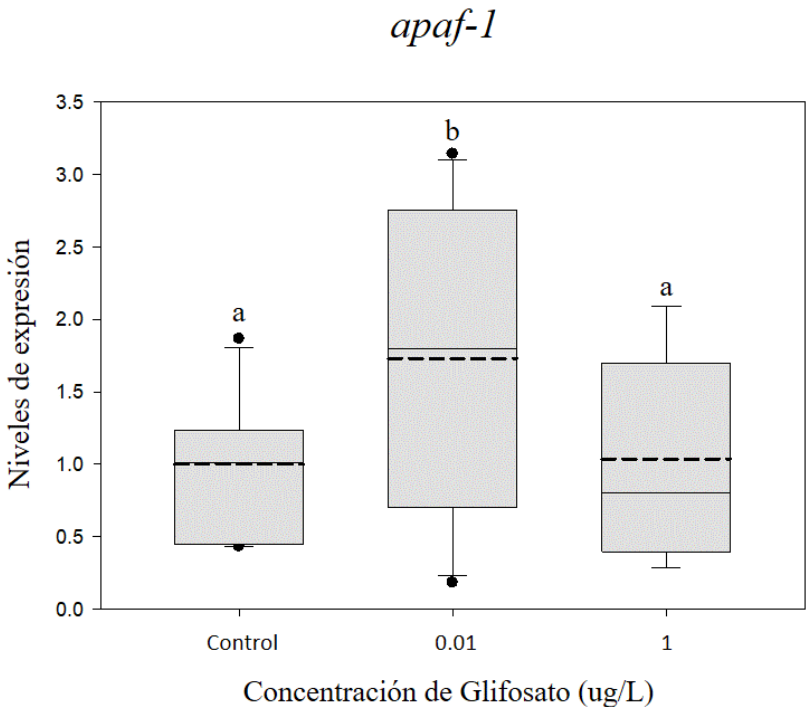


Figura 23. Expresión de *apaf-1* (marcador de apoptosis intrínseca) en corazones de pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de glifosato (0.01 y 1 ug/L). Las letras diferentes indican diferencias significativas en la expresión de *apaf-1*. La línea sólida representa la mediana y la línea punteada representa la media, $p<0.05$

6.6. Actividad de Cas3

Se midió la actividad de la Cas3 (caspasa efectora) sin observar diferencias significativas entre los tratamientos y el control (Figura 24).

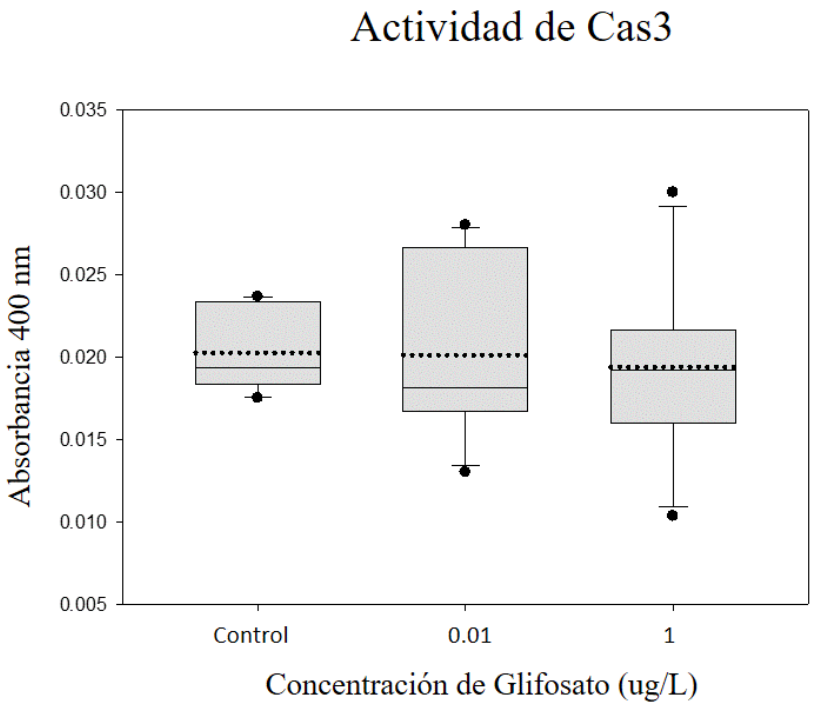


Figura 24. Actividad de Cas3 en corazones de pez cebra expuestos a dos concentraciones de glifosato (0.01 y1 ug/L). La línea sólida representa la mediana y la línea punteada representa la media.

6.7. Liberación de Lactato Deshidrogenasa

Para evaluar la muerte celular no programada (necrosis) se midió la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), ya que es un marcador comúnmente utilizado para medir necrosis.

Se midió la liberación de LDH (Lactato Deshidrogenasa), incrementando significativamente (p=0.006) en la concentración 1 ug/L respecto al control y a la concentración de 0.01 ug/L (Figura 25).

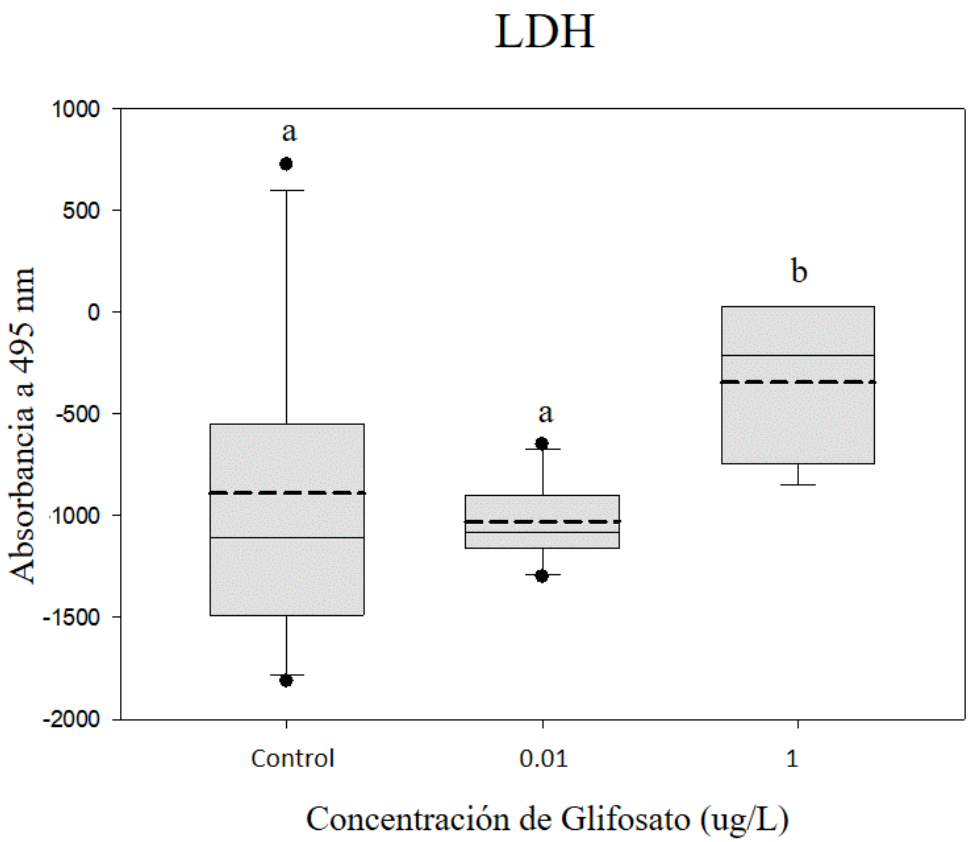


Figura 25. Liberación de LDH (marcador de necrosis) en corazones de pez cebra expuestos a diferentes concentraciones de glifosato (0.01 y 1 ug/L). Las letras diferentes indican diferencias significativas en la liberación de Lactato Deshidrogenasa. La línea sólida representa la mediana y la línea punteada representa la media, $p<0.05$

7. DISCUSIÓN

En este estudio se observó inicialmente una disminución de latido cardiaco conforme incrementó la concentración de glifosato. Esto concuerda con estudios realizados, donde se encontraron afectaciones en la función cardiaca, anomalías estructurales cardiacas y toxicidad cardiovascular (Roy *et al*., 2016; Costa *et al*., 2007).

Los cardiomiocitos (célula cardiaca contráctil) tienen capacidad de contracción-relajación y participan en el proceso de bombeo de sangre oxigenada a todo el cuerpo (Babette y Asa, 2014). La contracción se genera cuando se libera Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico hacia el citoplasma de los cardiomiocitos. Una caracterización de las cardiopatías es la baja producción de ATP, el cual es necesario en los procesos de contracción muscular y relajación cardiaca (Arboleda and Franco-Sierra, 2017). La pérdida de Ca^{2+} en este tipo de célula produce una reducción en la energía necesaria para un buen funcionamiento del corazón (Riva *et al*., 2006).

Se obtuvo una disminución significativa de la expresión de *pcna* en corazones expuestos a las concentraciones de 0.01 y 1 ug/L de glifosato, demostrando que la proliferación celular disminuye. El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) participa en el ciclo celular en la fase S (Síntesis) y actúa como proteína auxiliar de la DNA-polimerasa δ (Polδ) (Kelman, 1997), es por esto que es utilizado comúnmente como marcador de proliferación celular, ya que la síntesis de DNA precede a la mitosis en el ciclo celular. De acuerdo a Borner y colaboradores (1994) la probabilidad de que una célula entre a apoptosis depende en parte de su estado proliferativo.

Los mecanismos que controlan la muerte celular son diversos, pero se han identificado diferentes formas de muerte celular en respuesta a tóxicos entre los que destacan autofagia, necrosis y apoptosis (Leist et al., 2001). En este estudio, la expresión del gen anti-apoptótico *bcl-2* incrementó significativamente en corazones expuestos a la concentración de 0.01 ug/L de glifosato, mientras que a la concentración de 1 ug/L no se observaron diferencias significativas respecto al grupo control. Se ha demostrado que Bcl-2 puede interferir en el transporte nuclear de factores clave para el progreso de la fase S del ciclo celular, y el arresto de esta fase puede potenciar su expresión (Meikrantz *et al*., 1994). El incremento en la expresión de *bcl-2* está relacionado a la sobrevivencia celular. Se ha demostrado que la sobreexpresión de Bcl-2 retarda la proliferación celular, de tal manera que Bax (regulador negativo de Bcl-2) no pueda contrarrestarlo (Borner *et al.,* 1994). De

acuerdo a Krajewski y colaboradores (1993), es posible que Bcl-2 pueda regular la supervivencia celular, influyendo en la fosforilación oxidativa, controlando las reservas de energía celular. Se ha observado que la sobreexpresión de Bcl-2 previene alteraciones en la homeostasis de Ca^{2+} (Baffy *et al*., 1993), disminuyendo los flujos de Ca^{2+} a través de la membrana del retículo endoplasmático y de esta manera podría impedir la señalización de Ca^{2+} requerida ya sea para la apoptosis o proliferación celular (Lam *et al*., 1994). De manera interesante, se ha demostrado que a concentraciones altas de Roundup®, se provoca una sobrecarga de Ca^{+2} intracelular (De Liz Oliveira Cavalli *et al*., 2013).

Adicionalmente, al detenerse la proliferación celular, Bcl-2 disminuye la probabilidad de que una célula entre a mitosis o apoptosis, permitiendo que se enciendan los mecanismos de reparación celular (Borner *et al.,* 1994), previniendo (de manera indirecta) la fragmentación del DNA. Se ha sugerido que Bcl-2 podría regular la expresión de enzimas reparadoras de DNA como endonuclesa, uracil-DNA glicosilasa, DNA ligasa y 8-oxoguanina DNA glicosilasa (Deng *et al.*, 1999). Esto sugiere que en células expuestas a 0.01 ug/L de glifosato se detiene el ciclo celular y se activan mecanismos de reparación celular para permitir la sobrevivencia de la célula, mientras que en las células expuestas a la concentración más alta evaluada de glifosato (1 ug/L) esto no sucede (Figura 26). En 1999 Deng y colaboladores demostraron que la alta expresión de *bcl-2* aceleraba la recuperación del daño al DNA.

Mientras que Bcl-2 es pro-supervivencia, Bax es pro-apoptótico. Esto sugiere que la familia Bcl-2 está directamente relacionada con decisiones de vida o muerte (Rathmell *et al*., 2002). La expresión de *bax* (proteína pro-apoptótica) disminuyó de manera significativa en células expuestas a 0.01 ug/L de glifosato, mientras que en la concentración de 1 ug/L también se observó una disminución de la expresión, sin ser significativamente diferente al control. Bax es un homólogo de Bcl-2, el cual contrarresta su actividad de supervivencia celular, probablemente a través de la heterodimerización con Bcl-2 (Oltvai *et al*., 1993). También se ha comprobado que Bcl-2 puede inhibir a Bax (Antonsson y Martinou, 2000), sugiriendo en este caso la ausencia de apoptosis mitocondrial.

El gen pro-apoptótico *apaf-1* mostró un incremento significativo en su expresión en los corazones expuestos a 0.01 ug/L de glifosato, mientras que en corazones expuestos a la concentración de 1 ug/L no se observaron diferencias significativas respecto al control. Apaf-1 ha demostrado tener funciones no apoptóticas; cuando ocurre un daño en el DNA inducido por un estrés genotóxico,

Apaf-1 tiene un efecto modulador en el ciclo celular, mediando el arresto de la fase S. Apaf-1 está involucrado en el punto de control del daño al DNA y aparentemente puede funcionar de manera independiente a la activación de efectores apoptóticos (Zermati *et al.,* 2007). Esta función no-apoptótica requiere la translocación nuclear de Apaf-1, la cual ocurre de manera independiente a la permeabilización nuclear relacionada a la apoptosis durante la transición de la fase G1 a la fase S (Ferrando-May *et al*., 2001). La translocación nuclear activa a Chk1, el cual es responsable de la iniciación de los puntos de control del ciclo celular, el arresto del ciclo celular, reparación del DNA y activación de la muerte celular para evitar que las células dañadas proliferen (Zermati *et al.,* 2007; Patil *et al*., 2013). Se ha demostrado también que la ausencia de Apaf1 causa inestabilidad genómica, ya que el punto de control de daño en el DNA de la fase S se vuelve defectuoso (Zermati *et al*., 2007).

Las caspasas son endoproteasas que hidrolizan enlaces peptídicos. Son una familia de proteínas importantes que mantienen la homeostasis mediante la regulación de la muerte celular (apoptosis) y la inflamación. Se subclasifican por su mecanismo de acción; caspasas iniciadoras (8, 9 y 10) y caspasas efectoras (3, 6 y 7). En este estudio no se observó muerte celular programada mediada por caspasas (apoptosis) en corazones expuestos a ninguna de las dos concentraciones (0.01 y 1 ug/L) de glifosato, ya que tanto la expresión de *cas-3* como la actividad de Caspasa-3 (evaluadas en ensayos independientes) no presentaron diferencias significativas respecto al control. Caspasa-3 es una caspasa efectora, la cual puede ser activada por la ruta extrínseca (a partir de caspasas iniciadoras como Caspasa-8, la cual no fue medida en este estudio) o intrínseca de la apoptosis (a partir de Caspasa-9 como parte del apoptosoma) (Mcllwain *et al*., 2013).

La expresión de *cas-9* disminuyó significativamente en ambas concentraciones de glifosato (0.01 y 1 ug/L). Caspasa-9 activa a las caspasas efectoras como Caspasa-3, por medio de la formación de un apoptosoma en la ruta intrínseca de la apoptosis. El apoptosoma está conformado por Apaf-1, Caspasa-9 y citocromo c. Estos dos primeros se encuentran en el citoplasma, mientras que el citocromo c está en la mitocondria. Al momento de que el citocromo c es liberado al citoplasma, se une a Apaf-1 y reclutan a Caspasa-9, la cual se une a través de su dominio CARD a Apaf-1 y se activa. Una vez que se activa Caspasa-9 y se forma el apoptosoma, se lleva a cabo la cascada apoptótica (Mcllwain *et al.,* 2014; Shiozaki *et al.*, 2012). Es por esto, que los resultados en la expresión de *cas-9* y *cas-3*, sugieren que no hay muerte celular programada por apoptosis, por ninguna de las dos rutas (extrínseca o intrínseca).

La autofagia es otro tipo de muerte celular programada, la cual se define como la degradación lisosomal de materiales citoplasmáticos (Boya *et al*., 2013). En este estudio la expresión de *ulk1b* (complejo iniciador de la autofagia) no presentó diferencias significativas en ninguna de las dos concentraciones de glifosato evaluadas (0.01 y 1 ug/L), sugiriendo que no se activó el proceso de autofagia. Ulk1b es homólogo en el pez cebra del gen Ulk1 en mamíferos (He *et al*., 2009); AMPK y MTORC1 regulan la autofagia de manera coordinada mediante la fosforilación de Ulk1. MTORC1 inhibe la activación de Ulk1 e interrumpe la interacción AMPK-Ulk1 (Sanchez *et al.,* 2011; Shang *et al.,* 2011). En el año 2008, Kroemer y Levine reportaron que no se ha demostrado que la autofagia sea causa de muerte celular en condiciones fisiológicamente relevantes.

Durante la muerte celular accidental por necrosis, las células pierden la integridad de la membrana celular destruyéndose, permitiendo el escape de elementos tóxicos que provocan un proceso inflamatorio en el organismo (Arboleda *et al*., 2008). Este proceso no implica un gasto de ATP y puede ser cuantificable con el marcador de liberación LDH (Lactato Deshidrogenasa), que es comúnmente utilizado, ya que en un proceso necrótico la concentración de LDH incrementa (Aranda, 2010). La liberación de LDH fue significativamente mayor en los corazones expuestos a 1 ug/L de glifosato, indicando muerte celular por necrosis en la concentración ambiental más alta evaluada en este estudio. Se ha demostrado que a concentraciones de 36 ppm (36000 ug/L) de Roundup® existe muerte celular por necrosis relacionado con una sobrecarga de Ca^{+2} y un desequilibrio redox (De Liz Oliveira Cavalli *et al*., 2013). Sin embargo, las células expuestas a 0.01 ug/L de glifosato no presentaron diferencias significativas en la liberación de LDH respecto al control, sugiriendo que a menor concentración de glifosato se activan mecanismos de sobrevivencia y reparación celular, mientras que a concentraciones mayores (aún ambientales) se activa la muerte celular accidental o necrosis.

Recopilando la información generada en este estudio, se observaron dos escenarios diferentes; en el primero, a la concentración de 0.01 ug/L, la proliferación celular (medida por el marcador PCNA) disminuye significativamente, sugiriendo un arresto del ciclo celular. No se observa muerte celular por autofagia, ya que el marcador *ulk1b* (complejo iniciador en la autofagia) no se expresa. A esta concentración tampoco se observa muerte por necrosis, ya que no hay un incremento significativo en los niveles de LDH de la célula. Al haber una disminución significativa en la expresión de *cas-9*, sin cambios significativos en la expresión de *cas-3* y actividad de Caspasa-3, se demuestra que la muerte celular por apoptosis no se lleva a cabo ni por la ruta extrínseca ni

intrínseca. La disminución en la expresión de *cas-9* puede ser relevante y requiere más investigación. La expresión de *bax* disminuye, ya que puede ser inhibida por Bcl-2. El incremento en la expresión de *bcl-2* y *apaf-1*, sugieren una activación de los mecanismos de reparación por daño al DNA, lo cual indica que a una concentración de 0.01 ug/L de glifosato, la célula enciende mecanismos de reparación como una señal de sobrevivencia (Figura 26).

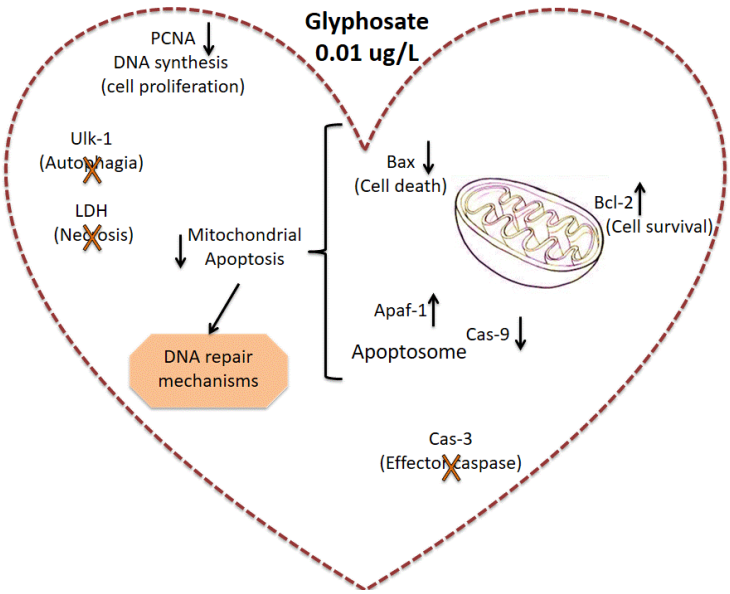


Figura 26. Esquema de muerte celular a la concentración de 0.01 ug/L de glifosato, en donde disminuye la proliferación celular, no se observa necrosis y aparentemente no se lleva a cabo el proceso de autofagia. La formación del apoptosoma en la apoptosis mitocondrial se inhibe, ya que disminuye la expresión de *cas-9* y *cas-3* no se activa; Bax puede ser contrarrestado por Bcl-2. Al aumentar la expresión de *apaf1* y *bcl-2* se encienden probablemente los mecanismos de reparación por daño al DNA, permitiendo que la célula sobreviva (aunque no prolifere).

En el segundo escenario, a la concentración de 1 ug/L también disminuye significativamente la proliferación celular (medida por el marcador PCNA). No se observa muerte celular por autofagia, ya que el marcador *ulk1b* no se expresa. Al haber una disminución significativa en la expresión de *cas-9*, sin cambios significativos en la expresión de *cas-3* y actividad de Caspasa-3, así como una disminución en la expresión de genes pro-apoptóticos *bax* y *apaf-1*, se demuestra que la muerte celular por apoptosis no se lleva a cabo ni por la ruta extrínseca ni intrínseca. La disminución en la expresión de *bcl-2* indica que la célula no está activando mecanismos de sobrevivencia, por lo

tanto, no se activan tampoco mecanismos de reparación de daño. Se observa un incremento significativo en la liberación de LDH, indicando que a la concentración de 1 ug/L de glifosato se activa el mecanismo de muerte celular accidental o necrosis (Figura 27).

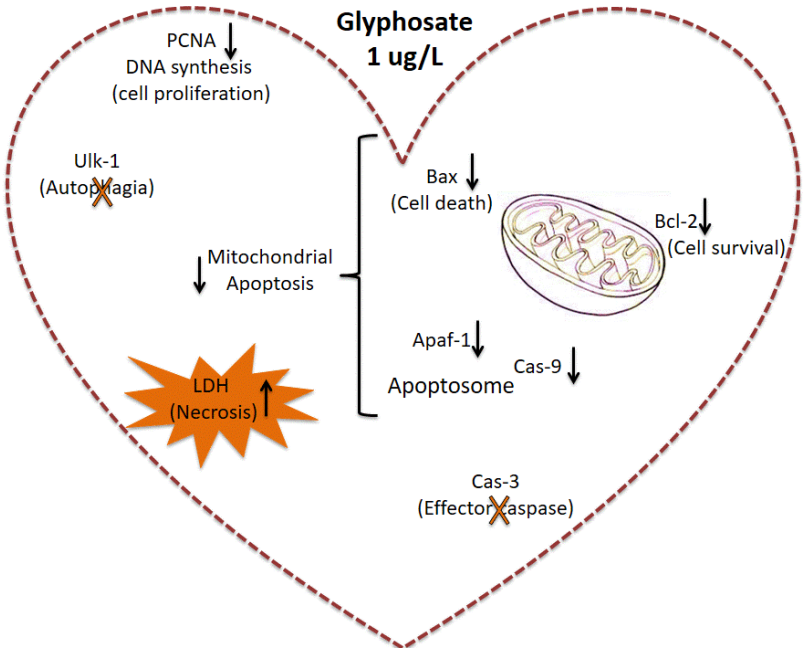


Figura 27. Esquema de muerte celular a la concentración de 1 ug/L de glifosato, en el cual disminuye la proliferación celular y la expresión de *cas-9, cas-3, bcl-2, apaf1* y *bax*, indicando que la apoptosis no se lleva a cabo y los mecanismos de reparación de DNA no se encienden. Por otra parte, los niveles de LDH aumentan significativamente indicando muerte celular accidental o necrosis.

8. CONCLUSIONES

- La exposición a glifosato *ex vivo* a concentraciones ambientales bajas disminuye la actividad cardiaca en el pez cebra sin provocar paro cardiaco.
- La exposición a glifosato en concentraciones bajas reduce la proliferación celular en corazón de pez cebra en condiciones *ex vivo*.
- No se observa muerte celular programada en los corazones de pez cebra en ninguna de las dos concentraciones de glifosato evaluadas (0.01 y 1 ug/L).
- A la concentración de 0.01 ug/L de glifosato, los cardiomiocitos probablemente encienden mecanismos de reparación como mecanismo de sobrevivencia.
- Por el contrario, a la concentración de 1 ug/L de glifosato, se activa el mecanismo de muerte celular accidental o necrosis.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda bajo estos escenarios realizar una comparación de transcriptomas para obtener los perfiles de expresión y conocer los genes que se estén expresando diferencialmente en el corazón por exposición a concentraciones bajas de glifosato. De esta manera se podrán identificar con mayor claridad y caracterizar de mejor manera los procesos biológicos activados o inhibidos por exposición a glifosato.

10. REFERENCIAS

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). Molecular Biology of the Cell. Omega Eds, Spain. pp. 767-769

Alonzo H.G.A., Corrêa C.L. (2008). En: Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO (Eds.). Plaguicidas. 3a ed. Atheneu Editora, São Paulo, pp. 621–642.

Antonsson B., Martinou J.C. (2000). The Bcl-2 Protein Family. Experimental Cell Research, 256(1), 50–57.

Aranda-Torrelio A. (2010). Interpretación de la deshidrogenasa láctica. Rev Soc Bol Ped, 49(2): 132– 134.

Arboleda C., Faranco-Sierra N. (2017). Rol de la función mitocondrial en el corazón y sus implicaciones en disfunciones cardiacas. Rev Ingeniería y Ciencia, vol. 13, no. 26, pp. 233-268.

Arboleda G., Sánchez R. (2008). Mitocondria y muerte celular. *Nova, 6(*10): 190-200.

Armiliato N., Ammar D., Nezzi L., Straliotto M., Muller Y.M., Nazari E.M. (2014). Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate. J.Toxicol Environ Health A, 77(7): 405–414.

Ashkenazi A., Dixit V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. Curr. Opin. Cell Biol. 11, 255–260.

Baeza M.R. (2014). Diecinueve formas de morir las células. Universidad de Valladolid. Tesis

Babette C.H., Asa B. G. (2014). "Mitochondrial quality control in the myocardium: Cooperation between protein degradation and mitophagy," Journal of Molecular and Cellular Cardiology, vol. 75, pp. 122–130, 235, 247

Battaglin W., Meyer M., Kuivila K., Dietze J. (2014). Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. Journal of American Water Resources Association. Vol. 50 No.2, 275-290.

Bronstein A.C., Spyker D.A., Cantilena Jr L.R., et al. (2012). Annual report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 29th annual report. Clin Toxicol (Phila); 50:911–1164

Borner C., Martinou I., Mattmann C., Irmler M., Schaerer E., Martinou

J.C., Tschopp J. (1994). The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. J. Cell Biol. 126, 1059 –1068

Boya P., Reggiori F., Codogno P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. Nat. Cell Biol. 15, 713–720.

Carling D., Mayer F.V., Sanders M.J., Gamblin S.J. (2011). AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. Nat Chem Biol; 7:512-8

Chan E.Y., Kir S., Tooze S.A. (2007). siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a

multidomain modulator of autophagy. J Biol Chem; 282:25464-74

Chen Y.R., Zweier J.L. (2014). Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. Circ Res; 114:524–37

Costa L.G. (2008). Toxic effects of pesticides. En: Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 7th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 911–917.

Costa M.J., Monteiro D.A., Oliveira-Neto A.L., Rantin F.T., Kalinin A.L. (2007). Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original. Ecotoxicology, 17(3) 153-163.

De Liz Oliveira Cavalli V. L., Cattani D., Heinz Rieg C. E., Pierozan P., Zanatta L., Benedetti Parisotto E., Zamoner A. (2013). Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. Free Radical Biology and Medicine, 65, 335–346

De Roos A.J., Zahm S.H., Cantor K.P., Weisenburger D.D., Holmes F.F., Burmeister L.F., et al. (2003). Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. Occup Environ Med.; 60(9):E11

Debnath J., Baehrecke E.H., Kroemer G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? Autophagy, 1: 66–74.

Deng J., Yu L., Liu C., Yu K., Shi X., Yeung L.W.Y., Zhou B. (2009). Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. Aquatic Toxicology, 93(1), 29–36

Deng G., Su J. H., Ivins K. J., Van Houten B., Cotman C. W. (1999). Bcl-2 Facilitates Recovery from DNA Damage after Oxidative Stress. Experimental Neurology, 159(1), 309–318.

Ferrando-May E., Cordes V., Biller-Ckovric I., Mirkovic J., Gorlich D., and Nicotera P. (2001). Caspases mediate nucleoporin cleavage, but not early redistribution of nuclear transport factors and modulation of nuclear permeability in apoptosis. Cell Death Differ. 8, 495–505.

Fleming A., Rubinsztein D. C. (2011). Zebrafish as a model to understand autophagy and its role in neurological disease. Biochimica et biophysica acta, 1812(4), 520–526.

Fuchs Y., and Steller H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. Cell 147: 742-758

Giesy J.P., Dobson S., Solomon K. (2000). Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. Reviews of Environmental Contaminant Toxicology 167:35-120.

Gordy C., He YW. (2012). The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? Protein Cell, 3: 17–27.

Green D.R., Reed J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. Science 281, 1309–1312

Grimm S., Brdiczka D. (2007). The permeability transition pore in cell death. Apoptosis, 12: 841-855.

Gui Y., Fan X., Wang H., Wang G., Chen S. (2012). Glyphosate induced cell death through apoptotic and autophagic mechanisms. Neurotoxicology and Teratology, 34: 344-349.

He C., Bartholomew C.R., Zhou W., Klionsky D.J. (2009). Assaying autophagic activity in

transgenic GFP-Lc3 and GFP-Gabarap zebrafish embryos. Autophagy 5 520–526.

Hu N., Yost H. J., Clark E. B. (2001). Cardiac Morphology and Blood Pressure in the Adult Zebrafish. The anatomical record 264:1-12.

Jin Y.F., Jin J.G., Hong Q.R., Xiao R.W., Chao H. (2013). Herbicide Roundup® and its main constituents cause oxidative stress and inhibit acetylcholinesterase in liver of Carassius auratus. J. Environ. Sci. Health Part B 48, 844-850.

Jopling C., Sleep E., Raya M., Martí M., Raya A., Belmonte J.C. (2010). Nature 464: 606-609.

Kelman Z. (1997). PCNA structure, functions and interactions. Oncogene; 14; 629–640.

Klionsky D. J. et al. (2016).Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy 12, 1–222.

Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M. J., Fenton W., Reed J. (1993). Investigation of the subcellular distribution of Bcl-2 onco-protein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum and outer mitochondrial membranes. Cancer Res. 53, 4701– 4714

Kroemer G., Levine B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. Nat Rev Mol Cell Biol, 9: 1004–1010.

Kruger M., Schrodl W., Pedersen I., Shehata A.A. (2014). Detection of glyphosate in malformed piglets. J Environ Anal Toxicol; 4:5.

Kostoglou M., Fuentes-Garí M., García-Münzer D., Georgiadis M. C., Panoskaltsis N., Pistikopoulos E. N., Mantalaris A. (2015). Mathematical analysis of multistage population balances for cell growth and death. Computer Aided Chemical Engineering, 2105–2110.

Laborde A., Tomasina F., Bianchi F., Brune M.N., Buka I., Comba P. et al. (2014). Children's Health in Latin America: The Influence of Environmental Exposures. Environ Health Perspect. 123(3): 201–209

Lam M., Dubyak G., Chen L., Nunez G., Miesfeld R. L., Distelhorst, C.W. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 6569 – 6573

Leist M, Jäättelä M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. Nat Rev Mol Cell Biol, 2: 589-598.

Lopes F. M., Junior A. S. V., Corcini C. D., da Silva A. C., Guazzelli V. G., Tavares G., da Rosa C. E. (2014). Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish Danio rerio. Aquatic toxicology, 155, 322-326.

Luzio A., Monteiro S.M., Fontainhas-Fernandes A.A., Pinto-Carnide O., Matos M., Coimbra A.M. (2013). Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. Aquat. Toxicol. 128–129, 183–189.

Mathai B.J., Meijer A.H., Simonsen A. (2017). Studying Autophagy in Zebrafish. Cells, 6, 21.

McDuffie HH., Pahwa P., McLaughlin J.R., Spinelli J.J., Fincham S., Dosman J.A., et al. (2001). Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.10 (11):1155–63.

McIlwain D. R., Berger T., Mak, T. W. (2013). Caspase Functions in Cell Death and Disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5(4), a008656–a008656.

Myers J.P., Antoniou M.N., Blumberg B., Carroll L., Colborn T., Everett L.G., Hansen M., Landrigan P.J., Lanphear B.P., Mesnage R., Vandenberg L.N., Saal F.S., Welshons W.V., Benbrook C.M. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. Environ. Health 15 (19).

Meikrantz W., Gisselbrecht S., Tam S. W., Schlegel R. A. (1994). Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 3754 –3758.

Mizushima N. (2002). Molecular mechanism of autophagy: the role of the Apg12 conjugation system. Seikagaku, 74(7): 523–537.

Monsanto, 2009. Backgrounder: History of Monsanto's Glyphosate Herbicides.

Oltvai Z. N., Milliman C. L., Korsmeyer S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell 74, 609 – 619

Paganelli A., Gnazzo V., Acosta H., Lopez S.L., Carrasco A.E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. Chem Res Toxicol. 23(10):1586–95

Patil M., Pabla N., Dong Z. (2013). Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation, Cellular and molecular life sciences: CMLS, 70 4009-4021.

Pieperhoff S., Wilson K.S., Baily J., Mora K., Maqsood S., Vass S., Taylor J., Del-Pozo J., MacRae C.A., Mullins J.J., Denvir M.A. (2014). Heart on a Plate: Histological and Functional Assessment of Isolated Adult Zebrafish Hearts Maintained in Culture. PLoS ONE, 9(5): e96771

Poss K.D., Wilson L.G., Keating M.T. (2002). Heart Reneration in Zebrafish. Science 298, 2188.

Poss K.D. (2007). Getting to the heart of regeneration in zebrafish. Seminars in Cell & Developmental Biology 18: 36-45.

Peixoto F. (2005). Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. Chemosphere, 61: 1115–1122.

Rathmell J. C., Lindsten T., Zong W. X., Cinalli R. M., Thompson C. B. (2002) Deficiency in Bak and Bax perturbs thymic selection and lymphoid homeostasis. Nat. Immunol. 3: 932–939.

Reed J. C. (1994). Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. The Journal of Cell Biology, 124(1), 1–6.

Rendon-von O.J., & Dzul-Caamal R. (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, 14(6), 595.

Rocha A., Ruiz S., Estepa A., Coll J.M. (2001). Biología molecular de los peces: Interés y Aplicaciones. Revista AquaTIC, 15: 1-9.

Roy N.M., Ochs J., Zambrzycka E., Anderson A. (2016). Glyphosate induces cardiovascular toxicity in Danio rerio. Environmental Toxicology and Pharmacology 46: 292-300.

Riva A. Tandler B., Lesnefsky E.J., Conti G., Loffredo F., Vazquez E., Hoppel C.L. (2006). "Structure of cristae in cardiac mitochondria of aged rat,"Journal of Mechanisms of Ageing and Development, vol. 127, pp. 917–921. 242, 243, 246.

Salazar López N. J., Silveira Gramont M. I., Zuno Floriano F. G., Rodríguez Olibarría G., Hengel M., Aldana Madrid M. L. (2016). Dissipation of glyphosate from grapevine soils in Sonora, Mexico. Terra Latinoamericana 34: 385-391.

Sanchez A.M., Csibi A., Raibon A., Cornille K., Gay S., Bernardi H., Candau R. (2011). AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of Forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. J Cell Biochem

Sanchis J., Kantiani L., Llorca M., Rubio F., Ginebreda A., Fraile J., Garrido T., Farre M. (2011). Determination of Glyphosate in Groundwater Samples Using an Ultrasensitive Immunoassay and Confirmation by On-Line Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 402(7):2335-2345.

Shang L., Chen S., Du F., Li S., Zhao L., Wang X. (2011). Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. Proc Natl Acad Sci USA. 108:4788-93

Shehata A.A, Schrodl W., Aldin A.A., Hafez H.M., Kruger M. (2013). The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. Curr Microbiol. 66(4):350–8.

Skark C., N. Zullei-Seibert U. Schottler, Schlett C. (1998). The Occurrence of Glyphosate in Surface Water. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 70(1-4):93-104.

Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. Nature, 397: 441-446.

Tai T., Yamashita M., Wakimori H. (1990). Hemodynamic effects of roundup, glyphosate and surfactant in dogs. Jpn J Toxicol. 3:63–8

Talbot A.R, Shiaw M.H., Huang J.S., Yang S.F., Goo T.S., Wang S.H., et al. (1991). Acute poisoning with a glyphosate surfactant herbicide: a review of 93 cases. Hum Exp Toxicol. 10:1–8

Tang R., Dodd A., Lai D., Warren C.M.,Love D.R. (2007). Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Normalization. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 39: 384-390

Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. Nat Rev Mol Cell Biol 9: 231-241

Thome M., Tschopp J. (2001). Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. Nat Rev Immunol 1, 50–58

Torres-Velarde J., Llera-Herrera R., García-Gasca T., García-Gasca A. (2018). Mechanisms of stress-related muscle atrophy in fish: an ex vivo approach. Mechanisms of Development, 154: 162-169

Uren-Webster T.M., Laing L.V., Florance H., Santos E.M. (2014). Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (Danio rerio). Environ. Sci. Technol. 48, 1271-1279.

U.S. Department of Agriculture. (2011). Pesticide Data Program Annual Summary, Calendar Year 2009. U.S. Department of Agriculture Agricultural Marketing Service, Science and Technology Programs.

Wilson N.S., Dixit V., Ashkenazi A. (2009). Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. Nat Immunol 10, 348–355.

Zhang N., Hartig H., Dzhagalov I., Draper D., He Y.W. (2005). The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. Cell Res 15, 749–769.

Zou H., Li Y., Liu X., Wang X. (1999). An APAF-1 Cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9, J. Biol. Chem. 274, 11549–11556.