

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Tesis**

**Toxicidad del glifosato por alimento vivo en el metabolismo y crecimiento del pez  
cebra**

**Presenta**

**M. en C. Gabriela Beatriz Alvarado Suárez**

**Para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Biológicas**

**Co-tutores**

**Dr. Roberto Rico Martínez**

**Dra. Beatriz Yáñez-Rivera**

**Comité Tutorial**

**Dr. Marcelo Silva Briano**

**Aguascalientes, Ags.**

**1 DICIEMBRE 2022**

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez  
Decano del Centro de Ciencias Básicas

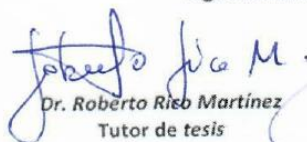
**PRESENTE**


Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **GABRIELA BEATRIZ ALVARADO SUÁREZ** con ID 200080 quien realizó **LA TESIS** titulada: **TOXICIDAD DEL GLIFOSATO POR ALIMENTO VIVO EN EL METABOLISMO Y CRECIMIENTO DEL PEZ CEBRA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

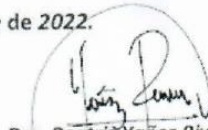
Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 11 de octubre de 2022.

  
Dr. Roberto Riso Martínez  
Tutor de tesis

  
Dr. Marcelo Silva Briano  
Asesor de tesis

  
Dra. Beatriz Yañez Rivera  
Co-Tutor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DG-SEE-FO-16  
Actualización: 00  
Emisión: 17/05/19

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 10-nov-22

NOMBRE: GABRIELA BEATRIZ ALVARADO SUÁREZ ID 200080

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, MODALIDAD TRADICIONAL LGAC (del posgrado): BIOINGENIERÍA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL

TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo práctico

TÍTULO: Toxicidad del glifosato por alimento vivo en el metabolismo y crecimiento del pez cebra.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

CONTRIBUYE AL ESTUDIO DE PROCESOS DE MONITOREO DE CONTAMINANTES COMO EL GLIFOSATO EN AMBIENTES ACUÁTICOS

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutoral, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- SI Coincide con el título y objetivo registrado
- SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
- SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- SI El estudiante es el primer autor
- SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí  SI

No

FIRMAS

Elaboró:

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DRA. ALMALILIAN GUERRERO BARRERA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutoral, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. JUAN JÁUREGUI RINCÓN

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: .... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.



## Feeding behavior of early life stages of the zebrafish *Danio rerio* is altered by exposure to glyphosate

Gabriela Beatriz Alvarado-Suárez<sup>1</sup> · Marcelo Silva-Briano<sup>2</sup> · Mario Alberto Arzate-Cárdenas<sup>1,3</sup> · Ana Laura Carbajal-Hernández<sup>1</sup> · Beatriz Yáñez-Rivera<sup>3,4</sup> · Roberto Rico-Martínez<sup>2,1</sup>

Received: 29 October 2021 / Accepted: 28 June 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

### Abstract

Glyphosate levels and the transfer of glyphosate across trophic levels have rarely been studied in zooplankton. The food preferences of zebrafish during the first-feeding stage (which is critical for the survival of organisms), were analyzed because of the requirement for live food. Larval survival begins to be affected when glyphosate intake exceeds 0.3666 µg/larvae/day, in the case that only the food is contaminated; if the medium is also contaminated, the effects on survival start from 0.2456 µg/larvae/day. It was shown that glyphosate was more likely to be incorporated through the medium than through the food (zooplankton), which supports the results of previous studies that have ruled out the potential for biomagnification. The bioconcentration factor (BCF) of glyphosate was determined using an ELISA tests specific to measure glyphosate in the fish *D. rerio*, the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Lecane papuana*, and the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. The experimental design consisted in exposing seven zebrafish adults per replica (four replicates) in three treatments 1, 5, and 10 mg/L of glyphosate for 96 h to obtain bioconcentration factors in the gills, liver, and muscle. These concentrations were selected as potential glyphosate concentrations right after application as double highest reported concentration. Glyphosate levels in zooplankton can represent up to 6.26% of the total weight of rotifers (BFC = 60.35) and in zebrafish adult organs were less than 8 µg/mg of tissue (BCF values < 6). Although glyphosate does not biomagnify, our results suggest that glyphosate affected the dynamics between zooplankton and zebrafish larvae, diminishing survival and feeding rates, given that zooplankton species bioconcentrate glyphosate in large quantities. The BCF values found in this contribution are higher than expected. Glyphosate exposure affected energy metabolism and feeding behavior of zebrafish larvae, which presented high mortality rates at environmentally relevant concentrations.

**Keywords** Energy content · Early life stages · Fish toxicity test · Survival · Pesticide

Responsible Editor: Bruno Nunes

Beatriz Yáñez-Rivera and Roberto Rico-Martínez are both PhD thesis co-directors of Gabriela Beatriz Alvarado-Suárez.

✉ Beatriz Yáñez-Rivera  
beyariv@ciad.mx

✉ Roberto Rico-Martínez  
roberto.rico@edu.uaa.mx

<sup>1</sup> Universidad Autónoma de Aguascalientes, Departamento de Biología, Avenida Universidad 940, Ags. C. P. 20131 Aguascalientes, Mexico

<sup>2</sup> Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Avenida

### Introduction

Glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine] is one of the most commonly used herbicides worldwide and is primarily used to eliminate weeds (Jansons et al. 2018). Glyphosate does not tend to bioaccumulate due to its low affinity to lipids, and biomagnification is also unlikely. Glyphosate

Universidad 940, Ciudad Universitaria Aguascalientes, Aguascalientes 20131, México

<sup>3</sup> Cátedras CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología, Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor, Alcaldía Benito Juárez, Ciudad de México 03940, México

<sup>4</sup> CIAD AC, Unidad Mazatlán en Acuicultura Y Manejo Ambiental, Avenida Sábalo-Cerritos S/N, Estero del Yugo, Mazatlán Sin. 82112, México



## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Aguascalientes**, por abrirme mis puertas para realizar mis estudios de posgrado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo para realizar mis estudios de posgrado con el registro de becario número 666012 y así como el financiamiento para realización de esta tesis enmarcado en el proyecto **CONACYT CB 2016 288306, titulado "¿Toxicidad transgeneracional del glifosato en el pez cebrá (Danio rerio)? : efectos moleculares, reproductivos y poblacionales"** a cargo del **Dr. Miguel Betancourt Lozano**.

A la **Dra. Beatriz Yáñez Rivera**, por su paciencia, disposición, apoyo y conocimientos brindados en la realización de esta tesis.

Al **Dr. Roberto Rico Martínez**, por abrirme nuevamente las puertas del laboratorio de toxicología, apoyo, palabras de aliento, conocimientos brindados y la confianza que me otorgo en la realización del proyecto.

Al **Dr. Marcelo Silva Briano**, por el apoyo brindado en la identificación de las especies y sus comentarios que enriquecieron este proyecto.

Al **Dr. Mario Alberto Arzate Cárdenas**, por estar en cada paso brindando comentarios que le dieron forma y dirección a este proyecto, la dedicación, apoyo, disponibilidad, conocimientos, consejos, pero sobre todo amistad.

A la **Dra. Ana Laura Carbajal y al Dr. Roberto Carlos Valerio**, por los conocimientos, consejos, disponibilidad para apoyarme en la realización del proyecto, su paciencia, y su amistad, son una parte muy importante en este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio **Mariana, Juan Pablo, Charlie, Mario y Fernanda** por hacer más amena mi estancia en el laboratorio, sus consejos y ayuda.

Al **Dr. José Luis Gómez Márquez** y a la **Dra. Bertha Peña Mendoza**, por sus palabras de aliento, asesorías y siempre estar al pendiente en cada paso de mi vida académica, personal, los quiero y admiro.

DEDICATORIA

A **Leonardo**, que llegaste cuando menos lo esperaba, todos los días son de aprendizaje, he descubierto otra versión de mí, Te amo infinitamente, bebé.

A **Ángel**, por ser mi compañero de vida, por las aventuras que nos espera con Leo, tu amor incondicional. Te amo.

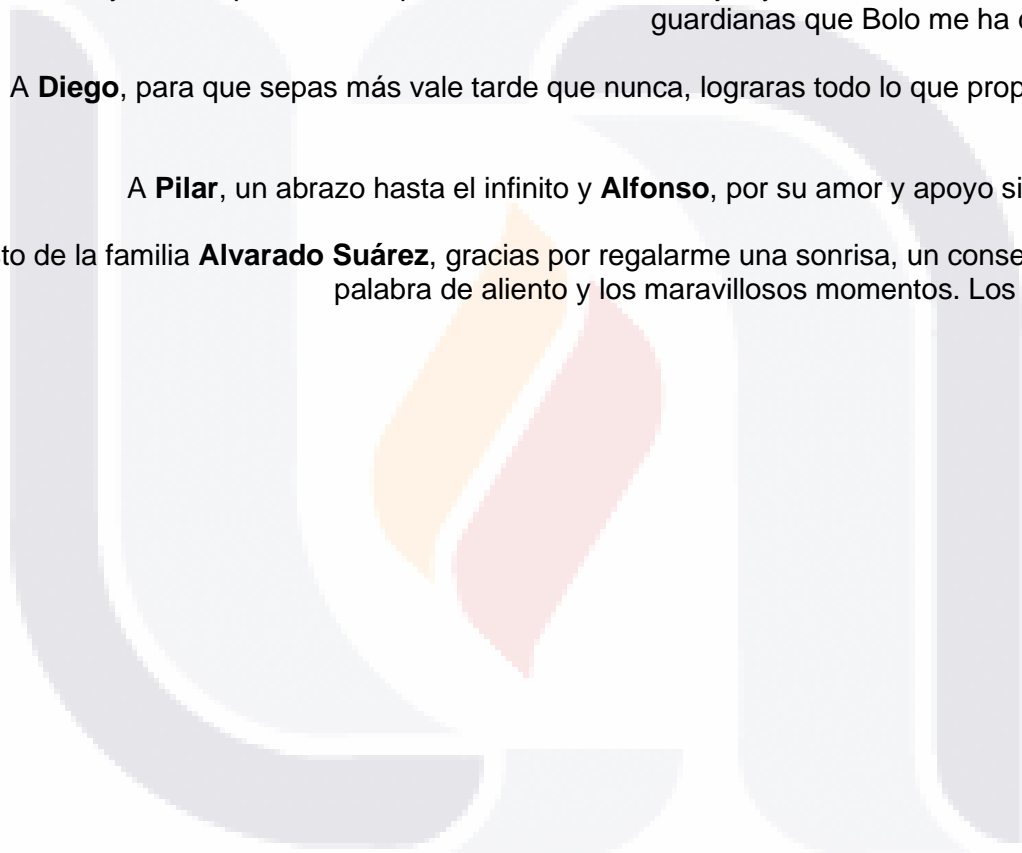
A **Blanca y Fernanda**, por estar siempre al pendiente de mí, en cada paso del proyecto y de la vida. Las quiero mis Reinitas.

A **Alicia y Leticia** por el amor que me tienen, los consejos y las risas, son las mejores guardianas que Bolo me ha dejado.

A **Diego**, para que sepas más vale tarde que nunca, lograras todo lo que propongas.

A **Pilar**, un abrazo hasta el infinito y **Alfonso**, por su amor y apoyo siempre.

Al resto de la familia **Alvarado Suárez**, gracias por regalarme una sonrisa, un consejo, una palabra de aliento y los maravillosos momentos. Los quiero.



ÍNDICE

**INTRODUCCIÓN**..... 7

**MARCO TEÓRICO** ..... 8

    CARACTERÍSTICAS DEL GLIFOSATO..... 8

    EL USO DEL GLIFOSATO EN EL MUNDO..... 9

    GLIFOSATO EN MÉXICO ..... 10

    DEGRADACIÓN DEL GLIFOSATO..... 11

    PERSISTENCIA DEL GLIFOSATO EN AGUA ..... 11

    TOXICOCINÉTICA DEL GLIFOSATO..... 13

    ESTRÉS OXIDATIVO..... 14

    REASIGNACIÓN DE ENERGÍA ..... 15

    ORGANISMOS ACUÁTICOS COMO INDICADORES DE LA CALIDAD DEL AGUA ..... 16

    CARACTERÍSTICAS DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*) ..... 16

**ANTECEDENTES**..... 17

    ESTUDIOS QUE LO CONSIDERAN INOCUO ..... 18

    ESTUDIOS QUE LO CONSIDERAN TÓXICO..... 19

    ESTUDIOS SUMINISTRANDO CULTIVOS TOLERANTES AL GLIFOSATO COMO ALIMENTO..... 21

    ESTUDIOS EN MÉXICO ..... 21

**PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**..... 22

**OBJETIVO GENERAL** ..... 22

**OBJETIVO ESPECÍFICOS** ..... 22

**HIPÓTESIS**..... 22

**JUSTIFICACIÓN** ..... 23

**MATERIALES Y MÉTODOS** ..... 23

    CULTIVO DE ESPECIES PLANCTÓNICAS..... 23

    REACTIVO QUÍMICO ..... 23

    BIOCONCENTRACIÓN DE ESPECIES ZOOPLANCTÓNICAS ..... 23

    MANTENIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE *Danio rerio*..... 24

    BIOCONCENTRACIÓN DE ADULTOS DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS A GLIFOSATO ..... 24

    PREFERENCIAS DURANTE LA ETAPA DE PRIMERA ALIMENTACIÓN ..... 25

    FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN ..... 25

    EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS Y MORFOMÉTRICOS ..... 26

        REASIGNACIÓN ENERGÉTICA DE PROTEÍNAS, CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS..... 26

CONTENIDO CALÓRICO .....	26
ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	26
ANÁLISIS DE DATOS.....	27
<b>RESULTADOS</b> .....	28
ESCALADO DE CULTIVOS PLANCTÓNICOS .....	28
PRUEBAS DE ALIMENTACIÓN.....	29
OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS DE LA EXPOSICIÓN EN AGUA EN ADULTOS DE <i>Danio rerio</i> .....	32
FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN DEL <i>D. rerio</i> ADULTO.....	34
FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN EN EL ZOOPLANCTON .....	34
REASIGNACIÓN ENERGÉTICA DE BIOMOLÉCULAS EN EL ZOOPLANCTON EXPUESTO AL GLIFOSATO .....	34
EFECTOS DEL GLIFOSATO DURANTE LA FASE DE PRIMERA ALIMENTACIÓN DE LAS LARVAS DE <i>Danio rerio</i> .....	35
INGESTIÓN DE ALIMENTOS.....	35
FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN Y SUPERVIVENCIA.....	35
REASIGNACIÓN DE ENERGÍA DE LAS LARVAS DE PEZ CEBRA EXPUESTAS AL GLIFOSATO A TRAVÉS DE LA DIETA.....	37
EVALUACIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	38
DISCUSIÓN.....	43
<b>CONCLUSIONES</b> .....	49
REFERENCIAS .....	50



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Principales vías de degradación de glifosato en el ambiente. Tomado de Grandcoin et al. (2017).....	12
Figura 2 Cultivo masivo de <i>Lecane papuana</i> , con sus diferentes fases de escalado (Elaboración propia).....	28
Figura 3 Cultivo masivo de <i>Brachionus calyciflorus</i> con sus diferentes fases de escalado..	29
Figura 4 Cultivo masivo de <i>Ceriodaphnia dubia</i> con sus diferentes fases de escalado (Elaboración propia).....	30
Figura 5. Supervivencia de los embriones de <i>Danio rerio</i> con alimento balanceado (AB) y combinación de alimento balanceado y <i>Lecane papuana</i> (AV+AB) .....	30
Figura 6. Número de organismos consumidos de <i>Lecane papuana</i> del día 8 al 13 n=100..	31
Figura 7. Organismos adultos de <i>Danio rerio</i> expuestos a diferentes concentraciones (A) Control (B) 1 mg/L. (C) 5 mg/L (D) 10 mg/L .....	32
Figura 8. Organismo adulto de <i>Danio rerio</i> expuesto a 10 mg/L de glifosato.....	32
Figura 9. Hígado de organismos de <i>Danio rerio</i> expuestos a diferentes concentraciones (A) Control (B) 1mg/L (C) 5 mg/L (D) 10 mg/L .....	33
Figura 10. Branquias de organismos de <i>Danio rerio</i> expuestos a diferentes concentraciones (A) Control (B) 1mg/L (C) 5 mg/L (D) 10 mg/L.....	34
Figura 11. Factor de bioconcentración de los organismos expuestos al glifosato. A-C) Pez cebra adulto expuesto durante 96 h (n=3); D-F) especies zooplanctónicas (n=4) . A) Branquias; B) músculo, C) hígado; D) <i>Brachionus calyciflorus</i> expuesto a 0,8 mg/L; D) <i>Ceriodaphnia dubia</i> expuesta a 1 mg/L; E) <i>Lecane papuana</i> expuesta a 0,8 y 200 mg/L. Las letras diferentes corresponden a diferencias significativas a p<0,05. ....	36
Figura 12. Asignación de energía de las especies zooplanctónicas tras 24 h de exposición. A-D) <i>Brachionus calyciflorus</i> (BC) expuesto a 0,8 mg/L de glifosato y <i>Ceriodaphnia dubia</i> (CD) expuesta a 1 mg/L de glifosato; E-H) <i>Lecane papuana</i> (LP) expuesta a 0,8 y 200 mg/L de glifosato. A) Proteínas; B) carbohidratos; C) lípidos; D) contenido calórico. Asteriscos corresponden a diferencias significativas a p<0,05, n=5). ....	37
Figura 13. Efectos del glifosato durante la primera fase de alimentación de las larvas de pez cebra. A) Tratamiento A: Control (sin glifosato); B) Tratamiento B: larvas y rotíferos en medio ISO con 0,8 mg/L de glifosato; C) Tratamiento C: rotíferos previamente expuestos durante 24 h a 0,8 mg/L de glifosato, larvas en medio ISO (sin glifosato); D) Tratamiento D: rotíferos previamente expuestos a 0 8 mg/L de glifosato durante 24 h y larvas en medio ISO con glifosato a 0,8 mg/L; E) Factor de bioconcentración (BFC) entre tratamientos; F) porcentaje de supervivencia entre tratamientos. * y letras diferentes muestran diferencias significativas a p<0,05, n=100. <i>Brachionus calyciflorus</i> (BC) y <i>Lecane papuana</i> (LP). ....	39
Figura 14. Asignación de energía en larvas de pez cebra tras 7 días de alimentación con especies zooplanctónicas. A) Proteínas; B) carbohidratos; C) lípidos; D) contenido calórico. Tratamientos como se ha descrito anteriormente . Las letras diferentes muestran diferencias significativas a p<0,05, n=5).....	40
Figura 15. Evaluación de enzimas antioxidantes en zooplancton. A-D-G) <i>Brachionus calyciflorus</i> , B-E-H) <i>Ceriodaphnia dubia</i> -C-F-I) <i>Lecane papuana</i> , ). A-C) Catalasa, D-F)	

Glutación peroxidasa, G-I) Superóxido dismutasa. Asteriscos corresponden a diferencias significativas a  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ )..... 41

Figura 16. Evaluación de enzimas antioxidantes en tratamiento de alimentación. A) Catalasa, B) Glutación peroxidasa, C) Superóxido dismutasa. Asteriscos corresponden a diferencias significativas a  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ )..... 42

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características del glifosato. Tomado de International Agency for Research on Cancer, 2017. .... 9

Cuadro 2. Cantidad de ingrediente activo de glifosato producido industrialmente de manera global. Tomado de Benbrook (2016). .... 10

Cuadro 3. Tiempo de vida media del glifosato en diferentes tipos de agua dulce. Modificado de Mackay et al. (2006). .... 12

Cuadro 3. Concentraciones encontradas en aguas superficiales o subterráneas en países de América y Europa. Elaborado por GBAS..... 13

Cuadro 4. Periodo de desarrollo de larva y adulto. Tomada de Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002..... 17

Cuadro 5. Dieta propuesta para los organismos de *Danio rerio* ..... 32

## RESUMEN

El glifosato [N-(fosfonometil) glicina] es uno de los herbicidas más utilizados en todo el mundo y se emplea principalmente para eliminar las malezas. Aunque International Agency for Research Cancer ha clasificado el glifosato como carcinógeno para los seres humanos, este herbicida se sigue utilizando actualmente en varios países. En México, por ejemplo, el glifosato sigue siendo muy utilizado. En 2014, se aplicaron en el país unas 13 700 toneladas métricas de glifosato. Por ello, es urgente generar información sobre la magnitud de sus impactos tanto en los organismos como en el medio ambiente, ya que los riesgos a corto y largo plazo de su uso siguen sin estar claros. En este estudio, nos propusimos evaluar la bioconcentración del glifosato en dos niveles tróficos [es decir el zooplancton (los rotíferos *Brachionus calyciflorus* y *Lecane papuana* y el cladóceros *Ceriodaphnia dubia*) y el pez cebra (*Danio rerio*)] y analizar las preferencias alimentarias de las larvas de pez cebra durante la primera fase de alimentación del zooplancton, haciendo hincapié en la reasignación energética de proteínas, carbohidratos y lípidos. Esto es particularmente interesante dado que los niveles de glifosato y la transferencia de glifosato a través de los niveles tróficos han sido raramente estudiados en el zooplancton.

Un análisis de la bioconcentración y la toxicidad del glifosato en *D. rerio* mostró que era más probable que el glifosato se incorporara a través del medio que a través del alimento (zooplancton), lo que apoya los resultados de estudios anteriores que han descartado el potencial de biomagnificación. Como se esperaba, los hígados de *D. rerio* contenían los niveles más altos de glifosato ( $< 8 \mu\text{g}/\text{mg}$  de tejido; valores del factor de bioconcentración  $< 6$ ), seguidos por las branquias y el tejido muscular. Sin embargo, observamos una bioconcentración de glifosato en el zooplancton de hasta el 6,26% del peso seco total de los rotíferos. También se analizaron las preferencias alimentarias del pez cebra durante la etapa de primera alimentación. Encontramos que la exposición al glifosato en el medio era más importante para su incorporación en las larvas de pez cebra que el consumo de especies de zooplancton que contenían glifosato. Nuestros resultados muestran una severa mortalidad ( $> 40\%$ ) a bajas concentraciones de glifosato durante la etapa de primera alimentación. Las concentraciones de exposición al glifosato utilizadas en este estudio (0,8 y 1,0 mg/L) pueden encontrarse en entornos con aplicaciones elevadas o recientes de glifosato. Aunque el glifosato no se biomagnifica, nuestros resultados sugieren que el glifosato podría afectar a la dinámica entre el zooplancton y las larvas de pez cebra al afectar a las tasas de supervivencia y alimentación.

## ABSTRACT

Glyphosate [N-(phosphonomethyl) glycine] is one of the most commonly used herbicides worldwide and is primarily used to eliminate weeds. Although the International Agency for Research on Cancer has classified glyphosate as a human carcinogen, this herbicide is still currently used in various countries. In Mexico, for example, glyphosate continues to be heavily used. In 2014, ~13 700 metric tons of glyphosate were applied within the country. As such, there is a pressing need to generate information on the magnitude of its impacts on both organisms and the environment given that the short- and long-term risks of its use remain unclear. In this study, we aimed to assess the bioconcentration of glyphosate in two trophic levels [i.e., zooplankton (the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Lecane papuana* and the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*) and zebrafish (*Danio rerio*)] and to analyze the food preferences of zebrafish larvae during the first zooplankton feeding stage with an emphasis on the energy reallocation of proteins, carbohydrates, and lipids. This is particularly interesting given that glyphosate levels and glyphosate transfer through trophic levels have been rarely studied in zooplankton.

An analysis of the bioconcentration and toxicity of glyphosate in *D. rerio* showed that glyphosate was more likely to be incorporated through the medium than through food (zooplankton), which supports the results of previous studies that have ruled out the potential for biomagnification. As expected, *D. rerio* livers contained the highest glyphosate levels ( $< 8 \mu\text{g}/\text{mg}$  of tissue; bioconcentration factor values  $< 6$ ), followed by the gills and muscle tissue. However, we did observe the bioconcentration of glyphosate in zooplankton of up to 6.26% of the total dry weight of rotifers. Zebrafish food preferences during the first-feeding stage were also analyzed. We found that exposure to glyphosate in the medium was more important for its incorporation in zebrafish larvae than consuming zooplankton species containing glyphosate. Our results show severe mortality ( $> 40\%$ ) at low glyphosate concentrations during the first-feeding stage. The exposure concentrations for glyphosate used in this study (0.8 and 1.0 mg/L) may be found in environments with either high or recent glyphosate applications. Although glyphosate is not biomagnified, our results suggest that glyphosate might affect the dynamics between zooplankton and zebrafish larvae by affecting survival and feeding rates.

## INTRODUCCIÓN

El glifosato (N- fosfometil glicina) es un compuesto activo de los herbicidas para el control de malezas de plantas perennes y anuales. El mecanismo de acción inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos, ya que suprime la enzima de la vía del shikimato, causando que la planta no crezca (Rondón-Barragán et al., 2012). Este compuesto es un ácido, normalmente se utiliza como sal, altamente soluble en agua con un tiempo de vida media de 3.5 a 70 días (Álvarez et al., 2012). Actualmente este herbicida es común usarlo en el proceso de preparación del campo, limpiar el terreno y genera millones de dólares por sus ventas.

México, cuenta con 110 registros autorizados para uso agrícola; también se utiliza como agente desecante, en cultivos como sorgo o soya para secar el grano y adelantar la cosecha o en caña de azúcar como madurante para aumentar el grado de sacarosa (Bejarano, 2017, 2018). Su uso continuo en estos casos aumenta el riesgo de encontrarlo en los alimentos, aunque la industria considera no tóxico para mamíferos y no existiría algún problema en que su ingesta fuera por dieta, ya que es menos tóxico que una aspirina (Williams et al., 2000, Duke y Powles, 2008; Samsel y Seneff, 2013).

En nuestro país, el glifosato es un compuesto activo de herbicidas comerciales, donde se adicionan surfactantes entre otros compuestos, como Faena®, Cacique 480®, Nobel 62%®, Lafam®, entre otros. De acuerdo con la COFEPRIS, se utiliza en 30 cultivos diferentes, incluyendo los cultivos genéticamente modificados. Su uso intensivo y repetido ha provocado resistencia para 22 especies de plantas registradas en 27 países (CIBIOGEM-CONACYT, 2019). Se han encontrado afectaciones en el sistema nervioso, y se considera embriotóxico, citotóxico y genotóxico (Bejarano, 2018). La International Agency for Research on Cancer ha clasificado el glifosato como carcinogénico en humanos (International Agency for Research on Cancer, 2016). Su uso en nuestro país es considerable y por lo tanto es importante obtener información sobre el impacto y magnitud de este compuesto a nivel nacional, ya que se desconoce la cifra exacta que se utiliza y los efectos a largo plazo que se deriven de este uso (Bejarano, 2018).

El glifosato no se puede bioacumular ya que es soluble en agua, el proceso de biomagnificación no es probable. Sin embargo, se ha considerado debido a la prevalencia de este compuesto en el agua, al ser expuestos los primeros eslabones de la cadena alimenticia, dan como resultado la presencia en tejidos de peces, crustáceos, entre otros, lo que provocaría contaminación en la cadena trófica acuática (Annett et al., 2014).

En estudios *in vitro*, se ha observado que el glifosato es un agente citotóxico epidérmico, afectando las defensas antioxidantes, el balance redox de glutatión, e incrementa la lipoperoxidación (Gehin et al., 2006; Heu et al., 2012). Se han realizado diferentes estudios de toxicidad sobre el efecto del glifosato o herbicidas basados en este compuesto en peces

en diferentes áreas de conocimiento, como el pez dorado (*Carassius auratis*) (Lushchak et al., 2009, Li et al., 2017), guppy (*Poecilia reticulata*) (Harayashiki et al., 2013), sábalo (*Prochilodus lineatus*) (Langiano y Martínez, 2008), pez cebra (*Danio rerio*) (Jofré et al., 2013; Webster y Santos, 2015; Sulukan et al., 2017; Zhang et al., 2017), en todos los casos las vías de exposición es por agua; de tal forma, que la información acerca de la biotransformación de este compuesto y los efectos en la cadena trófica acuática es limitada. Existe un alto riesgo de que el glifosato afecte los cuerpos de agua superficiales y subterráneos cercanos al lugar de aplicación, con un subsecuente desequilibrio ecológico debido a su potencial tóxico (Jofré et al., 2013). En Campeche, Chiapas, Jalisco y Colima se ha encontrado en aguas subterráneas y superficiales; además de estar presente en agua embotellada, y orina (Ruiz-Toledo et al., 2014; Rendon-von Osten y Dzul-Caamal, 2017; Sierra-Díaz et al., 2019; Polanco Rodríguez et al., 2019).

El pez cebra como modelo biológico tiene muchas ventajas, es pequeño, su ciclo reproductivo es corto, además de compartir un alto grado de similitud con el genoma humano (Yu-Jie et al., 2014). Además de combinar las ventajas de alto rendimiento y biología molecular en sistemas *in vivo*, con la ventaja de observar el efecto de tóxicos en un organismo completo, en un menor espacio y con menor mantenimiento que los organismos modelo tradicionales (Gamse y Gorelick, 2016).

## **MARCO TEÓRICO**

### **CARACTERÍSTICAS DEL GLIFOSATO**

El glifosato es identificado químicamente como N-fosfonometil glicina, y tiene en su estructura un enlace covalente entre el carbono y fósforo, por lo que se le considera un pesticida organofosforado con enlaces fosfodiéster. Este enlace proporciona propiedades físicas y químicas como: a) alta solubilidad en el agua, b) alta adsorción, c) capacidad de quelar iones metálicos, y d) compatibilidad con otros productos químicos (Sviridov et al., 2014; Gamse y Gorelick, 2016). El glifosato y otros fosfonatos son resistentes a la degradación química, física y biológica comparado con otro tipo de compuestos con otros enlaces como nitrógeno-fósforo (N-P), sulfuro-fósforo (S-P) u oxígeno-fósforo (O-P); resistente a la hidrólisis en los rangos de pH de 3-9 (Villarreal-Chiu et al., 2017).



**Cuadro 1. Características del glifosato. Tomado de International Agency for Research on Cancer, 2017.**

Descripción	Sólido cristalino, incoloro, inodoro.
Solubilidad	Media, 11.6 g/L en agua a 25°C, insoluble en solventes orgánicos
Volatilidad	1.31 x 10 <sup>-2</sup> mPa a 25°C
Estabilidad	A la hidrólisis en pH 3 a pH 9 y relativamente estable a la fotodegradación. No se hidroliza, ni se oxida en campo. Se descompone al calentarse, produciendo humos tóxicos que incluyen óxidos de nitrógeno y óxidos de fósforo
Reactividad	Corroe al hierro y acero galvanizado
Coeficiente de reparto octanol:agua	log P, < -3.2 a pH 2-5 y 20°C (Método 107 de OCDE)

El glifosato es un compuesto químico que es eléctricamente neutro que tiene cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes, con tres protones ácidos que lo convierten en un agente quelante tridentado de metales divalentes y trivalentes. Formado por tres grupos funcionales polares: amina, carboxilato y fosfonato; presenta afinidad por los cationes trivalente como Al<sup>3+</sup> y Fe<sup>3+</sup> y por los metales de transición Cu<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup> con los que forma complejos metálicos (Okada et al., 2019; Villamar-Ayala et al., 2019). Algunos estudios han encontrado que en los rumiantes se ha visto afectado la absorción de minerales en el tracto digestivo por la quelación del glifosato (Okada et al., 2019).

#### EL USO DEL GLIFOSATO EN EL MUNDO

En 1950 se descubrió la molécula de glifosato, sin embargo, hasta 1970, se identificó su actividad herbicida y en 1974 fue comercializado por Monsanto en la formulación conocida como Roundup.

Desde su aparición en el mercado su uso no era tan popular ya que se utilizaban otros dos herbicidas (atrazina y metolaclor), fue hasta 1995, que incrementaron las ventas por la introducción de los cultivos genéticamente modificados y a partir del año 2000 su precio ha bajado. No se tiene la compilación de datos globales en la agricultura y otros sectores relacionados, así que el cuadro 2 se basa solo en la producción de glifosato en la industria (Benbrook, 2016).

**Cuadro 2. Cantidad de ingrediente activo de glifosato producido industrialmente de manera global. Tomado de Benbrook (2016).**

Periodo	Uso total (T)	Incremento del periodo anterior	Porcentaje total de 1974-2014
1974	3.2	NA	0
1975-1984	130.5	127	1.5
1985-1994	387.3	257	4.5
1995-2004	1909	1522	22.3
2005-2014	6133	4224	71.6
Total	8563		

La expiración de la patente de Monsanto en el año 2000 ha incrementado su producción por otras compañías, lo que complica la recopilación de los datos sobre el uso o el volumen de ventas reales. Actualmente Estados Unidos, Argentina y Brasil en América y China e India en Asia, Sudáfrica en África son los principales países en usar el glifosato y semillas resistentes al herbicida. En el continente Europeo ha disminuido su uso debido a la reciente legislación (Benbrook, 2016; Richmond, 2018).

Actualmente algunos países han prohibido o restringido el uso de este herbicida, entre los que se encuentran: Malawi, Vietnam, Sri Lanka, Omán, Arabia Saudita, Kuwait, Emiratos Árabes Unidos, Bahrein, Qatar, Bermudas, San Vicente y las Granadinas, Bélgica, República Checa, Dinamarca, Francia, Italia, Países Bajos, Argentina (Grandcoin et al., 2017).

Después de la aplicación del glifosato se concentra en las capas superiores del suelo, pero dependerá del pH, textura del suelo y niveles de fosfato. Es importante mencionar que el uso de glifosato no está limitado a fuentes agrícolas, en los últimos años se ha encontrado que es de origen urbano (Grandcoin et al., 2017).

## GLIFOSATO EN MÉXICO

Es el herbicida más vendido en México, representa el 45% de las ventas; actualmente el gobierno mexicano ha decretado prohibir su uso para enero del 2024 con reducciones graduales (Alcántara-De la Cruz et al., 2021). Se comercializa por 49 empresas hasta septiembre del 2020 (Alcántara-De la Cruz et al., 2021): Dow, FMC, Syngenta, Agricultura Nacional Agri-Estrella, Química Agrícola de Morelos entre otras. En nuestro país se tiene registro de que a raíz de la expansión de la soya transgénica ha causado la contaminación de mantos freáticos (Bejarano, 2018). Del total de registros autorizados vigentes para uso agrícola, urbano, en jardinería e industrial, el mayor porcentaje se destina a uso agrícola. Se

estimó que la cantidad de glifosato combinado con surfactantes utilizado en los cultivos genéticamente modificados aprobados en México, para el 2009 fue de 60 mil a 1 millón de L, aumentando considerablemente para el 2011 entre 4 a 7 millones, al ser un solo sector el abarcado es importante obtener información más precisa sobre su uso y control estas cifras nos indican que ha aumentado a la par, con la introducción de los cultivos transgénicos (Arellano-Aguilar et al., 2009). Se tiene registro en 2018 que el consumo del ingrediente activo fue de 53,100 L en el año 2018 por lo tanto es importante tener una idea clara sobre la magnitud e impacto del compuesto (Arellano-Aguilar et al., 2009).

#### DEGRADACIÓN DEL GLIFOSATO

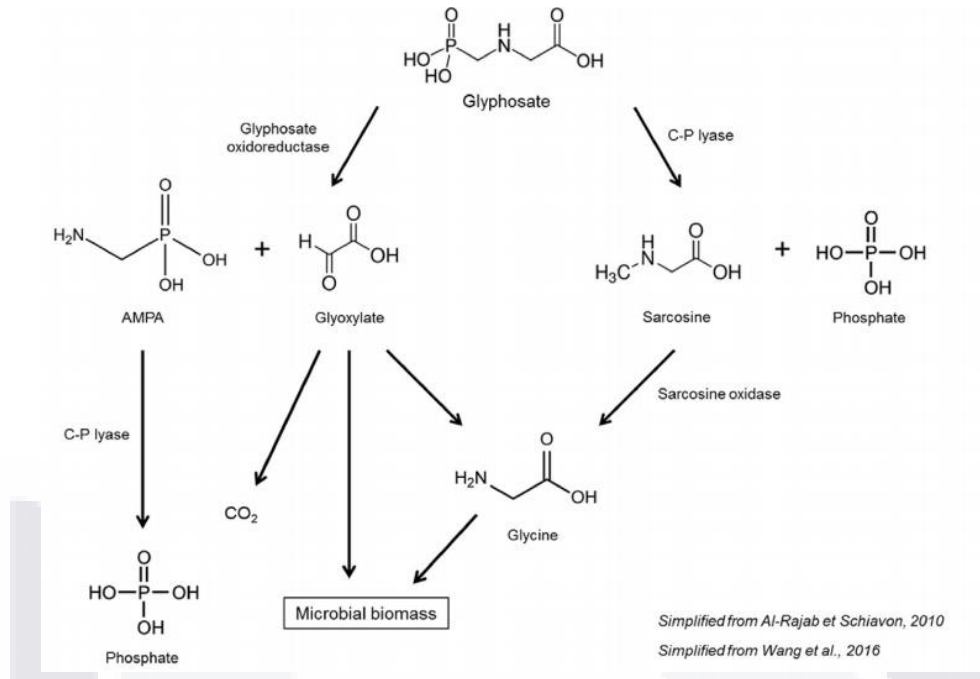
El glifosato inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos ya que suprime la enzima de la vía del shikimato, esta inhibición suprime la síntesis de las proteínas necesarias, así como los metabolitos secundarios y obstaculiza la vía de energía vital para las plantas y los microorganismos del suelo (Zhan et al., 2018).

Existen dos vías principales de degradación (Figura 1), en una se obtiene ácido aminometilfosfónico (AMPA) y ácido glioxilato y en otro sarcosina y glicina, la presencia en el suelo de microorganismos facilita su degradación, independientemente de las condiciones de oxigenación (Grandcoin et al., 2017), por ello se ha detectado AMPA a menudo en aguas superficiales y subterráneas (Li et al., 2017). Aunque en agua, el papel de las comunidades bacterianas es importante, también se pueden degradar debido a la hidrólisis y fotodegradación (Mercurio et al., 2014; Li et al., 2017).

Al ser un herbicida de uso agrícola, los estudios se han enfocado hacia el tiempo de vida media en suelos; el registro del tiempo de vida media en aguas dulces se encuentra entre menor a 60 días hasta 70 días de permanencia, y varía dependiendo del sitio de estudio (Cuadro 3) (Mercurio et al., 2014).

#### PERSISTENCIA DEL GLIFOSATO EN AGUA

La persistencia de este compuesto en aguas superficiales o subterráneas ha ido en aumento, debido a las fuertes lluvias y escorrentías urbanas y agrícolas. En el cuadro 3, se registran algunas concentraciones encontradas en aguas superficiales o subterráneas en países de América y Europa.



**Figura 1 Principales vías de degradación de glifosato en el ambiente. Tomado de Grandcoïn et al. (2017).**

**Cuadro 3. Tiempo de vida media del glifosato en diferentes tipos de agua dulce. Modificado de Mackay et al. (2006).**

Tiempo de vida media (días)	Sitio
70	Agua de estanque
> 63	Agua contaminada de un lago
63	Agua de pantano
49	Pantano con <i>Sphagnum</i>

**Cuadro 3. Concentraciones encontradas en aguas superficiales o subterráneas en países de América y Europa. Elaborado por GBAS.**

País	Ocurrencia y concentraciones de glifosato	Año	Referencia
Alemania	Pocas muestras positivas en dos afluentes del río Ruhr, hasta 0.59 µg/L	1998	Zirena Vilca et al. (2018)
Argentina	35% de muestras de agua superficial positivas, 0.1-7.6 µg/L	2012	
Canadá	22% e muestras positivas, hasta 6.07 µg/L	2002	
Dinamarca	El 25% de las muestras de agua superficial son positivas, hasta 31 µg/L; 4% de muestras de aguas subterráneas positivas hasta 0.6 µg/L	1999-2009	
Medio Oeste E. U. A.	36% de muestras de arroyos positivas, hasta 8.7 µg/L	2002	
	44% de muestras de arroyos positivas hasta 27.8 µg/L	2013	
Washington, Maryland, Iowa, Wyoming E. U. A.	Todas las corrientes son positivas hasta 328 µg/L	2005-2006	Battaglin et al. (2009)
Iowa, Indiana, Mississippi	La mayoría de los ríos son positivos, hasta 430 µg/L, después de una tormenta	2004-2008	Coupe et al. (2012)
México	Todas las muestras de aguas superficiales son positivas hasta 1.42 µg/L	2015	Rendón-von Osten y Dzul-Caamal (2017)
España	41% de muestras positivas de aguas subterráneas, hasta 2.5 µg/L	2007-2010	Zirena Vilca et al. (2018)
Francia	91% de muestras de flujo positivas, hasta 165 µg/L	2003-2004	Villeneuve et al. (2011)
Hungría	La mayoría de las muestras de ríos y aguas subterráneas son positivas, hasta 0.001 µg/L	2010-2011	Zirena Vilca et al. (2018)
Suiza	La mayoría de las muestras de agua corriente hasta 2.1 µg/L	2016	Poiger et al. (2017)

### TOXICOCINÉTICA DEL GLIFOSATO

Los detalles de la absorción y los procesos siguientes en el organismo están más documentados para mamíferos, principalmente en el modelo murino. Anadón et al. (2009), describieron el mecanismo de absorción del glifosato por vía oral mediante un modelo de dos compartimentos diferentes probado en ratas cuando es ingresado por vía intravenosa o alimento. La fase inicial consta de la distribución rápida y una eliminación más lenta. La distribución del glifosato se da principalmente en los tejidos vasculares, aunque llega a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

todos los tejidos. En el intestino la absorción ocurre lentamente a través del tracto gastrointestinal; cuando la vía de ingreso es oral, tarda 5.16 h, por lo tanto, su biodisponibilidad es baja, lo que puede ser causado por la excreción biliar o degradación en el sitio de absorción. La vida media de eliminación varió de 20 h en el intestino delgado a más de 90 h en el hueso (Brewster et al., 1991).

La absorción del glifosato en el tracto digestivo es poco y lento, el tiempo de vida media en este órgano es de 2.29 h, la concentración máxima en plasma es 4.62  $\mu\text{m}/\text{mL}$  y el tiempo máximo que se registró el compuesto cuando el consumo es vía oral es de 5.16 h, en una dosis de 400 mg/kg. Aproximadamente la absorción del compuesto va del 19% hasta 36% dependiendo de la dosis y la mayoría es eliminada en las heces (Anadón et al., 2009).

La distribución por vía oral se lleva a cabo rápidamente, sin acumulación significativa en ningún tejido en particular (Menkes et al., 1991; Pohl et al., 2019). Sin embargo, algunos reportes mencionan que se puede encontrar en un rango de < 1- 10% en ratas F344/N, en intestinos, hígado, piel, sangre, en un lapso de 6 h, posteriormente a las 24 h solo se encontraba < 1% de la dosis administrada (Chan y Malher 1992). Otros estudios mencionan que el pico de distribución se da en las primeras 6 h, posterior a ello se elimina fácilmente, aunque sugieren que algunos órganos como el hueso puede ser un poco más lento (Brewster et al., 1991).

Se tiene poca información sobre la biotransformación del glifosato y solo en mamíferos. El glifosato se biotransforma en dos principales metabolitos, AMPA y glioxilato, se conoce que este último compuesto puede reaccionar con las cisteínas, argininas y lisinas de las proteínas, afectando la función de estas. El estudio de Ford et al. (2017), donde realizaron un mapeo del metabolismo en vivo en ratones utilizando 200 mg/kg, demostró que cuando los organismos son expuestos a glifosato la concentración de glioxilato aumenta, incrementando el potencial reactivo de este compuesto, haciendo que se inhiban o reaccionen las enzimas involucradas en la oxidación de lípidos, afectando principalmente el hígado. Sin embargo, no descartan la posibilidad de que el microbioma intestinal contribuye en el metabolismo del glifosato.

El tiempo de eliminación se encuentra entre 3-4 h o cuando ha sido en grandes cantidades de 2- 3 días, recuperándose del 60%- 90% de la dosis administrada y principalmente en heces y orina (Chan y Malher 1992; United Nations Environment Programme 1994; Roberts et al., 2010).

## ESTRÉS OXIDATIVO

Está caracterizado por debilitar las defensas antioxidantes y la formación de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) o especies reactivas de oxígeno (ROS) o ambas. Entre las ROS, se encuentran el superóxido anión radical ( $\text{O}^{2-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y el



radical hidroxilo (-OH). Estas son causadas por el desequilibrio en la formación de componentes prooxidantes y antioxidantes. Las enzimas antioxidantes incluyen superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la conversión de  $O_2$  a  $H_2O_2$ , catalasa (CAT), que regula los niveles de  $H_2O_2$  transformándolo en  $H_2O$  y  $O_2$ , glutatión peroxidasa (GPx), que reacciona con  $H_2O_2$  transformándolo en agua y alcohol, utilizando glutatión en su forma reducida (GSH) como agente reductor, aunque el principal regulador es CAT.

Glutatión reductasa (GR) cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) regulando la concentración intracelular de glutatión reducido (GSH) y por último la glutatión-S-transferasa que participa en la detoxificación y excreción de xenobióticos y sus metabolitos (Ochoa y González 2008).

Se tiene evidencia de que la generación de estrés oxidativo es una respuesta de los organismos no blanco del glifosato, ya que existen algunos estudios que indican que el glifosato y las formulaciones comerciales que lo contienen producen estrés oxidativo. En peces se ha observado daño oxidativo en lípidos y ADN (Samanta et al., 2014; Ostera et al., 2016).

#### REASIGNACIÓN DE ENERGÍA

El enfoque energético es muy útil ya que se basa en la termodinámica (materia y energía se conservan) y proporciona una base para los vínculos entre los distintos niveles de organización biológica (Chizinski et al., 2008). El metabolismo energético desempeña un papel central en el comportamiento y desarrollo de los organismos, que permite la supervivencia, crecimiento y reproducción exitosa del organismo en el ambiente, la alteración del metabolismo energético puede tener efectos a largo plazo en niveles supraindividuales de la organización biológica. Algunos estudios han demostrado asociación entre las alteraciones químicas energéticas y el deterioro de funciones fisiológicas o comportamiento en organismos no objetivo expuestos a contaminantes (Gravato et al., 2014; Rodrigues et al., 2015; Abe et al., 2018).

Los biomarcadores involucrados en el balance energético tienen una gran relevancia ecológica, ya que se ha demostrado que cuando los organismos están expuestos a estresantes químicos, los mecanismos de desintoxicación son energéticamente costosos (Abe et al., 2018). Provocando una reasignación alternativa de energía en los organismos manifestando un aumento de consumo, una reducción en el crecimiento o ambas cosas (Chizinski et al., 2008). Una combinación de un enfoque descendente sobre el individuo y un enfoque ascendente sobre las células y las moléculas puede ser útil para identificar qué efectos de nivel inferior son relevantes para predecir las consecuencias directas de los factores de estrés sobre el individuo, de esa forma vincular las primeras respuestas subcelulares o celulares con respuestas individuales y reproductivas más lentas, pero

ecológicamente relevantes (Smolders et al., 2003).

## ORGANISMOS ACUÁTICOS COMO INDICADORES DE LA CALIDAD DEL AGUA

Uno de los primeros eslabones de las cadenas tróficas acuáticas, son los rotíferos, importantes en la transferencia de masa y energía, como intermediarios de los niveles más pequeños, que no son aprovechados por otros organismos planctónicos, hasta los consumidores secundarios (Conde- Porcuna et al., 2004). Son sensibles a las alteraciones ambientales, buenos indicadores de calidad (Da Silva Azevêdo et al., 2015), útiles para medir interacciones en el tipo depredador-presa, cambios en la dinámica poblacional y estructura comunitaria (Gagneten, 2002).

Los peces juegan un papel importante en las redes tróficas acuáticas, ya que nos permite obtener información sobre la estructura y funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, lo que permite abordar algunos de los problemas ecológicos como la contaminación por plaguicidas (Granado, 2000). Los peces al encontrarse en todas las partes del medio ambiente acuático y ser parte de las cadenas alimenticias, permiten evaluar las respuestas biológicas y bioquímicas de los contaminantes ambientales. Por esta razón su estudio resulta de gran importancia y se ha convertido en una herramienta para la toma de decisiones en cuestiones ambientales y como índices en calidad del medio acuático (Van der Oost et al., 2003).

El pez cebra, se ha desarrollado como un modelo biológico para estudios toxicológicos ambientales. Tiene la ventaja de producir cientos de embriones, y las etapas de desarrollo están bien documentadas (Roy et al., 2016). La sensibilidad de este organismo con diferentes contaminantes ha permitido observar cambios en la morfología, desarrollo y fisiología (Yu-Jie et al., 2014).

## CARACTERÍSTICAS DEL PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

Son peces nativos de arroyos y ríos del norte y centro de la India, pertenecen al superorden Ostariopsysi. Se caracteriza por tener los huesos y ligamentos conectados a la vejiga natatoria con el oído interno (aparato Weber). Los adultos tienen una longitud promedio de 2- 3 cm, pero pueden alcanzar tallas de 4-5 cm. Sus cuerpos son alargados con una cabeza corta, un hocico puntiagudo y una boca hacia arriba. Los machos son más delgados que las hembras y más oscuros, los machos reproductores son oscuros con amarillo oscuro en la parte inferior. Las larvas y los juveniles tienen aproximadamente 3.5 mm de longitud, la maduración de cada una de las larvas es asincrónica, después de las 72 horas postfecundación (hpf), se realiza la primera natación y las reservas del saco vitelino son su alimento principal (Cuadro 4) (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002).

**Cuadro 4. Periodo de desarrollo de larva y adulto. Tomada de Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002**

Periodo	Días	Longitud	Descripción
Larva temprana	3	3.5 mm	Natación libre, orientación vertical, respuesta a situaciones externas
Larva media	14	6 mm	Búsqueda de comida
Juvenil	30	1 cm	Aparecen los patrones de pigmentación
Adulto temprano	90	2 cm	Primera reproducción
Esperanza de vida	1000	4-5 cm	Muerte

Existen algunas ventajas del pez cebrá como sistema modelo, por ejemplo, sus características de fertilización y el desarrollo de los embriones que es transparente, y facilita su observación. Después de aproximadamente dos días se pueden ver todas las características corporales específicas de los vertebrados, todos los órganos internos. Las larvas eclosionadas son capaces de nadar y buscar alimento después de cinco días de fertilización. La gran cantidad de progenie facilita los estudios experimentales, por ello se han desarrollado un número de métodos y herramientas para emprender nuevos enfoques experimentales (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002). Entre los que se incluyen procedimientos internacionales para evaluar la toxicidad aguda de sustancias químicas como la prueba embrionaria de toxicidad aguda, la prueba para la detección de sustancias endocrinas activas, que actúan a través de los receptores de estrógeno, utilizando *tg(cyp19a1b:GFP)*, la prueba de toxicidad aguda en las diferentes etapas de vida de los peces, ensayos de toxicidad en la reproducción de la OECD, y en las pruebas de toxicidad en peces de la EPA.

## **ANTECEDENTES**

El glifosato es un herbicida utilizado de manera global, sus consecuencias no son del todo claras, (se ha realizado durante los últimos años alrededor de 200,000 publicaciones científicas en inglés y alrededor de 30,000 en español) los temas son diversos, la resistencia de las plantas genéticamente modificadas, el mecanismo de acción del compuesto y sus efectos con los surfactantes, así como la toxicología de este compuesto y otros que lo utilizan como ingrediente activo en su base, algunos de estos estudios han sido financiados por la industria con intereses específicos y algunas investigaciones muestran

resultados aparentemente contradictorios. De tal forma que aún existe controversia sobre la toxicidad del glifosato.

#### ESTUDIOS QUE LO CONSIDERAN INOCUO

Folmar et al. (1979) realizaron un estudio sobre la toxicidad aguda del glifosato con grado técnico, la sal isopropilamina de glifosato, el herbicida Roundup a peces e invertebrados acuáticos, algunas de las especies manejadas fueron *Daphnia magna*, gambas (*Gammarus pseudolimnaeus*), larvas de mosquito (*Chironomous plumosus*), ninfas de mosca (*Ephemera walklas*), bagre de canal (*Ictalurus punctatus*), mojarra azul (*Lepomis macrochirus*), trucha arcoiris (*Salmo gairdneri= Onchorhynchus mykiss*). El glifosato grado técnico era considerablemente menos tóxico que Roundup. No se observaron cambios en la fecundidad ni en el índice gonadosomático en la trucha arcoiris adulta tratada con sal de isopropilamina. Consideraron que la aplicación del herbicida, a las tasas recomendadas, en los cuerpos de agua cercanos no debe afectar negativamente a las poblaciones residentes de peces o invertebrados. Sin embargo, las aplicaciones de primavera en situaciones lénticas, donde los niveles de oxígeno disuelto son bajos o las temperaturas son elevadas, podrían ser peligrosas para los peces jóvenes del año.

Williams et al., (2000) realizaron una revisión de diversos artículos publicados hasta esa fecha sobre la seguridad de su uso en humanos, mencionan que la absorción de glifosato y AMPA vía oral y dérmica es baja. Sin embargo, la exposición directa en ojos puede causar irritación como cualquier otro tipo de aerosol, sin efectos significativos. La bioacumulación de este herbicida en tejidos animales no se presenta. El compuesto no presenta toxicidad crónica, subcrónica o aguda, por lo tanto, argumentaron que no hay mayor riesgo para los humanos.

Pienjzek et al., (2004) estudiaron el efecto de glifosato en eritrocitos humanos a 1, 5 y 24 h expuestos a Roundup ULTRA 360 SL y glifosato activo a diferentes concentraciones (100 a 1500 ppm), evaluando lipoperoxidación lipídica, oxidación de hemoglobina, hemólisis y las enzimas GSH, CAT, encontraron que no había diferencias significativas en los niveles de los parámetros evaluados por ello, justificaron que es seguro para humanos.

Peixoto (2005) realizó una comparación de los efectos de Roundup y glifosato en la fosforilación oxidativa mitocondrial, observaron cambios significativos en la actividad bioenergética de la mitocondria, sin embargo, no pueden asegurar que el glifosato sea el causante de estas modificaciones, probablemente sean resultado de la sinergia de los surfactantes con el glifosato.

## ESTUDIOS QUE LO CONSIDERAN TÓXICO

Tsui y Chu (2003) evaluaron la toxicidad aguda del ácido de glifosato de grado técnico, la sal isopropilamina (IPA) de glifosato, Roundup y su surfactante polioxietilen amina (POEA) en *Vibrio fischer*, microalgas (*Selenastrum capricornutum* y *Skeletonema costatum*), protozoos (*Tetrahymena pyriformis* y *Euplotes vannus*) y crustáceos (*Ceriodaphnia dubia* y *Acartia tonsa*). En general, el orden de toxicidad de los productos químicos fue: POEA > Roundup > glifosato ácido > sal de IPA de glifosato, mientras que la toxicidad del ácido de glifosato se debió principalmente a su alta acidez. *Vibrio fischer* y los protozoos, tenían sensibilidades similares hacia Roundup. Por el contrario, las microalgas y los crustáceos eran 4-5 veces más sensibles al Roundup excepto las microalgas fotosintéticas, POEA representó más del 86% de Roundup, se demostró que la toxicidad y la contribución de la toxicidad de POEA dependen de la especie.

Dutra et al. (2011) examinaron los efectos de Roundup® sobre la composición química, los niveles de lipoperoxidación, la actividad de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa y los rasgos reproductivos en *Hyalella castroi* se expusieron a 0.36, 0.52, 1.08 y 2.16 mg/L de glifosato durante 7 días. Todas las concentraciones disminuyeron significativamente los parámetros bioquímicos y la actividad de la actividad de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa y aumento en los niveles de lipoperoxidación. Al mostrar cambios en concentraciones tan bajas concluyeron que puede conducir a cambios en la estructura trófica de ambientes acuáticos.

Gluszczak et al. (2006) estudiaron la exposición de la especie *Leporinus obtusidens* a concentraciones a 3, 6 10 o 20 mg/L durante 96 h y su efecto en los parámetros metabolismo plasmático, la sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS), catalasa, proteína carbonilo y los niveles de glucosa y lactato plasmáticos. Los niveles de TBARS en el cerebro mostraron una disminución, pero en cerebro se observó un aumento en los niveles de TBARS en las concentraciones probadas, mientras que en músculo no se notó algún cambio después de la exposición con el herbicida. En cuestión de los parámetros bioquímicos aumentaron los niveles de proteínas y carbohidratos de la mucosa en todas las concentraciones. Estos resultados muestran que una exposición de 96 h modifica los parámetros toxicológicos del organismo.

Domínguez-Cortinas et al. (2008) evaluaron la toxicidad del glifosato puro y la formula comercial Faena®, utilizando como modelos biológicos al rotífero *Lecane quadridentata* y al cladocero *Daphnia magna*, observando que la toxicidad aguda, de la formula comercial Faena fue 11 veces más tóxico para *L. quadridentata* que el glifosato puro y ligeramente más tóxico para *D. magna* (1.7 veces). Registrando inhibición de la actividad de la esterasa y fosfolipasa A12 con el glifosato puro en *L. quadridentata*, encontrando que el glifosato puro y la formula comercial Faena son tóxicos para organismos acuáticos no objetivo.



En la evaluación de la toxicidad aguda de dos herbicidas comerciales formulados con glifosato y de una solución del mismo; en peces de la especie *Poecilia reticulata* "lebistes" se encontró mortalidad del 100 % de los especímenes a 100 µl/l (equivalente a 48 mg/L de principio activo) y a 50 µl/L (equivalente a 24 mg/L de principio activo) en los herbicidas comerciales; en la solución formulada con glifosato puro no se registró mortalidad aún a concentraciones de 400 mg/L. Utilizando dosis subletales en función de los datos obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda se determinó que a largo plazo especímenes de *Cyprinus carpio haematopterus* "carpa koi", manifestaron severas alteraciones hematológicas principalmente frente a una de las formulaciones evaluadas (Álvarez et al., 2012).

Bridi et al. (2017) evaluaron los efectos del glifosato y Roundup en el comportamiento y algunos aspectos morfológicos en alevines y adultos de pez cebra a diferentes concentraciones. Ellos encontraron que ambos reducen la velocidad en los adultos, así como una disminución de la distancia ocular y deterioro en la memoria. Presentan evidencias de que existen pocas diferencias entre el efecto del glifosato y Roundup, ya que alteran la morfología y el comportamiento del pez cebra teniendo un mecanismo similar de toxicidad y respuesta celular.

Zhang et al. (2017), evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de glifosato en *D. rerio* y la modificación de desarrollo morfológico, biomecanismos, comportamiento y análisis fisiológicos. Los resultados morfológicos muestran una disminución en el proceso de epibolia y la longitud del cuerpo, ojo y área de la cabeza que se reduce con concentraciones por encima de 10 mg/L. La expresión de *ntl* (no tail) disminuyó y *krox20* (también conocido como *Egr2b* y responsable de crecimiento temprano de 2b) cambian cuando la concentración del glifosato incrementa pero no cambia en la expresión de *shh* (sonic hedgehog). Además los análisis biomecánicos de la elasticidad del corion indicaron que la tensión superficial de los embriones tratados disminuyó; el test de locomoción reveló que los embriones expuestos elevan la actividad locomotora, probablemente por daño motoneuronal, estas dos situaciones pueden explicar las altas tasas de eclosión después de ser expuestos a glifosato.

Li et al. (2017) evaluaron la toxicidad del glifosato en *Carassius auratus*, durante 90 días. Analizaron por inspección histopatológica en los tejidos de cerebro, riñón e hígado, así como análisis de algunos biomarcadores químicos como creatinina, nitrógeno en orina, transaminasa glutámico- pirúvica, transaminasa glutámico- oxalacética y lactato deshidrogenasa, dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. La exposición durante este tipo causó cambios en los índices bioquímicos de la sangre y lesiones en riñones. Encontraron cambios en el metabolismo energético, de aminoácidos y nucleótidos, así como aumento en el estrés oxidativo.

Vajargah et al. (2018) registraron mortalidad a partir de los 50 mL/L en *C. carpio* a las 96 h.



Los cambios visibles fueron incremento de mucus, nado y actividad del opérculo, así como oscurecimiento de la piel. Las muertes registradas se observaron con la boca abierta.

Para las formulaciones comerciales, De Moura et al. (2017) registraron los efectos de Roundup Original en "jundiara" (*Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma reticulatum*) basándose en parámetros hematológicos, metabólicos, fisiológicos y genotóxicos, observando alteraciones en dichos parámetros concluyendo que estos cambios afectan el desarrollo de los organismos, ya que tienen que implementar estrategias para la desintoxicación como la movilización de ácidos grasos. Samanta et al. (2014) evaluaron la respuesta enzimática de Excel Mera 71 en dos especies de teleósteos *Anabas testudineus* y *Heteropneustes fossilis*. Utilizando 17.20 mg/L durante 30 días en condiciones de laboratorio y diferentes órganos (cerebro, músculo y médula espinal), observando un incremento en los niveles de acetilcolinesterasa, lipoperoxidación para ambas especies en todos los tejidos y decremento en los niveles de GST y proteína en todos los tejidos, afectando el desarrollo de los organismos.

#### ESTUDIOS SUMINISTRANDO CULTIVOS TOLERANTES AL GLIFOSATO COMO ALIMENTO

Se han realizado estudios con animales de granja para evaluar el efecto del alimento (cultivos transgénicos tolerantes al glifosato). Estos estudios incluyeron vacas lecheras (Grant et al., 2003; Combs y Hartnell, 2008) ganado vacuno (Erickson et al., 2003), ovejas (Hartnell et al., 2005) y pollos (Taylor et al., 2003; Kan y Hartnell, 2004; McNaughton et al., 2011). Ninguno de los estudios mencionados encontró efectos negativos en desarrollo, morfología o fisiología en los organismos que fueron alimentados con los cultivos tratados con glifosato.

#### ESTUDIOS EN MÉXICO

Polanco- Rodríguez y Araujo León. (2018) registraron la presencia de glifosato en 90% de las muestras de agua evaluadas que van desde 0.47 µg/L y 1 µg/L en aguas subterráneas por encima de lo permitido por el Consejo de la Unión Europea de Glifosato. La mayoría de las muestras superaron los límites aceptables para consumo humano en la Unión Europea (0.1 µg/L) Hicieron énfasis que en México no hay legislación específica para glifosato en agua potable, pero la NOM-201-SSA1-2015, establece que los compuestos orgánicos no halogenados, donde se incluye el glifosato, no deben exceder 10 µg/L. Además de encontrar glifosato en la orina de las personas que viven y trabajan dentro de las áreas agrícolas con una concentración de 0.47 µg/L y las que viven en la ciudad de Campeche 0.22 µg/L.

Leyva-Soto et al. (2018) analizaron el riesgo para los agricultores expuestos a agua contaminada con glifosato y AMPA, en Valle de Mayo, Sonora, concluyeron que las concentraciones de ingesta diarias ponen en riesgo la salud y el consumo de agua de un pozo cerca de canales donde ha sido aplicado está correlacionado con la cantidad de personas con diabetes e hipertensión.

En Chiapas en aguas subterráneas se han registrado con una concentración de  $<0.13 \mu\text{g/L}$  a  $18.43 \mu\text{g/L}$  y de  $<0.13 \mu\text{g/L}$  a  $36.7 \mu\text{g/L}$  en aguas superficiales (Ruiz-Toledo et al., 2014). Además de estar presente en agua embotellada, y orina (Rendón-Von Osten y Dzul-Caamal 2017; Sierra-Díaz et al., 2019). En la cuenca Ayuquila-Armería, en los estados de Jalisco y Colima, se ha encontrado una concentración promedio de  $0.29 \text{mg/L}$  en aguas superficiales (Rodríguez Aguilar et al., 2019).

## **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es el potencial de bioacumulación de glifosato en *Lecane papuana*, *Ceriodaphnia dubia* y *Brachionus calyciflorus*?

¿Cómo se realiza la asignación de energía en el metabolismo del pez cebrá cuando ingiere alimento con glifosato?

¿Cómo actúan las enzimas antioxidantes ante la presencia de glifosato en el alimento y/o medio en el pez cebrá?

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del glifosato cuando la exposición es a través de dieta en biomarcadores bioquímicos y morfométricos en el pez cebrá.

## **OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- Determinar la tasa de alimentación del pez cebrá durante los primeros treinta días.
- Evaluar el factor de bioconcentración del glifosato en el alimento vivo, así como en organismos adultos de pez cebrá.
- Determinar la cantidad de proteínas, carbohidratos y lípidos en el pez cebrá en diferentes etapas.
- Determinar el efecto del glifosato en el desarrollo de (*Danio rerio*) sobre los biomarcadores, bioquímicos y morfométricos.

## **HIPÓTESIS**

Al proporcionar alimento vivo expuesto previamente a glifosato a los organismos del pez

cebra desde su primera alimentación hasta su etapa juvenil modificará los biomarcadores bioquímicos y morfométricos

## JUSTIFICACIÓN

La aparición de glifosato en ambientes acuáticos y terrestres ha aumentado la preocupación por sus impactos ambientales. Sin embargo, los efectos en la cadena alimentaria desde los primeros eslabones no se han documentado ampliamente en el ambiente acuático. Se sabe que el glifosato, afecta a los organismos no blanco provocando estrés oxidativo, generando alteraciones significativas en el desarrollo de estos, pero existen vacíos de conocimiento. Por lo tanto, es importante su estudio cuando la exposición es a través de la dieta, así como las posibles modificaciones en el metabolismo de los organismos y el comportamiento del compuesto a través de las redes alimentarias a pequeña escala.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CULTIVO DE ESPECIES PLANCTÓNICAS

Para realizar los cultivos, se preparó medio Bold (Nichols, 1973) para el crecimiento del alga *Nannochloropsis oculata* y *Raphidocelis subcapitata*. que sirvieron de alimento para *Lecane papuana* (LP) rotífero totalmente lorizado, bentónico, longitud media 113  $\mu\text{m}$ , media de peso 0.68  $\mu\text{g}$ ; *Brachionus calyciflorus* (BC), rotífero utilizado como alimento vivo en la acuicultura, se presenta en toda la columna de agua, longitud media 181  $\mu\text{m}$ , media de peso 1.37  $\mu\text{g}$  y *Ceriodaphnia dubia* (CD), longitud media 950  $\mu\text{m}$ , media de peso 10  $\mu\text{g}$ . Para el crecimiento de las especies planctónicas se preparó medio EPA (U.S. EPA, 1985), los organismos se mantuvieron a una temperatura de  $25 \pm 3$  °C y un fotoperiodo de 16 h luz. Se realizaron cultivos masivos de las tres especies planctónicas para compensar la demanda alimenticia de las larvas de *Danio rerio*.

### REACTIVO QUÍMICO

Se utilizó glifosato de grado analítico de Sigma Aldrich (número CAS 1071-83-6) de 99% de pureza, para hacer la solución stock, se prepararon 10 mg de glifosato se disolvieron en agua destilada (100 mL). A partir de la solución stock se prepararon las concentraciones utilizadas.

### BIOCONCENTRACIÓN DE ESPECIES ZOOPLANCTÓNICAS

Los organismos zooplanctónicos fueron expuestos durante 4, 8, 16 y 24 h al glifosato para evaluar la posible bioconcentración. Estas concentraciones de exposición se seleccionaron

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

como concentraciones relevantes para el medioambiente (0,8 y 1,0 mg/L) y la de 200 mg/L se consideró una concentración alta de glifosato para ver el comportamiento de absorción del mismo, esta concentración se seleccionó a partir de resultados anteriores (Domínguez-Cortinas et al., 2008). Trescientos veinte organismos de BC fueron expuestos a 0,8 mg/L, 320 organismos de LP fueron expuestos a 0,8 y 200 mg/L, y 320 organismos de CD fueron expuestos a 1 mg/L. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. Tras el periodo de exposición, los organismos se lavaron cinco veces con medio EPA de pH 7.5 y se realizó la cuantificación de glifosato tal y como se informó para los adultos de *D. rerio*.

#### MANTENIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE EMBRIONES DE *Danio rerio*

Los peces cebra adultos, machos y hembras, se obtuvieron del cultivo de peces del Laboratorio de Ecotoxicología de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México, donde se han mantenido con éxito en condiciones controladas durante más de 2 años. Los adultos fueron aclimatados en una piscina de 100 L con agua ciclada y oxigenada. Se mantuvieron a 27 °C, y un fotoperiodo de 10:14 h oscuridad: luz, alimentados dos veces al día con Tetramin® Tropical Flakes. Para la obtención de huevos fecundados se siguió el protocolo propuesto por la Guideline 236 de la OCDE (2013). Los adultos reproductores se colocaron en acuarios de 40 L con una malla de maternidad de 0.5 cm con una proporción sexual de 2♂:1♀. Los machos y las hembras se separaron la noche anterior sin comida. A continuación, los adultos reproductores se unieron en la maternidad, el apareamiento, el desove y la fecundación tuvieron lugar dentro de los 30 min después del inicio de la luz en la mañana. Los huevos se recogieron y se limpiaron en medio ISO (International Standard Organization, 1996). Todos los huevos se observaron bajo el estereomicroscopio, se identificaron y separaron los embriones viables, y se eliminaron los no viables.

#### BIOCONCENTRACIÓN DE ADULTOS DE *DANIO RERIO* EXPUESTOS A GLIFOSATO

Siete peces cebra adultos fueron expuestos a 1, 5 y 10 mg/L de glifosato durante 96 h, y se determinó la concentración en branquias, hígado y músculo. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado (n = 12). Los organismos fueron aletargados en un baño de hielo frío sin anestesia, la manipulación y sacrificio siguió las directrices éticas internacionales (National Research Council, 2011). Se siguió el protocolo propuesto por Guideline 203 de la OECD (2019). Brevemente, tras el periodo de exposición los organismos fueron disecados y los tejidos se lavaron cinco veces con medio EPA de pH 7,5 (96 mg NaHCO<sub>3</sub>, 60 mg CaSO<sub>4</sub>-2H<sub>2</sub>O, 60 mg MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 4 mg KCl en 1 L de agua destilada). Las muestras se almacenaron en un ultracongelador (Haier Modelo: DW-86L338). A continuación, las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

muestras se homogeneizaron en PBS de pH 7,4 (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1,8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en agua desionizada). A continuación, se ajustó el pH con NaOH 2N y HCl 2 N. Las muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se recogió y se utilizó para la determinación del glifosato. Cada réplica se homogeneizó en un volumen de 1 mL y se cuantificó la concentración de glifosato con un kit de prueba ELISA (Eurofins Abraxis; PN 500086; USA). La prueba se basa en un ELISA competitivo directo basado en el reconocimiento del glifosato por anticuerpos policlonales. La muestra se derivatiza y luego se añade a pocillos de microtitulación recubiertos con anticuerpos de cabra anti-conejo.

### PREFERENCIAS DURANTE LA ETAPA DE PRIMERA ALIMENTACIÓN

Se realizaron cuatro tratamientos:

- A) Control: larvas de *D. rerio* alimentadas con LP-BC en medio ISO: 2 Mm CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, 0,5 mM MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0,75 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,07mM KCl (ISO,1996).(libre de glifosato)
- B) Larvas alimentadas con LP-BC en medio ISO con 0. 8 mg/L de glifosato
- C) Larvas alimentadas con LP-BC previamente expuestas a 0,8 mg/L de glifosato en medio ISO
- D) Larvas alimentadas con LP-BC previamente expuestas a 0,8 mg/L de glifosato en medio ISO con 0,8 mg/L de glifosato.

Cada tratamiento consistió 20 organismos para cada una de las cinco réplicas. El experimento se inició a los 8 días postfertilización (dpf) con la primera alimentación de las larvas de *D. rerio* con rotíferos, (8 LP y 4 BC) aumentando según las necesidades, durante siete días (15 dpf). La revisión se hizo diariamente y se registró la supervivencia de las larvas. Al final del experimento se determinó la concentración de glifosato con un kit de prueba ELISA (Eurofins Abraxis; PN 500086; E. U. A.), así como la cuantificación de biomoléculas (carbohidratos, lípidos y proteínas).

### FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN

El factor de bioconcentración (BFC) se calculó a partir de la concentración de glifosato encontrada en el zooplancton entre el peso seco de la especie de zooplancton y los valores de concentración del medio ISO. En el caso del pez cebra adulto, el BFC se calculó a partir de la concentración de glifosato encontrada en los tejidos de los órganos entre el peso del órgano y los valores de concentración del medio ISO. El BFC en las larvas de pez cebra se calculó como la relación entre la concentración tisular de glifosato medida en el tejido y la concentración tisular de la especie zooplanctónica consumida durante 7 días. (Harangi et

al., 2017).

## EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS Y MORFOMÉTRICOS REASIGNACIÓN ENERGÉTICA DE PROTEÍNAS, CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS.

La cuantificación de proteínas se realizó con el método de Bradford según (Carbajal-Hernández et al., 2017), utilizando como estándar la albúmina de suero bovino. Se añadió 1 mL de reactivo de Bradford a 100  $\mu$ L de muestra de tejido homogeneizado (en el mismo proceso de homogeneización utilizado para las muestras de *D. rerio*). A continuación, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro (Thermo Scientific Serie GENESYS 10S UV-VIS).

La determinación de hidratos de carbono se realizó por el método del fenol-ácido sulfúrico utilizando glucosa como patrón (Carbajal-Hernández et al., 2017), basado en la formación de un color amarillo-anaranjado como resultado de la reacción entre los hidratos de carbono con el fenol en medio ácido. Se utilizaron 100  $\mu$ L de la muestra homogeneizada añadiendo 300  $\mu$ L de ácido sulfúrico y 60  $\mu$ L de fenol al 5%. La muestra se leyó a 530 nm con un espectrofotómetro (Thermo Scientific Serie GENESYS 10S UV-VIS).

Por último, se realizó la determinación de lípidos mediante el método de la sulfo-fosfovanillina (Carbajal-Hernández et al., 2017). La extracción se realizó añadiendo 500  $\mu$ L de metanol/cloroformo (2:1, v/v) a 100  $\mu$ L del extracto crudo y vortex. A continuación, se añadieron 100  $\mu$ L de agua desionizada para formar dos fases; la fase orgánica se calentó hasta sequedad a 80 °C; después, se añadieron 500  $\mu$ L de ácido sulfúrico concentrado y se calentó a 80 °C durante 5 min. Por último, se añadieron 600  $\mu$ L de reactivo de vainillina (9 mM disuelto en ácido fosfórico concentrado), se enfrió la mezcla en hielo y se midió la absorbancia a 525 nm utilizando el colesterol como patrón.

## CONTENIDO CALÓRICO

Los hidratos de carbono, lípidos y proteínas se utilizan para calcular el contenido calórico de especímenes expuestos al tóxico. El contenido calórico se estimó multiplicando el contenido de cada macromolécula por su factor específico: 4.10 cal/mg para los carbohidratos, 5.65 cal/mg para la proteína y 9,45 cal/mg de lípidos. Los resultados se expresaron como  $\mu$ cal/organismo (Arzate-Cárdenas y Martínez-Jerónimo, 2012).

## ENZIMAS ANTIOXIDANTES

### CATALASA (CAT)

Se determinó por la técnica modificada de Vega-López et al. (2007) . Se evaluó el cambio



en la absorbancia producida por la degradación del peróxido de hidrógeno. Las mezclas de reacción que fueron usadas consisten de: 800  $\mu\text{L}$  de buffer (Sacarosa 0.3 M, HEPES 1 mM, EDTA 5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5.0 mM, pH ajustado a 7.4), 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30mM) y 50  $\mu\text{L}$  de muestra. La reacción enzimática se detuvo adicionando 1 mL de molibdato de amonio (32.4 mmol/L) y fue leído a una absorbancia de 405 nm con un espectrofotómetro (Thermo Scientific Serie GENESYS 10S UV-VIS).

#### GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)

Se empleó la técnica modificada de Cano-Europa et al. (2009) la cual consiste en evaluar la actividad detoxificadora de la GPX reduciendo el  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la oxidación del GSH. Se colocaron 50  $\mu\text{l}$  del homogeneizado en 500  $\mu\text{l}$  de buffer de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM pH 7.0, el cual contenía EDTA 0.4 mM,  $\text{NaN}_3$  10 mM y GSH 2 mM. Posteriormente se adicionó 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.25 mM (disuelto en buffer de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM) para iniciar la reacción. Se tomaron muestras de 250  $\mu\text{l}$  a los 5 y 10 min de iniciada la reacción y se colocó cada muestra en 250  $\mu\text{l}$  de solución precipitante (NaCl 30 g y ácido metafosfórico 1.6 g en 100 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ). Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm y se realizó una dilución 1:4 con buffer de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  400 mM. Finalmente, se agregaron 250  $\mu\text{l}$  de la solución de ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (44 mg DTNB en 100 ml de citrato de sodio al 1%) incubando por 5 minutos y se obtuvo la absorbancia a 412 nm con un espectrofotómetro (Thermo Scientific Serie GENESYS 10S UV-VIS). Los resultados se expresan como  $\mu\text{g}$  de GSH oxidado/min/mg de proteínas.

#### SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

Se determinó por el método de Crapo et al. (1978), el cual considera el cambio de la absorbancia del citocromo C a 550 nm. Se utilizaron 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de muestra y 700  $\mu\text{L}$  del sustrato (EDTA 1 mM, citocromo C reducido 10 mM, azida de sodio 20 mM, xantina 10  $\mu\text{M}$ ) disuelto en buffer de carbonatos que contiene carbonato de sodio 10 mM y tritón al 0.02% X- 100. Agregar 10  $\mu\text{L}$  de xantina oxidasa (0.34%) y medir durante 5 minutos cada 30 segundos con un espectrofotómetro (Thermo Scientific Serie GENESYS 10S UV-VIS).

#### ANÁLISIS DE DATOS

Todos los datos se analizaron con el software GraphPad Prism versión 6 para Windows 10, GraphPad ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Se comprobó la distribución gaussiana mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Dado que los datos se ajustaban a una distribución normal las diferencias entre tratamientos se comprobaron con ANOVA de una vía y post-hoc de Tukey. Se utilizó una  $p < 0,05$  en todos los análisis estadísticos.

## RESULTADOS

### ESCALADO DE CULTIVOS PLANCTÓNICOS

Los cultivos de cada una de las especies planctónicas se comenzaron en cajas petri de 60 x 15 mm, con una capacidad de 5 mL aproximadamente, con una densidad de 5 organismos por mL. El desdoble de los organismos se aprecia en la figura 2, 3 y 4.

En el caso de LP es un cultivo estático ya que no se necesita aireación desde la fase de 5 mL hasta la fase de 210 mL. Esta especie en específico requiere recipientes alargados, es decir donde el fondo es amplio, ya que por sus hábitos bentónicos, no se desarrolla en columnas de agua de gran altura. El alimento utilizado es *Nannochloropsis oculata*, en cajas petri la alimentación fue de 1 mL cada cinco días, aumenta a 5 mL cada tercer día cuando se expande el cultivo a en los recipientes de 210 mL. Se alcanzó una densidad es de 200 organismos por mililitro.(Figura 2).



Figura 2 Cultivo masivo de *Lecane papuana*, con sus diferentes fases de escalado (Elaboración propia).

Para el cultivo de BC, fue con aireación y aunque en la literatura se sugiere comenzar con recipientes altos (250 mL), no se obtuvieron resultados favorables, en la fase de inicio, es por ello que se utilizaron los recipientes alargados anteriormente usados para LP, se hizo el primer desdoble cuando la densidad alcanza los 50 organismos por mL, por el espacio que ocupan en la columna de agua.. El alimento utilizado para esta especie es *Scenedesmus*

sp. En cajas petri se alimenta con 1 mL cada cuatro días, aumenta a 5mL cada dos días cuando se expande en recipientes de 210 mL. Se alcanzo una densidad de 100 organismos por mililitro (Figura 3).



Figura 3 Cultivo masivo de *Brachionus calyciflorus* con sus diferentes fases de escalado.

Para CD ,fue sin aireación, de manera inicial se comenzó el cultivo con 20 organismos, realizando el desdoble a otras cajas petri de 5mL , cuando se obtuvo una densidad de 40 organismos por mL, el desdoble se realizó hacia un frasco de 250 mL, cuando este alcanzó una densidad de 20 organismos por mL se pasó a un recipiente de 1L, donde se alcanzó una densidad de  $10 \pm 3.3$  organismos por mililitro. El alimento utilizado es *Nannochloropsis oculata*, en cajas petri la alimentación fue de 1mL cada cinco días, aumenta a 5 mL cada tercer día cuando se expande el cultivo a en los recipientes de 210 mL (Figura 4).

#### PRUEBAS DE ALIMENTACIÓN

La tasa de alimentación con alimento vivo para las larvas de pez cebra se determinó tratando de integrar un balance entre los requerimientos de las larvas y la capacidad de producción del alimento vivo.

Se suministró alimento balanceado (AB) en combinación con alimento vivo (*Lecane papuana*) (AV+AB) a partir del día 8, ya que es cuando se observó que la mayoría de los embriones se quedaban sin saco vitelino. La combinación de alimento se continuó hasta el día 13, ya que la producción de alimento era menor a la demanda de este, por lo que se

suplió con Tetramin® Tropical Flakes, molido previamente hasta el día 28. La mortalidad se observa en la figura 6, observándose que en los peces alimentados solo con balanceado no quedaron sobrevivientes y en el caso de la combinación la mortalidad fue del 95.14%.



Figura 4 Cultivo masivo de *Ceriodaphnia dubia* con sus diferentes fases de escalado (Elaboración propia)

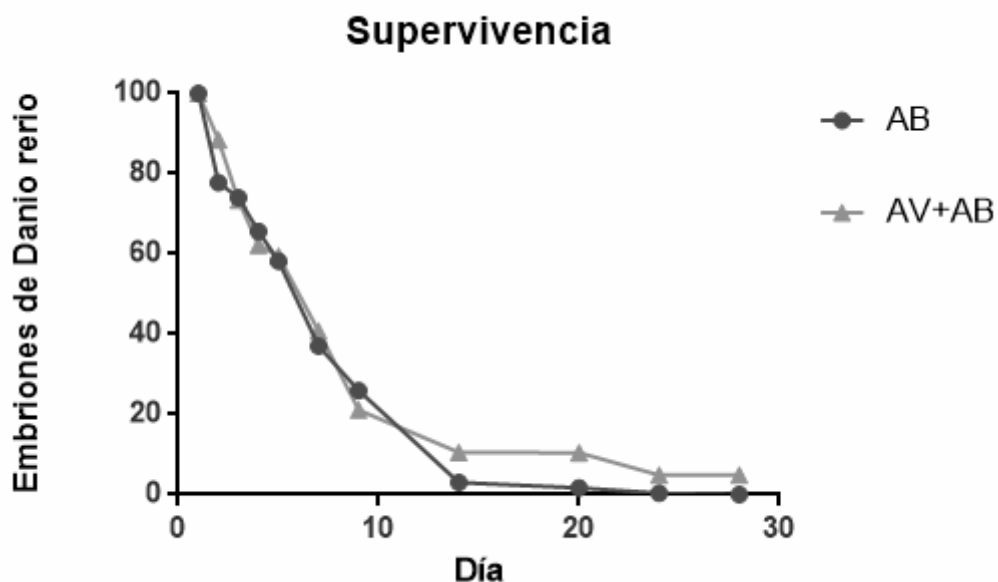


Figura 5. Supervivencia de los embriones de *Danio rerio* con alimento balanceado (AB) y combinación de alimento balanceado y *Lecane papuana* (AV+AB)

Se puso a prueba la dieta con LP durante 6 días, comenzando con 15 organismos a partir del día 7. Sin embargo, se observó que los organismos no comenzaban a consumir alimento, así que se retiró el alimento, a partir del día 8 se observa consumo por la mayoría de los organismos, sucede que en algunos queda algún vestigio de saco vitelino y no comienzan la alimentación hasta el día 9. Se suministraron 20 organismos, en el día 12 y al día 13 incrementó a 25, los datos no se comportan de manera normal ni homocedástica es por ello que se trabajó con la mediana y el rango. Se puede observar que existen diferencias significativas en cada uno de los días estudiados.

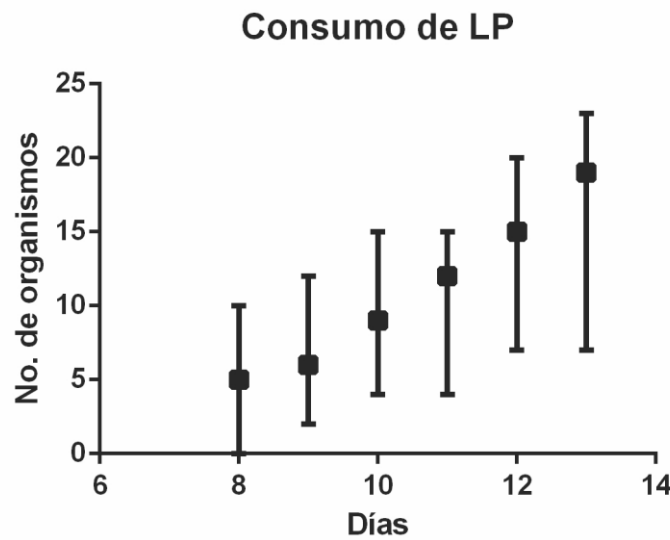


Figura 6. Número de organismos consumidos de *Lecane papuana* del día 8 al 13 n=100

A partir del día 13 se alimentó con Tetramin debido a que las cinco réplicas se llevaron al mismo tiempo, la demanda de LP y su producción no fueron suficientes para seguir con el tratamiento, por ello se estableció la siguiente dieta, que permitió la recuperación del cultivo y la supervivencia de los organismos de *Danio rerio*.

Cuadro 5. Dieta propuesta para los organismos de *Danio rerio*

Día	Alimento vivo
8-14	<i>Lecane papuana</i>
15-16	<i>Lecane papuana</i> + <i>Brachionus calyciflorus</i>
17-19	<i>Brachionus calyciflorus</i>
20-22	<i>Brachionus calyciflorus</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i>
23-28	<i>Ceriodaphnia dubia</i>

OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS DE LA EXPOSICIÓN EN AGUA EN ADULTOS DE *Danio rerio*

En la concentración de 1 mg/L se nota una coloración roja en el abdomen y tonos grisáceos en las líneas (Figura 7B). En 5 mg/L no se notan cambios físicos aparentes, sólo una ligera coloración rojiza (Figura 7C). En 10 mg/L se observó pérdida de coloración en el organismo (Figura 7D-9). Se extrajo hígado, branquias y músculo para su posterior análisis.

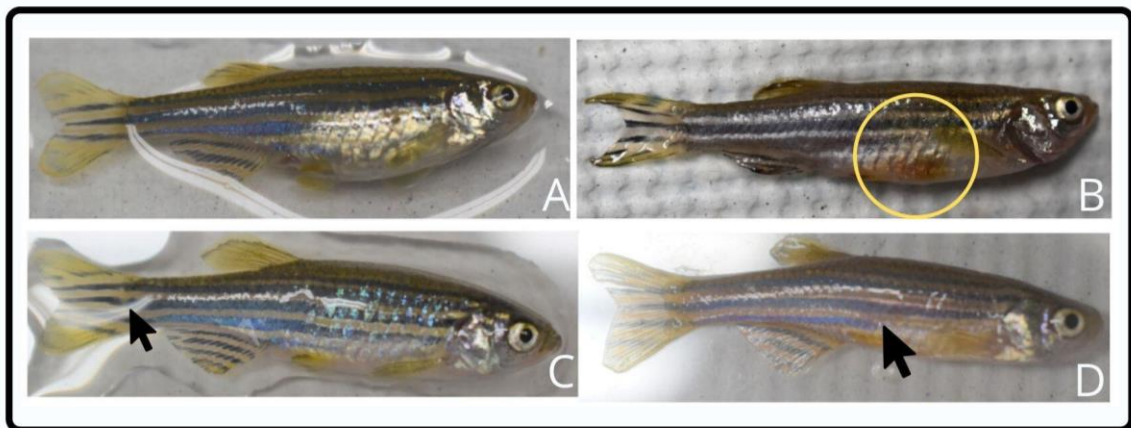
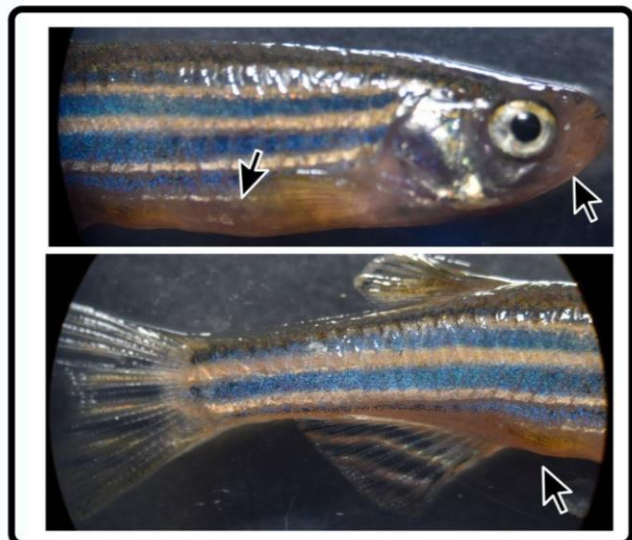


Figura 7. Organismos adultos de *Danio rerio* expuestos a diferentes concentraciones (A) Control (B) 1 mg/L. (C) 5 mg/L (D) 10 mg/L

Figura 8. Organismo adulto de *Danio rerio* expuesto a 10 mg/L de glifosato





Se observó una coloración roja en el abdomen y gránulos grises en las líneas en *D. rerio* expuesto a 1 mg/L de glifosato. A 5 mg/L no hay cambios físicos aparentes, salvo una ligera coloración roja. A 10 mg/L observamos una pérdida de coloración en el organismo. En el hígado, observamos que a medida que aumentaba la concentración de glifosato, se producía una pérdida de color y de turgencia, y un aumento del número de vasos capilares (Figura 9). En las branquias se observa, solo perdida de color en la concentración de 1mg/L, pero no se observa ninguna diferencia en las concentraciones restantes (Figura 10).

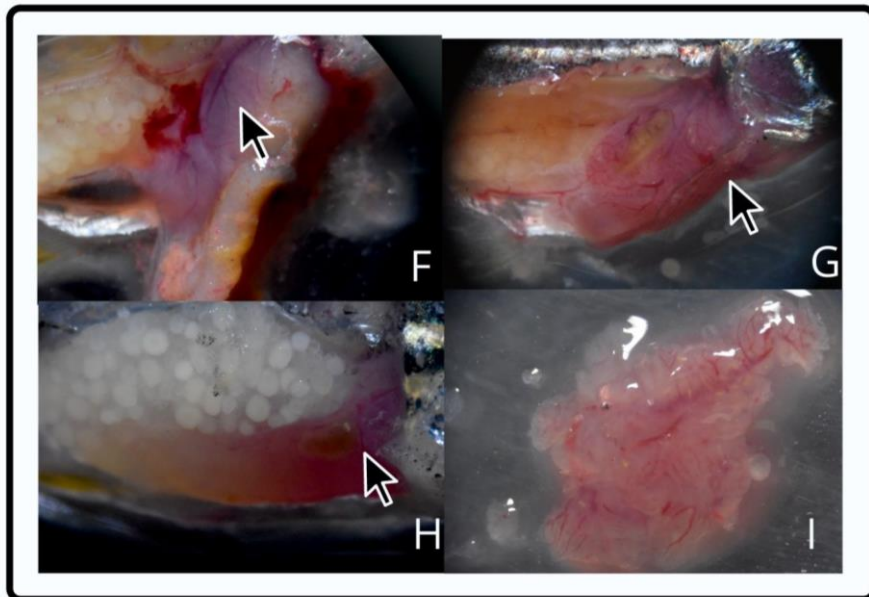
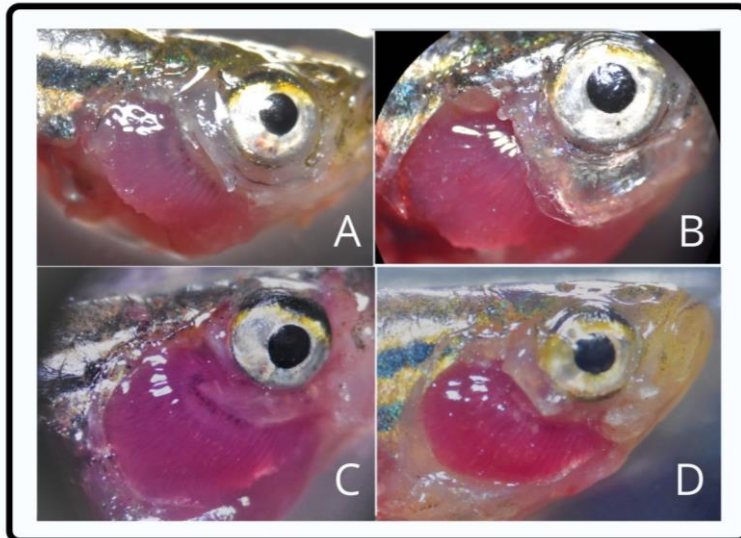


Figura 9. Hígado de organismos de *Danio rerio* expuestos a diferentes concentraciones (A) Control (B) 1mg/L (C) 5 mg/L (D) 10 mg/L



**Figura 10. Branquias de organismos de *Danio rerio* expuestos a diferentes concentraciones (A) Control (B) 1mg/L (C) 5 mg/L (D) 10 mg/L**

#### FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN DEL *D. rerio* ADULTO

El análisis del BFC en los tejidos de los peces cebra adultos expuestos indica valores mayores en los organismos expuestos a 1 mg/L (Figura 11A-C), con diferencias significativas entre las concentraciones en las branquias y el músculo. Se observó una diferencia no significativa entre el BFC del hígado de los organismos expuestos a diferentes concentraciones.

#### FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN EN EL ZOOPLANCTON

Para determinar el efecto de la exposición al glifosato en las especies del zooplancton, analizamos los valores del BFC en diferentes momentos (Figura 11D-F). El intervalo del BFC en el zooplancton fue de 5 a 60.35. En BC encontramos un BFC más alto durante la primera exposición sin que haya diferencias significativas entre los tratamientos hasta las 24 h. En cuanto a CD hay un BFC más alto a las 8 h (aunque no hay diferencias significativas con el valor a las 4 h). El valor mínimo se encontró a las 16 h (Figura 11E). En el caso de la exposición a LP hay un aumento del BFC a las 8 y 16 h seguido de una disminución a las 24 h para ambas concentraciones de exposición (Figura 11F).

#### REASIGNACIÓN ENERGÉTICA DE BIOMOLÉCULAS EN EL ZOOPLANCTON EXPUESTO AL GLIFOSATO

En el caso de las proteínas, existe una disminución en las tres especies zooplanctónicas analizadas (Figura 12A y E); sin embargo, esta diferencia no es significativa en LP (Figura

12E). Los carbohidratos disminuyeron en BC y LP en el tratamiento de 0,8 mg/L de glifosato, así como en el cladócono CD, pero esta diferencia no es significativa (Figura 12B y F) CD y LP mostraron una disminución significativa del contenido de lípidos en todos los tratamientos; en LP, la concentración de 200 mg/L registró la menor cantidad. Cabe destacar que los organismos del control CD, en comparación con los controles BC y LP, presentaron una mayor cantidad de lípidos (Figura 12C y G). Hubo una disminución significativa de los valores de energía en todos los tratamientos (Figura 12D y H).

## EFFECTOS DEL GLIFOSATO DURANTE LA FASE DE PRIMERA ALIMENTACIÓN DE LAS LARVAS DE *Danio rerio*

### INGESTIÓN DE ALIMENTOS

En los cuatro tratamientos al principio las larvas de pez cebra se alimentaron de LP y se produce un cambio a BC a lo largo de los días de alimentación (Figura 13A-D). Se observó una clara preferencia por BC sobre LP cuando los rotíferos no estaban expuestos previamente (Figura 13A), incluso cuando el glifosato estaba presente en el medio (Figura 13 B). En ambos casos, el consumo de LP finalizó al tercer día. Cuando el zooplancton fue expuesto previamente, la preferencia por el CB se observa hasta el cuarto día (Figura 13 C y D). Los patrones de ingestión de alimentos en los distintos tratamientos indican que el momento en que el glifosato se encuentra en el medio afecta al consumo del zooplancton. Sin embargo, la presencia de glifosato en el interior del zooplancton tiene un efecto mayor, ya que los peces detectan el glifosato y evitan su consumo. En los tratamientos en los que se intoxica el alimento y se encuentra el zooplancton muerto, en varias ocasiones observamos que *D. rerio* ingirió los animales muertos y luego los expulsó.

### FACTOR DE BIOCONCENTRACIÓN Y SUPERVIVENCIA

Las larvas de los tratamientos B y D registraron un BFC entre 0,36 y 1,30, en contraste con el tratamiento C que registró el BFC más bajo (Figura 13E). Los porcentajes de supervivencia muestran que el alimento intoxicado provoca una mayor mortalidad en las larvas de *D. rerio*, ya que el rechazo del alimento intoxicado por parte de las larvas induce la muerte. La presencia de glifosato solo en el medio, disminuye la supervivencia en un 45%, el tratamiento que consumió rotíferos intoxicados disminuyó un 55%, y la combinación de glifosato en el medio y alimento disminuye la supervivencia en un 79% (Figura 13F).

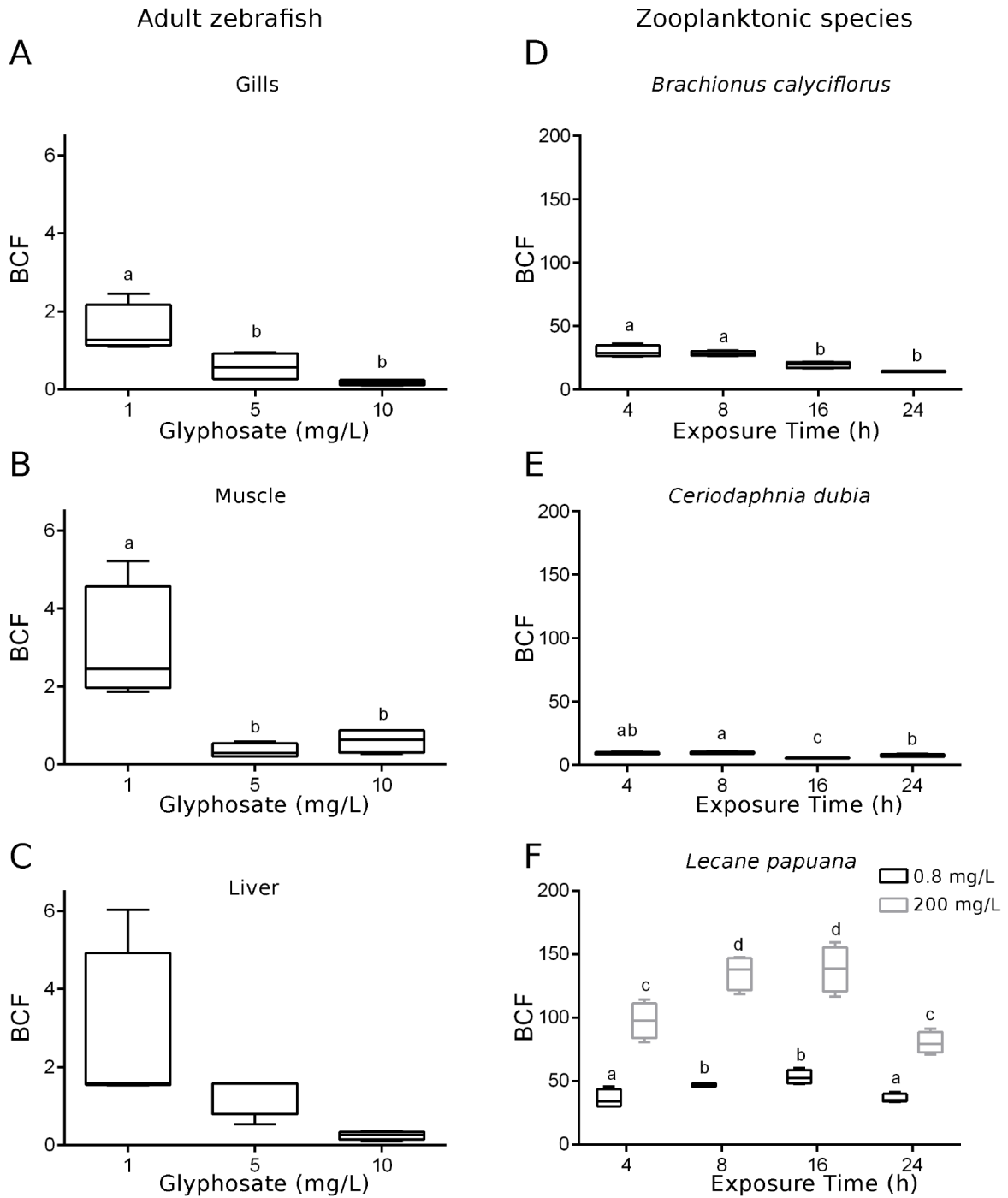


Figura 11. Factor de bioconcentración de los organismos expuestos al glifosato. A-C) Pez cebra adulto expuesto durante 96 h (n=3); D-F) especies zooplanctónicas (n=4) . A) Branquias; B) músculo, C) hígado; D) *Brachionus calyciflorus* expuesto a 0,8 mg/L; E) *Ceriodaphnia dubia* expuesta a 1 mg/L; F) *Lecane papuana* expuesta a 0,8 y 200 mg/L. Las letras diferentes corresponden a diferencias significativas a p<0,05.

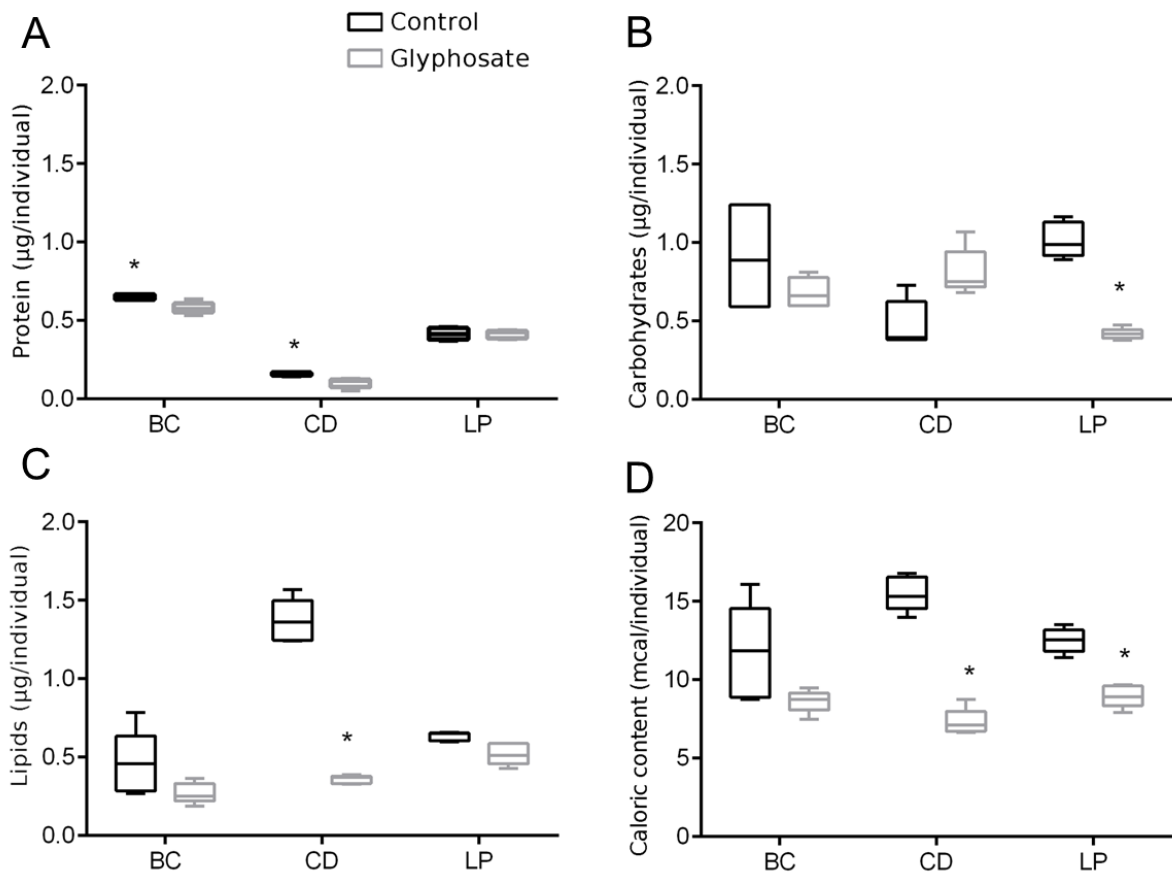


Figura 12. Asignación de energía de las especies zooplanctónicas tras 24 h de exposición. A-D) *Brachionus calyciflorus* (BC) expuesto a 0,8 mg/L de glifosato y *Ceriodaphnia dubia* (CD) expuesta a 1 mg/L de glifosato; E-H) *Lecane papuana* (LP) expuesta a 0,8 y 200 mg/L de glifosato. A) Proteínas; B) carbohidratos; C) lípidos; D) contenido calórico. Asteriscos corresponden a diferencias significativas a  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ .

## REASIGNACIÓN DE ENERGÍA DE LAS LARVAS DE PEZ CEBRA EXPUESTAS AL GLIFOSATO A TRAVÉS DE LA DIETA

La reorganización de las biomoléculas en el interior de los peces es mayor en el caso de las proteínas y los lípidos que disminuyen respecto al control (Figuras 14A y C). En el caso de los hidratos de carbono hay una disminución significativa de todos los tratamientos con respecto al control. Los tratamientos C y D tienen un comportamiento similar (Figura 14B). Se observa una disminución significativa de los valores energéticos en todos los tratamientos (Figura 14D).

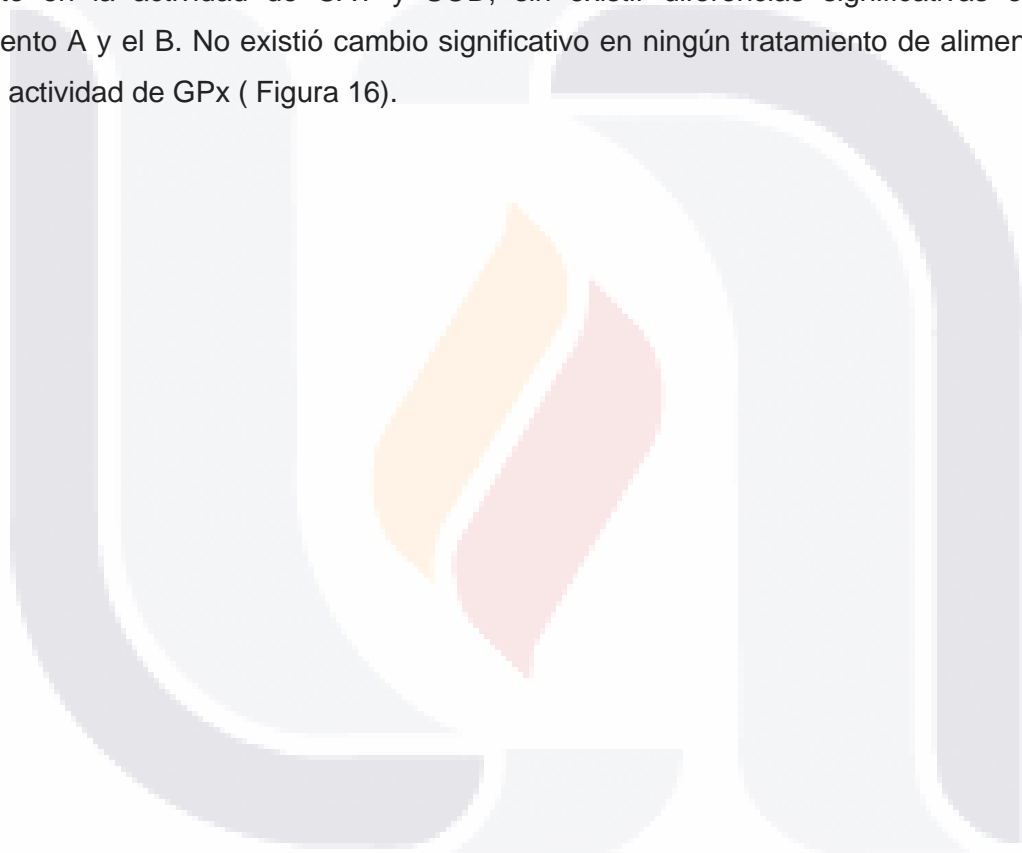
## EVALUACIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

### ESPECIES ZOOPLANCTÓNICAS

La actividad de CAT aumentó en el caso de CD y LP siendo estadísticamente significativo en la primera especie, pero, para la actividad de GPx, no se observa ningún cambio estadísticamente significativo en ninguna de las tres especies de zooplancton. En SOD, no existió diferencias significativas en BC. (Figura 15).

### LARVAS DE PEZ CEBRA EXPUESTAS AL GLIFOSATO A TRAVÉS DE LA DIETA

Al igual que en la sección de ingestión, los tratamientos C y D, son los que tuvieron un aumento en la actividad de CAT y SOD, sin existir diferencias significativas entre el tratamiento A y el B. No existió cambio significativo en ningún tratamiento de alimentación, para la actividad de GPx ( Figura 16).





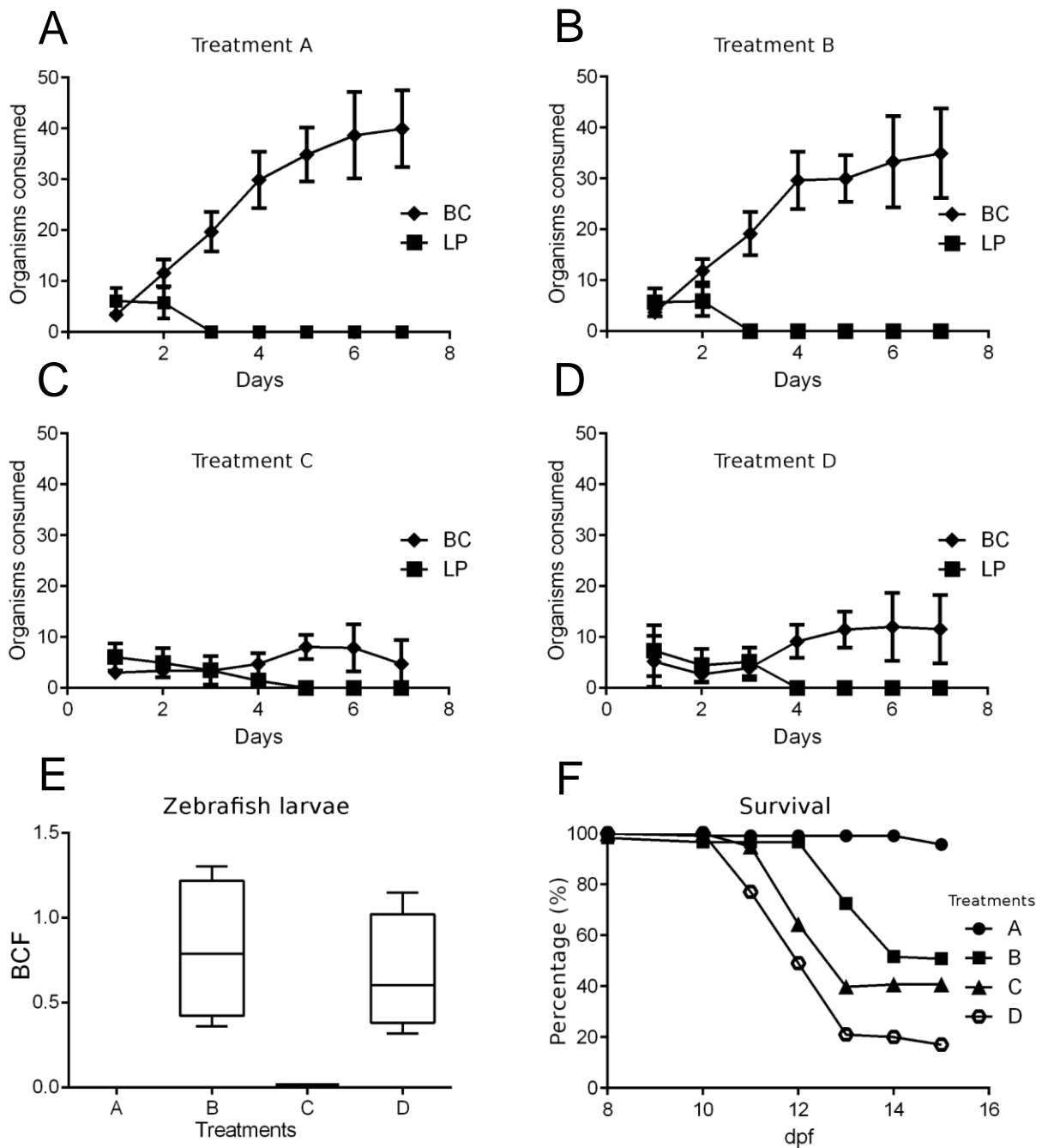


Figura 13. Efectos del glifosato durante la primera fase de alimentación de las larvas de pez cebra. A) Tratamiento A: Control (sin glifosato); B) Tratamiento B: larvas y rotíferos en medio ISO con 0,8 mg/L de glifosato; C) Tratamiento C: rotíferos previamente expuestos durante 24 h a 0,8 mg/L de glifosato, larvas en medio ISO (sin glifosato); D) Tratamiento D: rotíferos previamente expuestos a 0,8 mg/L de glifosato durante 24 h y larvas en medio ISO con glifosato a 0,8 mg/L; E) Factor de bioconcentración (BCF) entre tratamientos; F) porcentaje de supervivencia entre tratamientos. \* y letras diferentes muestran diferencias significativas a  $p < 0,05$ ,  $n = 100$ . *Brachionus calyciflorus* (BC) y *Lecane papuana* (LP).

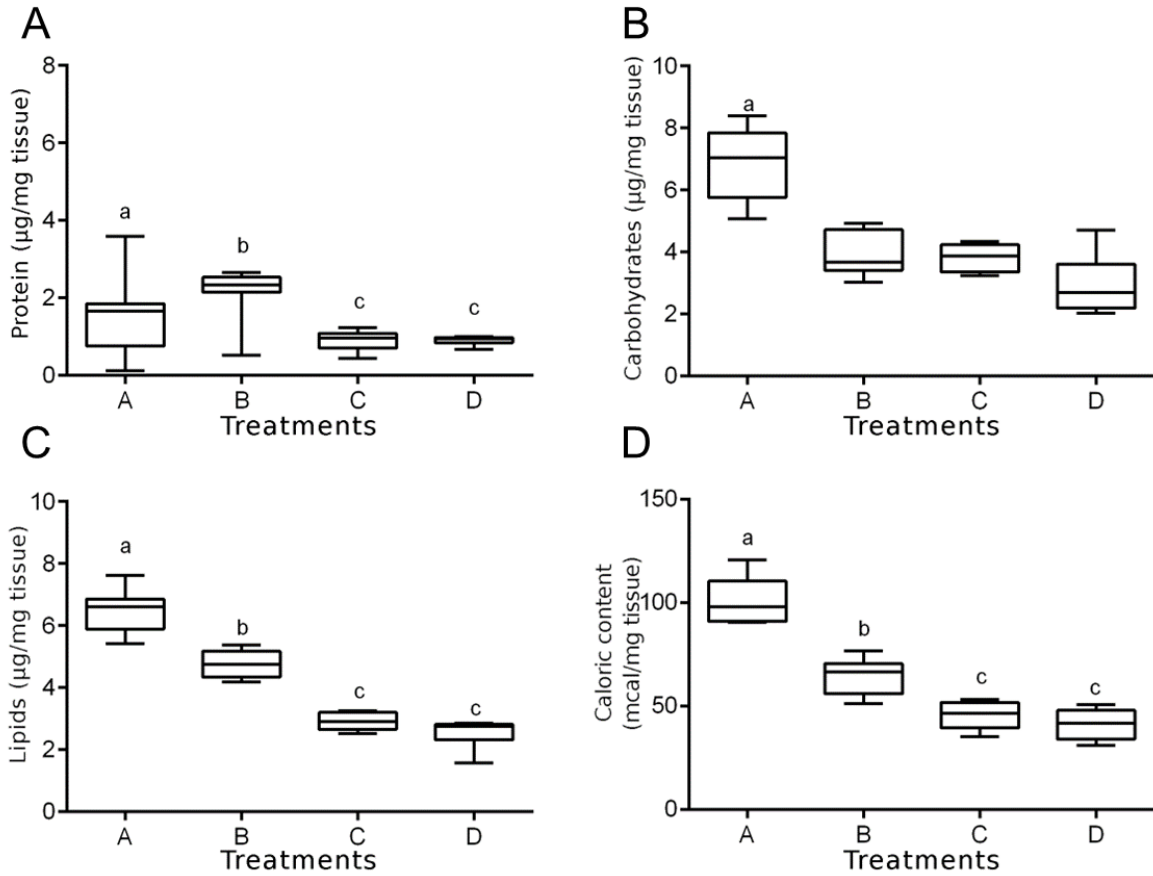


Figura 14. Asignación de energía en larvas de pez cebra tras 7 días de alimentación con especies zooplanctónicas. A) Proteínas; B) carbohidratos; C) lípidos; D) contenido calórico. Tratamientos como se ha descrito anteriormente . Las letras diferentes muestran diferencias significativas a  $p < 0,05$ ,  $n=5$ ).

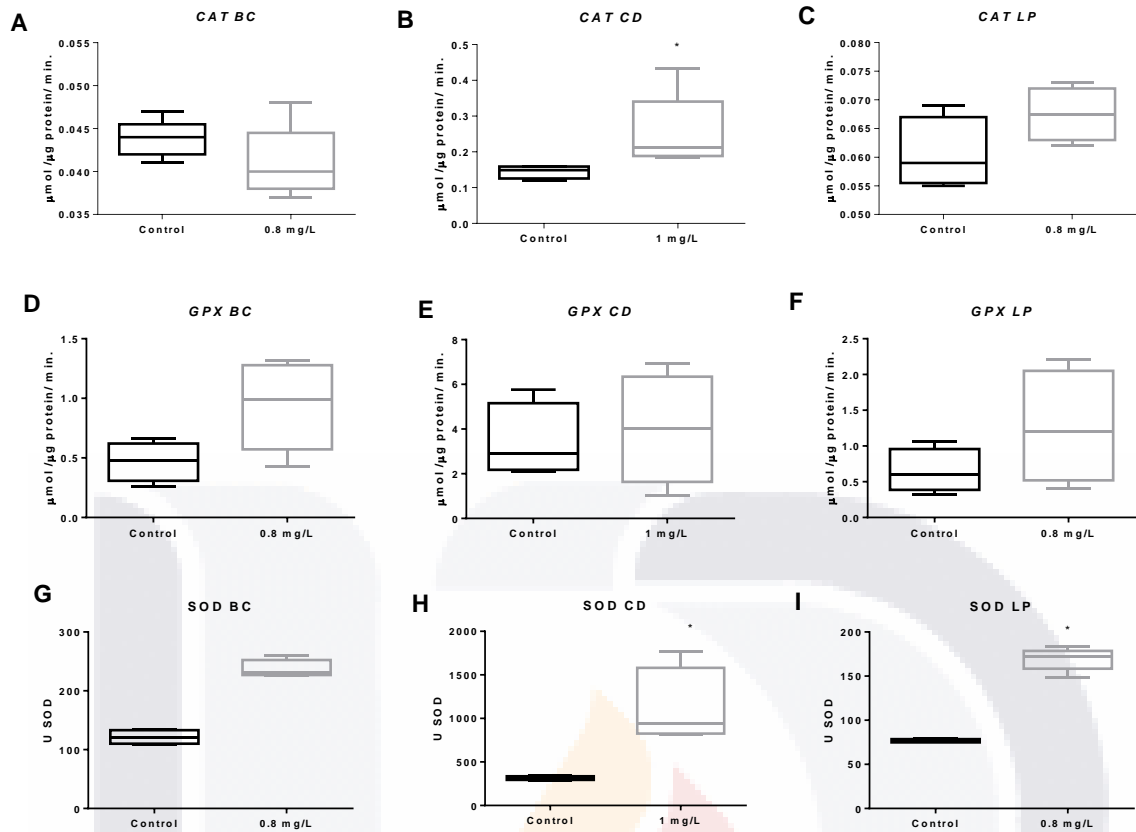


Figura 15. Evaluación de enzimas antioxidantes en zooplancton. A-D-G) *Brachionus calyciflorus*, B-E-H) *Ceriodaphnia dubia* -C-F-I) *Lecane papuana*, ). A-C) Catalasa, D-F) Glutati6n peroxidasa, G-I) Super6xido dismutasa. Asteriscos corresponden a diferencias significativas a  $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ).

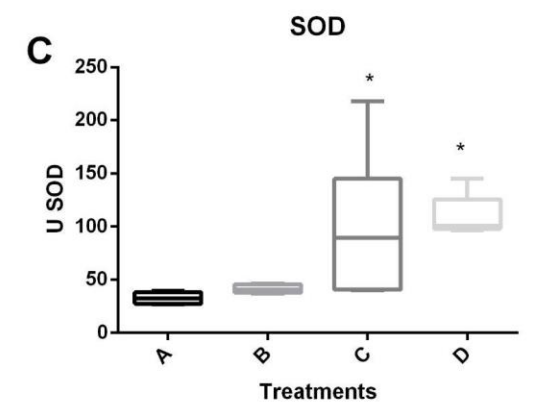
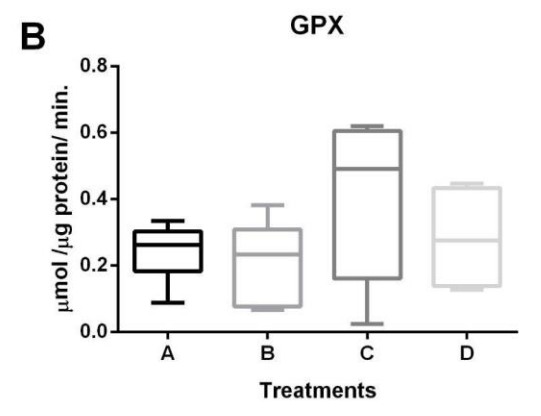
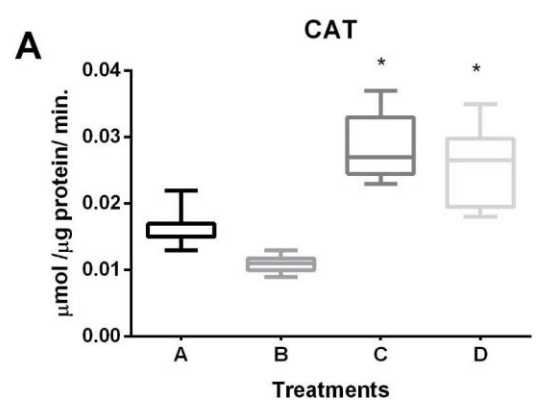


Figura 16. Evaluación de enzimas antioxidantes en tratamiento de alimentación. A) Catalasa, B) Glutación peroxidasa, C) Superóxido dismutasa. Asteriscos corresponden a diferencias significativas a  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el glifosato fue fácilmente absorbido del medio e incorporado por los organismos. La facilidad con la que el glifosato fue absorbido del medio fue consistente con los informes recientes de la presencia de glifosato en muchos fluidos, granos y organismos en todo el mundo (Bus 2015; Pérez et al. 2017; Tarazona et al. 2017; Jansons et al. 2018). El BCF del glifosato ha sido raramente reportado en la literatura. Considerando las características químicas de acuerdo con su partición octanol-agua ( $\log Pow$ ), los valores del BCF deberían ser menores a 0.01 (Contardo-Jara et al., 2009). Sin embargo, el BCF encontrado en este estudio fue mayor al esperado (Fig. 11), lo cual concuerda con reportes previos sobre la incorporación del glifosato dentro de los tejidos de los animales (Contardo-Jara et al., 2009; Dey et al., 2016).

Los valores del BFC del glifosato en tres organismos zooplanctónicos diferentes (utilizados en este estudio) fueron un orden de magnitud mayor (hasta 60.35) que los valores más altos del BFC encontrados en los diferentes órganos y tejidos de cebras adultas. La literatura informa que el BFC para el glifosato en diferentes organismos puede alcanzar valores de 1,4 a 5,89 en *Lumbriculus variegatus*, el gusano negro de California (Contardo-Jara et al., 2009), y hasta 20-2080 en *Ludwigia peploides*, el sauce primilla (Pérez et al. 2017). Por lo tanto, los resultados están dentro de los valores previamente reportados para otras especies. Las diferencias en la captación de glifosato por parte del zooplancton en el medio podrían estar relacionadas con las características intrínsecas de las especies seleccionadas para este estudio. Algunos autores como Hernández-Ruiz et al. (2016) y Garza-León et al. (2017) consideraron que los rotíferos con lorica dura podrían presentar una barrera natural para evitar la entrada de xenobióticos. Sin embargo, los LP presentaron los valores más altos de BFC en este estudio. Por lo tanto, el glifosato comprendió hasta el 6.26% del peso seco total de los rotíferos LP expuestos a 0.8 mg/L de glifosato. Nuestros resultados indican que las especies de zooplancton analizadas podrían bioconcentrar cantidades más elevadas en comparación con otros organismos como el líquen *Xanthoria parietana*, en el que el glifosato representó solo el 1.1-1.2% del peso seco total (Vannini et al., 2016). Los factores intrínsecos que permiten al LP bioconcentrar el glifosato hasta ese punto están fuera del interés de este estudio, aunque abre la oportunidad de realizar más investigaciones en el área de la biorremediación o el tratamiento del agua, ya que las especies de este género se han probado para la mejora de los procesos biológicos (Aidan Al-Hussieny et al., 2014; Fiałkowska et al., 2016).

Los valores más altos del BFC en el hígado, el músculo y las branquias de *D. rerio* adultos se obtuvieron cuando los peces fueron expuestos al glifosato a 1 mg/L, lo que podría estar relacionado con el límite de activación del proceso de detoxificación/excreción (Ferrario et

al., 2018). Es decir, la concentración menor no activa dichos procesos y por ello encontramos los más altos BFC; mientras que a concentraciones elevadas el organismo activa los mecanismos de detoxificación/excreción. Por otro lado, Braz-Mota et al. (2015) afirmaron que a concentraciones subletales de glifosato, surgen mecanismos de defensa en las branquias, como el levantamiento del epitelio, la hipertrofia y la hiperplasia, que impiden la absorción de xenobióticos, evitando así que el glifosato pase a través de las branquias. Estudios anteriores han demostrado efectos tóxicos generalizados del glifosato puro en peces cebra adultos tras una exposición prolongada a altas concentraciones. También se ha encontrado evidencia de cambios moderados en la histoarquitectura del hígado tras 30 días de exposición al glifosato a 18 mg/L, lo que sugiere la presencia de hiperemia (Jofré et al., 2016). Sin embargo, tras 24 h de exposición, se ha encontrado apoptosis y una reducción de la actividad de la glutatión S-transferasa en una línea celular de hepatocitos de peces cebra (Moreira et al., 2018). También se han registrado cambios en el comportamiento de natación a una concentración de glifosato de 0.5 mg/L (Bridi et al., 2017), lo que demuestra que incluso períodos cortos de exposición pueden afectar al pez cebra. Tales efectos se observaron en este estudio en el aspecto físico de los tejidos de pez cebra. En el caso de las larvas de *D. rerio*, los valores del BFC no fueron significativamente superiores a uno, ni por exposición directa en el medio de agua dulce, ni por alimentación con zooplancton contaminado con glifosato. De tal manera que en las larvas de pez cebra a los 8 dpf no se produjo bioconcentración (del medio) ni biomagnificación (de la dieta). El principal componente energético de los cladóceros son los lípidos, que participan activamente en la reproducción, pero en caso de exposición a xenobióticos, esa energía se reasigna a procesos de detoxificación (Sancho et al., 1996). En el caso de CD, el contenido de lípidos disminuyó como consecuencia de la exposición al glifosato a 1 mg/L, lo que podría deberse a la reasignación de energía para hacer frente al estrés inducido por el glifosato, como se informó para *Daphnia magna* expuesta a tebuconazol (fungicida) (Sancho et al., 1996), para *D. schoedleri* expuesta a  $\alpha$ -cipermetrina (Martínez-Jerónimo et al., 2013), y el cladóceros *Alona guttata* (Osorio-Treviño et al., 2019). En CD, encontramos una mayor producción de carbohidratos cuando los organismos fueron expuestos al glifosato, lo que probablemente estaba relacionado con mecanismos de compensación o ajustes en el metabolismo para hacer frente al estrés inducido por el glifosato. Aunque Li et al. (2017) informaron del aumento de la glucosa en el pez *Carassius auratus* expuesto a una formulación comercial con un 30% de glifosato y discutieron que el efecto podría estar vinculado a alteraciones en la actividad de la piruvato quinasa (una enzima que regula la velocidad de la glucólisis), la pérdida de actividad de esta enzima provocó la acumulación de glucosa y disminuyó la síntesis de ATP, lo que podría explicar el aumento de la cantidad de carbohidratos en el zooplancton expuesto al glifosato.



La primera etapa de alimentación es crucial para el crecimiento y la supervivencia de los peces. Los primeros elementos de presa deben ser accesibles; así los peces reducen los costos energético para capturar sus presas (Lawrence, 2019). En este estudio, los ensayos con larvas de peces en su primera etapa de alimentación mostraron que el glifosato alteró el comportamiento alimentario de las larvas de pez cebra, lo que tuvo consecuencias tanto en la reasignación de energía como en la supervivencia. Las preferencias de alimentación cambiaron cuando las especies zooplanctónicas fueron expuestas previamente al glifosato. En condiciones de control, durante los primeros 3 días, las larvas de peces cebra consumieron LP, que es una especie bentónica y no requiere un alto coste energético para ser capturada (las larvas solo necesitan expandir su cavidad bucal y succionar) (Pekkan et al., 2016). Después de este tiempo, las larvas comenzaron a alimentarse de BC, que nadan constantemente durante el día (Castro-Barrera, 2003). Este cambio en la preferencia de alimentación se produjo incluso cuando las larvas fueron expuestas al glifosato disuelto en el medio de agua dulce, pero los rotíferos no fueron expuestos previamente al glifosato. Así, la exposición al glifosato disuelto no cambió las preferencias de alimentación, aunque el número de presas disminuyó a lo largo del tiempo, lo que podría estar relacionado con las diferencias en la locomoción de las larvas de peces (Bridi et al., 2017; Zhang et al., 2017). Por el contrario, cuando los rotíferos fueron expuestos al glifosato y ofrecidos a los peces, las preferencias de las larvas cambiaron y las presas LP fueron consumidas durante 2 días más (Fig. 14C). El cambio a la alimentación con BC se retrasó, y sólo se consumieron pocas presas en comparación con los grupos alimentados con rotíferos no expuestos. Las larvas de peces en la etapa de primera alimentación presentan un sistema olfativo que es funcional en esta etapa, y ayuda a los peces a encontrar y detectar el alimento (Miyasaka et al., 2013). El sabor también juega un papel importante en la selección de presas (Lawrence, 2019). Por lo tanto, el glifosato podría cambiar la palatabilidad o el olor de los rotíferos ya que fueron capturados pero las larvas los expulsaron. Es posible que los BC fueron capturados por extrema necesidad y debido al mínimo esfuerzo de captura requerido. Se han registrado algunas alteraciones electrofisiológicas cerebrales del cerebro medio con reducción de la actividad locomotora en larvas de peces cebra tras 5 días de exposición al glifosato a 1 mg/L (Forner-Piquer et al., 2021). Sin embargo, en larvas y adultos de peces cebra expuestos a alimentos contaminados con deoxinivalenol, no se informó del rechazo de los alimentos ni de efectos adversos en el crecimiento (Sanden et al., 2012). Sin embargo, los estudios sobre los efectos del glifosato en el comportamiento alimentario en las redes alimentarias acuáticas son escasos; por lo tanto, este trabajo presenta información de gran relevancia, ya que describe las alteraciones en las preferencias alimentarias de las larvas de peces, que de hecho afectaron negativamente a la supervivencia. En cuanto a la reasignación de energía en las larvas de *D. rerio*, las concentraciones de macromoléculas

disminuyeron de forma similar a lo observado en los juveniles del pez *Rhamdia quelen* (Persch et al., 2017), en los que la cantidad de lípidos resultó ser la más afectada, ya que los lípidos constituyen la macromolécula más utilizada por las larvas (Lawrence, 2019). Los lípidos son también las macromoléculas más activas en los procesos de desintoxicación, como observaron Rodríguez-Estrada et al. (2016) que expusieron a *D. rerio* a  $\alpha$ -cipermetrina.

Los tratamientos que más afectaron a la asignación de energía y a la supervivencia de las larvas de los peces fueron aquellos en los que el zooplancton estuvo previamente expuesto al glifosato. A partir del momento de la primera alimentación exógena (8 dpf), los recursos energéticos disponibles, que se obtenían del saco vitelino, se utilizan en la desintoxicación, el desarrollo del crecimiento, lo que se ha observado en *D. rerio* expuesto a otros pesticidas (Rodríguez-Estrada et al., 2016). Además, el alimento vivo contaminado no contiene la cantidad óptima de nutrientes (ya que requieren más energía para su supervivencia en un medio estresante, disminuyendo el consumo de algas y aumentando el de lípidos y proteínas), lo que aumenta el gasto energético asociado. Ese efecto podría limitar la asignación de energía al crecimiento, y cuando la demanda supera la energía disponible, entonces, la supervivencia ya no es posible. Panetto et al. (2019) evaluaron los efectos de la formulación comercial de glifosato y no encontraron efectos significativos en embriones de *D. rerio* al evaluar el contenido de proteínas, glucosa, glucógeno y triglicéridos. Sin embargo, informaron de la disminución de la actividad de la hexoquinasa, que disminuye el metabolismo de los hidratos de carbono (lo que explica el aumento de la cantidad en el organismo expuesto al glifosato) y la incapacidad de los peces cebras para inflar su vejiga natatoria, lo que limita su locomoción y la adquisición de alimentos y, en consecuencia, compromete su supervivencia. Los resultados aquí presentados muestran altas tasas de mortalidad (> 40%) con la exposición de larvas de pez cebra a una concentración relativamente baja de glifosato durante la primera etapa de alimentación. Se sabe que la etapa de desarrollo de los organismos constituye un factor clave para su susceptibilidad; por ejemplo, los embriones de los peces están protegidos por las membranas externas del corion y los compuestos tóxicos podrían no afectarles (Hallare et al., 2006). Se ha informado de altas tasas de mortalidad en larvas de peces mayores expuestas a diferentes compuestos tóxicos (Burkhardt-Holm et al., 1999; Kristofco et al., 2016). También se ha demostrado el efecto transgeneracional del glifosato. En este caso, la mortalidad de las larvas de pez cebra aumentó cuando los progenitores fueron expuestos al glifosato durante la gametogénesis; la mortalidad de la exposición directa de las larvas fue menor a concentraciones de 10 mg/L (Uren Webster et al., 2014). Por lo tanto, la edad de las larvas de peces cebra es un factor importante a tener en cuenta para la evaluación de los efectos tóxicos de las sustancias químicas (Kristofco et al., 2016). Nuestro escenario de exposición

se centró en la etapa de primera alimentación e incluyó la transición crucial de la alimentación endógena a la exógena, cuando se produce una alta mortalidad. En el diseño experimental, el uso de alimentos vivos como rotíferos y nauplios de *Artemia* en la etapa de primera alimentación mejoró la supervivencia de las larvas como se ha demostrado en informes anteriores (Best et al., 2010; Lawrence, 2019). La concentración de glifosato en el ensayo en el medio fue de 0.8 mg/L, que se consideró dentro del intervalo de concentración más probable de encontrar en el medio ambiente (< 1 mg/L). La tasa de mortalidad en el tratamiento B (medio de agua dulce + glifosato a 0.8 mg/L) superó los valores encontrados en informes científicos que emplearon concentraciones similares (Uren Webster et al., 2014; Fiorino et al., 2018). También se encontró que esta mortalidad aumentaba cuando la exposición al glifosato en el medio se combinaba con la exposición dietética a través de rotíferos contaminados. El rendimiento de las larvas de peces se ve sometido a altos niveles de estrés al estar contaminados el medio y el alimento y puede producirse la transferencia de glifosato, lo que afecta a su metabolismo energético (mayor demanda de energía para hacer frente al estrés y menor energía disponible en el alimento con escaso contenido energético), a su comportamiento de alimentación y a su locomoción (disminuyendo la captura de rotíferos como alimento); y finalmente, la falta de energía y el estrés promovido por el glifosato aumentan las tasas de mortalidad de las larvas de peces.

El estrés oxidativo se puede definir como el desequilibrio, ya sea el aumento o disminución en la producción de las enzimas antioxidantes, produciendo modificación en la actividad, estructura y función de las biomoléculas (Ostera et al., 2016). La enzima SOD, aumenta significativamente en las tres especies de zooplancton, similar a lo encontrado por Fanton et al. (2020) con el copépodo *Notodiaptomus carteri* expuesto a  $0.38 \pm 0.2$  mg/L y concentraciones encontradas en argentina de Sulfosato Touchdown® una formulación a base de glifosato (sal de potasio, 62%), al ser SOD la primera línea de defensa, es un indicador de estrés oxidativo en la célula, ya que indica una superproducción del anión superóxido. Posteriormente la CAT, para eliminar el peróxido de hidrógeno generado por la primera línea de defensa, lo que es un segundo indicador de estrés oxidativo (Husak et al., 2022), sin embargo, en nuestro estudio no se observa un cambio significativo en la concentración de CAT en ninguna de las tres especies de zooplancton, similar a lo encontrado en *Daphnia magna* por Husak et. al. (2022) con Roundup en una exposición de 24 h a 0.1-5 µg/L, mencionando que aunque no se observe una modificación en este biomarcador no se rechaza la hipótesis de generación de ROS por efecto de glifosato, su respuesta antioxidante y daño oxidativo en invertebrados acuáticos así como tampoco se descarta llegar a un punto de equilibrio donde se permita la adaptación a condiciones estresantes y realizar cambios en las concentraciones de estas enzimas. Se ha demostrado que el aumento de las enzimas antioxidantes está asociado a la protección contra factores

ambientales estresantes, como lo encontrado en el rotífero marino *Brachionus koreanus*, después de la exposición a microplásticos (Jeong et al., 2016).

La acumulación de pesticidas en el tejido de peces puede generar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) dando como resultado estrés oxidativo. Li et al. (2017) observaron un incremento de GPx y SOD en el suero del pez (*Carassius auratus*), después de la exposición al glifosato, siendo similares a los resultados obtenidos por Ma et al. (2019), en branquias con carpa común, que a diferencia de nuestra prueba de alimentación hubo variaciones dependiendo del tipo de exposición (glifosato en medio y glifosato en alimento vivo) sin embargo, ninguno fue estadísticamente significativo. De acuerdo a lo registrado, era de esperarse que la enzima SOD, se encuentre en una mayor concentración en aquellos tratamientos donde se encuentra un consumo menor de alimento, ya que es la primera línea de defensa antioxidante, seguida de la CAT, para transformar el peróxido de hidrogeno producido por la primera línea. Lo que nos indicaría que el glifosato aumenta la cantidad de peróxido de hidrógeno en los tratamientos C y D; valores altos de CAT indican un nivel de contaminación elevado. Además, esta reacción redox incrementa el consumo de oxígeno en el organismo (Ahmad et al., 2000; Ochoa y Gonzalez, 2008), aumentando la cantidad de energía necesaria que se puede observar como resultado en la supervivencia de los tratamientos, es decir la cantidad de energía que se necesita para la supervivencia de la especie fue mayor provocandola muerte de los organismos. La mayoría de los estudios en pecesevalúan el hígado, donde se da la principal actividad de la CAT, niveles elevados han sido encontrados en este órgano para carpa plateada cuando fue expuesta a 96 h en glifosato (Lushchak et al., 2009). En los resultados presentados aquí, se midió el organismo completo ya que son larvas, sin embargo, el estrés oxidativo puede afectar a las biomoléculas, como proteínas, lípidos y ADN. Además de que el principal órgano diana del estrés oxidativo en peces son las branquias, por su poco potencial antioxidante (Sayeed et al., 2003; Nwani et al., 2013), lo cual indicaría estrés en este órgano afectando la alimentación y respiración de los organismos. Las mitocondrias son las centrales de energía en la célula y a su vez los sitios de generación de ROS, por lo que el daño oxidativo se traduce en reducción de energía (Li et al., 2017). La degradación del glifosato comienza con el glioxilato y AMPA, degradando el segundo compuesto a fosfeno formaldehído con la subsiguiente transformación en formaldehído, siendo la descomposición del glioxilato la que contribuye a la producción de ROS (Husak et al., 2022). Tanto en zooplancton como en larvas de pez cebra, se observa que existió una adaptación al estrés oxidativo, que puede ser el resultado de la reasignación de energía, visto previamente, esto es debido a que se designa la energía para el mantenimiento de la defensa antioxidante y reducción en otros procesos fisiológicos importantes, como la reproducción, y la búsqueda de alimento (Saebelfeld et al., 2017). Se ha demostrado que concentraciones ambientales del glifosato y

Roundup, provoca estrés oxidativo en peces y otras especies acuáticas, lo que provoca daños en ADN, proteínas y lípidos, la readaptación del sistema antioxidante (Cavaş y Könen 2007; Cavalcante et al., 2008; Modesto y Martinez 2010; Guilherme et al., 2010, 2012; ; De Castilhos Ghisi y Cestari 2013; Uren Webster y Santos, 2015), altas concentraciones de ROS pueden dar como resultado la apoptosis como mecanismo de defensa ante la exposición a glifosato (Uren Webster y Santos, 2015).

## **CONCLUSIONES**

En este estudio, se observó una bioconcentración del glifosato en el zooplancton de hasta el 6.26% del peso seco total de los rotíferos (BFC = 60.35). Los valores del BFC difieren de los de otros estudios con larvas de pez cebra y sugieren que no se produce biomagnificación en las larvas de *D. rerio* dado que los valores obtenidos no fueron significativamente mayores que uno. Además, la exposición al glifosato en el medio fue más importante para su incorporación en las larvas de pez cebra que el consumo de rotíferos contaminados. En los adultos, se encontraron diferencias entre el BFC de los tejidos y un mayor valor a concentraciones menores.. Los valores del BFC para el zooplancton encontrados en este estudio fueron más altos de lo esperado. Los niveles de los sistemas antioxidantes del zooplancton y larvas de pez cebra, sugiere que la exposición al glifosato provoca estrés oxidativo, limitando las funciones del organismos al mantenimiento y la protección a xenobióticos dando como resultado alta mortalidad en las larvas de pez cebra, cuando el glifosato se encuentra en el medio y la dieta, en cambio no se ve reflejada solo cuando se encuentra en el medio. La exposición al glifosato afectó el metabolismo energético, el comportamiento alimentario y produjo estrés oxidativo de las larvas de pez cebra que presentaron altas tasas de mortalidad a concentraciones ambientalmente relevantes.



## REFERENCIAS

- Abe FR, Soares AMVM, Oliveira DP d., Gravato C (2018) Toxicity of dyes to zebrafish at the biochemical level: Cellular energy allocation and neurotoxicity. *Environ Pollut* 235:255–262. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.020>
- Ahmad I, Hamid T, Fatima M, Chand HS, Jain SK, Athar M, Raisuddin S (2000) Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1523(1):37–48. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00098-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00098-2)
- Aidan Al-Hussieny A, Thijar LA, Faiq A, Sameer Mohammed E (2014) Study of Sludge and comparison for Various Wastewater Treatment. *Int J Adv Res* 2(7):292–304. <https://doi.org/http://doi.org/10.21474/IJAR01>
- Alcántara-De la Cruz R, Cruz-Hipolito HE, Domínguez-Valenzuela JA, De Prado R (2021) Glyphosate ban in Mexico : potential impacts on agriculture and weed management. *Pest Manag Sci* 77(9):3820–3831. <https://doi.org/10.1002/ps.6362>
- Alvarez M, Gimenez I, Saitua H, Enriz RD, Giannini F (2012) Toxicidad en peces de herbicidas formulados con glifosato. *Acta Toxicol Argentina* 20(1):5–13
- Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA, Castellano VJ, Martínez M, Martín MT, Nozal MJ, Bernal JL (2009) Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol Lett* 190(1):91–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.008>
- Annett R, Habibi HR, Hontela A (2014) Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J Appl Toxicol* 34(5):458–479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>
- Arellano-Aguilar O, Montoya RM, Garcia CM (2009) Endogenous Functions and Expression of Cytochrome P450 Enzymes in Teleost Fish: A Review. *Rev Fish Sci* 17(4):541–556. <https://doi.org/10.1080/10641260903243487>
- Arzate-Cárdenas MA, Martínez-Jerónimo F (2012) Energy resource reallocation in *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae) reproduction induced by exposure to hexavalent chromium. *Chemosphere* 87(4):326–332. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.014>
- Battaglin WA, Rice KC, Focazio MJ, Salmons S, Barry RX (2009) The occurrence of glyphosate, atrazine, and other pesticides in vernal pools and adjacent streams in Washington, DC, Maryland, Iowa, and Wyoming, 2005-2006. *Environ Monit Assess* 155(1–4):281–307. <https://doi.org/10.1007/s10661-008-0435-y>



- Bejarano Gonzalez F (2018) Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México
- Benbrook CM (2016) Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur* 28(1):1–15. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Best J, James A, Lawrence C, Adatto I, Cockington J (2010) A Novel Method for Rearing First-Feeding Larval Zebrafish: Polyculture with Type L Saltwater Rotifers ( *Brachionus plicatilis* ) . *Zebrafish* 7(3):289–295. <https://doi.org/10.1089/zeb.2010.0667>
- Braz-Mota S, Sadauskas-Henrique H, Duarte RM, Val AL, Almeida-Val VMF (2015) Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere* 135:53–60. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.042>
- Brewster DW, Warren J, Hopkins li WE, Hopkjns WE, Hopkins li WE (1991) Metabolism of glyphosphate in Sprague-Dawley rats: Tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Fundam Appl Toxicol* 17(1):43–51
- Bridi D, Altenhofen S, Gonzalez JB, Reolon GK, Bonan CD (2017) Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology* 392(July):32–39. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.10.007>
- Burkhardt-Holm P, Oulmi Y, Schroeder A, Storch V, Braunbeck T (1999) Toxicity of 4-Chloroaniline in Early Life Stages of Zebrafish ( *Danio rerio* ): II. Cytopathology and Regeneration of Liver and Gills After Prolonged Exposure to Waterborne 4-Chloroaniline. *Arch Environ Contam Toxicol* 37(1):85–102. <https://doi.org/10.1007/s002449900493>
- Bus JS (2015) Analysis of Moms Across America report suggesting bioaccumulation of glyphosate in U.S. mother's breast milk: Implausibility based on inconsistency with available body of glyphosate animal toxicokinetic, human biomonitoring, and physico-chemical data. *Regul Toxicol Pharmacol* 73(3):758–764. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.10.022>
- Cano- Europa E (2009) Participación del estrés oxidativo y de las alteraciones del ambiente óxido.reducción en la generación de daño celular inducido por la deficiencia de hormonas tiroideas
- Carbajal-Hernández AL, Valerio-García RC, Martínez-Ruíz EB, Jarquín-Díaz VH, Martínez-Jerónimo F (2017) Maternal-embryonic metabolic and antioxidant response of *Chapalichthys pardalis* (Teleostei: Goodeidae) induced by exposure to 3,4-dichloroaniline. *Environ Sci Pollut Res* 24(21):17534–17546. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9340-7>
- Castro-Barrera T (2003) *Alimento Vivo Para Organismos Acuáticos*, First edit. AGT Editor, Distrito Federa, México

- Cavalcante DGSM, Martinez CBR, Sofia SH (2008) Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 655(1–2):41–46. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.06.010>
- Çavaş T, Könen S (2007) Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22(4):263–268. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem012>
- Chan P, Mahler J (1992) NTP technical report on the toxicity studies of Glyphosate (CAS No. 1071-83-6) Administered In Dosed Feed To F344/N Rats And B6C3F1 Mice. *Toxic. Rep. Ser.* 1-D3
- Chizinski CJ, Sharma B, Pope KL, Patiño R (2008) A bioenergetic model for zebrafish *Danio rerio* (Hamilton). *J Fish Biol* 73(1):35–43. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01900.x>
- CIBIOGEM-CONACyT. 2019. “Monografía Sobre El Glifosato.”
- Combs DK, Hartnell GF (2008) Alfalfa Containing the Glyphosate-Tolerant Trait Has No Effect on Feed Intake, Milk Composition, or Milk Production of Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 91(2):673–678. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0611>
- Conde-Porcuna JM, Ramos-Rodríguez E, Morales-Baquero R (2004) El zooplancton como integrante de la estructura trófica de los ecosistemas. *Ecosistemas* 13(2):23–29
- Contardo-Jara V, Klingelmann E, Wiegand C (2009) Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environ Pollut* 157(1):57–63. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.07.027>
- Coupe RH, Kalkhoff SJ, Capel PD, Gregoire C (2012) Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Manag Sci* 68(1):16–30. <https://doi.org/10.1002/ps.2212>
- Crapo JD, McCord JM, Fridovich I (1978) [41] Preparation and assay of superoxide dismutases. In: *Methods in Enzymology*. pp 382–393
- Da Silva Azevêdo DJ, De Lucena Barbosa JE, Porto DE, Gomes WIA, Molozzi J (2015) Fatores bióticos ou abióticos: Quais exibem maior influência na determinação da estrutura de rotíferos em reservatórios no semiárido? *Acta Limnol Bras* 27(1):60–77. <https://doi.org/10.1590/S2179-975X2914>
- De Castilhos Ghisi N, Cestari MM (2013) Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. *Environ Monit Assess* 185(4):3201–3207. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2783-x>

- De Moura FR, Brentegani KR, Gemelli A, Sinhorin AP, Sinhorin VDG (2017) Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original®. *Chemosphere* 185:445–451. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.030>
- Dey S, Samanta P, Pal S, Mukherjee AK, Kole D, Ghosh AR (2016) Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide (Excel Mera 71). *Emerg Contam* 2(4):191–203. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.002>
- Domínguez-Cortinas G, Saavedra JM, Santos-Medrano GE, Rico-Martínez R (2008) Analysis of the toxicity of glyphosate and Faena® using the freshwater invertebrates *Daphnia magna* and *Lecane quadridentata*. *Toxicol Environ Chem* 90(2):377–384. <https://doi.org/10.1080/02772240701529038>
- Duke S, Powles S (2008) Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci* 63(11):1100–1106. <https://doi.org/10.1002/ps>
- Dutra BK, Fernandes FA, Failace DM, Oliveira GT (2011) Effect of Roundup ® ( glyphosate formulation ) in the energy metabolism and Effect of roundup Ò ( glyphosate formulation ) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* ( Crustacea , Amphipoda , Dogielinotidae ). *Ecotoxicolo* 20:255–263. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0577-x>
- Erickson GE, Robbins ND, Simon JJ, Berger LL, Klopfenstein TJ, Stanisiewski EP, Hartnell GF (2003) Effect of feeding glyphosate-tolerant (Roundup-Ready events GA21 or nk603) corn compared with reference hybrids on feedlot steer performance and carcass characteristics. *J Anim Sci* 81(10):2600–2608. <https://doi.org/10.2527/2003.81102600x>
- Fantón N, Bacchetta C, Rossi A, Gutierrez MF (2020) Effects of a glyphosate-based herbicide on the development and biochemical biomarkers of the freshwater copepod *Notodiaptomus carteri* (Lowndes, 1934). *Ecotoxicol Environ Saf* 196(March):110501. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110501>
- Ferrario C, Parolini M, De Felice B, Villa S, Finizio A (2018) Linking sub-individual and supra-individual effects in *Daphnia magna* exposed to sub-lethal concentration of chlorpyrifos. *Environ Pollut* 235:411–418. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.113>
- Fiałkowska E, Pajdak-Stós A, Fyda J, Kocerba-Soroka W, Sobczyk M (2016) *Lecane tenuiseta* (Rotifera, Monogononta) as the best biological tool candidate selected for preventing activated sludge bulking in a cold season. *Desalin Water Treat* 57(59):28592–28599. <https://doi.org/10.1080/19443994.2016.1192565>
- Fiorino E, Sehonova P, Plhalova L, Blahova J, Svobodova Z, Faggio C (2018) Effects of glyphosate on early life stages: comparison between *Cyprinus carpio* and *Danio rerio*. *Environ Sci Pollut Res* 25(9):8542–8549. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1141-5>

- Folmar LC, Sanders HO, Julin AM (1979) Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol* 8(3):269–278. <https://doi.org/10.1007/BF01056243>
- Ford B, Bateman LA, Gutierrez-Palominos L, Park R, Nomura DK (2017) Mapping Proteome-wide Targets of Glyphosate in Mice. *Cell Chem Biol* 24(2):133–140. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.12.013>
- Forner-Piquer I, Faucherre A, Byram J, Blaquiere M, de Bock F, Gamet-Payraastre L, Ellero-Simatos S, Audinat E, Jopling C, Marchi N (2021) Differential impact of dose-range glyphosate on locomotor behavior, neuronal activity, gliocerebrovascular structures, and transcript regulations in zebrafish larvae. *Chemosphere* 267:128986. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128986>
- Gagneten AM (2002) Efectos del herbicida Paraquat sobre el zooplancton. *Iheringia Série Zool* 92(3):47–56. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212002000300005>
- Gamse JT, Gorelick DA (2016) Mixtures, Metabolites, and Mechanisms: Understanding Toxicology Using Zebrafish. *Zebrafish* 13(5):377–378. <https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1370>
- Garza-León CV, Arzate-Cárdenas MA, Rico-Martínez R (2017) Toxicity evaluation of cypermethrin, glyphosate, and malathion, on two indigenous zooplanktonic species. *Environ Sci Pollut Res* 24(22):18123–18134. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9454-y>
- Gehin A, Guyon C, Nicod L (2006) Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. *Environ Toxicol Pharmacol* 22(1):27–34. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2005.11.003>
- Gluszczak L, dos Santos Miron D, Crestani M, Braga da Fonseca M, Arajo Pedron F de, Duarte MF, Vieira VLP (2006) Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Saf* 65(2):237–241. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.017>
- Granado L (2000) Ecología de comunidades: el paradigma de los peces de agua dulce
- Grandcoin A, Piel S, Baures E, Grandcoin A, Piel S, Baures E (2017) AminoMethylPhosphonic acid ( AMPA ) in natural waters : Its sources , behavior and environmental fate To cite this version : HAL Id : hal-01516026. *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055>
- Grant RJ, Fanning KC, Kleinschmit D, Stanisiewski EP, Hartnell GF (2003) Influence of glyphosate-tolerant (event nk603) and corn rootworm protected (event MON863) corn silage and grain on feed consumption and milk production in holstein cattle. *J Dairy Sci* 86(5):1707–1715. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73756-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73756-4)
- Gravato C, Almeida JR, Silva C, Oliveira C, Soares AMVM (2014) Using a multibiomarker approach and behavioural responses to assess the effects of

anthracene in Palaemon serratus. Aquat Toxicol 149:94–102.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.024>

Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M (2012) DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 743(1–2):1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.017>

Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M (2010) European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup® - A glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis* 25(5):523–530.  
<https://doi.org/10.1093/mutage/geq038>

Harangi S, Baranyai E, Fehér M, Tóth CN, Herman P, Stündl L, Fábrián I, Tóthmérés B, Simon E (2017) Accumulation of Metals in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to Sublethal Levels of Iron and Manganese: Survival, Body Weight and Tissue. *Biol Trace Elem Res* 177(1):187–195. <https://doi.org/10.1007/s12011-016-0854-5>

Harayashiki CAY, Varela Junior AS, de Souza Machado AA, Da Costa Cabrera L, Primel EG, Bianchini A, Corcini CD (2013) Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquat Toxicol* 142:176–184. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.006>

Hernández-Ruiz E, Alvarado-Flores J, Rubio-Franchini I, Ventura-Juárez J, Rico-Martínez R (2016) Adverse effects and bioconcentration of chromium in two freshwater rotifer species. *Chemosphere* 158:107–115.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.05.067>

Heu C, Elie-Caille C, Mougey V, Launay S, Nicod L (2012) A step further toward glyphosate-induced epidermal cell death: Involvement of mitochondrial and oxidative mechanisms. *Environ Toxicol Pharmacol* 34(2):144–153.  
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.02.010>

Husak V, Strutynska T, Burdyliuk N, Pitukh A, Bubalo V, Falfushynska H, Strilbytska O, Lushchak O (2022) Low-Toxic Herbicides Roundup and Atrazine Disturb Free Radical Processes in *Daphnia* in Environmentally Relevant Concentrations. *EXCLI J* 21:595–609. <https://doi.org/10.17179/excli2022-4690>

International Agency for Research on Cancer (2017) Monograph Glyphosate. In: *Some Organophosphate Insecticides and Herbicides*. pp 321–412

Jansons M, Pugajeva I, Bartkevičs V (2018) Occurrence of glyphosate in beer from the Latvian market. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 35(9):1767–1775. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1469051>

Jeong CB, Won EJ, Kang HM, Lee MC, Hwang DS, Hwang UK, Zhou B, Souissi S, Lee SJ, Lee JS (2016) Microplastic Size-Dependent Toxicity, Oxidative Stress Induction, and p-JNK and p-p38 Activation in the Monogonont Rotifer (*Brachionus*



- Jofré DM, Alvarez M, Perez E, Mohamed F, Jerez MB, Juri AM, Enriz RD, Giannini F (2016) Studies of Acute and Chronic Toxicity of Commercial Herbicides with Glyphosate against *Danio rerio*. *J Environ Anal Toxicol* 06(01):1–5. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000340>
- Jofré DM, Garcia MJG, Salcedo R, Morales M, Alvarez M, Enriz D, Giannini F (2013) Fish Toxicity of Commercial Herbicides Formulated With Glyphosate. *J Environ Anal Toxicol* 4(1):1–3. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000199>
- Kan CA, Hartnell GF (2004) Evaluation of broiler performance when fed Roundup-Ready wheat (event MON 71800), control, and commercial wheat varieties. *Poult Sci* 83(8):1325–1334. <https://doi.org/10.1093/ps/83.8.1325>
- Kristofco LA, Cruz LC, Haddad SP, Behra ML, Chambliss CK, Brooks BW (2016) Age matters: Developmental stage of *Danio rerio* larvae influences photomotor response thresholds to diazinon or diphenhydramine. *Aquat Toxicol* 170(1):344–354. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.011>
- Langiano V d C, Martinez CBR (2008) Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol* 147(2):222–231. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.09.009>
- Lawrence C (2019) Zebrafish larviculture. In: Cartner C, Eisen J, Farmer S, Guillemain K, Kent M, Sanders G (eds) *The Zebrafish in Biomedical Research: Biology, Husbandry, Diseases, and Research Applications*. Academic Press, London, England, pp 365–378
- Leyva-Soto LA, Balderrama-Carmona AP, Moran-Palacio EF, Diaz-Tenorio LM, Gortares-Moroyoqui P (2018) Glyphosate and aminomethylphosphonic acid in population of agricultural fields: Health risk assessment overview. *Appl Ecol Environ Res* 16(4):5127–5140. [https://doi.org/10.15666/aeer/1604\\_51275140](https://doi.org/10.15666/aeer/1604_51275140)
- Li M, Ruan L, Zhou J, Fu Y, Jiang L, Zhao H, Wang J (2017) Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. *Aquat Toxicol* 188(May):159–169. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.004>
- Lushchak O V, Kubrak OI, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI (2009) Chemosphere Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76(7):932–937. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.045>
- Ma J, Zhu J, Wang W, Ruan P, Rajeshkumar S, Li X (2019) Biochemical and molecular impacts of glyphosate-based herbicide on the gills of common carp. *Environ Pollut* 252:1288–1300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.040>
- Mackay D, Shiu W-Y, Shiu W-Y, Lee SC (2006) *Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals*. CRC Press



- Martínez-Jerónimo F, Arzate-Cárdenas M, Ortiz-Butrón R (2013) Linking sub-individual and population level toxicity effects in *Daphnia schoedleri* (Cladocera: Anomopoda) exposed to sublethal concentrations of the pesticide  $\alpha$ -cypermethrin. *Ecotoxicology* 22(6):985–995. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1077-6>
- McNaughton J, Roberts M, Rice D, Smith B, Hinds M, Delaney B, Iiams C, Sauber T (2011) Evaluation of broiler performance and carcass yields when fed diets containing corn grain from transgenic stacked-trait product DAS-Ø15Ø7-1xdas-59122-7xmon-ØØ81Ø-6xm on-ØØ6Ø3-6. *J Appl Poult Res* 20(4):542–553. <https://doi.org/10.3382/japr.2011-00367>
- Menkes DB, Temple WA, Edwards IR (1991) Intentional Self-Poisoning with Glyphosate-Containing Herbicides. *Hum Exp Toxicol* 10(2):103–107. <https://doi.org/10.1177/096032719101000202>
- Mercurio P, Flores F, Mueller JF, Carter S, Negri AP (2014) Glyphosate persistence in seawater. *Mar Pollut Bull* 85(2):385–390. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.021>
- Miyasaka N, Wanner AA, Li J, Mack-Bucher J, Genoud C, Yoshihara Y, Friedrich RW (2013) Functional development of the olfactory system in zebrafish. *Mech Dev* 130(6–8):336–346. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.09.001>
- Modesto KA, Martinez CBR (2010) Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78(3):294–299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047>
- Moreira LF, Sandrini JZ, Marques SM (2018) Toxicity induced by glyphosate and glyphosate-based herbicides in the zebrafish hepatocyte cell line (ZF-L). *Ecotoxicol Environ Saf* 162:201–207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.005>
- National Research Council (2011) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Eight Edit. National Academies Press, Washington, D.C.
- Nesković NK, Poleksić V, Elezović I, Karan V, Budimir M (1996) Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull Environ Contam Toxicol* 56(2):295–302. <https://doi.org/10.1007/s001289900044>
- Nüsslein-Volhard C, Dahm R (2003) *Zebrafish: A Practical Approach*.
- Nwani CD, Ivoke N, Ugwu DO, Atama C, Onyishi GC, Echi PC, Ogbonna SA (2013) Investigation on acute toxicity and behavioral changes in a freshwater African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), exposed to organophosphorous pesticide, Termifos®. *Pak J Zool* 45(4):959–965
- Ochoa DM, González JF (2008) ESTRÉS OXIDATIVO EN PECES INDUCIDO POR CONTAMINANTES AMBIENTALES. *Rev la Fac Meicina Vet y Zootec* 55:115–126
- OECD (2013) Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

OECD (2019) Test Guideline No. 203 Fish, Acute Toxicity Testing. OECD

Okada E, Allinson M, Barral MP, Clarke B, Allinson G (2019) Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) are commonly found in urban streams and wetlands of Melbourne, Australia. *Water Res* 168:115139. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115139>

Osorio-Treviño OC, Arzate-Cárdenas MA, Rico-Martínez R (2019) Energy budget in *Alona guttata* (Chydoridae: Aloninae) and toxicant-induced alterations. *J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng* 54(5):398–407. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1558901>

Ostera JM, Malanga G, Puntarulo S (2016) Actualización sobre aspectos oxidativos del efecto del glifosato en sistemas biológicos. *Biocencia* 18(2):3–10

Panetto OS, Gomes HF, Fraga Gomes DS, Campos E, Romeiro NC, Costa EP, do Carmo PRL, Feitosa NM, Moraes J (2019) The effects of Roundup® in embryo development and energy metabolism of the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol* 222(November 2018):74–81. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.007>

Peixoto F (2005) Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 61(8):1115–1122. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.044>

Pekkan K, Chang B, Uslu F, Mani K, Chen CY, Holzman R (2016) Characterization of zebrafish larvae suction feeding flow using  $\mu$ PIV and optical coherence tomography. *Exp Fluids* 57(7):1–7. <https://doi.org/10.1007/s00348-016-2197-6>

Pérez DJ, Okada E, Menone ML, Costa JL (2017) Can an aquatic macrophyte bioaccumulate glyphosate? Development of a new method of glyphosate extraction in *Ludwigia peploides* and watershed scale validation. *Chemosphere* 185:975–982. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.093>

Persch TSP, Weimer RN, Freitas BS, Oliveira GT (2017) Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. *Chemosphere* 174:98–109. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.092>

Pienjzek D, Bukowska B, Duda W (2004) Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pestic Biochem Physiol* 79(2):58–63. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.03.003>

Pohl HR, Wohlers D, Chou CH, Citra MJ, Fay M, Coley C, Harper C, Buser H, Ingerman L, Przybyla J, Li J, Ragin-Wilson A (2019) Toxicological Profile for Lead. CRC Press

Poiger T, Buerge IJ, Bächli A, Müller MD, Balmer ME (2017) Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environ Sci Pollut Res* 24(2). <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7835-2>

Polanco- Rodríguez AG, Araujo Leon JA (2018) The glyphosate herbicide in Yucatan, Mexico. *MOJ Bioequivalence Bioavailab* 5(6). <https://doi.org/10.15406/mojbb.2018.05.00115>

Polanco Rodríguez AG, Magaña Castro TV, Cetz Iuit J, Quintal López R (2019) Uso de agroquímicos cancerígenos en la región agrícola de Yucatán , México. *Cent Agrícola* 46(2):72–83

Rendón-Von Osten J, Dzul-Caamal R (2017) Glyphosate Residues in Groundwater , Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities : A Survey in Hopelch é n , Campeche , Mexico. *Int J Enviromental Res Public Heal* 14(595). <https://doi.org/10.3390/ijerph14060595>

Richmond ME (2018) Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *J Environ Stud Sci* 8(4):416–434. <https://doi.org/10.1007/s13412-018-0517-2>

Roberts DM, Buckley NA, Mohamed F, Eddleston M, Goldstein DA, Mehrsheikh A, Bleeke MS, Dawson AH (2010) A prospective observational study of the clinical toxicology of glyphosate-containing herbicides in adults with acute self-poisoning. *Clin Toxicol* 48(2):129–136. <https://doi.org/10.3109/15563650903476491>

Rodrigues ACM, Gravato C, Quintaneiro C, Golovko O, Žlábek V, Barata C, Soares AMVM, Pestana JLT (2015) Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. *Sci Total Environ* 508:506–513. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.021>

Rodríguez-Estrada J, Sobrino-Figueroa AS, Martínez-Jerónimo F (2016) Effect of sublethal  $\alpha$ -cypermethrin exposure on main macromolecules concentration, energy content, and malondialdehyde concentration in free-feeding *Danio rerio* larvae. *Fish Physiol Biochem* 42(3):859–868. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0180-4>

Rodríguez Aguilar BA, Martínez Rivera LM, Peregrina Lucano AA, Ortiz Arrona CI, Cárdenas Hernández OG (2019) Análisis de residuos de plaguicidas en el agua superficial de la cuenca del río Ayuquila-Armería, México. *Rev TERRA Latinoam* 37(2):151. <https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.462>

Rondón-Barragán I, Marin-Mendez G, Chacón-Novoa R, Naranjo-Suarez L, Pardo-Hernández D, Eslava-Mocha P (2012) Glyphosate (Roundup®) and Cosmoflux® 411F induce oxidative stress in red-bellied pacu (*Piaractus brachypomus*). *Orinoquia* 16(2):162–176

Roy N, Carneiro B, Ochs J (2016) Glyphosate Induces Neurotoxicity in Zebrafish. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.003>

Ruiz-Toledo J, Castro R, Rivero-Pérez N, Bello-Mendoza R, Sánchez D (2014) Occurrence of Glyphosate in Water Bodies Derived from Intensive Agriculture in a

Tropical Region of Southern Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 93(3):289–293. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1328-0>

Saebelfeld M, Minguez L, Griebel J, Gessner MO, Wolinska J (2017) Humic dissolved organic carbon drives oxidative stress and severe fitness impairments in *Daphnia*. *Aquat Toxicol* 182:31–38. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.006>

Samanta P, Pal S, Mukherjee AK, Ghosh AR (2014) Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicol Environ Saf* 107:120–125. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.025>

Samsel A, Seneff S (2013) Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. :1416–1463. <https://doi.org/10.3390/e15041416>

Sancho J V., Hernández F, López FJ, Hogendoorn EA, Dijkman E, Van Zoonen P (1996) Rapid determination of glufosinate, glyphosate and aminomethylphosphonic acid in environmental water samples using precolumn fluorogenic labeling and coupled-column liquid chromatography. *J Chromatogr A* 737(1):75–83. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(96\)00071-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00071-4)

Sanden M, Jørgensen S, Hemre GI, Ørnsrud R, Sissener NH (2012) Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for investigating dietary toxic effects of deoxynivalenol contamination in aquaculture feeds. *Food Chem Toxicol* 50(12):4441–4448. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.042>

Sayeed I, Parvez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S (2003) Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol Environ Saf* 56(2):295–301. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00009-5](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00009-5)

Sierra-Diaz E, Celis-de la Rosa A de J, Lozano-Kasten F, Trasande L, Peregrina-Lucano AA, Sandoval-Pinto E, Gonzalez-Chavez H (2019) Urinary pesticide levels in children and adolescents residing in two agricultural communities in Mexico. *Int J Environ Res Public Health* 16(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph16040562>

Smolders R, De Boeck G, Blust R (2003) Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 22(4):890–899. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220429>

Sulukon E, Köktürk M, Ceylan H, Beydemir Ş, Işık M, Atamanalp M, Ceyhun SB (2017) An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 180:77–85. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.018>

- Sviridov A V, Shushkova T V, Ermakova IT, Ivanova E V, Leontievsky AA (2014) Glyphosate: Safety Risks , Biodegradation , and Bioremediation. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8777-2>
- Tarazona J V., Court-Marques D, Tiramani M, Reich H, Pfeil R, Istace F, Crivellente F (2017) Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Arch Toxicol* 91(8):2723–2743. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1962-5>
- Taylor M, Hartnell G, Riordan S, Nemeth M, Karunanandaa K, George B, Astwood J (2003) Comparison of broiler performance when fed diets containing grain from roundup ready (NK603), yieldgard x roundup ready (MON810 x NK603), non-transgenic control, or commercial corn. *Poult Sci* 82(3):443–453. <https://doi.org/10.1093/ps/82.3.443>
- Tsui MTK, Chu LM (2003) Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52(7):1189–97. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00306-0)
- United Nations Environment Programme (1994) Glyphosate - Environmental Health Criteria 159
- Uren Webster TM, Laing L V., Florance H, Santos EM (2014) Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol* 48(2):1271–1279. <https://doi.org/10.1021/es404258h>
- Uren Webster TM, Santos EM (2015) Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics* 16(32):1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1254-5>
- Vajargah MF, Yalsuyi AM, Sattari M, Hedayati A (2018) Acute toxicity effect of glyphosate on survival rate of common carp , *Cyprinus carpio*. *Kerman Univ Med Sci* 5(2):61–66. <https://doi.org/10.15171/EHEM.2018.09>
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13:57–149
- Vannini A, Guarnieri M, Paoli L, Sorbo S, Basile A, Loppi S (2016) Bioaccumulation, physiological and ultrastructural effects of glyphosate in the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. *Chemosphere* 164:233–240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.058>
- Vega-López A, Galar-Martínez M, Jiménez-Orozco FA, García-Latorre E, Domínguez-López ML (2007) Gender related differences in the oxidative stress response to PCB exposure in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*). *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol* 146(4):672–678. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.04.022>



- Villamar-Ayala CA, Carrera-Cevallos JV, Vasquez-Medrano R, Espinoza-Montero PJ (2019) Fate, eco-toxicological characteristics, and treatment processes applied to water polluted with glyphosate: A critical review. *Crit Rev Environ Sci Technol* 0(0):1–39. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1579627>
- Villarreal-Chiu JF, Acosta-Cortés AG (2017) Biological Limitations on Glyphosate Biodegradation. :179–201. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50654-8>
- Villeneuve A, Larroud S, Humbert JF (2011) Herbicide Contamination of Freshwater Ecosystems: Impact on Microbial Communities. In: *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*. InTech
- Williams GM, Kroes R, Munro IC (2000) Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 31(2 I):117–165. <https://doi.org/10.1006/rtph.1999.1371>
- Yu-Jie D, Yong-Fang J, Na C, Wan-Ping B, Qin-Kai L, Ma Y-B, Yan-Ling C, De-Sheng P (2014) Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ Toxicol Chem* 33(1):11–17. <https://doi.org/10.1002/etc.2406>
- Zhan H, Feng Y, Fan X, Chen S (2018) Recent advances in glyphosate biodegradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 102(12):5033–5043. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9035-0>
- Zhang S, Xu J, Kuang X, Li S, Li X, Chen D, Zhao X, Feng X (2017) Biological impacts of glyphosate on morphology, embryo biomechanics and larval behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 181:270–280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.094>
- Zirena Vilca F, Gosgot Angeles W, Campos Quiroz CN, Zamalloa Cuba WA (2018) GLIFOSATO EN CUERPOS HÍDRICOS: PROBLEMA AMBIENTAL. *Rev Investig Altoandinas - J High Andean Res* 20(3):325–332. <https://doi.org/10.18271/ria.2018.396>