



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco

Departamento de Toxicología

**“Efecto sobre el sistema renina-angiotensina y la
capacidad antioxidante por exposición a los
plaguicidas clorpirifos y glifosato en el modelo de
pez cebra”**

Tesis que presenta:

Ing. Jeney Ajete Acosta

Para obtener el grado de Maestra en
Ciencias en la Especialidad de Toxicología

Director de tesis:

Dr. Octavio Gamaliel Aztatzi Aguilar

Ciudad de México

Agosto, 2024

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Toxicología de Contaminantes Atmosféricos y Estrés Oxidante en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección del Dr. Octavio Gamaliel Aztatzi Aguilar. Este trabajo recibió apoyo del proyecto CF-2019/3265538 titulado: Evaluación de los efectos transgeneracionales potencialmente heredados por la exposición a clorpirifos y glifosato en dos modelos experimentales. Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca de maestría otorgada desde septiembre de 2022 hasta agosto de 2024, con número de becario 836114 y número de CVU 1254714.

Resumen

El clorpirifos (CPF) y glifosato (GF) son plaguicidas organofosforados, que afectan la salud humana, induciendo estrés oxidante (EsOx), y efectos adversos en el sistema nervioso, respiratorio, reproductivo y cardiovascular. Se ha reportado que provocan efectos cardiotóxicos, sin embargo, se desconoce si pueden producir cardiotoxicidad mediante la alteración del sistema endocrino de renina-angiotensina (SRA), el cual regula la presión arterial y la remodelación tisular cardiovascular. El presente proyecto evaluó el efecto de la exposición a CPF y GF sobre el SRA y la capacidad antioxidante en el modelo pez cebra. Se realizaron bioensayos de exposición aguda (5 días) a los plaguicidas de presentación comercial y grado técnico por medio de una columna de agua. Se tuvieron nueve grupos de exposición (n=10 por grupo) a 0.3 y 5 µg/L de CPF, 500 y 1000 µg/L de GF, así como a las co-exposiciones CPF-GF 0.3-1000 µg/L, 5-500 µg/L, 0.3-500 µg/L y 5-1000 µg/L, respectivamente, y un grupo control no expuesto. Al término de la exposición, se determinó el consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada (n=6 por grupo), posteriormente se llevaron a eutanasia para la obtención de los tejidos de corazón, hígado y ojos. Se determinaron los biomarcadores de EsOx [gamma-glutamil transferasa (GGT), glutatión-s-transferasa (GST), malondialdehído (MDA), paraoxonasa 1 (PON-1) y productos avanzados de oxidación de proteínas (POAPs)] en homogenizados de hígado de los peces. Además, se determinó la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE) en homogenizados de ojo como biomarcador de exposición. Por Western Blot se determinaron los receptores de Angiotensina II tipo 1 y tipo 2, AT1R y AT2R, respectivamente, y el receptor activador de proliferación de peroxisomas alfa (PPAR-α) como marcador del proceso de reprogramación génica fetal cardíaca (RGFC). La tabla a continuación presenta los resultados obtenidos. Se observaron cambios en las respuestas fisiológicas de los peces (consumo de oxígeno y excreción nitrogenada) para las dos presentaciones de los plaguicidas, siendo los efectos más adversos para la PC. Los resultados de EsOx mostraron diferencias ante ambos plaguicidas y sus co-exposiciones afectando la capacidad antioxidante y de detoxificación de los organismos. Los resultados a nivel cardiovascular mostraron que la presentación comercial y el grado técnico de los plaguicidas afectan los niveles proteicos de AT1R, AT2R y PPARα. Estos resultados sugieren que la exposición a ambos plaguicidas y sus co-exposiciones ocasionan modificaciones en sus respuestas fisiológicas con la subsecuente alteración en el metabolismo y de la respuesta antioxidante, que desencadena a su vez cambios en los niveles proteicos de los blancos moleculares del SRA e induciendo cambios en la RGFC.

Tabla i. Efectos producidos por los plaguicidas PC y GT en los peces expuestos. Aumenta (↑), Disminuye (↓).

Parámetros		Presentación comercial						Grado Técnico										
		CPF		GF		CPF+GF		CPF		GF		CPF+GF						
		0.3	5	500	1000	5+500	0.3+1000	0.3+500	5+1000	0.3	5	500	1000	5+500	0.3+1000	0.3+500	5+1000	
Respuestas fisiológicas	Consumo O ₂		↑	↑	↑	↓	↓					↑	↓	↓			↓	
	Excreción Nitrogenada	↓	↓		↑	↑	↑	↑		↑			↓		↓			
Biomarcadores de EsOx y efecto	MDA (hígado)				↑		↓			↓	↓	↑	↓					
	POAPs (hígado)		↑		↑		↓			↑	↓							
	GST (hígado)		↑		↑				↑		↓	↑				↑	↓	
	GGT (hígado)	↓			↓	↓	↓			↓		↓	↓	↓				↓
	PON-1 (hígado)	↓	↓				↓			↓	↓	↓		↓	↓			↓
	AChE (ojo)		↓			↓		↑					↑					↑
SRA	AT1R (corazón)			↑							↑		↑		↑		↓	
	AT2R (corazón)		↑					↓	↓		↑		↑	↑	↑		↓	
RGFC	PPARα (corazón)						↓	↓	↓		↑						↓	

Palabras claves: clorpirifos, glifosato, *Danio rerio*, sistema renina-angiotensina, estrés oxidante.

Abstract

Chlorpyrifos (CPF) and glyphosate (GF) are organophosphate pesticides that affect human health by inducing oxidative stress (EsOx) and adverse effects on the nervous, respiratory, reproductive and cardiovascular systems. They have been reported to cause cardiotoxic effects; however, it is not known whether they can produce cardiotoxicity by altering the renin-angiotensin endocrine system (RAS), which regulates blood pressure and cardiovascular tissue remodeling. The present project evaluated the effect of CPF and GF exposure on the RAS and antioxidant capacity in the zebrafish model. Acute exposure bioassays (5 days) to commercial formulation and technical grade pesticides were performed in the water. Nine exposure groups (n=10 per group) were exposed to 0.3 and 5 µg/L CPF, 500 and 1000 µg/L GF, as well as to CPF-GF co-exposures 0.3-1000 µg/L, 5-500 µg/L, 0.3-500 µg/L and 5-1000 µg/L, respectively, and an unexposed control group. At the end of exposure, oxygen consumption and nitrogen excretion were determined (n=6 per group), then euthanized to obtain heart, liver and eye tissues. EsOx biomarkers [gamma-glutamyl transferase (GGT), glutathione-s-transferase (GST), malondialdehyde (MDA), paraoxonase 1 (PON-1) and advanced protein oxidation products (POAPs)] were determined in fish liver homogenates. In addition, acetylcholinesterase (AChE) enzyme activity was determined in eye homogenates as a biomarker of exposure. Angiotensin II type 1 and type 2 receptors, AT1R and AT2R, respectively, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α) were determined by western blot as a marker of the cardiac fetal gene reprogramming process (CFGR). The table below presents the results obtained. Changes in the physiological responses of the fish (oxygen consumption and nitrogen excretion) were observed in the two pesticide presentations, with the most adverse effects from the commercial formulation. The EsOx results showed differences for both pesticides and their co-exposures affecting the antioxidant and detoxification capacity of the organisms. The results at the cardiovascular level showed that commercial formulation and technical grade of the pesticides affect the protein levels of AT1R, AT2R and PPAR α . These results suggest that exposure to both pesticides and their co-exposures cause modifications in their physiological responses with subsequent alteration in metabolism and antioxidant response, which in turn triggers changes in protein levels of RAS molecular targets and induces changes in CFGR.

Table i. Effects produced by PC and GT pesticides on exposed fish. Increase (↑), Decrease (↓).

Parameters		Formulation commercial						Technical Grade										
		CPF		GF		CPF+GF		CPF		GF		CPF+GF						
		0.3	5	500	1000	5+500	0.3+1000	0.3+500	5+1000	0.3	5	500	1000	5+500	0.3+1000	0.3+500	5+1000	
Physiological responses	Oxygen consumption		↑	↑	↑	↓	↓					↑	↓	↓			↓	
	Nitrogen excretion	↓	↓		↑	↑	↑	↑		↑			↓		↓			
Biomarkers of oxidative stress and effects	MDA (liver)				↑		↓			↓	↓	↑	↓					
	POAPs (liver)		↑		↑		↓			↑	↓							
	GST (liver)		↑		↑				↑		↓	↑				↑	↓	
	GGT (liver)	↓			↓	↓	↓		↓		↓	↓	↓	↓				↓
	PON-1 (liver)	↓	↓				↓		↓	↓	↓		↓	↓	↓			↓
	AChE (eyes)		↓			↓		↑					↑					↑
RAS	AT1R (heart)			↑							↑		↑		↑		↓	
	AT2R (heart)		↑					↓	↓		↑		↑	↑	↑		↓	
CFGR	PPARα (heart)						↓	↓	↓		↑						↓	

Key words: chlorpyrifos, glyphosate, *Danio rerio*, angiotensin-renin system, oxidative stress.

Agradecimientos

Al Dr. Gamaliel por su apoyo y tiempo brindado durante la realización de este proyecto, pero sobre todo por su asesoría, consejos, por todo lo que me ha enseñado y por darme la oportunidad de pertenecer al Laboratorio 26.

A mi comité académico conformado por la Dra. Denhi Schnabel Peraza, Dra. María Isabel Hernández y el Dr. Miguel Betancourt Lozano por sus valiosas observaciones y recomendaciones durante la realización de este proyecto, que permitieron mejorar la calidad del estudio.

Al colegio de profesores del departamento de Toxicología, por brindar sus conocimientos y enseñanzas durante los cursos de formación de la maestría,

A la Q.B.P Juana Narvárez Morales y Biol. Teresa Marisela Uribe Ramírez por su asesoría y apoyo con los experimentos realizados durante el proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio 26, Andy, Eliud, Sandy, Yum y Dani, por sus ánimos, consejos, momentos de risas y frustración, me siento muy feliz de haberlos conocido.

A mis compañeros de generación por el apoyo durante los cursos y momentos de estrés durante nuestra formación.

A mi esposo Yeinier por toda la fuerza y apoyo que me das en esta etapa tan importante de nuestra vida, por las desveladas y por compartir conmigo mis tristezas y alegrías, sin tu ayuda no habría sido posible. Te amo mucho.

A mis padres por su amor sin límites y apoyo incondicional, son mi fuente de motivación y la guía fundamental en todo lo que soy, en mi educación tanto académica como de la vida. Los amo mucho.

A mis hermanos por todo su cariño y apoyo, pero sobre todo a mi Baldriche por ser una motivación para convertirme en una excelente profesional.

A mis suegros y cuñada por alentarme en alcanzar este logro, por su enorme cariño y son un gran motivo para el alcance de mis metas. Los quiero mucho.

A mis abuelos por su cariño inmenso, que, a pesar de no estar presentes, siempre están a mi lado y los tendré eternamente en mi corazón.

A mis amigas Anita, Géss, Roxi y Meli, por brindarme su apoyo a la distancia, por acompañarme en momentos de risas y llanto. Las quiero mucho.

A todos, ¡Muchas Gracias!

índice

1. Introducción	1
1.1. Plaguicidas	1
1.1.1. Plaguicidas organofosforados	1
1.1.2. Importancia de estudiar el clorpirifos y glifosato	8
1.2. Estrés oxidante asociado a enfermedades cardiovasculares	9
1.2.1. Glutación S-transferasa (GST).....	10
1.2.2. Gamma glutamil transferasa (GGT)	10
1.2.3. Paraoxonasa-1	11
1.3. Sistema renina-angiotensina	11
1.3.1. Receptores de Angiotensina II tipo 1 y 2.....	12
1.4. Reprogramación génica cardíaca	12
1.4.1. Receptor activador de proliferación de peroxisomas alfa (PPAR- α)	13
1.5. Respuestas fisiológicas	14
1.5.1. Consumo de oxígeno	14
1.5.2. Excreción nitrogenada.....	14
1.5.3. Porciento de agua corporal	15
1.6. Antecedentes.....	15
1.6.1. Pez cebra como modelo toxicológico	17
1.7. Justificación	19
1.8. Hipótesis	20
1.9. Objetivos.....	20
1.3.1. Objetivo general	20
1.3.2. Objetivos específicos	20
2. Materiales y métodos	21
2.1. Reactivos	21
2.2. Estrategia Experimental.....	21
2.3. Homogenización de los tejidos	23
2.4. Consumo de Oxígeno	23
2.5. Determinación de amoníaco	24
2.6. Determinación del porciento de agua corporal.....	24
2.7. Ensayos de actividad enzimática	25
2.8. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....	28
2.9. Ensayos de estrés oxidante	29
2.10. Western Blot	30
2.11. Análisis estadístico.....	32
3. Resultados	33
3.1. Consumo de oxígeno y excreción nitrogenada basal	33
3.2. Parámetros del agua de exposición	34

3.3.	Efectos de la exposición a plaguicidas de grado técnico y presentación comercial en el consumo de oxígeno de <i>Danio rerio</i>	35
3.4.	Efectos de la exposición a los plaguicidas de grado técnico y presentación comercial sobre la excreción nitrogenada de <i>Danio rerio</i>	37
3.5.	Efectos en el porcentaje de agua corporal de peces expuestos a los plaguicidas grado técnico y comercial	39
3.6.	Efectos de la exposición a plaguicidas de presentación comercial y grado técnico sobre la enzima AChE en ojo de <i>Danio rerio</i>	41
3.7.	Efectos en la capacidad antioxidante de <i>Danio rerio</i> expuestos a los plaguicidas de grado técnico y presentación comercial	43
3.8.	Efectos en los niveles de proteína de AT1R y AT2R en los peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico y presentación comercial	51
3.9.	Efectos en los niveles de proteína de PPAR- α en los peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial y grado técnico	55
4.	Discusión.....	58
4.1.	Consumo de oxígeno y excreción nitrogenada basal del pez cebrado adulto.	58
4.2.	La exposición a plaguicidas de grado técnico y presentación comercial afecta el consumo de oxígeno	59
4.3.	La exposición a plaguicidas de grado técnico y presentación comercial modifica la excreción de amonio.....	60
4.4.	La exposición a los plaguicidas de grado técnico provoca retención de líquido en los peces y la presentación comercial disminuye la cantidad de agua corporal.....	63
4.5.	La exposición a glifosato anula el efecto inhibitorio del CPF sobre la AChE en los peces.....	64
4.6.	La exposición a CPF y glifosato, grado técnico y presentación comercial induce daño oxidante en el hígado del pez cebrado.....	65
4.7.	La exposición a plaguicidas de grado técnico y presentación comercial modifican los niveles proteicos de AT1R, AT2R y PPAR- α	71
5.	Conclusiones.....	75
6.	Perspectivas.....	76
7.	Referencias.....	77

Lista de Tablas

Tabla 1. Anticuerpos comerciales empleados en la evaluación de los marcadores cardiotóxicos por Western Blot.....	32
Tabla 2. Parámetros del agua de exposición a plaguicidas de grado técnico durante el primer día, primer recambio, segundo recambio y último día.....	34
Tabla 3. Parámetros del agua de exposición a plaguicidas de presentación comercial durante el primer día, primer recambio, segundo recambio y último día.....	35

Lista de Figuras

Figura 1. Estrategia experimental con peces cebra.....	22
Figura 2. Consumo de oxígeno y excreción nitrogenada basal.	34
Figura 3. Consumo de oxígeno para los plaguicidas de grado técnico.....	36
Figura 4. Consumo de oxígeno para los plaguicidas presentación comercial.	37
Figura 5. Excreción nitrogenada para los plaguicidas de grado técnico.	38
Figura 6. Excreción nitrogenada para los plaguicidas presentación comercial.	39
Figura 7. Porcentaje de agua corporal para los plaguicidas de grado técnico.....	40
Figura 8. Porcentaje de agua corporal para los plaguicidas presentación comercial.....	41
Figura 9. Actividad enzimática de AChE en ojo para los plaguicidas de grado técnico.	42
Figura 10. Actividad enzimática de AChE en ojo para los plaguicidas de presentación comercial.	42
Figura 11. Niveles de MDA en hígado para los plaguicidas de grado técnico.	43
Figura 12. Niveles de MDA en hígado para los plaguicidas presentación comercial.	44
Figura 13. Niveles de POAPs en hígado para los plaguicidas de grado técnico.....	45
Figura 14. Niveles de POAPs en hígado para los plaguicidas de presentación comercial. ...	46
Figura 15. Actividad enzimática de GST en hígado para los plaguicidas de grado técnico. ..	46
Figura 16. Actividad enzimática de GST en hígado para los plaguicidas presentación comercial.	47
Figura 17. Actividad enzimática de GGT en hígado para los plaguicidas de grado técnico. ..	48
Figura 18. Actividad enzimática de GGT en hígado para los plaguicidas presentación comercial.	49
Figura 19. Actividad enzimática de PON-1 en hígado los plaguicidas de grado técnico.....	50
Figura 20. Actividad enzimática de PON-1 en hígado para los plaguicidas presentación comercial.	51
Figura 21. Niveles proteicos de AT1R en corazón para los plaguicidas de grado técnico.	52
Figura 22. Niveles proteicos de AT1R en corazón para los plaguicidas presentación comercial.	53
Figura 23. Niveles proteicos de AT2R en corazón para los plaguicidas de grado técnico.	54
Figura 24. Niveles proteicos de AT2R en corazón para los plaguicidas presentación comercial.	55
Figura 25. Niveles proteicos de PPAR- α en corazón para los plaguicidas de grado técnico.	56
Figura 26. Niveles proteicos de PPAR- α en corazón para los plaguicidas presentación comercial.	57

Abreviaturas

Adenosina trifosfato (ATP)

Agencia de Protección Ambiental (EPA)

Amoníaco (NH₃)

Angiotensina-II (Ang-II)

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)

Coefficiente de partición octanol-agua (log K_{ow})

Clorpirifos (CPF)

Consumo de oxígeno (VO₂)

Enfermedades cardiovasculares (ECV)

Enzima acetilcolinesterasa (AChE)

Enzima convertidora de angiotensina (ECA)

Estrés oxidante (EsOx)

Glifosato (GF)

Horas post-fertilización (hpf)

Oxígeno disuelto (OD)

Paraoxonasa- 1 (PON-1)

Receptor activador de proliferación de peroxisomas alfa (PPAR- α)

Receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R)

Receptor de angiotensina tipo 2 (AT2R)

Sistema renina-angiotensina (SRA)

Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL)

Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC)

Western Blot (WB)

Xenobiótico (Xb)

1. Introducción

1.1. Plaguicidas

Un plaguicida es “cualquier sustancia o combinación de sustancias utilizadas para prevenir o erradicar insectos no deseados, incluyendo vectores de enfermedades en humanos o animales y plagas que afectan a las plantaciones agrícolas”. Son ampliamente empleados en la producción agrícola y de alimentos para evitar el ataque de plagas durante su cultivo, procesamiento, almacenamiento, transporte y/o comercialización (Krzastek et al., 2020). Existen diferentes formas de clasificarlos, por ejemplo, de acuerdo a su uso como insecticidas, fungicidas, herbicidas, productos químicos para el jardín, desinfectantes domésticos y rodenticidas. Entre las clasificaciones que mayor importancia cobra desde el punto de vista toxicológico son de acuerdo con su estructura química, clasificándose en carbamatos, organofosforados, organoclorados y piretroides, además de ser clasificados en persistentes o no persistentes (Hassaan & El Nemr, 2020).

1.1.1. Plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas organofosforados son un grupo heterogéneo dentro de los plaguicidas, siendo de los más utilizados en la agricultura. Desde el punto de vista químico se caracterizan por la presencia de átomos de fósforo doblemente unidos a oxígeno o azufre como estructura básica. Se degradan por exposición a la luz y por hidrólisis en medio alcalino en suelo. Sin embargo, por lo general son compuestos liposolubles y medianamente volátiles, por lo que presentan altos niveles de toxicidad y bioacumulación. Además, son relativamente fáciles de adquirir, representando la principal causa de intoxicaciones agudas por plaguicidas en todo el mundo (Vlaiculescu & Varrone, 2022).

Es conocido que los plaguicidas organofosforados ejercen su acción tóxica aguda y directa porque inhiben irreversiblemente a la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en las terminaciones nerviosas, lo que conlleva a la acumulación de acetilcolina en los espacios sinápticos y con ello, a la aceleración del impulso nervioso. Entre los principales sistemas afectados por intoxicación por organofosforados se encuentran el sistema nervioso central, además de provocar afectaciones respiratorias, reproductivas y hepáticas. Es por ello, que su uso excesivo afecta la salud humana o ambiental, considerándose una preocupación global (Mali et al., 2023). En la

actualidad se conocen más de cien organofosforados entre los que destacan el glifosato, clorpirifos, malatión, fentión y diazinón, que son empleados en diferentes regiones y países como Europa, Estados Unidos y México, representando el 45% del mercado mundial (Suratman et al., 2015).

1.1.1.1. Clorpirifos (CPF)

El CPF es un insecticida clorado organofosforado, nombrado por la IUPAC como O, O-dietil-O-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato y fórmula química $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$. Es un compuesto sólido cristalino de color blanco, que posee un olor suave, con baja solubilidad en agua y coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) de 4.96 que lo convierte en una sustancia bioacumulable (Venturino et al., 2021). Es relativamente estable a hidrólisis en pH fisiológico y soluciones acuosas ácidas (Kopjar et al., 2018). Se utiliza principalmente en comunidades agrícolas y urbanas para controlar las plagas de cultivos (maíz, nueces de árbol y soja) en la agricultura, reducir las plagas domésticas como las termitas y el daño de los insectos en el césped y los campos de golf, además para el control de los mosquitos (Eaton et al., 2008).

Este plaguicida aún no se encuentra clasificado de acuerdo con su carcinogenicidad en humanos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), sin embargo, se ha sugerido que representa un riesgo para el desarrollo de cáncer pulmonar, de mama en mujeres premenopáusicas, de próstata, leucemia y cáncer cerebral (IARC, 2020).

1.1.1.1.1. Metabolitos

El proceso de degradación del CPF genera diferentes metabolitos, entre estos se encuentran: CPF-oxón (CPF-O) derivado de la oxidación del compuesto padre, el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) y el dietiltiofosfato (DETP), que son los principales productos de hidrólisis del CPF. Mientras que otros productos de transformación de menor impacto ambiental son el O-etil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridilo), dietilfosfato (DEP) y 3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina (TMP). Se ha demostrado por investigaciones que el CPF-O y TCP son más peligrosos en comparación con el compuesto principal, esto debido a su estructura cíclica y de cloración en las posiciones 3, 5, 6 que resulta similar a la estructura similar de los compuestos organoclorados que presentan mayor toxicidad ambiental (Tan et al., 2001).

1.1.1.1.2. Toxicocinética

La exposición humana al CPF se produce principalmente a través de la ingestión de sus residuos en los productos alimenticios y en el agua potable, pero también puede incluir la inhalación y vía dérmica, que constituyen las más relevantes para la exposición ocupacional. Esta última por su parte puede ocurrir durante la mezcla, la aplicación por aspersion, la limpieza de equipos o la eliminación de contenedores (Kopjar et al., 2018). La DL₅₀ oral aguda oscila entre 66 y 195 mg/kg de peso corporal. La NOAEL en ratas es de 1 mg/kg/día, mientras que, en el caso de los seres humanos se calculó y obtuvo un valor de 0.5 mg/kg/día (Eaton et al., 2008). Presenta una vida media en suelo de 2 a 120 días y en agua de 22 a 55 días (Venturino et al., 2021)

a) Absorción

El CPF se puede absorber en los seres humanos y animales a través del tracto respiratorio y la piel, al respirar y estar en contacto con aerosoles o polvo, aunque no se ha cuantificado el grado y la velocidad de su absorción. Después de la exposición oral, y ser absorbido por el tracto gastrointestinal y entra al torrente sanguíneo (Kopjar et al., 2018). Un estudio reportó que, al administrar en ratas, una dosis de 50 mg/kg de peso corporal de CPF en aceite de maíz, se observó una absorción de ~80% de la dosis, lo que dio como resultado la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) (Eaton et al., 2008).

b) Distribución

En organismos mamíferos como ratas se ha establecido que el CPF después de ser absorbido se distribuye ampliamente, a órganos como riñón, hígado y cerebro. Sin embargo, no se dispone de estudios sobre la distribución del plaguicida y sus metabolitos en seres humanos (Kopjar et al., 2018). Aun así, diversos estudios se han basado en coeficientes de partición octanol: agua y el contenido de lípidos en los tejidos, para calcular la distribución del plaguicida entre los tejidos y las sangre, pues se conoce que es capaz de acumularse en tejido adiposo. En animales gestantes, existe evidencia que el CPF y sus metabolitos pueden atravesar la placenta y llegar al feto (Testai et al., 2010).

c) Metabolismo

El principal órgano donde se metaboliza el CPF es el hígado; sin embargo, se ha documentado metabolismo extrahepático en órganos como el cerebro y el intestino (John and Shaike, 2015). Las vías del metabolismo del CPF se encuentran catalizadas

principalmente por la familia de los citocromos-P450, la desulfuración oxidativa catalizada que produce el CPF-O. Este metabolito puede sufrir hidrólisis por esterasas tipo A (paraoxonasa-1) de los enlaces éster fosfato del CPF-O transformándose en TCP y DEP, los cuales van a formar conjugados de glucurónido y sulfato. A su vez el CPF también puede transformarse a TCP, DEP y DETP por desarilación oxidativa (Eaton et al., 2008).

d) Excreción

Las concentraciones de CPF en sangre por lo general son muy bajas, es eliminado del organismo principalmente por la orina, siendo el producto más abundante TCP, junto con el DEP y DETP que se emplean como biomarcadores de exposición, además de conjugados de sulfatos y glucurónidos (Testai et al., 2010). Se ha estimado que la vida media de eliminación en humanos es de 27 h, con una tasa máxima de excreción del TCP en 24 a 48 h después de la exposición (Eaton et al., 2008). Hasta el momento no existen estudios en humanos que aborden la eliminación por bilis/heces de CPF, sin embargo se conoce que en ratas se eliminan como conjugados de glutatión reducido y glucurónido, que pueden hidrolizarse en el lumen intestinal y reabsorberse entrando en la recirculación enterohepática. Otra vía de eliminación estudiada es a través de la leche materna que, al ser relativamente rica en grasas, tiende a acumularse el CPF y CPF-O (Testai et al., 2010).

1.1.1.1.3. Toxicodinamia

Los efectos tóxicos del CPF se derivan principalmente de la inhibición que origina en la enzima AChE, lo que lleva a una sobreestimulación del sistema nervioso que provoca náuseas, mareos, confusión y parálisis respiratoria (Kopjar et al., 2018). Por lo que su exposición a largo plazo puede provocar efectos adversos a la salud, principalmente en los sistemas nervioso, cardiovascular y respiratorio como déficit cognitivo, hipertrofia cardíaca e hiperreactividad de las vías respiratorias, respectivamente (Wołejko et al., 2022).

Además, se ha reportado que provoca aumento en el peso relativo de los riñones y malformaciones esqueléticas en ratones, así como incremento en los niveles del colesterol, estrés oxidante (EsOx), padecimientos alérgicos, e incluso trastornos de autoinmunidad (Eaton et al., 2008). Mientras tanto también se ha documentado que causa disminución de los triglicéridos, la progesterona y niveles séricos de estradiol

(Deng et al., 2016), además de reducir los niveles de la hormona Tiroxina (T4) de cortisol y tiroides (Testai et al., 2010).

A nivel molecular, el CPF es capaz de activar la vía de señalización del factor nuclear κ B (NF- κ B) e inducir a los macrófagos a secretar gran cantidad de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1), que provoca inflamación y lesiones pulmonares en ratas (Aboubakr et al., 2021).

1.1.1.2. Glifosato (GF)

El glifosato es un herbicida organofosforado de fórmula química $C_3H_8NO_5P$ y nombrado por la IUPAC como N-fosfonometil-glicina, con propiedades de fosfonato, carboxilato y amina, que le permiten quelar con metales trivalentes y tetravalentes. El enlace covalente entre sus átomos de carbono y fósforo le proporciona varias especificidades químicas y físicas, como alta adsorción al suelo y solubilidad en agua (Soares et al., 2021), con un log Kow menor a -3.4. Es ampliamente utilizado en el control de malezas en cultivos de granos de cereales como avena, trigo, legumbres y maíz transgénico. Su vida media reportadas varía de 2 a 215 días en suelos y de 1.5 a 130 días en aguas antes de su degradación microbiana (ATSDR, 2020).

Este plaguicida fue clasificado por la IARC como probable carcinógeno humano en el 2015, pues se ha relacionado con el riesgo de padecer cánceres linfohematopoyéticos como linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple (IARC, 2020).

1.1.1.2.1. Metabolitos

El glifosato es degradado en el medio ambiente por microorganismos del suelo y las plantas, por lo que puede encontrar en productos vegetales. Sus metabolitos principales son el ácido aminometilfosfónico (AMPA) conocido como su metabolito más activo, el ácido metilfosfónico (MPA) y el glioxilato (Peillex & Pelletier, 2020). Tanto el glifosato como su principal metabolito AMPA han sido considerados no tóxicos para mamíferos, sin embargo, evidencia reciente indica que podrían afectar el microbioma intestinal. Los resultados muestran que las bacterias altamente patogénicas (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, *Clostridium pefrigens* y *Clostridium botulium*) son resistentes al glifosato, mientras que las bacterias beneficiosas (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus badius*, y *Lactobacillus spp*) resultan ser más susceptibles, de ahí que la reducción de estas en el microbiota del tracto gastrointestinal podría alterar la comunidad bacteriana normal del intestino

(Milesi et al., 2021). Hay que destacar que existe falta de conocimiento sobre la degradación de glifosato a AMPA en el cuerpo humano.

1.1.1.2.2. Toxicocinética

Los estudios actuales indican que la exposición humana a glifosato puede ocurrir a través del uso ocupacional por contacto con la sustancia al inhalarla o con la piel durante o después de su uso, mientras que la población de manera general se encuentra expuesta por la ingesta de sus residuos de alimentos (Milesi et al., 2021). A través de estudios experimentales en ratas, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), definieron en 2016, una DL_{50} de 5600 mg/kg de peso corporal para la vía oral y más de 2000 mg/kg de peso corporal para la vía dérmica. La NOAEL reportada por estudios de laboratorio en conejos fue de 100 mg/kg de peso corporal por día (Soares et al., 2021).

a) Absorción

El glifosato es más probable que ingrese al organismo a través de las vías dérmica, oral e inhalatoria. Estudios en ratas reportan que después de una administración oral, el plaguicida se absorbe de forma rápida pero incompleta a través del tracto gastrointestinal, pues solo alrededor del 20 al 30% de la dosis administrada es absorbida, aunque se conoce que penetra fácilmente en los tejidos. Mientras que la absorción del plaguicida por la piel es limitada (Peillex & Pelletier, 2020).

b) Distribución

Estudios han analizado la distribución tisular del glifosato e indicaron como órganos diana el intestino delgado, hueso, riñón e hígado. Sin embargo, se necesitan más estudios toxicocinéticos para conocer sobre la distribución del plaguicida en diferentes tejidos, órganos y fluidos biológicos, para conocer si se bioacumula en el organismo (Milesi et al., 2021). Pues un estudio reciente en ratas reportó que solo el 1% de la dosis absorbida de glifosato permanece después de 7 días, y que no se distribuye por la circulación enterohepática (Soares et al., 2021).

c) Metabolismo

La información sobre el metabolismo del glifosato es limitada pues los estudios en animales de experimentación (ratas, conejos, cabras lactantes y pollos) o en plantas indican que no se biotransforma; esto debido a que la mayor parte de la dosis administrada se excreta como molécula original sin cambios, solo alrededor del 1 %

se metaboliza a través de hidrólisis, lo que origina AMPA como principal metabolito (Peillex & Pelletier, 2020).

d) Excreción

La principal ruta de eliminación del glifosato en ratas son las heces, con alrededor del 60 al 70 % de la dosis administrada, y el por ciento restante se elimina rápidamente por vía urinaria, mientras que no se conoce su excreción a través de la bilis y los pulmones. Se estima que su vida media es de 6 a 12 h. La mayor parte del plaguicida y sus metabolitos se excretan a las 48 h (Soares et al., 2021). En humanos, el glifosato se detecta en sangre y orina, especialmente en trabajadores expuestos, pero igualmente se excreta en unos pocos días (Peillex & Pelletier, 2020).

1.1.1.2.3. Toxicodinamia

Se ha informado que el glifosato y los herbicidas a base de este, causan efectos crónicos hepatorreñales y teratogénicos como alteraciones estructurales de los hepatocitos en ratas a dosis de 50 a 500 mg/kg/día, y alteraciones en el desarrollo cefálico y cartílagos craneales de *Xenopus Laevis* a dosis de 30 a 100 mg/L, junto con alteración de la funcionalidad endocrina al causar disminución de progesterona en células de placenta humana e interrumpir la vía de síntesis del estrógeno (Singh et al., 2020). Es considerado una sustancia nefrotóxica, pues conduce a la pérdida de células tubulares por apoptosis (Soares et al., 2021).

Es capaz de producir un aumento del EsOx, interrumpir la vía de síntesis de estrógeno y deteriorar funciones cerebrales como disminución de los niveles de dopamina y serotonina. También parece afectar el sistema inmune al alterar la cascada del complemento y aumentar la producción de citocinas proinflamatorias en modelos no mamíferos (Peillex & Pelletier, 2020). Cabe señalar que el herbicida puede afectar la respuesta biológica en especies marinas (crustáceos y moluscos) como su movimiento, después de la exposición crónica a bajas concentraciones, del orden de magnitud de µg/L (Milesi et al., 2021). Además, a partir de estudios realizados en modelo de pez cebra se reportó que el glifosato y su metabolito AMPA provocan cardiotoxicidad al producir arritmias y edemas, así como, aumento de malformaciones cardíacas en aurículas y ventrículos, incluso a concentraciones bajas 0, 1, 10, 100 y 700 ng/mL (Soares et al., 2021).

1.1.2. Importancia de estudiar el clorpirifos y glifosato

El CPF y el GF son dos de los plaguicidas organofosforados más utilizados a nivel mundial, con un uso de 50 000 toneladas/ año de CPF para el 2022 y de 777 millones de kg/ año de glifosato para el 2020. Se ha detectado la presencia de ambos o de sus metabolitos en entornos acuáticos y alimentos como frutas y verduras; esto debido a que son compuestos empleados de forma conjunta por sus funciones como insecticida y herbicida en la agricultura, respectivamente (Zhang et al., 2023). Agencias reguladoras como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés), responsables de proteger la salud de los seres humanos, recursos naturales y el ambiente, y prevenir la contaminación y enfermedades de origen alimentario, respectivamente, han reportado efectos producidos por ambos plaguicidas a nivel nervioso, genético y reproductivo, en abejas, peces, y otras especies como invertebrados, anfibios, aves y mamíferos. Esto ha servido como evidencia para algunos países y regiones como la Unión Europea, Estados Unidos, Argentina, Vietnam y Chile donde se ha prohibido y restringido su uso, mientras que en México aún se fabrican, comercializan e importan al país (Bejarano & Rojas-García, 2023).

El CPF es el segundo insecticida más utilizado en México, que para el año 2022 contó con 206 registros vigentes autorizados por la Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios (Cofepris) para su uso en productos comerciales (INECC, 2018). Puede utilizarse sin restricciones para uso doméstico, pecuario y agrícola pues no se encuentra regulado, a pesar de que es ampliamente empleado en Salud Pública en campañas de control de mosquitos (Bejarano & Rojas, 2023). Por su parte el glifosato es el herbicida más utilizado en el país, siendo empleado en el 77.6% de cultivos genéticamente modificados y puede obtenerse en tiendas de autoservicio debido a que su venta no se encuentra regulada y es asequible económicamente (Cano et al., 2023). A pesar de que se conoce que la degradación ambiental de ambos plaguicidas puede tener una vida media de días hasta años en agua y suelo, dependiendo de la intensidad de su aplicación y el tipo de ecosistema; existe ausencia de monitoreos regulares en estas matrices ambientales y vigilancia epidemiológica por parte de organizaciones encargadas de la sanidad, inocuidad y seguridad de la población (Bejarano & Rojas, 2023). Se ha confirmado la presencia de ambos en lagunas y sedimentos, incluso en ecosistemas alejados de los lugares de aplicación al ser transportados por corrientes

atmosféricas o vía acuática. Aunado a esto, lo que resulta más preocupante para la población es la detección de residuos de glifosato y CPF o sus metabolitos en alimentos como maíz, producto altamente consumido en el país, así como el trigo y soya, esto debido a que muchas veces son empleados de forma conjunta en las plantaciones agrícolas (Cano et al., 2023; Díaz et al., 2021; García et al., 2018; La Rosa et al., 2018), recordando además que el CPF debido a su alta lipofiliidad es un compuesto bioacumulable en los organismos. Hasta el momento, no existe ninguna norma oficial mexicana que regule sus usos, a pesar de que cada vez más se realizan investigaciones que relacionan la exposición a ambos contaminantes con la producción de EsOx, vinculado este a su vez con el desarrollo de enfermedades cerebrales, renales y cardiovasculares.

1.2. Estrés oxidante asociado a enfermedades cardiovasculares

El EsOx se refiere al desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno (*ROS, por sus siglas en inglés*) y la capacidad de eliminar dichas ROS por parte de los sistemas antioxidantes en el organismo. La presencia excesiva de ROS provoca daños irreversibles en las membranas celulares al oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que juega papel crucial en la patogenia de enfermedades cardiovasculares (ECV) relacionadas con la hipoxia y la cardiotoxicidad (Farías et al., 2017).

Las ECV son un término amplio que comprenden problemas en el corazón y los vasos sanguíneos, y que constituyen la principal causa de muerte en todo el mundo. Se ha demostrado que una variedad de ECV como insuficiencia cardíaca, aterosclerosis e hipertensión están asociadas con un exceso de producción de ROS, por lo que a su vez se ha podido conocer que el EsOx impulsa la aparición y progresión de ECV (Senoner & Dichtl, 2019). Estudios realizados en mamíferos y en modelos de refinamiento como el pez cebra, han sugerido que la generación de ROS y la inducción de la muerte de los cardiomiocitos son mecanismos por los cuales algunos xenobióticos (Xbs) lesionan el miocardio provocando efectos cardiotóxicos e indicando afectaciones cardiovasculares como alteración en el SRA (Maciag et al., 2022).

En el organismo se encuentran enzimas con actividad antioxidante que participan en la prevención de ECV, como es el caso de glutatión S-transferasa (GST), gamma glutamil transferasa (GGT) y paraoxonasa 1 (PON-1).

1.2.1. Glutación S-transferasa (GST)

Las glutación-S-transferasas (EC 2.5.1.18) son una familia de enzimas que intervienen en la detoxificación de Xbs. Estas catalizan el ataque nucleofílico del átomo de azufre del glutación con los grupos electrofílicos de un segundo compuesto dando como resultado una molécula de glutación-S conjugado más soluble y menos tóxico. Representan una barrera contra los efectos nocivos del EsOx y codifican genes que son necesarios para contrarrestar la toxicidad causada por productos farmacéuticos y contaminantes ambientales (Vaish et al., 2020).

Se ha especulado que esta enzima se induce en condiciones de EsOx como mecanismo protector, de ahí que los polimorfismos que se producen en los genes GST pueden contribuir en un individuo al desarrollo de enfermedades relacionadas con cambios en el metabolismo oxidativo (Akgul et al., 2012). Además, se ha reportado que la acumulación ROS están relacionados con polimorfismos en enzimas antioxidantes como las glutación S-transferasas, relacionadas a su vez con un mayor riesgo de enfermedad vascular como la hipertensión y la aterosclerosis (Matuz-Mares et al., 2021).

1.2.2. Gamma glutamil transferasa (GGT)

La gamma-glutamil transferasa (EC 2.3.2.2) es una enzima ubicada en la superficie externa de las membranas celulares. La GGT contribuye al mantenimiento de las concentraciones fisiológicas de glutación citoplasmático y a la defensa celular contra el EsOx mediante la degradación del glutación extracelular y el aumento de la disponibilidad de aminoácidos para su síntesis intracelular (Whitfield, 2001). Estudios epidemiológicos han sugerido que una actividad elevada de GGT se asocia con un mayor riesgo de ECV, como enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular, hipertensión arterial, insuficiencia y arritmias cardíacas (Ndrepepa et al., 2018). Esto debido al papel de la GGT en la descomposición del glutación, que conduce a la producción de dipéptido cisteinil-glicina (fuerte agente reductor), que participa en reacciones de peroxidación escalonadas, incluidas las LDL, ejerciendo una acción prooxidante y proinflamatoria local (Pitisuttithum et al., 2020).

La medición de la actividad de GGT circulante se utiliza ampliamente como marcador para el diagnóstico del estado de EsOx y la insuficiencia de antioxidantes en los organismos (Ndrepepa et al., 2018).

1.2.3. Paraoxonasa-1

La PON-1 (EC 3.1.1.2, 3.1.1.81, 3.1.8.1) es una enzima sintetizada en el hígado y es capaz de hidrolizar compuestos organofosforados como el paraoxón, diazoxón, CPF, por lo que es considerada la primera línea de defensa contra dichos compuestos (Durrington et al., 2023). Diversos estudios le han atribuido propiedades antioxidantes a esta enzima por su capacidad de eliminar peróxidos lipídicos de las lipoproteínas, en especial lipoproteínas de baja densidad (*LDL, por sus siglas en inglés*). También es capaz de modular los niveles de EsOx, evitando la formación y propagación de la placa de ateroma y riesgo cardiovascular (Dardiotis et al., 2019).

La PON-1 también presenta efectos antioxidantes y cardioprotectores, pues estudios han reportado que disminuye el riesgo de ECV al reducir los niveles de EsOx, además de tener propiedades antiinflamatorias y antioxidantes atribuidos a las lipoproteínas de alta densidad (*HDL, por sus siglas en inglés*) (Bhattacharyya et al., 2008).

Se han realizado estudios en el modelo de pez cebra que han sugerido que la desregulación en la generación de ROS y la inducción de la muerte de los cardiomiocitos son mecanismos por los cuales algunos Xbs lesionan el miocardio provocando efectos cardiotóxicos e indicando afectaciones en parámetros cardiovasculares como los receptores β -adrenérgicos y de angiotensina (Maciag et al., 2022).

1.3. Sistema renina-angiotensina

El sistema renina-angiotensina (SRA) es un regulador de las funciones cardiovascular y renal (Soler et al., 2008), este controla la contracción del músculo cardíaco a través de péptidos vasoactivos (Hall & Hall, 2021), por lo que las alteraciones de este sistema desempeñan un papel fundamental en la fisiopatología de diversas enfermedades, en especial las ECV. El SRA involucra a la proteína precursora angiotensinógeno (Agt) que es secretada por el hígado hacia la sangre para posteriormente ser convertida en Angiotensina I (Ang-I) en el endotelio vascular y en el plasma; la Ang-I por sí sola no presenta actividad biológica, pero es precursora de otras angiotensinas. Para ello, la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA), también conocida como dipeptidil carboxipeptidasa tipo I (DCEP-1) cataliza la conversión de Ang-I a Angiotensina II (Ang-II), además de estar involucrada en inactivación de hormonas vasodilatadoras como la bradicinina (Ramalingam et al., 2017). La Ang-II, el péptido activo del SRA es conocida

que constituye un estímulo significativo para la generación y el aumento de los niveles de ROS (Farías et al., 2017). Está implicada en la regulación y activación de la NAD(P)H oxidasa, junto con citoquinas y factores de crecimiento.

1.3.1. Receptores de Angiotensina II tipo 1 y 2

La Ang-II, ejerce sus acciones a través de los receptores de Ang-II tipo 1 (AT1R) y Ang-II tipo 2 (AT2R). Por una parte, la Ang-II mediante AT1R estimula la activación de la NAD(P)H oxidasa, esto debido a una mayor producción de anión superóxido que causa un desacople en la enzima Óxido Nítrico Sintasa Endotelial (eNOS). Este desacople provocará una menor producción de óxido nítrico (NO), que hace que los vasos sanguíneos se vasodilaten y no se vasoconstruyan, aumentando la presión arterial e induciendo la generación de ROS (Masi et al., 2019). Por otro lado, hay que mencionar que la Ang-II también ejerce sus acciones mediante los AT2R, que median acciones protectoras y anti-fibróticas como la liberación de NO y diferenciación celular además de contrarrestar los efectos proinflamatorios de AT1R (Fyhrquist & Saijonmaa, 2008), sin embargo, esto no se ha establecido claramente desde el punto de vista clínico.

Se ha sugerido que los receptores AT1R y AT2R tienen efectos opuestos. la estimulación de los receptores AT2 regulados positivamente puede contribuir significativamente a contrarrestar el efecto nocivo de los receptores AT1R (Lu et al., 2015).

A partir de estudios farmacológicos *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que la Ang-II puede participar como causa directa de ECV, independientemente de su efecto vasoconstrictor (Kim & Iwao, 2000). El aumento del EsOx, las ROS y la inflamación, desencadenan entre muchos efectos, la alteración del SRA, lo que promueve el desarrollo de ECV como trombosis, aterosclerosis, arritmias, hipertensión arterial, e incluso un proceso de reprogramación génica cardíaca (El-Nahhal & El-Nahhal, 2021) como mecanismo de protección al corazón estresado de una discapacidad funcional irreversible o de la muerte celular programada (Steven et al., 2019).

1.4. Reprogramación génica cardíaca

La reprogramación génica cardíaca es un proceso que consiste en el regreso al programa genético fetal y la suspensión del posnatal. Se conoce como una respuesta que presenta el corazón cuando está expuesto a estrés hemodinámico o metabólico,

donde genes posnatales se ven suprimidos, produciendo alteraciones en la fisiología y estructura del sistema cardiovascular que lo devuelven a un estado similar al fetal (van der Pol et al., 2020). Es por ello, que se ha sugerido que protege al corazón estresado de discapacidades funcionales irreversibles ya que las células participan en un proceso de preconditionamiento donde se protegen y retardan la muerte celular (Ferdinandy et al., 2007).

Aunque no se encuentran completamente definidos los factores que influyen en la reprogramación génica cardíaca, se conoce que entre estos se encuentran la activación neurohumoral, capaz de modificar el metabolismo y la proporción de proteínas que constituyen la sarcómera (Paradis et al., 2000). Como parte de la activación neurohumoral se encuentra el SRA que a través de la Ang-II y la activación del AT1R se produce la expresión de genes de la reprogramación génica fetal del miocardio (Kim & Iwao, 2000). Uno de los genes que cambia de la etapa adulta a la fetal en un estado patológico es el receptor activador de proliferación de peroxisomas alfa (*PPAR- α* , por sus siglas en inglés) involucrado en el metabolismo de los lípidos, el cual sufre una disminución durante este proceso (Rajabi et al., 2007).

1.4.1. Receptor activador de proliferación de peroxisomas alfa (PPAR- α)

El PPAR- α consta de ocho exones y cinco dominios principales. PPAR- α se activa mediante ligandos naturales, incluidos ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, fosfolípidos oxidados. Se expresa predominantemente en tejidos que requieren alta energía, como el músculo esquelético, el corazón y el hígado (Han et al., 2017). La activación de PPAR- α aumenta los niveles circulantes de colesterol HDL ateroprotector, reduce los niveles plasmáticos de triacilglicéridos y ejerce efectos beneficiosos sobre la inflamación, la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico (Kersten, 2014). Las condiciones de estrés patológico provocan cambios en la expresión de PPAR- α , que produce alteraciones en el flujo metabólico y el estado redox en el corazón, y a su vez alteraciones en la expresión génica de componentes del SRA, como AT1R, que puede conducir a modificaciones en la reprogramación génica a nivel cardíaco (Warren et al., 2017).

El proceso de reprogramación cardíaca, así como alteraciones en el SRA o de forma general a nivel cardiovascular, pueden afectar respuestas fisiológicas en los organismos (Hall & Hall, 2021), necesarias para mantener la homeostasis de los individuos.

1.5. Respuestas fisiológicas

Las respuestas fisiológicas son reacciones que se producen en el organismo ante estímulos estresores que interrumpen la homeostasis (Prasanna et al., 2020). Estas pueden ser adaptativas, para hacer frente a cambios presentados por desafíos ambientales. Sin embargo, si la exposición a un estresor se vuelve repetitiva o prolongada, la respuesta al estrés puede convertirse en perjudicial para la fisiología (Chu et al., 2022). La contaminación por plaguicidas de diferentes clases como organoclorados, organofosforados y carbamatos pueden desencadenar respuestas fisiológicas como la variación del consumo de oxígeno (VO_2), la excreción nitrogenada en peces y su cantidad de agua corporal (Prasanna et al., 2020).

1.5.1. Consumo de oxígeno

El VO_2 en animales acuáticos es un proceso fisiológico muy sensible, pues la alteración de su actividad respiratoria, cardíaca y renal se considera un indicador de estrés cuando se encuentran expuestos a sustancias tóxicas, en particular plaguicidas (Kann et al., 2022).

El VO_2 refleja la cantidad de oxígeno utilizado por los tejidos de un organismo y depende de la capacidad del corazón y los tejidos para extraer el mismo (Dunn et al., 2016). Los cambios en este parámetro se emplean ampliamente en fisiología como indicador biológico del estado de salud, ya que integra la actividad metabólica general de un organismo en respuesta a factores ambientales de estrés. El VO_2 se determina a partir del oxígeno disuelto (OD) en agua.

1.5.2. Excreción nitrogenada

La excreción nitrogenada es considerada un indicador biológico de cambios fisiológicos en los organismos acuáticos, y recientemente se ha implicado al EsOx en la variación de dicho parámetro, lo que es indicativo de alteraciones metabólicas (Ip & Chew, 2018).

La excreción de nitrógeno en peces es un proceso producido a partir del catabolismo de compuestos proteicos y ácidos nucleicos. En el pez cebra, al igual que otros peces teleósteos estos residuos nitrogenados son excretados en forma de amoníaco (NH_3) como principal desecho (Ip & Chew, 2018). El NH_3 circula a través del plasma y se excretan principalmente por las branquias para evitar su acumulación (Bucking, 2017).

1.5.3. Porcentaje de agua corporal

La cantidad de agua corporal es un indicativo del estado de salud de un animal, y puede verse modificada por exposición a contaminantes. Constituye el componente corporal con mayor por ciento en el peso total y composición de un organismo (Tzamaloukas et al., 2003). El agua corporal es esencial en todos los sistemas y funciones del cuerpo, debido a que es un componente básico de las células que permite su supervivencia y participar en procesos metabólicos y de transporte de proteínas (Verbalis, 2003). Variaciones en el porcentaje de agua corporal puede afectar aspectos de su biología, ya que influye en su apetito y el crecimiento (Breck, 2014).

1.6. Antecedentes

En los últimos años ha aumentado la evidencia de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que indican que tanto el glifosato como el CPF pueden alterar la función endocrina normal, con efectos sobre el desarrollo reproductivo y el sistema cardiovascular.

Se ha observado que el CPF provoca EsOx en diferentes tejidos como hígado, riñón y corazón al aumentar significativamente los niveles de malondialdehído (MDA) y actividad de la catalasa (CAT), y disminuir de forma significativa los niveles de superóxido dismutasa (SOD) (Alipanah et al., 2022).

De igual manera, el EsOx inducido por glifosato en tejido hepático se evidenció por aumento de los niveles de MDA, peróxido de hidrógeno, con una disminución significativa de los niveles enzimáticos de SOD y CAT (Soudani et al., 2019).

El EsOx y las ROS pueden conducir al daño cardiovascular y lesión celular, pues se conoce que son capaces de modular la expresión y función del AT1R, el cual participa en la homeostasis de la presión arterial, la conservación de líquidos y electrolitos corporales y su implicación en enfermedades como aterosclerosis e hipertensión (Nickenig et al., 2000). Por otro lado, este EsOx puede ser reducido por la estimulación del AT2R, a partir de la inhibición la activación de la NAD(P)H oxidasa y equilibrio de la producción de superóxido, de ahí que se ha reportado que la expresión y funciones de AT2R aumentan en condiciones patológicas en la vasculatura, diabetes (tanto en humanos como en animales) e insuficiencia cardíaca, por citar algunas (Lu et al., 2015).

Entre las moléculas antioxidantes encargadas de mantener a las especies reactivas en niveles aceptables para proteger las células contra el daño oxidante y prevenir el desarrollo de ECV se encuentran GST, GGT y PON-1.

La GGT es una enzima que se ha asociado con factores de riesgo cardiovascular, síndrome metabólico y resistencia a la insulina. Su actividad elevada es un marcador de insuficiencia de antioxidantes, aumento del EsOx y estado inflamatorio. En varios estudios epidemiológicos se ha podido asociar que los niveles elevados de GGT con ECV, tanto en mujeres como en hombres (Ndrepepa et al., 2018). Un ejemplo, fue un estudio realizado por *British Regional Heart Study* en 7 613 hombres durante 11.5 años, donde se pudo asociar los altos niveles de GGT con enfermedad coronaria isquémica (OR: 2.03, 95% IC: 1.70–2.41; $p < 0.001$) (Sheikh et al., 2017). De igual forma se ha correlacionado positivamente con la exposición a plaguicidas organofosforados, donde su aumento se relacionó con un daño de la función hepática en un estudio transversal de una población indonesia (Desimal et al., 2013).

La alteración en la actividad de la enzima GST también se ha relacionado con daño cardiovascular. Tal es el caso de un estudio realizado en 133 pacientes que presentaban enfermedad de arteria coronaria, la cual se asoció a un aumento en la actividad enzimática de GST en sangre, con respecto a pacientes sanos. Este aumento en los niveles enzimáticos de GST, los autores plantean que puede deberse a un mecanismo protector frente al EsOx reflejado en el aumento de MDA (Pahwa et al., 2017). Además, se ha planteado que su actividad hepática también puede verse alterada por plaguicidas organofosforados como el CPF, metilparatió y diazinón, al ser una enzima que participa en la detoxificación de dichos compuestos, tal como reportaron Medina-Díaz et al., 2011 y Fujioka & Casida, 2007, en células HepG2 e hígado de ratones albinos Swiss-Webster, respectivamente.

Por otra parte, se conoce que el grupo de genes de las PON protegen contra la aterosclerosis y las enfermedades de las arterias coronarias, a través de sus características antioxidantes, antiinflamatorias y antitrombóticas (Kotur-Stevuljević et al., 2019). En un estudio, se emplearon ratones transgénicos C57BL/6J que portaban los genes *PON1*, *PON2* y *PON3* de humanos, y se demostró que este grupo de genes los protegía de hipertrofia cardíaca inducida por Ang-II, ya que presentaron proporciones reducidas de peso del corazón/peso corporal y disminución del grosor de la pared del ventrículo izquierdo en comparación con los ratones control tipo salvaje (Pei et al., 2016). Además, en personas urémicas se ha reportado que existen asociaciones entre polimorfismos de una sola base en el gen *PON1* y el desarrollo de enfermedades como dislipemia y aterosclerosis, que proporciona argumentos para

considerar a *PON1* como diana terapéutica (Grzegorzewska et al., 2021). Estudios en conejos y ratones transgénicos han demostrado también que niveles bajos de PON-1 provocan una mayor susceptibilidad a la toxicidad de compuestos organofosforados como el diazinón, paraoxoón y CPF, provocando una menor detoxificación metabólica e incluso un mayor el porcentaje de inhibición de la enzima AChE (Costa et al., 2008). La Ang-II del SRA es un factor clave en la patología cardiovascular y que a su vez induce la reprogramación de genes del corazón (Aztatzi-Aguilar et al., 2015), que lleva consigo la supresión de genes postnatales como *PPAR- α* . La activación de *PPAR- α* inhibe la expresión de genes proinflamatorios en el endotelio vascular, y atenúa el desarrollo de la aterosclerosis (Hamblin et al., 2009). Un estudio realizado en ratones knockout para *PPAR- α* , exhibieron fibrosis cardiaca progresiva y miofibrillas anormales, además de que los estudios de histología mostraron un acortamiento en el ventrículo izquierdo en el músculo papilar. Esto sugirió que la pérdida del receptor está estrechamente relacionada con una disfunción y deterioro cardiaco (Campbell et al., 2002; Djouadi et al., 1998).

Uno de los modelos animales más establecidos para los estudios de regeneración de órganos y tejidos, en especial, el corazón debido a su capacidad de regenerar el miocardio después de haber sufrido una lesión es el pez cebra (Tahara et al., 2016).

1.6.1. Pez cebra como modelo toxicológico

El pez zebra (*Danio rerio*) es un organismo vertebrado utilizado en varias etapas (embrión, larva, adulto, células, tejidos y órganos) desde la década de 1960 para el estudio de múltiples efectos biológicos asociados a la exposición de Xb (Bambino & Chu, 2017).

Entre las ventajas que presenta este modelo, son sus costos considerablemente más bajos de mantenimiento y crianza, desarrollo y maduración en un tiempo más corto, obtención de gran cantidad de embriones tras la fertilización, alcanzan una madurez sexual alrededor de tres a cuatro meses, su longevidad es de cuatro años y presentan facilidad de exposición durante el desarrollo (Gonçalves et al., 2020). Además su genoma comparte 70 % de similitud con el genoma humano en sistemas como el digestivo, cardiovascular y nervioso (Haque & Ward, 2018). Se ha convertido en una herramienta valiosa en la investigación cardiovascular, pues, aunque existen diferencias aparentes en la anatomía del corazón entre el pez cebra y el humano, hay

similitudes fisiológicas como la velocidad del latido del corazón, un sistema circulatorio cerrado y la aorta dorsal es la principal arteria embrionaria que recorre todo el tronco, en la que comienza el flujo sanguíneo y la velocidad aumenta gradualmente en las etapas de la vida del pez (Maciag et al., 2022).

Es considerado un modelo de refinamiento que funciona de manera comparable a modelos de mamíferos pues la concordancia entre ambos grupos en la evaluación de sustancias químicas como metales, bencenos nitrados y plaguicidas es del 55 % al 100 % (Horzmann & Freeman, 2018).

Un estudio realizado en embriones de pez cebra (1 hpf) expuestos a glifosato reportó que este provocaba deformaciones en el corazón a concentraciones variables (0, 30, 60, 90 y 120 µg/mL), por lo que al analizar el alcance de la deformidad a concentraciones de 30 y 90 µg/mL, se observó que las áreas pericárdicas del pez cebra se agrandaron en comparación con el grupo control, y las frecuencias cardíacas se redujeron. La fluorescencia mostró que los corazones de pez cebra sufrieron dilatación ventricular y que la distancia entre el seno venoso cardíaco y el bulbo arterioso aumentó con concentraciones crecientes de glifosato (Lu et al., 2022). Otro estudio de exposición a glifosato en peces cebra adultos machos por 28 días a 700 µg/L mostró una disminución de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (Gpx) en hígado (Giommi et al., 2022).

Al igual, otro estudio donde fueron expuestos embriones de pez cebra (2 hpf) a 30, 100 y 300 µg/L de CPF, se obtuvo un aumento significativo de la apoptosis celular en el tejido cardíaco, especialmente en el grupo tratado con 300 µg/L de CPF en comparación con el grupo control. Además, se observaron cambios en la transcripción de genes cardiovasculares, como la disminución significativa de los niveles de ARNm de *Mef2c* que está relacionado con el desarrollo de los miocitos y del sistema vascular, y *Bmp4* involucrado en el desarrollo embrionario y hematopoyesis en el grupo tratado con 300 µg/L de CPF. Mientras que los niveles de ARNm de *JunB*, asociado al desarrollo de vasos sanguíneos y osteoblastos aumentaron significativamente a la misma concentración (Wang et al., 2019a). Los mismos autores realizaron otro estudio en peces cebra macho adultos por exposición a 21 días a las mismas concentraciones de CPF, y observaron disminución de la actividad de SOD en hígado e intestino a la mayor concentración, así como aumento en los niveles de MDA en intestino (Wang et al., 2019b).

Dichas investigaciones evidencian que estos plaguicidas causan lesiones morfológicas y funcionales en el corazón del pez cebra, así como EsOx en los organismos capaces de alterar su desarrollo.

Si bien esta evidencia reportada ha permitido conocer que el glifosato y CPF pueden ocasionar daños a la salud y en particular al corazón, no se enfocan en conocer si los daños que se producen a nivel cardiovascular podrían deberse a alteraciones en el SRA, tanto en modelos de roedores como de pez cebra. Además de que esta alteración del SRA podría afectar la respuesta cardiovascular, puede provocar en ratas alteraciones de procesos fisiológicos como el consumo y distribución de oxígeno (Cassis et al., 2002). Por lo que es posible que en el modelo de pez cebra se pudiera comprometer dicho parámetro junto con su excreción nitrogenada, osmorregulación, ritmo cardíaco, entrada y salida del agua unido al intercambio de gases que se asocia al movimiento opercular (El-Nahhal & El-Nahhal, 2021).

Por ello, en este proyecto se pretende estudiar si estas alteraciones en el SRA debido a un aumento del EsOx pueden sobrepasar la capacidad antioxidante del corazón y provocar ECV.

1.7. Justificación

El aumento demográfico a nivel mundial ha propiciado el desarrollo intensivo de la agricultura y prácticas agrícolas que requieren grandes cantidades de plaguicidas sintéticos, los cuales carecen de eficiente regulación y monitoreo. Este uso indiscriminado ha provocado daños medioambientales, además de efectos adversos a la salud humana como enfermedades hepáticas, neurológicas y reproductivas. México no se encuentra ajeno a dicha situación pues la agricultura es una actividad importante llevada a cabo en el país, por su aporte a la alimentación nacional y contribución a la economía. Es por ello, que el uso de plaguicidas, como el CPF y glifosato, se ha convertido en una problemática, pues se han relacionado con aumento del EsOx en los organismos, que podría contribuir al desarrollo de ECV que pueden transmitirse entre generaciones por la respuesta del SRA. Por lo anterior, resulta de interés evaluar si la exposición a los plaguicidas CPF y glifosato a concentraciones de referencia establecidas por la EPA y EFSA, las cuales se encargan del bienestar del medio ambiente y la seguridad alimentaria, respectivamente, pueden provocar efectos en el SRA y la capacidad antioxidante, empleando un modelo *in vivo* de pez cebra.

1.8. Hipótesis

La exposición a los plaguicidas clorpirifos y glifosato afectará el SRA y la capacidad antioxidante del pez cebra.

1.9. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición a los plaguicidas clorpirifos y glifosato en el pez cebra sobre el SRA y la capacidad antioxidante.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la exposición a glifosato y clorpirifos sobre respuestas fisiológicas del pez: consumo de oxígeno, excreción nitrogenada y porcentaje de agua corporal.
2. Determinar si la exposición a glifosato y clorpirifos provoca cambios en la respuesta antioxidante del pez cebra, a partir de la evaluación de los biomarcadores PON-1, GST, GGT, MDA y POAPs a nivel hepático.
3. Evaluar el efecto de la exposición a glifosato y clorpirifos sobre componentes del SRA, específicamente los niveles de proteínas de AT1R y AT2R en corazón.
4. Determinar si la exposición a glifosato y clorpirifos induce reprogramación génica cardíaca en el pez cebra, a partir de la evaluación de los niveles proteicos de PPAR- α .

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Se emplearon formulaciones comerciales líquidas de clorpirifos (Foley, concentrado emulsionable, 44.85% de pureza) y glifosato (Faena, concentrado emulsionable, 35.6% de pureza) para la exposición, obtenidos de Mercado Libre, México. Además, se emplearon formulaciones químicas de grado técnico de CPF (Chem Service, CAS: 2921-88-2, Pensilvania, USA) y glifosato (Sigma Aldrich, CAS: 2439-99-8, No. Cat. 15149, Massachusetts, USA). Para la construcción de la curva estándar para la determinación de amoníaco se utilizó una solución de hidróxido de amonio (Sigma-Aldrich, CAS: 1336-21-6, 28% NH₃ in H₂O). El ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, No. 200-714-4), yoduro de acetilcolina (CAS-No:1866-15-5), el paraoxón (CAS-No: 311-45-5) y Triton X-100 (CAS: 9002-93-1) se obtuvieron de Sigma Aldrich. Los anticuerpos empleados (ver tabla 2) se obtuvieron en Santa Cruz Biotechnology (USA), al igual que el Tween-20.

2.2. Estrategia Experimental

En el presente estudio se realizó una exposición subaguda (5 días) a dosis repetidas *in vivo* a los plaguicidas clorpirifos y glifosato (presentación comercial y grado técnico) en un modelo de pez cebra adulto (tres a cinco meses de edad), que incluyó peces hembras (Figura 1). Todos los procedimientos fueron aprobados en el protocolo experimental número 0365-23 por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV.

Los plaguicidas fueron disueltos en la columna de agua y se emplearon concentraciones de referencia agudas y crónicas establecidas por la EPA y EFSA, a las cuales una población de organismos puede estar expuesta y no causarán efectos nocivos durante un ciclo de vida (EPA, 2023). Se tuvieron nueve grupos de exposición con 10 peces cada uno. Los grupos fueron: grupo control (no expuesto a los plaguicidas), dos grupos expuestos a la dosis de referencia aguda establecida por la EFSA para el CPF y GF (5 µg/L y 500 µg/L), respectivamente (EFSA, 2019; EFSA, 2015), dos grupos expuestos a las dosis de referencia crónica establecidas por la EPA para el CPF y GF (0.3 µg/L y 1000 µg/L), respectivamente (Smegal, 1999; Perron et al., 2017) y cuatro grupos co-expuestos a ambos plaguicidas (5 µg/L de CPF con 500 µg/L de GF, 0.3 µg/L de CPF con 1000 µg/L de GF, 0.3 µg/L de CPF con 500 µg/L de

GF y 5 µg/L de CPF con 1000 µg/L de GF). Al término de la exposición, se realizó un aislamiento parcial donde seis peces de cada grupo fueron colocados en cámaras independientes para determinar el MO₂ y la excreción nitrogenada mediante oximetría y el método de indofenol (colorimétrico), respectivamente. Al término de este experimento los peces se llevaron a eutanasia, para ser disectados y obtener corazón, hígado y ojos, los cuales se emplearán para determinar los niveles de las proteínas AT1R, AT2R y PPAR-α por WB. Los otros cuatro peces se llevaron a eutanasia directamente después de la exposición sin realizar el aislamiento parcial ni la disección, sino que se envolvieron en papel aluminio para ser colocados en un horno y poder determinar a partir del peso seco, la cantidad de agua corporal del pez. La eutanasia se realizó a partir de la inmersión de los peces en agua fría (2-4 °C) durante al menos 20 minutos, hasta el cese del movimiento opercular para la disección de los tejidos de interés (ojos, hígado y corazón) y su preservación a -80 ° C.

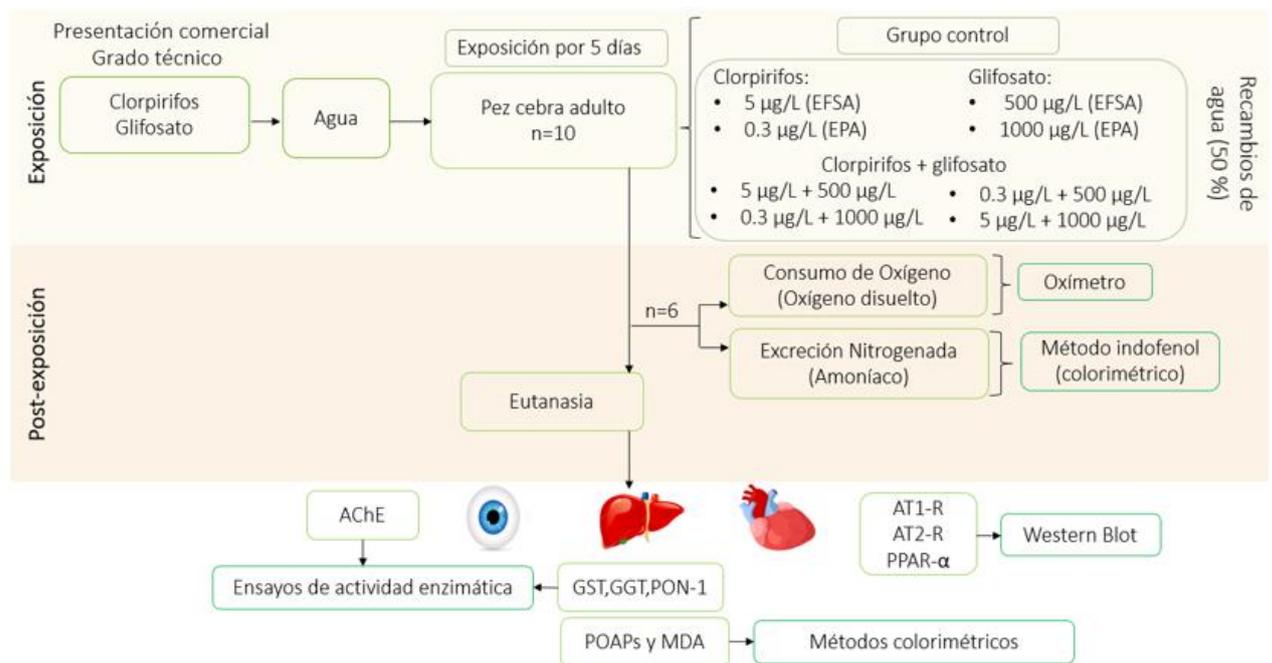


Figura 1. Estrategia experimental llevada a cabo para la exposición del pez cebra a los plaguicidas en la columna de agua.

2.2.1. Condiciones experimentales

Los peces durante la exposición fueron mantenidos en grupos de 10, en acuarios sin flujos con oxigenación y recambios de agua cada dos días del 50 %. La alimentación se realizó de 2 a 3 veces al día, siendo la cantidad de alimento proporcionado el 4 % del peso corporal de cada pez. El ciclo de luz/oscuridad será de 14 h/10 h y una

temperatura ambiental constante de 28 °C. El pH del agua (7-8), los niveles de oxígeno (6-8 mg/L), amoníaco (0- 0.50 mg/L) y dureza de carbonatos (50 – 150 mg/L CaCO₃) fueron monitoreados durante toda la exposición (Avdesh et al., 2012).

2.3. Homogenización de los tejidos

Para la realización de los ensayos colorimétricos en ojo e hígado y western blot en corazón se realizó la homogenización de los tejidos. En el caso de ojo e hígado se empleó solución tampón fosfatos pH 7.4 con tres inhibidores de proteasa (EDTA, DTT y PMSF), para su homogenización con politrón en hielo y posterior centrifugación (12 000 x g durante 10 min a 4° C). En el caso de corazón se empleó la misma solución tampón con inhibidores además de agregar Triton X-100. La suspensión resultante se sonicó (1 min, 50 % amplitud) y se centrifugó a 8000 x g por 5 min. El sobrenadante se conservó en alícuotas a -20 °C hasta su uso.

2.4. Consumo de Oxígeno

2.4.1. Principio

El oxígeno disuelto (OD) en líquidos se obtiene a partir de un oxímetro y las muestras del medio que se va a analizar. Los valores son expresados en mg/L. El instrumento tiene un medidor y un sensor electroquímico, este último utiliza un electrodo polarizado, en una solución electrolítica, que se encuentra aislado de la muestra por una membrana delgada semipermeable. El OD se difunde a través de la membrana, se consume y al generarse dicha reacción se produce una corriente eléctrica directamente relacionada con la concentración de oxígeno (Wei et al., 2019).

2.4.2. Procedimiento

La determinación del VO₂ se realizó a partir de la concentración de OD en agua. Se empleó un sistema cerrado de 10 cámaras independientes que recibirán el flujo de agua desde una cisterna, este será regulado con válvulas y el curso de temporalidad será de dos horas, con toma de muestra cada 1 hora. Con las muestras tomadas se introdujo un medidor comercial de OD (DO 9100) en un frasco con 5 mL de la muestra. A partir de las mediciones realizadas se obtendrá la diferencia entre las mismas que permitirá conocer el VO₂ y su comportamiento en los peces en el transcurso del tiempo, empleando la ecuación 1.

$$VO_2 = OD_{inicial} - OD_{final} \quad \text{Ecuación 1}$$

2.5. Determinación de amoníaco

2.5.1. Principio

La cantidad de amoníaco en líquidos puede determinarse a partir de un kit de prueba de acuario, basado en el método de indofenol modificado. Este consiste en que el fenol al mezclarse con hipoclorita reacciona en presencia de amoníaco. La intensidad del color es proporcional a la cantidad total de amoníaco existente, formando un compuesto de color azul, que se leerá a una absorbancia de 670 nm (Verdouw et al., 1977).

2.5.2. Procedimiento

Para determinar la cantidad de amoníaco, se colocaron 250 μ L de la muestra en placas de 96 pozos. A cada pozo se le añadirán los reactivos del kit de prueba (1 μ L de cada reactivo) y se dejará reposar durante 45 minutos. Posteriormente se determinó la absorbancia a 670 nm empleando el lector de placas Infinite® 200 PRO (TECAN, Switzerland). A partir de una curva patrón de hidróxido de amonio se determinó la concentración de amoníaco en las muestras de interés, la cual seguirá el mismo procedimiento descrito para las muestras.

Las pruebas de consumo de oxígeno y excreción nitrogenada se realizaron primero en peces no expuestos, considerados sanos por un tiempo de 14 h (horario diurno donde se encuentran las luces del acuario encendidas). Esto para conocer el comportamiento basal de ambos parámetros y ver alteraciones después de la exposición, ya que no se encuentran reportes en la literatura.

2.6. Determinación del porcentaje de agua corporal

2.6.1. Principio

La determinación de la composición corporal de un organismo, especialmente el porcentaje de agua corporal se determina a partir de una cuantificación *in vivo*. Permite conocer las relaciones cuantitativas entre los componentes del organismo y los cambios que pueden producirse en los mismos causados por factores influyentes como la exposición a Xbs (González, 2013). Existen diferentes formas para determinar el porcentaje de agua corporal como por ejemplo por resonancia magnética y desecación en horno (Reinoso et al., 1997), siendo esta última la empleando en este trabajo.

2.6.2. Procedimiento

Se emplearon cuatro peces de cada grupo para determinar peso seco. Después de la eutanasia fueron envueltos en papeles de aluminio de forma independiente para determinar su peso (considerado peso húmedo) a partir de una balanza. Posteriormente se colocaron en el horno y se dejaron al menos siete días para volver a determinar nuevamente su peso (considerado peso seco). Este procedimiento se realizó hasta que se alcanzará un valor constante de peso seco, y así determinar la diferencia entre peso húmedo y peso seco, que se dividió entre el peso húmedo final de los peces y multiplicó por cien para obtener la cantidad de agua del pez en por ciento, como se muestra en la ecuación 2.

$$\text{Cantidad de } H_2O (\%) = \left(\frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso húmedo}} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

2.7. Ensayos de actividad enzimática

Los ensayos enzimáticos son protocolos experimentales estandarizados, que se establecen para medir la actividad o concentración de enzimas en sistemas bioquímicos o celulares. La mayoría de los ensayos enzimáticos se basan en la detección de señales de punto final fluorescentes, luminiscentes o espectrofotométricas (Sarfraz et al., 2022).

2.7.1.1. Acetilcolinesterasa (AChE)

2.7.1.1.1. Principio

El ensayo se basa en el método de Ellman (Ellman et al., 1961), donde se utiliza el sustrato alternativo acetilcolina y ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB). A partir de esta reacción se mide la actividad enzimática a partir del aumento del color amarillo producido por el desplazamiento de electrones hacia el átomo de azufre, dando como resultado la producción de 5-tio-2-nitrobenzoato (Pohanka et al., 2011).

2.7.1.1.2. Procedimiento

La actividad de la AChE se determinó por un método colorimétrico de actividad enzimática en placas de 96 pozos. En los pozos, se agregaron las muestras de ojo previamente homogeneizada, diluidas en una mezcla de reacción compuesta por (PBS 0.1 mM pH 8.0, Acetilcolina yodada 0-0.75 M, DTNB 0.01 M), a un volumen final de 250 μ L. Posteriormente se leyó la absorbancia empleando el lector de placas Infinite®

200 PRO (TECAN) a 412 nm por 10 min previa incubación y agitación. El ensayo se realizó por triplicado. La actividad de AChE se expresa de la siguiente manera:

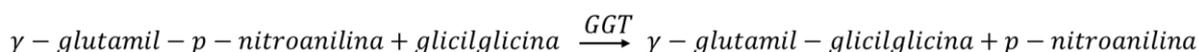
$$\text{Actividad AChE} = \frac{\text{Absorbancia}/\text{min}}{1.36 \cdot 10^4} = \frac{\text{mol}}{\text{L min}} \quad \text{Ecuación 3}$$

2.7.1.2. Gamma glutamil transferasa (GGT)

2.7.1.2.1. Principio

La γ -glutamil transferasa (GGT) es una enzima localizada en la membrana que juega un papel importante en el metabolismo del glutatión y en la reabsorción de los aminoácidos del filtrado glomerular y de la luz intestinal. Aunque la mayor actividad de la GGT se presenta en el tejido renal, la elevación de la GGT generalmente es un indicador de la enfermedad hepática (Whitfield, 2001).

La actividad de la γ -glutamil transferasa mediante un método cinético enzimático se basa en la reacción donde la γ -glutamil transferasa cataliza la transferencia de un grupo gamma-glutamil desde el sustrato incoloro gamma-glutamil-p nitroanilina, al aceptor, glicilglicina, y genera un producto coloreado, la p-nitroanilina (UNAM, 2009). como se muestra a continuación:



2.7.1.2.2. Procedimiento

Para la determinación de GGT se realizó un método colorimétrico de actividad enzimática en placas de 96 pozos. En el mismo, se agregaron las muestras de hígado previamente homogeneizada, diluidas en una mezcla de reacción compuesta por (Buffer Tris-gly/gly pH 8.2 y L- γ -glutamil-p-nitroanilida 10mM) a un volumen final de 200 μ L. Posteriormente se leyó la absorbancia empleando el lector de placas Infinite® 200 PRO (TECAN, Switzerland) a 405 nm por 12 min previa incubación y agitación. El ensayo se realizó por triplicado. A continuación, se presenta la ecuación empleada para determinar la actividad de GGT (ecuación 4).

$$\text{Actividad GGT} = \frac{\frac{\text{Absorbancia}}{\text{min}} * 1190}{\text{mg proteína}} = \frac{\text{mmol}/\text{min}}{\text{mg proteína}} \quad \text{Ecuación 4}$$

2.7.1.3. Glutación S-transferasa (GST)

2.7.1.3.1. Principio

La enzima glutación S-transferasa (GST) cataliza el ataque nucleofílico del átomo de azufre del glutación (GSH) sobre los grupos electrofílicos del sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB), como se muestra en la reacción siguiente. La actividad de la GST se cuantifica espectrofotométricamente a $\lambda = 340$ nm por medio del complejo formado por el glutación y el sustrato (GS-DNB) (Habig et al., 1974).



2.7.1.3.2. Procedimiento

Se realizó un método colorimétrico de actividad enzimática para la determinación de GST en placas de 96 pozos. En el mismo, se agregaron las muestras de hígado previamente homogeneizada, diluidas en una mezcla de reacción compuesta por (PBS 100 mM, GSH 10 mM y DCNB 60 Mm) a un volumen final de 235 μ L. Posteriormente se leyó la absorbancia empleando el lector de placas Infinite® 200 PRO (TECAN, Switzerland) a 340 nm por 10 min previa incubación y agitación. El ensayo se realizó por triplicado y la actividad de la enzima se determinó por la ecuación 5 donde Δ Abs/min es la pendiente de la absorbancia detectada en un minuto, ϵ es el coeficiente de extinción molar de la reacción GS-DNB ($9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), b es el espesor del pozo (1 cm), volumen del pozo es de 250 μ L.

$$\text{Actividad GST} = \frac{(\text{Abs/min}) * (\text{Vol pozo/Vol muestra})}{\epsilon * \text{mg proteína}} = \text{mmol/min} / \text{mg proteína} \quad \text{Ecuación 5}$$

2.7.1.4. Paraoxonasa 1 (PON-1)

2.7.1.4.1. Principio

La PON-1 es una esterasa dependiente de calcio, que se le han conferido propiedades antioxidantes sobre las HDL por disminuir la acumulación de los productos de lipoperoxidación. Es capaz de hidrolizar cierto número de sustratos, como paraoxón, peróxidos lipídicos colesteril éster hidroperóxido y H_2O_2 , que son productos de reacción de algunas sustancias como los plaguicidas (Garelnabi & Younis, 2015).

2.7.1.4.2. Procedimiento

La actividad de la PON-1 se determinó por un método colorimétrico de actividad enzimática en placas de 96 pozos tanto para las muestras de ojo como para las muestras de hígado. En los pozos, se agregaron las muestras de hígado previamente homogeneizada, diluidas en una mezcla de reacción compuesta por (Paraoxon 2.5 mM y Trizma Pre-Set HCl pH 8.5 90 mM) a un volumen final de 245 μ L. Posteriormente se leyó la absorbancia empleando el lector de placas Infinite® 200 PRO (TECAN) a 405 nm por 10 min previa incubación y agitación. El ensayo se realizó por triplicado. La actividad de PON-1 se expresa de la siguiente manera (ecuación 6):

$$\text{Actividad PON1} = \frac{\Delta(1 \times 10^6)}{18053} = \frac{\text{nmol/mL}}{\text{min de formación de } p\text{-nitrofenol}} \quad \text{Ecuación 6}$$

2.8. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

2.8.1. Principio

La cuantificación de proteínas por el método de Bradford se basa en el principio de que la unión no covalente de una molécula colorante, azul de coomassie, a las proteínas en medio ácido da como resultado un cambio en el espectro de absorción del tinte. Cuando el tinte se une a la proteína, su máximo de absorción cambia de 465 nm a 595 nm, lo que resulta en un cambio de color de marrón a azul. La cantidad de proteína en una muestra se determina midiendo la absorbancia de la solución de color azul a 595 nm y comparándola con una curva estándar generada utilizando concentraciones conocidas de proteína (Kielkopf et al., 2020). El azul de coomassie G-250 presenta diferentes espectros de absorción según su estado de protonación: la forma catiónica es de color rojo amarronado (máximo de absorción a 470 nm), la neutra es verde (máximo a 650 nm) y la aniónica es azul (máximo a 595 nm) (Bradford, 1976).

2.8.2. Procedimiento

Para la cuantificación de proteínas se construyó una curva de calibración de concentración de la dilución de una solución de albumina bovina sérica (BSA) de 1 mg/mL con agua Milli-Q. En una placa de 96 pozos se agregó la curva estándar y las muestras diluidas (1:60). Se añadió después el reactivo de Bradford (dilución 1:4) y se incubó por 15 minutos en oscuridad para leer la absorbancia a 595 nm en el lector de placas Infinite® 200 PRO (TECAN, Switzerland). Los resultados obtenidos se procesaron en Microsoft Excel para determinar la concentración de proteínas totales

en las muestras, teniendo en cuenta el factor de dilución. El ensayo se realizó por triplicado. Los datos se expresaron en μg de proteína/mL.

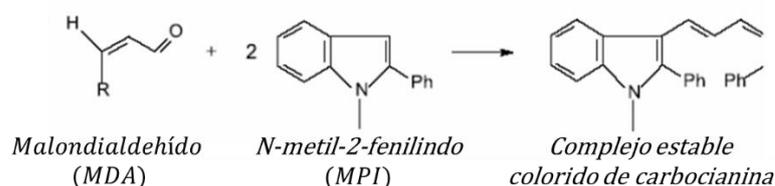
2.9. Ensayos de estrés oxidante

Los ensayos de EsOx son un enfoque alternativo, que ha permitido evaluar de forma indirecta a ROS en muestras clínicas. Esto se realiza mediante pruebas de daño oxidante que demuestran lo que radicales peroxilo y peróxido de hidrógeno causan a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en las células (Katerji et al., 2019).

2.9.1.1. Malondialdehído (MDA)

2.9.1.1.1. Principio

La peroxidación lipídica genera una variedad compleja de productos, muchos de los cuales son reactivos electrófilos. El MDA es considerado un biomarcador para la peroxidación de lípidos ya que puede indicar el daño de las membranas celulares mediado por ROS y estimar las condiciones de EsOx. Su principio se basa en la técnica de (Esterbauer et al., 1991), la cual está basada en la reacción de un reactivo cromógeno, N-metil-2-fenilindo (MPI), con el malondialdehído (MDA) a 45 °C. Una molécula de MDA reacciona con 2 moléculas de MPI para producir un complejo estable de carbocianina colorido como se muestra en la siguiente reacción. Los niveles de MDA se cuantifican a una longitud de onda de 586-595 nm.



2.9.1.1.2. Procedimiento

Para la determinación de los niveles de MDA se realizó una curva patrón a partir de MDA 1,1,3,3- tetrametoxipropano 10 mM. En tubos eppendorf fueron agregados 25 μL del homogeneizado y 25 μL de agua destilada. Posteriormente, tanto a las muestras como a la curva estándar se les añadió el MPI 10mM y HCl al 37 % en oscuridad para un volumen final de 275 μL , y se agitó inmediatamente. Después se dejaron incubando los tubos por 40 min a 45 °C, para posteriormente centrifugar a 9000 rpm 15 min, y tomar 200 μL y colocar en cada pozo de la microplaca, para leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 586-595 nm.

2.9.1.2. Productos proteicos de oxidación avanzada (POAPs)

2.9.1.2.1. Principio

Los productos proteicos de oxidación avanzada (POAPs) también se generan mediante la reacción de proteínas plasmáticas con oxidantes clorados como las cloraminas. Es un marcador importante de estrés oxidativo, directamente relacionado con los productos finales de glicación avanzada, y mediadores también de inflamación y activación de células monocíticas. En este método, la muestra de los pacientes, calibrado con cloramina-T, se mezcla con yoduro de potasio y ácido acético para leer su absorbancia espectrofotométricamente a 340 nm (Witko-Sarsat et al., 1996).

2.9.1.2.2. Procedimiento

Se realizó una curva estándar a partir de cloramina T 100 μ M, para la determinación de los POAPS. En los pozos de la microplaca se agregaron 10 μ L de la muestra de homogeneizado de hígado y 190 μ L de PBS. Posteriormente tanto a las muestras como a la curva estándar se le añadió yoduro de potasio, ácido acético concentrado, y se agitó por 2 minutos, se dejó reposar la placa por 10 minutos a temperatura ambiente para leer en el espectrofotómetro a 340 nm.

2.10. Western Blot

2.10.1. Principio

El Western blot es una técnica semicuantitativa de laboratorio empleada para detectar proteínas y modificaciones postraduccionales en estas, sobre un soporte sólido de membrana de nitrocelulosa o de cloruro de polivinilideno (PVDF) (Mishra et al., 2017). Implica tres pasos principales como la separación de proteínas en función del peso molecular, la transferencia de proteínas separadas a la membrana y la detección de la proteína diana con la ayuda de anticuerpos. Los anticuerpos se unirán a la proteína de interés, por lo que se verá una sola banda, en la que su grosor corresponderá a la cantidad de proteína presente (Begum et al., 2022). A partir de programas de cómputo como ImageJ se calcula la densidad de la proteína de interés y esto permite determinar cambios relativos en los niveles de proteínas entre las muestras.

2.10.2. Procedimiento

Se cuantificaron las muestras por el método de Bradford y partir de este se tomó un volumen equivalente de 30 µg de cada muestra y se ajustó el volumen con solución tampón de y se les agregó buffer de carga (6 µL de loading buffer), se dejaron reposar a temperatura ambiente o desnaturalizadas a 95° C durante 5 min. Las muestras se cargaron en geles de 12 %. Los geles se corrieron a temperatura ambiente a voltaje constante (80 V) aproximadamente durante 3 h.

Finalizada la electroforesis de las muestras en el gel de acrilamida, se transfirieron a una membrana de PVDF, activada en metanol, a un amperaje constante de 250 mA durante 2 h.

Se corroboró el proceso de transferencia empleando el marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Dual Color Standards así como la tinción con rojo de Ponceau S. La membrana se lavó con PBS 1X y se bloqueó con una solución leche descremada al 5 % durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se colocó el anticuerpo primario (**tabla 1**) durante toda la noche a 4° C (dilución 1:500). Las membranas se lavaron tres veces durante 5 min con PBS 1x – Tween 0.1%, para después incubarse con el anticuerpo secundario conjugado (**tabla 1**) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas fueron nuevamente lavadas dos veces durante 5 min, para revelarlas mediante el Ultra Violet Product (UVP) y la identificación de las proteínas blanco se hizo con relación al marcador de peso molecular de proteínas de detección quimioluminiscente. Se determinó como control de carga de la cantidad de proteína la inmunodetección de β- actina. Se empleó el programa ImageJ 1.37v. para obtener las densitometrías de las bandas y se reportaron los datos como unidades relativas.

Tabla 1. Lista de anticuerpos comerciales empleados en la evaluación de los marcadores cardiotóxicos por Western Blot.

Anticuerpo	No. catálogo	Dilución	Casa Comercial
Anti-AT1R	Sc-579	1:500	Santa Cruz
Anti-AT2R	Sc-9040	1:500	Santa Cruz
Anti-PPAR- α	Sc-9000	1:500	Santa Cruz
Anti-actina	Sc-1616	1:500	Santa Cruz
Secundario Cabra anti-conejo IgG (H+L)-HRP conjugado	5196-2405	1:10 000	BioRad
Secundario Conejo anti-cabra IgG (H+L)-HRP conjugado	172-1034	1:5000	Santa Cruz

2.11. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 8.0.1, 2018). Se empleó el análisis no paramétrico de Kruskal- Wallis con prueba post-hoc de Dunn para los resultados obtenidos de las pruebas fisiológicas del EsOx, y se expresaron los resultados como mediana y rango. Los análisis de la evaluación de los marcadores cardiotóxicos se realizó un análisis de Kruskal-Wallis con prueba post-hoc de U-Mann Whitney. Los valores de los gráficos descriptivos se expresaron en promedios \pm desviación estándar. Todos los experimentos se realizaron por duplicado (respuestas fisiológicas) y triplicado (marcadores de EsOx) para un tamaño de muestra de 10 (n=10) por grupo.

3. Resultados

A continuación, se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto. Primero se describen los resultados relacionados con las respuestas fisiológicas de los peces expuestos a los plaguicidas. Posteriormente los marcadores de EsOx evaluados, así como las enzimas con capacidad antioxidante. Por último, se reportan los efectos asociados a la exposición sobre los blancos cardiovasculares estudiados, del SRA (AT1R y AT2R) y de la reprogramación génica cardíaca (PPAR- α).

3.1. Consumo de oxígeno y excreción nitrogenada basal

El consumo de oxígeno y la excreción nitrogenada basal se determinaron durante 14 h (tiempo en que las luces del acuario se encuentran encendidas). Los valores fueron corregidos por el tiempo (minutos) y el peso húmedo (gramos). Es importante mencionar que, durante este experimento, a los peces se les priva de alimento. En la **figura 2** se muestra dichos parámetros, donde se puede observar un pico de consumo de oxígeno en el primer tiempo, donde se encienden las luces del acuario, con un segundo pico de consumo a las 12:40 pm del mediodía, el cual va disminuyendo en las horas de la tarde, hasta el momento que se apagan las luces el acuario (19:00 PM). Por otra parte, la excreción de amoníaco presentó un pico máximo a las 10:00 am, seguido del punto máximo de excreción, el cual desciende hasta las 16:35 pm que vuelve a presentar un pico de excreción, sin embargo, no tan alto como en el horario de la mañana. Se debe mencionar que el horario de las 12:40 pm se consideró el más estable entre ambos parámetros, por lo que se considerará entre las 11:20 am y 14:40 pm para realizar las tomas de muestras correspondientes para los animales expuestos, considerando que en este horario ambos puntos coinciden.

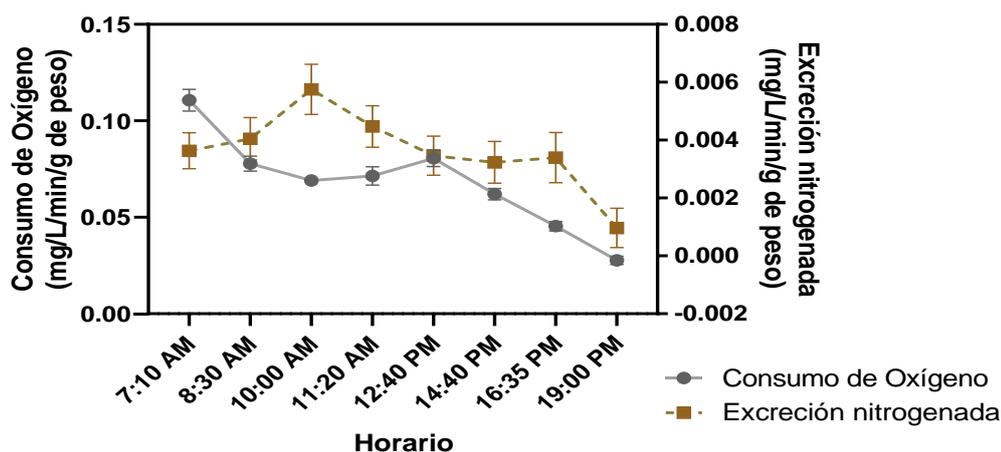


Figura 2. Parámetros fisiológicos basales. Consumo de oxígeno basal y excreción nitrogenada basal, durante 14 h en animales no expuestos. Los datos representan la media \pm desviación estándar (n=16).

3.2. Parámetros del agua de exposición

Se realizaron monitoreos del agua de exposición durante los días de recambios antes y después del mismo, el primer y último día de exposición (50 % del agua). A continuación, se muestran las tablas de los parámetros medidos tanto para la exposición de grado técnico (**Tabla 2**) como de presentación comercial (**Tabla 3**).

Tabla 2. Parámetros del agua de exposición a plaguicidas de grado técnico durante el primer día, primer recambio, segundo recambio y último día. Valores expresados en mediana y rango.

Grupos	Nivel de Oxígeno (mg/L)	Nivel de Amoníaco (mg/L)	Temperatura (°C)	Dureza de carbonatos (mg/L CaCO ₃)	pH
Control	5.5 (5.3 - 6)	0.25 (0.07 - 2.67)	28 (27 - 29)	45 (30 - 50)	6.5 (6.5-7)
CPF (0.3 µg/L)	4.12 (3.95 - 4.95)	0.80 (0.14- 2.16)	28 (28 - 29)	40 (30 - 50)	6.5 (6-7)
CPF (5 µg/L)	4.22 (3.55 - 4.8)	1.06 (0.33 - 2.29)	27 (26 - 29)	45 (30 - 50)	6.5 (6-7)
GF (500 µg/L)	4.2 (4.2 - 5.4)	1.40 (0.63 - 2.76)	28 (26 - 29)	40 (30 - 60)	7 (6-7.5)
GF (1000 µg/L)	4.15 (3.95 -5.5)	1.38 (0.06 - 2.62)	28 (27 - 28)	40 (30 - 50)	7 (6.5-7.5)
CPF-GF (5 + 500 µg/L)	4.87 (3.7 - 5.2)	0.63 (0.26 - 1.77)	28 (26 - 28)	40 (30 - 50)	6.75 (6.5-7)
CPF-GF (0.3 + 1000 µg/L)	4.45 (3.5 - 4.5)	0.67 (0.02 - 2.61)	28 (28 - 29)	35 (30 - 40)	6.75 (6.5-7)
CPF-GF (0.3 + 500 µg/L)	4.1 (3.9-4.35)	1.43 (0.12-1.94)	28 (28 - 29)	35 (30-50)	6.75 (6.5-7)
CPF-GF (5 + 1000 µg/L)	4 (3.9-4.1)	1.22 (0.46-1.79)	27.5 (26 - 28)	35 (30-50)	6.75 (6.5-7)

Tabla 3. Parámetros del agua de exposición a plaguicidas de presentación comercial durante el primer día, primer recambio, segundo recambio y último día. Valores expresados en mediana y rango.

Grupos	Nivel de Oxígeno (mg/L)	Nivel de Amoníaco (mg/L)	Temperatura (°C)	Dureza de carbonatos (mg/L CaCO ₃)	pH
Control	6.70 (5.75 - 7.15)	0.58 (0.5 - 0.66)	28 (26 - 28)	50 (40 - 50)	7
CPF (0.3 µg/L)	5.95 (5.05 - 6)	0.69 (0.59 - 0.80)	28 (26 - 28)	50 (40 - 50)	7
CPF (5 µg/L)	6.10 (5.55 - 6.35)	0.57 (0.47 - 0.68)	28 (26 - 28)	50 (40 - 50)	7
GF (500 µg/L)	5.17 (4.65 - 6.45)	0.54 (0.12 - 0.81)	29 (26 - 28)	40 (40 - 50)	7
GF (1000 µg/L)	5.10 (4.65 - 6.05)	0.30 (0.12 - 0.76)	27 (26 - 28)	40 (40 - 50)	7
CPF-GF (5 µg/L + 500 µg/L)	4.8 (4.45 - 4.85)	0.55 (0.20 - 1.38)	27 (26 - 28)	40 (40 - 60)	7
CPF-GF (0.3 µg/L + 1000 µg/L)	4.85 (4.3 - 5.25)	0.20 (0.20 - 1.32)	28 (27 - 28)	45 (40 - 60)	7
CPF-GF (0.3 µg/L + 500 µg/L)	5.12 (4.95-5.45)	0.30 (0.07-1.06)	27.5 (26-29)	30 (30 - 40)	7
CPF-GF (5 µg/L + 1000 µg/L)	5.02 (4.85-5)	0.34 (0.05-1.10)	28 (27-29)	35 (30 - 40)	7

3.3. Efectos de la exposición a plaguicidas de grado técnico y presentación comercial en el consumo de oxígeno de *Danio rerio*.

El consumo de oxígeno se determinó al día siguiente de haber terminado la exposición (sexto día), a partir de la cantidad de OD en el agua durante dos horas (11:20 AM a 14:40 PM, horario considerado más estable mencionado anteriormente). Este valor fue corregido por el tiempo (minutos) entre la toma inicial y final y el peso húmedo (gramos) de los peces. La **Figura 3** y **Figura 4** muestran el consumo de oxígeno de los peces expuestos al grado técnico y la presentación comercial de los plaguicidas, respectivamente, en comparación con el grupo control.

Para el grado técnico de los plaguicidas (**Figura 3**), se observó una tendencia a un mayor consumo para los grupos expuestos a los plaguicidas de forma individual, siendo solamente significativo para la concentración mayor de GF (1000 µg/L: $p=0.003$) con respecto al control. Además, se observó una disminución del consumo para los grupos co-expuestos a ambos plaguicidas, que fue estadísticamente significativa para las combinaciones aleatorias de los plaguicidas, 5 µg/L de CPF con 500 µg/L de GF: $p=0.0366$ y 0.3 µg/L de CPF con 1000 µg/L de GF: $p=0.0042$ y para la combinación de ambas concentraciones altas, 5 µg/L de CPF con 1000 µg/L de GF, $p=0.0315$.

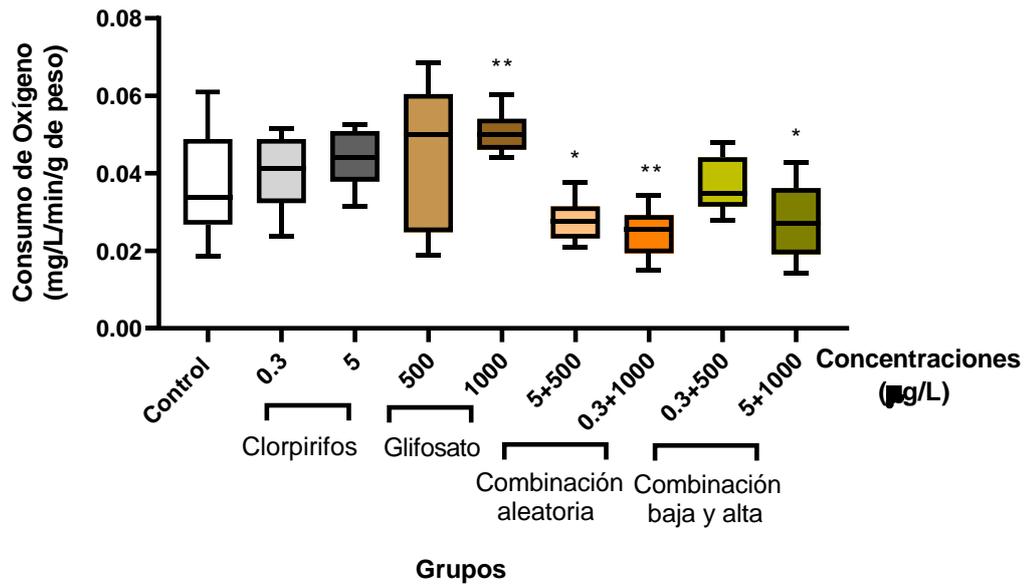


Figura 3. Consumo de oxígeno de peces expuestos a los plaguicidas grado técnico. Se realizaron los experimentos por duplicado. Los datos representan la mediana y rango (n=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

Por otra parte, para la presentación comercial del CPF y GF (**Figura 4**) se observó un aumento significativo del consumo de oxígeno para los dos grupos expuestos a GF de 500 y 1000 µg/L ($p = 0.0036$ y $p = 0.0002$, respectivamente) y a el grupo expuesto a CPF a la concentración más alta de 5 µg/L: $p = 0.001$ con respecto al control. Además, se observó una disminución del consumo para los grupos co-expuestos a ambos plaguicidas, que fue estadísticamente significativa para las combinaciones aleatorias de los plaguicidas 5 µg/L de CPF con 500 µg/L de GF ($p = 0.0283$) y 0.3 µg/L de CPF con 1000 µg/L de GF ($p = 0.0138$).

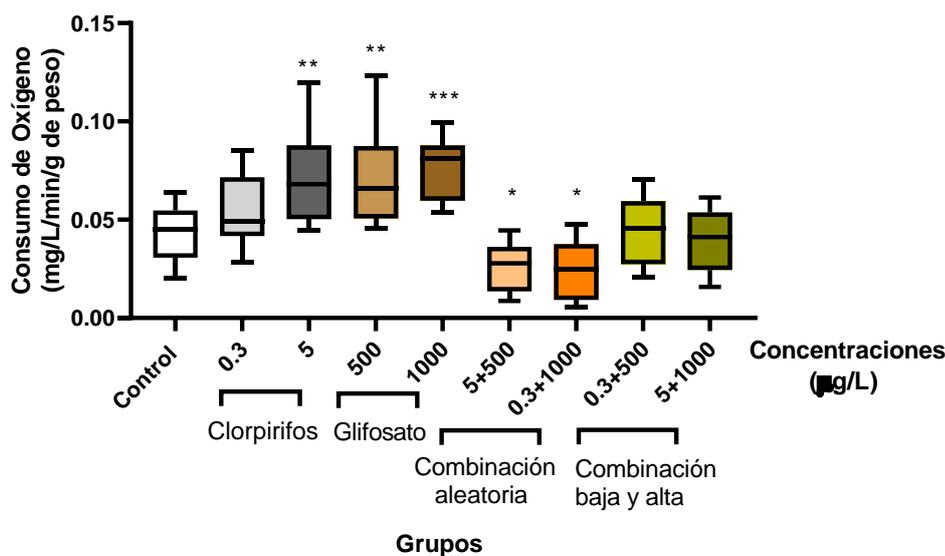


Figura 4. Consumo de oxígeno de peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Se realizaron los experimentos por duplicado. Los datos representan la mediana y rango (n=6). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

3.4. Efectos de la exposición a los plaguicidas de grado técnico y presentación comercial sobre la excreción nitrogenada de *Danio rerio*.

La excreción nitrogenada se determinó al día siguiente de terminar la exposición (sexto día), a partir de la determinación de amonio en el agua durante dos horas (11:20 AM a 14:40 PM, horario considerado más estable mencionado anteriormente). Este valor fue corregido por el tiempo (minutos) entre la toma inicial y final y el peso húmedo (gramos) de los peces. En la **Figura 5** y **Figura 6** se muestran la excreción nitrogenada de los peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico y presentación comercial en comparación con el grupo control, respectivamente.

En la **Figura 5** se muestra la excreción nitrogenada de los peces expuestos al grado técnico en comparación con el grupo control. Se puede observar un aumento significativo de la excreción el grupo expuesto a la menor concentración de CPF (0.3 µg/L: p= 0.0003). Además, se evidencia una disminución significativa para dos grupos expuestos, específicamente para la mayor concentración de GF (1000 µg/L de GF: p< 0.0001) y una de las combinaciones alternas (0.3 µg/L de CPF con 1000 µg/L de GF: p= 0.0273), todos estos efectos respecto al control.

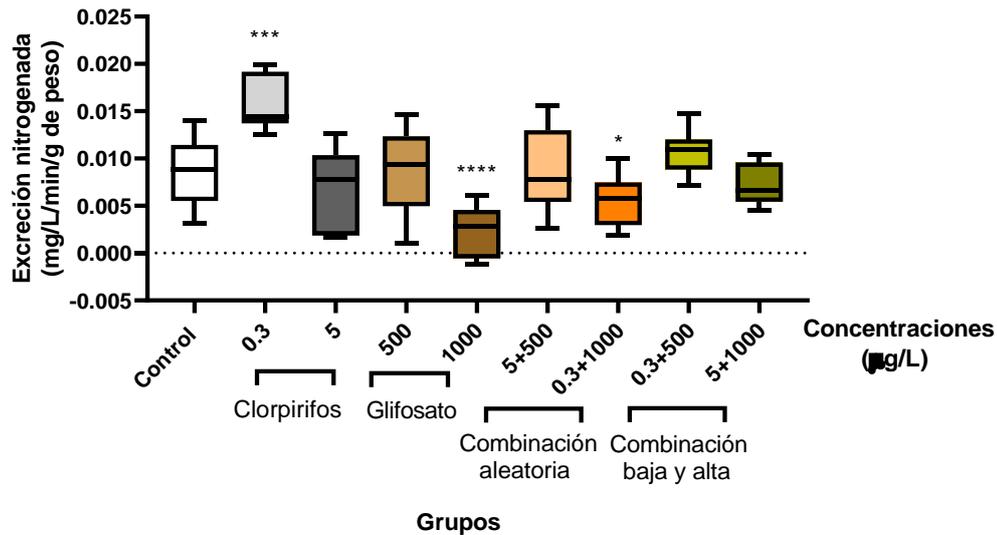


Figura 5. Excreción nitrogenada de peces expuestos a los plaguicidas grado técnico. Se realizaron los experimentos por duplicado. Los datos representan la mediana y rango intercuartílico (n=6). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

Para los peces expuestos a la presentación comercial de los plaguicidas, se observó un comportamiento completamente diferente a los de grado técnico, lo que puede deberse a que la formulación comercial puede ser más tóxica que el compuesto activo. La excreción nitrogenada aumentó significativamente en cuatro grupos expuestos (el grupo de 1000 µg/L, el grupo de 5 µg/L de CPF con 500 µg/L de GF, el de 0.3 µg/L de CPF con 1000 µg/L de GF: $p = 0.0013$, y el de 0.3 µg/L de CPF con 500 µg/L de GF) con respecto al control (**Figura 6**). En cambio, en los grupos expuestos solamente a CPF (0.3 µg/L de CPF y 5 µg/L de CPF) se observaron disminuciones estadísticamente significativas en la excreción comparados con el grupo control.

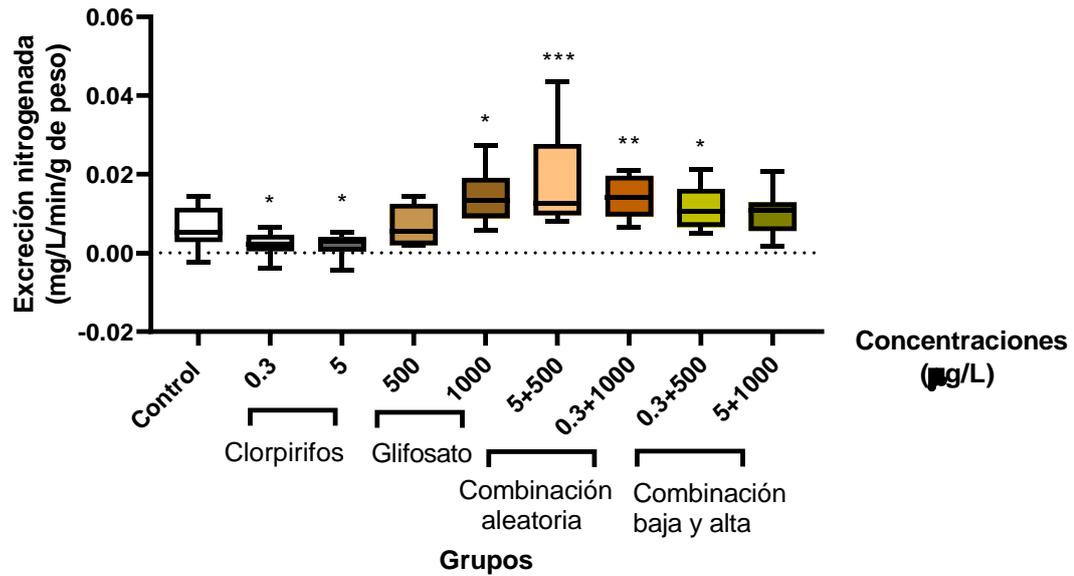


Figura 6. Excreción nitrogenada de peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Se realizaron los experimentos por duplicado. Los datos representan la mediana y rango intercuartílico (n=6). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

3.5. Efectos en el porcentaje de agua corporal de peces expuestos a los plaguicidas grado técnico y comercial

El porcentaje de agua corporal fue determinado por desecación en horno en 4 peces de cada grupo de exposición, a partir del pesado de los animales en diferentes tiempos después de su eutanasia. En las **Figuras 7 y 8** se representa la cantidad de agua corporal expresada en por ciento de los peces expuesto al grado técnico y presentación comercial de los plaguicidas, respectivamente.

En la **Figura 7** se observa un aumento significativo de la cantidad de agua corporal en los grupos expuestos a las combinaciones alternas de los plaguicidas, 5 µg/L de CPF con 500 µg/L de GF: p= 0.0287 y 0.3 µg/L de CPF con 1000 µg/L de GF: p= 0.0342, con respecto al control.

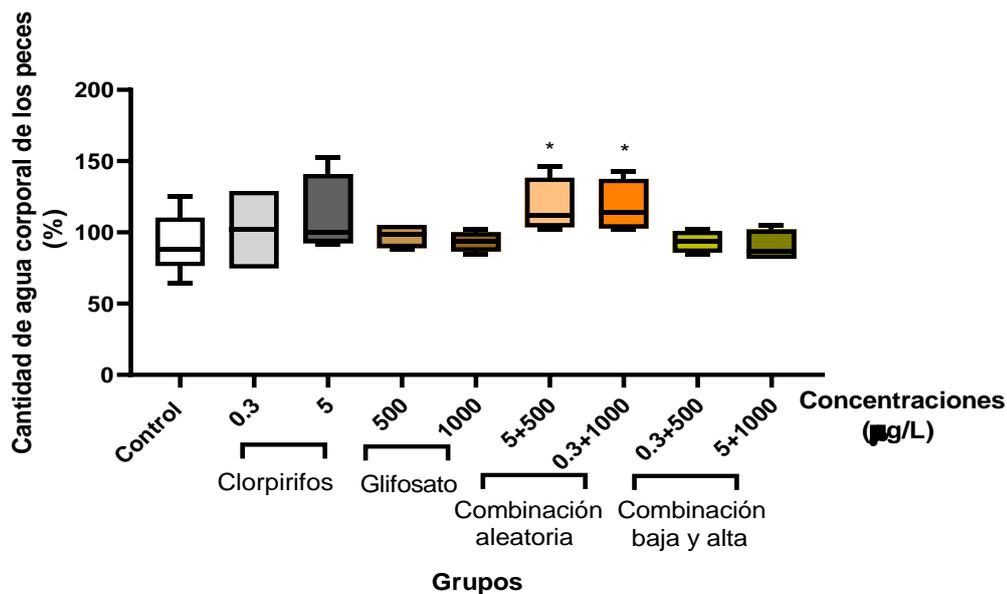


Figura 7. Cantidad porcentual de agua corporal en los peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico. Los datos representan la mediana y rango (n=4). *p<0.05, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

Como se puede observar en la **Figura 8**, correspondiente a la presentación comercial de los plaguicidas, también mostró una tendencia completamente diferente al grado técnico. Los peces expuestos a ambas dosis de CPF presentaron una disminución estadísticamente significativa de la cantidad de agua corporal solo en los grupos de 0.3 µg/L de CPF y 5 µg/L de CPF, con respecto al control. Debido a esta disminución obtenida en ambos grupos expuestos a CPF, se decidió realizar el ensayo de determinación de la actividad enzimática de AChE, como marcado de efecto.

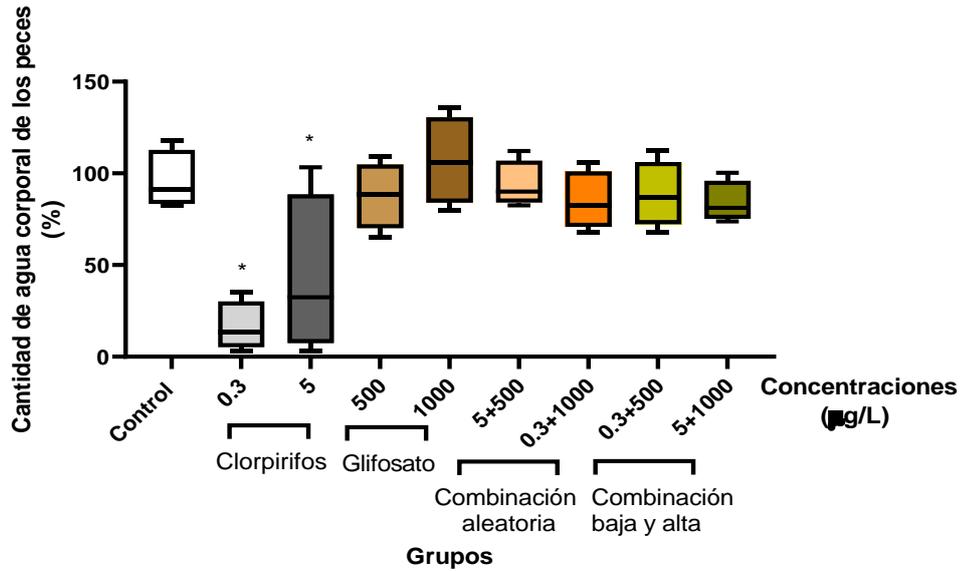


Figura 8. Cantidad porcentual de agua corporal en los peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Los datos representan la mediana y rango intercuartílico (n=4). *p<0.05, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

3.6. Efectos de la exposición a plaguicidas de presentación comercial y grado técnico sobre la enzima AChE en ojo de *Danio rerio*

La AChE es una enzima que hidroliza el neurotransmisor acetilcolina, este se acumula en las sinapsis y las uniones neuromusculares como resultado de la inhibición de la AChE, provocando que las fibras colinérgicas se estimulen continuamente en todo el sistema nervioso (McHardy et al., 2017).

La actividad enzimática de la AChE fue determinada en homogenizados de ojo de los peces, por el método de Ellman (Ellman et al., 1961). La determinación realizada para los plaguicidas grado técnico (**Figura 9**), mostró un aumento significativo de la actividad de la AChE en el grupo expuesto a la mayor concentración de GF (1000 µg/L GF: p= 0.0044) y en el grupo co-expuesto a las concentraciones más altas (5 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.0024), con respecto al control.

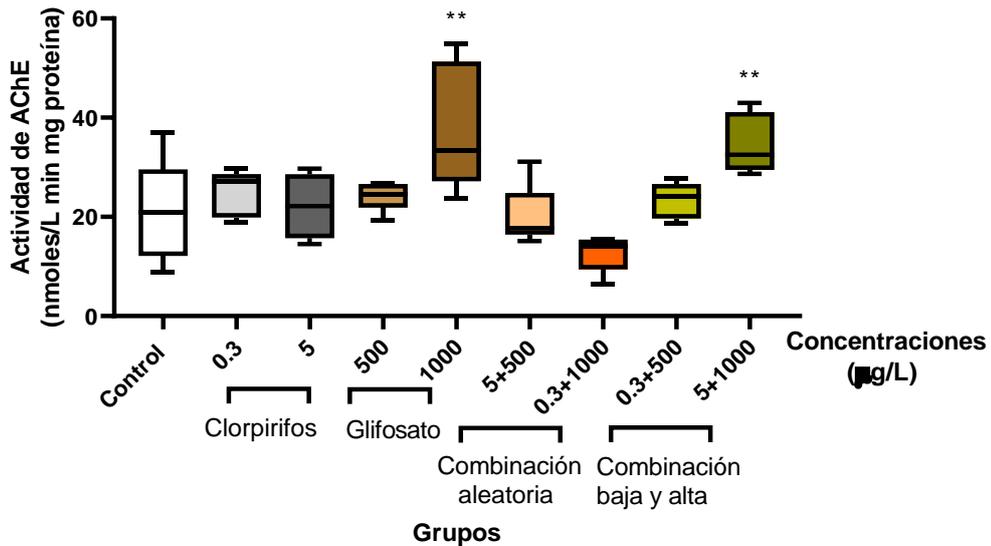


Figura 9. Actividad enzimática de AChE en ojo de los peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico. Se presentan la mediana y rango intercuartílico (n=6). **p<0.01, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

Por otra parte, para la presentación comercial (**Figura 10**) se obtuvo una disminución significativa de la actividad de la AChE en ojo en el grupo expuesto a la mayor concentración de CPF (5 µg/L de CPF: p= 0.0432) y la combinación de 5 µg/L de CPF con 500 µg/L de GF: p= 0.0005, y un aumento significativo para el grupo co-expuesto a las concentraciones más bajas (0.3 µg/L CPF con 500 µg/L GF: p= 0.0129) con respecto al control.

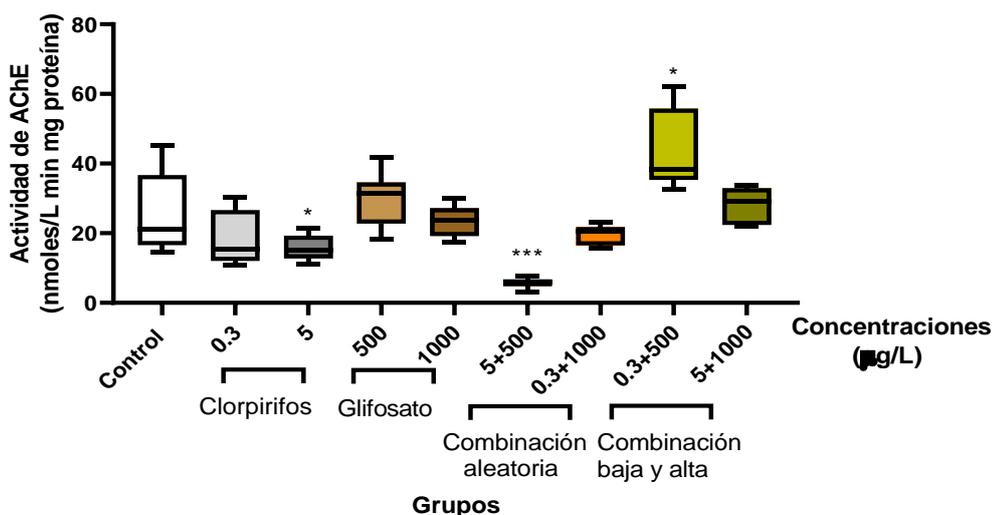


Figura 10. Actividad enzimática de AChE en ojo de los peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Se realizaron los experimentos por triplicado.

Los datos representan la mediana y rango (n=6). *p<0.05, ***p<0.001, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

3.7. Efectos en la capacidad antioxidante de *Danio rerio* expuestos a los plaguicidas de grado técnico y presentación comercial

3.7.1. Malondialdehído (MDA)

El ensayo de MDA se realizó por un método colorimétrico en homogenizados de hígado del pez. La exposición a los plaguicidas de grado técnico (**Figura 11**) evidenció un aumento significativo de MDA en el grupo expuesto a la mayor concentración de GF (1000 µg/L GF:p= 0.0146), y una disminución en dos grupos expuestos (5 µg/L CPF: p= 0.0037 y 500 µg/L GF: p= 0.0083), y en el grupo co-expuesto a 5 µg/L CPF con 500 µg/L GF: p= 0.0240 respecto al grupo control.

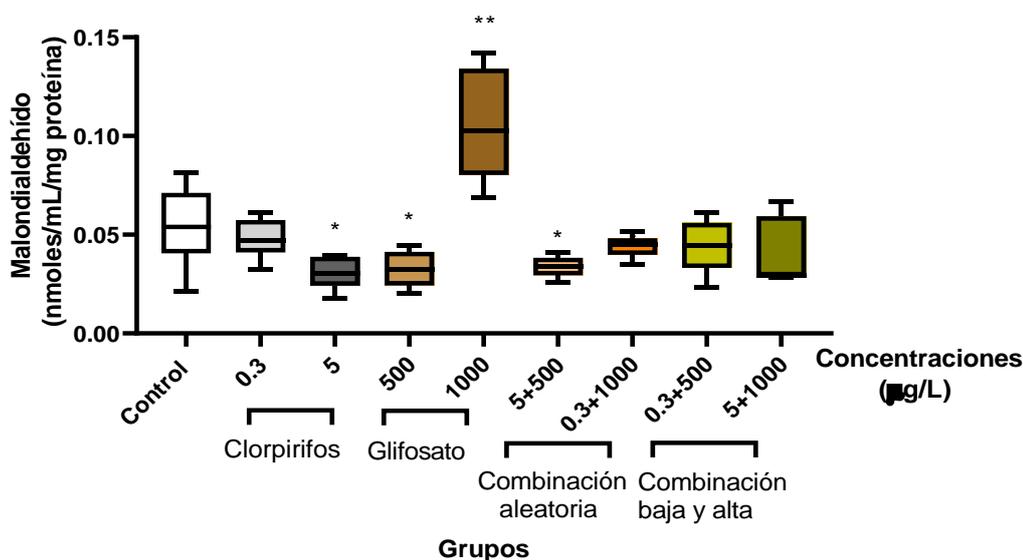


Figura 11. Niveles de MDA en hígado de los peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico. Se realizaron los experimentos por triplicado. Los datos representan la mediana y rango intercuartílico (n=6). *p<0.05, **p<0.01, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

Por otra parte, los resultados de los grupos expuestos a la presentación comercial de los plaguicidas (**Figura 12**) mostraron una disminución de MDA en la co-exposición a 0.3 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.0365, junto a un aumento significativo del mismo indicador en el grupo expuesto a la mayor concentración de GF, 1000 µg/L GF: p= 0.0010, respecto al grupo control. Como se pudo observar en las dos presentaciones

de los plaguicidas, el daño oxidante a las membranas fue más pronunciado en los grupos expuestos a la mayor concentración de GF.

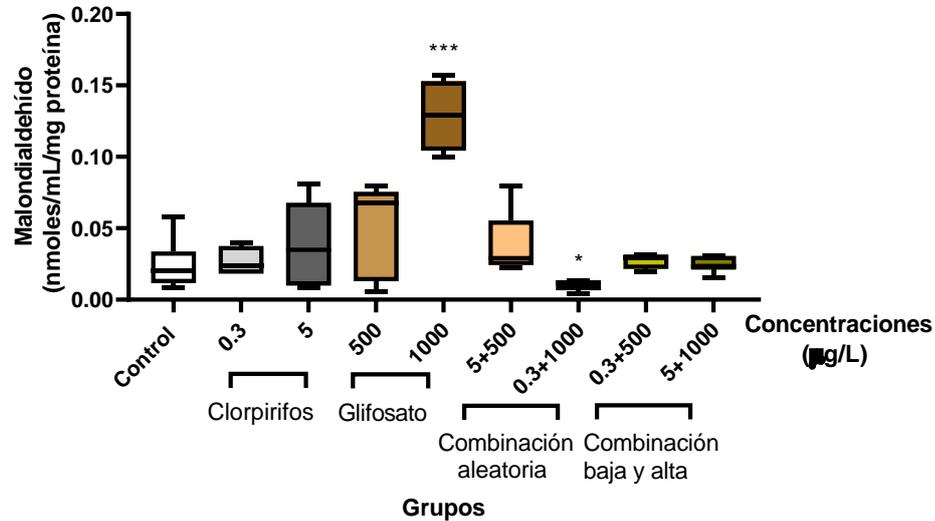


Figura 12. Niveles de MDA en hígado de los peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Se realizaron los experimentos por triplicado. Los datos representan la mediana y rango intercuartílico (n=6). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

3.7.2. Productos de Oxidación Avanzada de Proteínas (POAPs)

La determinación de POAPs se realizó igualmente en homogeneizados de hígado a partir de un método colorimétrico. Los bioensayos con los plaguicidas grado técnico (**Figura 13**) evidenciaron un aumento de los POAPs en el grupo expuesto a la mayor concentración de CPF (5 µg/L CPF: $p = 0.0114$), y una disminución significativa en el grupo expuesto a 500 µg/L GF: $p = 0.0041$, con respecto al grupo control.

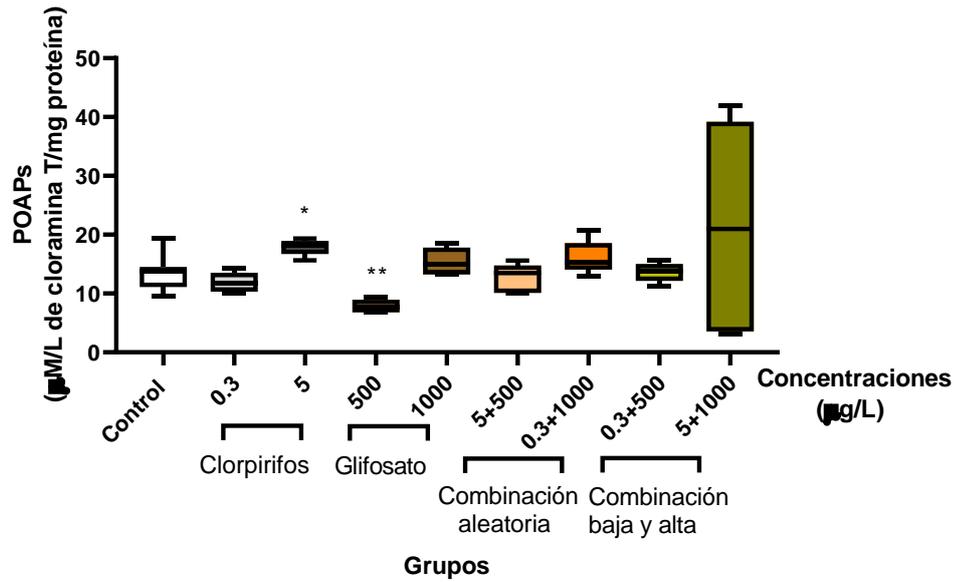


Figura 13. Niveles de POAPs en hígado de los peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico. Se presenta la mediana y rango (n=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

Por la parte de la presentación comercial (**Figura 14**), los resultados de los bioensayos mostraron también un aumento de los POAPs en el grupo expuesto a la mayor concentración de CPF (5 µg/L CPF: $p = 0.0055$), al igual que para el grupo expuesto a la mayor concentración de GF (1000 µg/L GF: $p = 0.0018$), mientras que fue evidente una disminución significativa para el grupo co-expuesto a 0.3 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: $p = 0.02$, con respecto al grupo control.

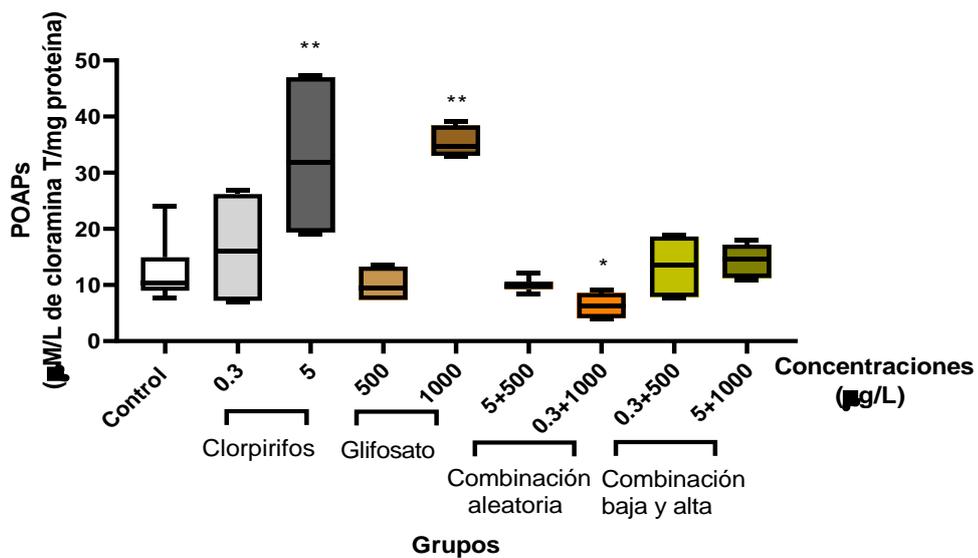


Figura 14. Niveles de POAPs en hígado de los peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Se presenta la mediana y rango (n=6). *p<0.05, **p<0.01, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

3.7.3. Glutación S-Transferasa (GST)

La determinación de la cinética enzimática de GST se realizó en homogenizados de hígado. Tras la exposición al grado técnico de los plaguicidas (**Figura 15**) se observó un aumento significativo en la actividad de la enzima en el grupo expuesto a la concentración más alta de GF (1000 µg/L GF: p= 0.0257) y el grupo co-expuesto a las concentraciones más bajas (0.3 µg/L CPF con 500 µg/L GF: p= 0.0076), con respecto al grupo control. Los grupos expuestos a 500 µg/L GF: p= 0.0177) y co-expuesto a 5 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.0151 evidenciaron una disminución estadísticamente significativa, igualmente respecto al control.

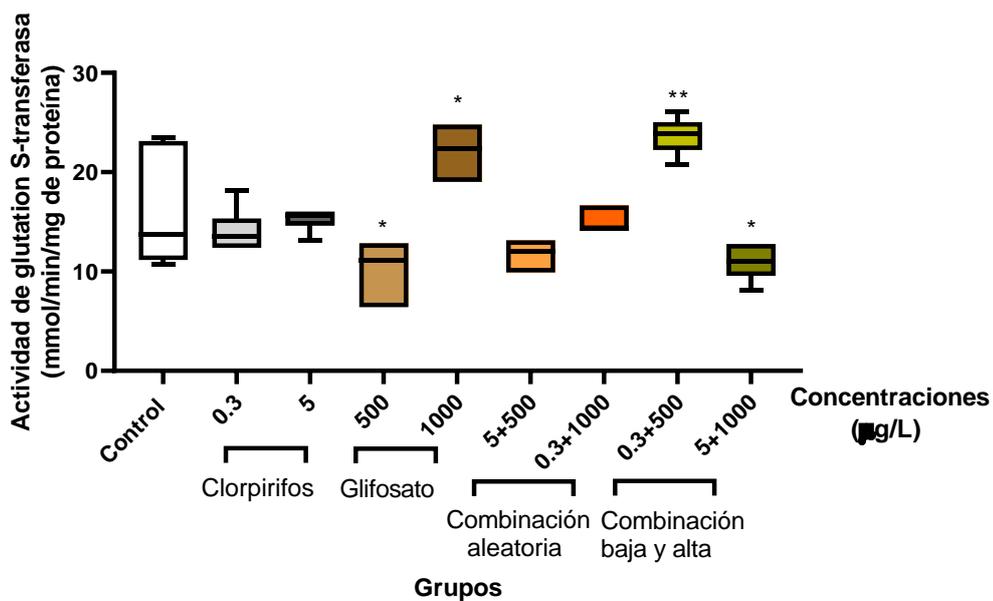


Figura 15. Actividad enzimática de GST en hígado de los peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico. Se presenta la mediana y rango (n=6). *p<0.05, **p<0.01, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

La exposición a la presentación comercial de los plaguicidas mostró un aumento significativo en la actividad de GST (**Figura 16**) en los grupos expuestos mostró un aumento significativo para los grupos expuestos a 5 µg/L CPF: p= 0.0049 y 1000 µg/L GF: p= 0.0005 y el grupo co-expuesto ambas concentraciones, 5 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.0051. Esta tendencia de aumento en la actividad de la enzima podría

indicar una mayor capacidad antioxidante, para hacer frente al estrés que pueden estar ambas concentraciones más altas de los plaguicidas, y su combinación.

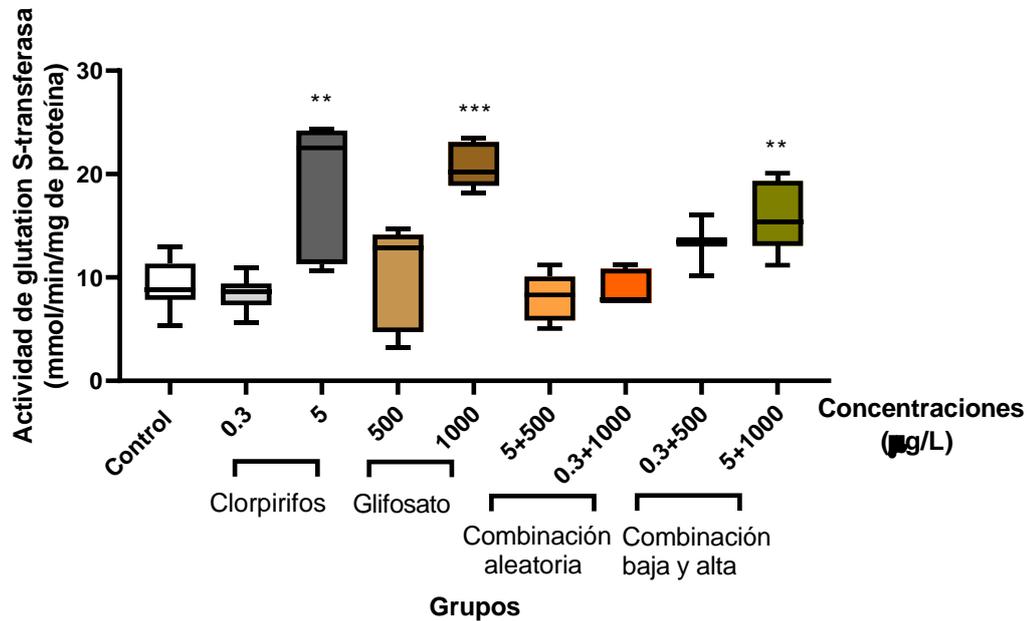


Figura 16. Actividad enzimática de GST en hígado de los peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Se presenta la mediana y rango (n=6). **p<0.01, ***p<0.001, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

3.7.4. Gama Glutamyl transferasa (GGT)

La determinación de GGT se realizó por un ensayo colorimétrico enzimático en homogenizados de hígado. Los bioensayos con los plaguicidas grado técnico evidenciaron disminuciones significativas en 5 de los grupos expuestos (**Figura 17**), específicamente, 0.3 µg/L CPF: p= 0.0083, 500 µg/L GF: p < 0.0001, 1000 µg/L GF: p= 0.0038, 5 µg/L CPF con 500 µg/L GF: p= 0.0068 y 5 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.0054, respecto al grupo control.

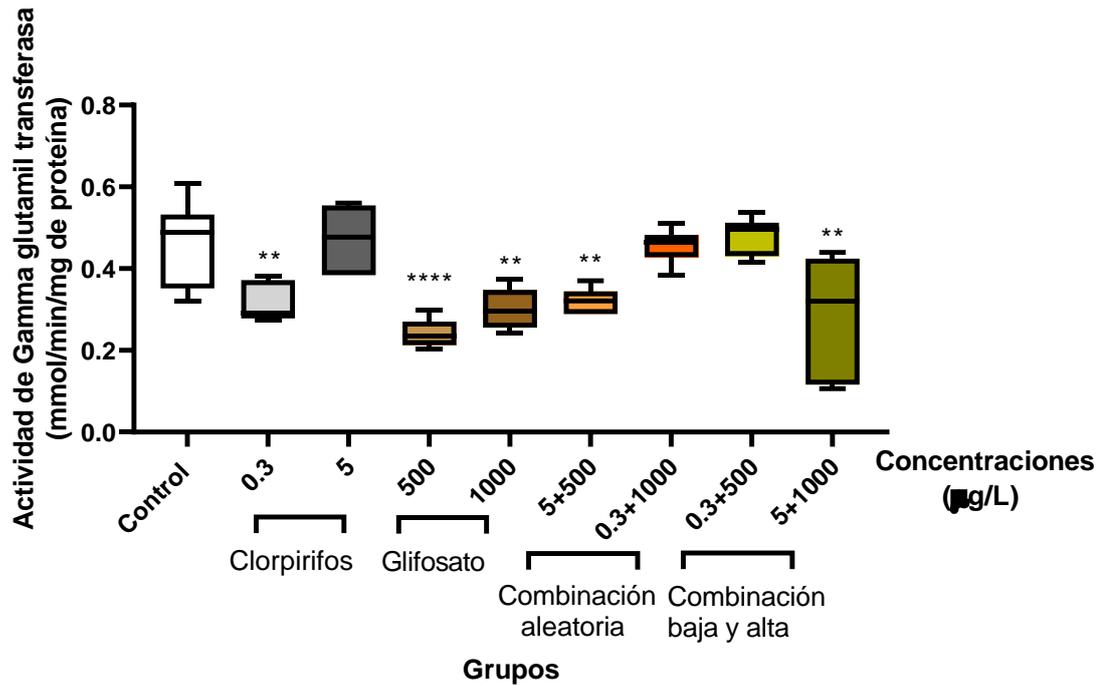


Figura 17. Actividad enzimática de GGT en hígado de los peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico. Se presenta la mediana y rango (n=6). **p<0.01, ****p<0.0001, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

Tras la exposición con la presentación comercial, la actividad de la enzima GGT (**Figura 18**) mostró disminuciones significativas en los grupos expuestos a 0.3 µg/L CPF: p= 0.0247, 1000 µg/L GF: p= 0.0002, 5 µg/L CPF con 500 µg/L GF: p= 0.00118 y 0.3 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.0008, respecto al control.

Para ambas presentaciones de los plaguicidas, fue evidente el comportamiento de disminución en la actividad de GGT, que podría indicar alteraciones en el proceso de detoxificación de los compuestos.

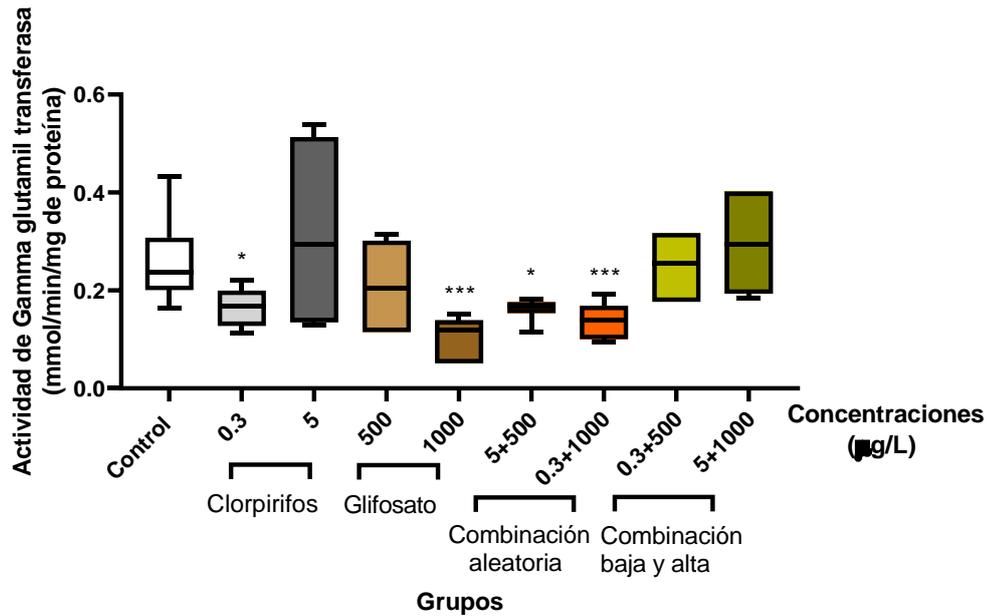


Figura 18. Actividad enzimática de GGT en hígado de los peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Se presenta la mediana y rango (n=6). *p<0.05, ***p<0.001, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

3.7.5. Paraoxonasa 1 (PON-1)

La actividad de la PON-1 se determinó por ensayo colorimétrico enzimático, en homogenizados de hígado. Tras la exposición al grado técnico de los plaguicidas, la actividad hepática de la PON-1 (**Figura 19**) mostró disminuciones significativas en los grupos expuestos a ambas concentraciones de CPF (0.3 µg/L CPF: p= 0.0007 y 5 µg/L CPF: p< 0.0001), en el expuesto a la concentración más baja de GF (500 µg/L GF: p< 0.0001) y en tres grupos co-expuestos (5 µg/L CPF con 500 µg/L GF: p= 0.029, 0.3 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.0208 y 5 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.0066), con respecto al grupo control.

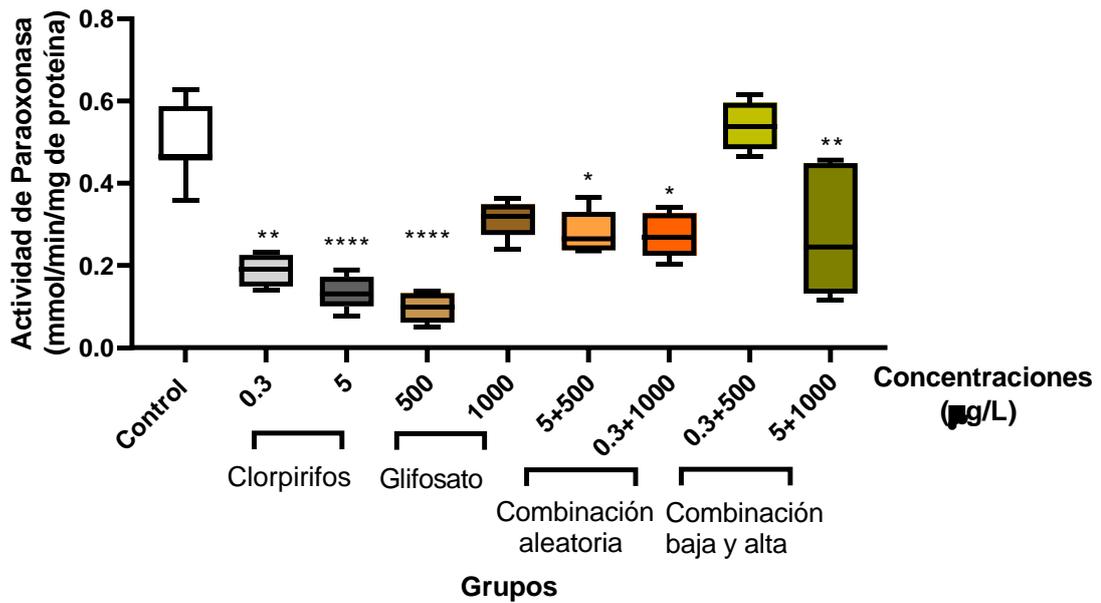


Figura 19. Actividad enzimática de PON-1 en hígado de los peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico. Se realizaron los experimentos por triplicado. Los datos representan la mediana y rango (n=6). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

Por parte de los grupos expuestos a los plaguicidas presentación comercial, la actividad de la PON-1 en hígado (**Figura 20**) mostró un decremento significativo en los grupos expuestos a ambas concentraciones de CPF (0.3 µg/L CPF: p= 0.0001 y 5 µg/L CPF: p= 0.0044) y en el grupo co-expuesto a 0.3 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.0001), con respecto al grupo no expuesto.

Tanto para el grado técnico como la presentación comercial de los plaguicidas se observó el mismo comportamiento de disminución en la actividad de la enzima PON-1, lo que podría indicar alteraciones en su capacidad antioxidante, al igual que en la enzima GGT.

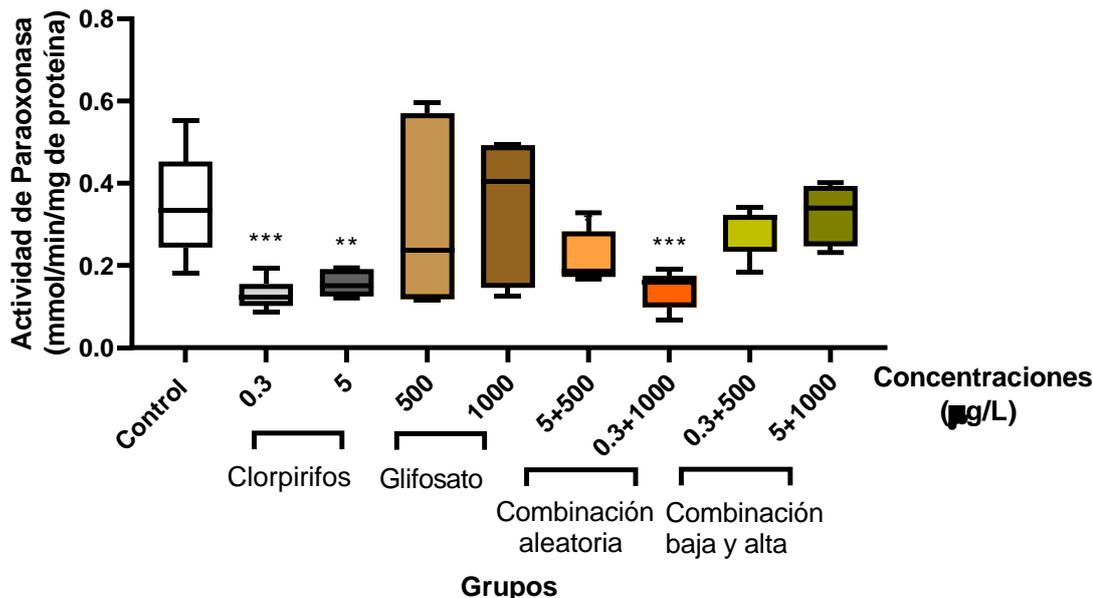


Figura 20. Actividad enzimática de PON-1 en hígado de los peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Se realizaron los experimentos por triplicado. Los datos representan la mediana y rango intercuartílico (n=6). **p<0.01, ***p<0.001, Kruskal Wallis, prueba post hoc Dunn.

3.8. Efectos en los niveles de proteína de AT1R y AT2R en los peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico y presentación comercial

El AT1R es uno de los componentes del SRA más estudiados para conocer si existen alteraciones en dicho sistema. En condiciones normales, su estimulación genera vasoconstricción, reabsorción tubular de sodio e incrementa el transporte de calcio. Sin embargo, en condiciones patológicas, puede promover un aumento del EsOx, provocando disfunción endotelial (Miller & Arnold, 2019b), e induciendo la sobreactivación de AT2R como efecto compensatorio.

Esto debido a que la estimulación de AT2R, produce efectos opuestos a los mediados por los receptores AT1, tales como vasodilatación e inhibición de crecimiento vascular y remodelación cardiovascular a partir de la mayor producción de NO (Kaschina & Unger, 2003).

La exposición a los plaguicidas grado técnico mostró para el AT1R (**Figura 21**) una disminución significativa del receptor para el grupo co-expuesto a las mayores concentraciones de los plaguicidas (5 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.002), mientras que para que se observó un aumento para el grupo expuesto al a la menor

concentración de GF de forma individual (500 µg/L GF: $p= 0.0326$), y dos de los grupos co-expuestos (5 µg/L CPF con 500 µg/L GF: $p= 0.01$ y 0.3 µg/L CPF con 500 µg/L GF: $p= 0.0011$), respecto al grupo control.

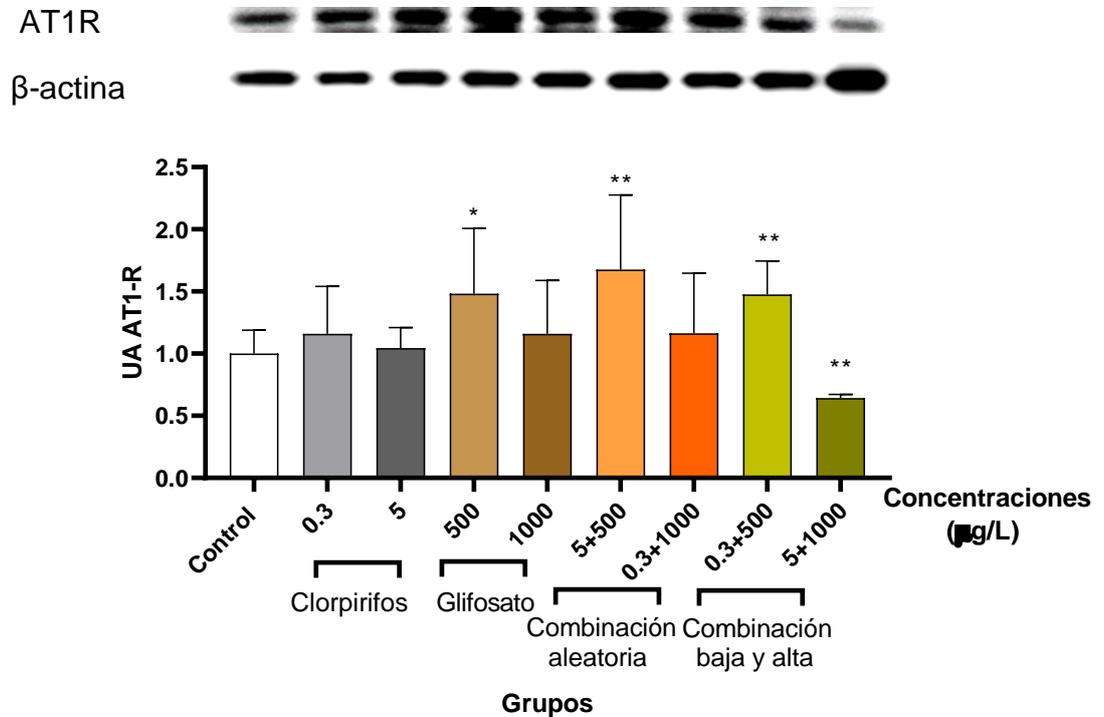


Figura 21. Expresión de AT1R en corazón de peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico. Los datos representan la media y rango ($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Kruskal Wallis, prueba post hoc U-Mann Whitney.

Este comportamiento fue diferente para la presentación comercial de los plaguicidas (**Figura 22**), donde se solo se observó un aumento significativo para el grupo expuesto a la menor concentración de glifosato (500 µg/L GF: $p= 0.0189$), respecto al grupo control.

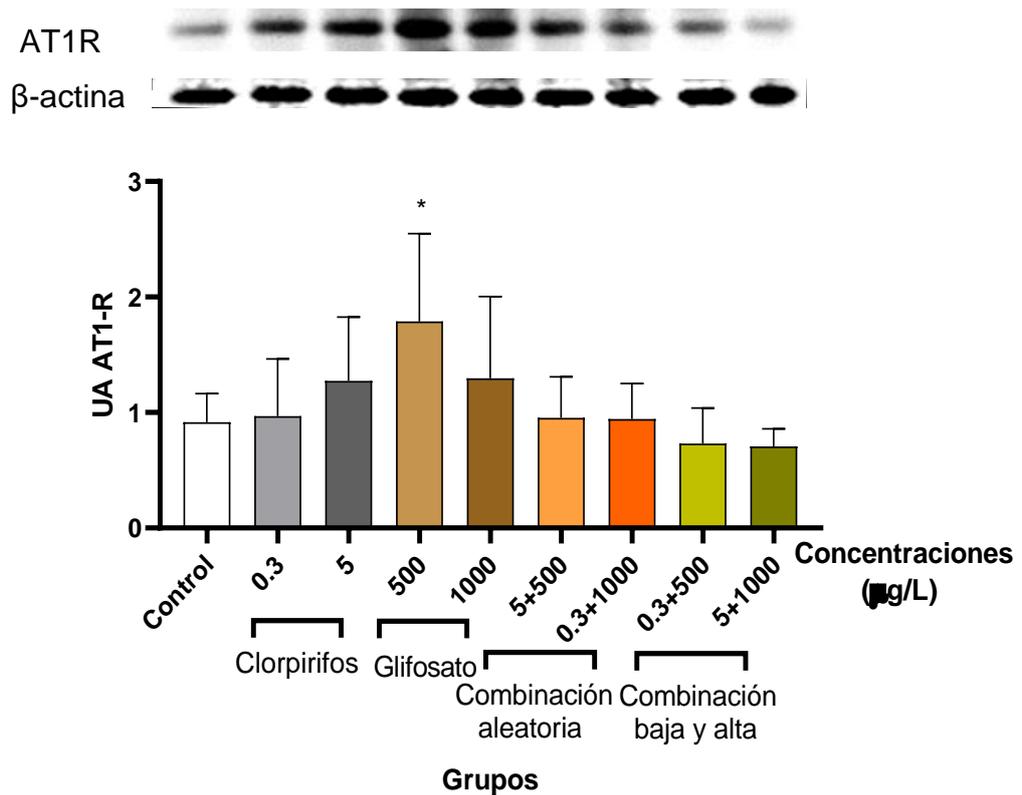


Figura 22. Expresión de AT1R en corazón de peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Los datos representan la media y rango (n=6). *p<0.05, Kruskal Wallis, prueba post hoc U-Mann Whitney.

Por otra parte, el AT2R en los corazones de los peces expuestos al grado técnico de los plaguicidas (**Figura 23**), mostró también una disminución significativa para el grupo co- expuesto a las concentraciones más altas (5 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.002). Además, se observó un aumento significativo de los niveles proteicos del receptor para el grupo expuesto a la menor concentración de GF (500 µg/L GF: p= 0.002), y tres de las mezclas (5 µg/L CPF con 500 µg/L GF: p= 0.0003, 0.3 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.0015 y 0.3 µg/L CPF con 500 µg/L GF: p= 0.0047) respecto al control.

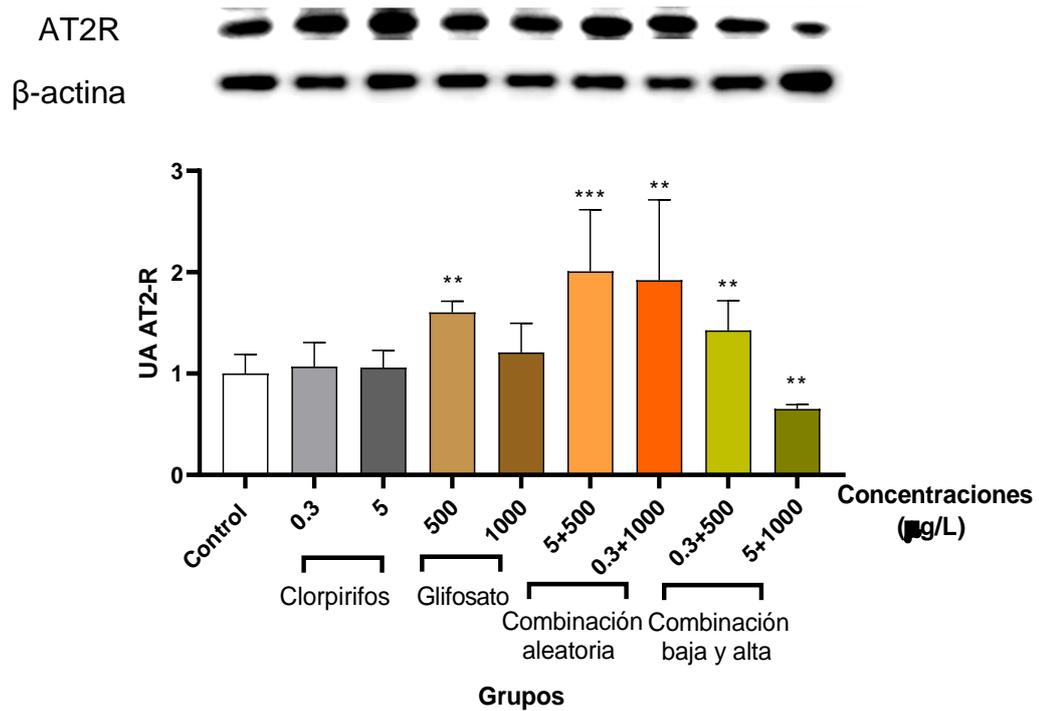


Figura 23. Expresión de AT2R en corazón de peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico. Los datos representan la media y rango (n=6). *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, Kruskal Wallis, prueba post hoc U-Mann Whitney.

Para la presentación comercial (**Figura 24**), se obtuvo una sobreactivación del receptor AT2R para el grupo expuesto a 5 µg/L CPF: p= 0.0296, pero un efecto de disminución para todos dos de los grupos co-expuestos (0.3 µg/L CPF con 500 µg/L GF: p= 0.0023 y 5 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: p= 0.0063), respecto al grupo control.

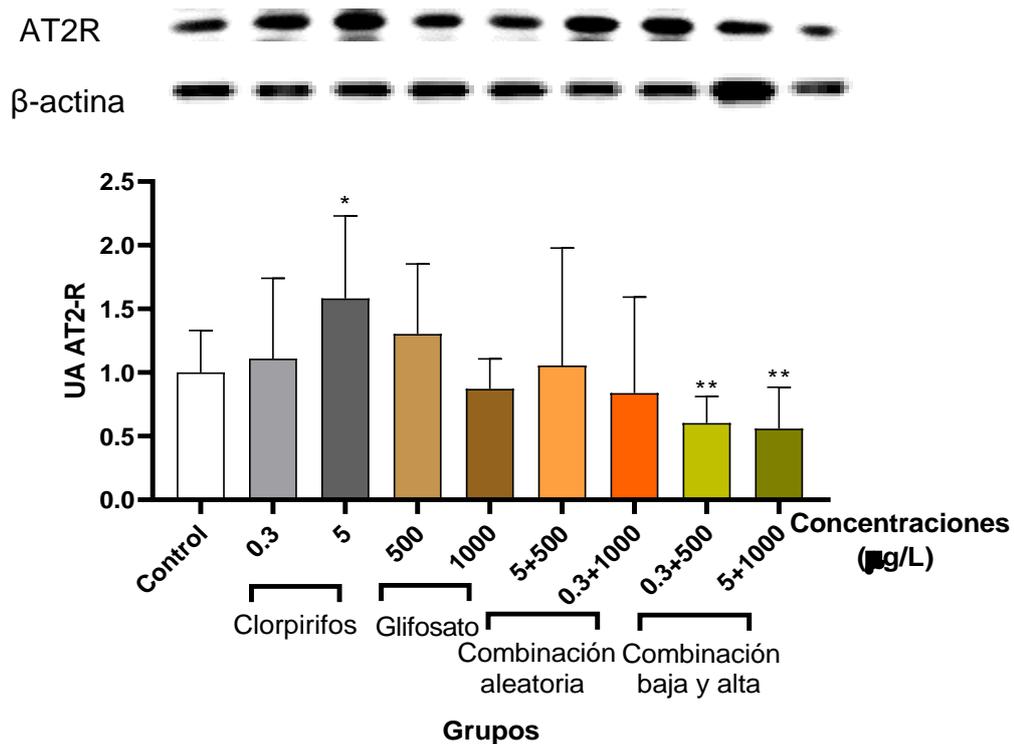


Figura 24. Expresión de AT2R en corazón de peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Los datos representan la media y rango (n=6). *p<0.05, **p<0.01, Kruskal Wallis, prueba post hoc U-Mann Whitney.

Debido a que estas alteraciones en el SRA, principalmente a nivel de la activación del AT1R pueden producir un proceso de reprogramación cardiaca, se decidió evaluar un marcador de daño al miocardio (Rajabi et al., 2007). En este caso se determinaron los niveles proteicos de PPAR- α , receptor involucrado la reducción de los triacilglicéridos y el mantenimiento de la homeostasia energética.

3.9. Efectos en los niveles de proteína de PPAR- α en los peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial y grado técnico

Para evaluar la alteración en el miocardio, se determinó el nivel proteico de PPAR- α , esto debido a que alteraciones en el mismo se ha relacionado al proceso de reprogramación génica en el miocardio cuando se presenta alguna enfermedad en el corazón.

En los grupos expuestos al grado técnico de los plaguicidas (**Figura 25**), PPAR- α mostró disminución significativa en el grupo expuesto a la menor concentración de GF

(500 µg/L GF: $p= 0.0145$) y en uno de los grupos co-expuestos (5 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: $p= 0.003$), respecto al grupo control.

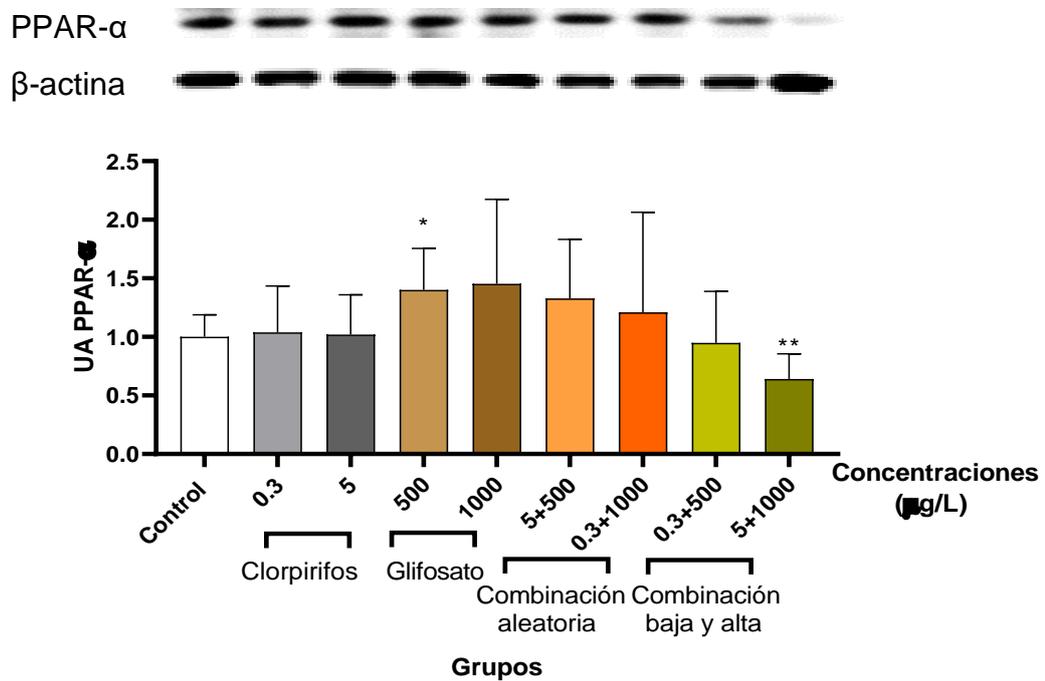


Figura 25. Expresión de PPAR- α en corazón de peces expuestos a los plaguicidas de grado técnico. Los datos representan la media y rango ($n=6$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Kruskal Wallis, prueba post hoc U-Mann Whitney.

Por otra parte, los grupos expuestos a la presentación comercial de los plaguicidas (**Figura 26**) mostraron una disminución significativa de los niveles proteicos de PPAR- α para tres grupos co-expuestos, 0.3 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: $p= 0.022$, 0.3 µg/L CPF con 500 µg/L GF: $p= 0.0088$ y 5 µg/L CPF con 1000 µg/L GF: $p= 0.0043$, respecto al grupo control.

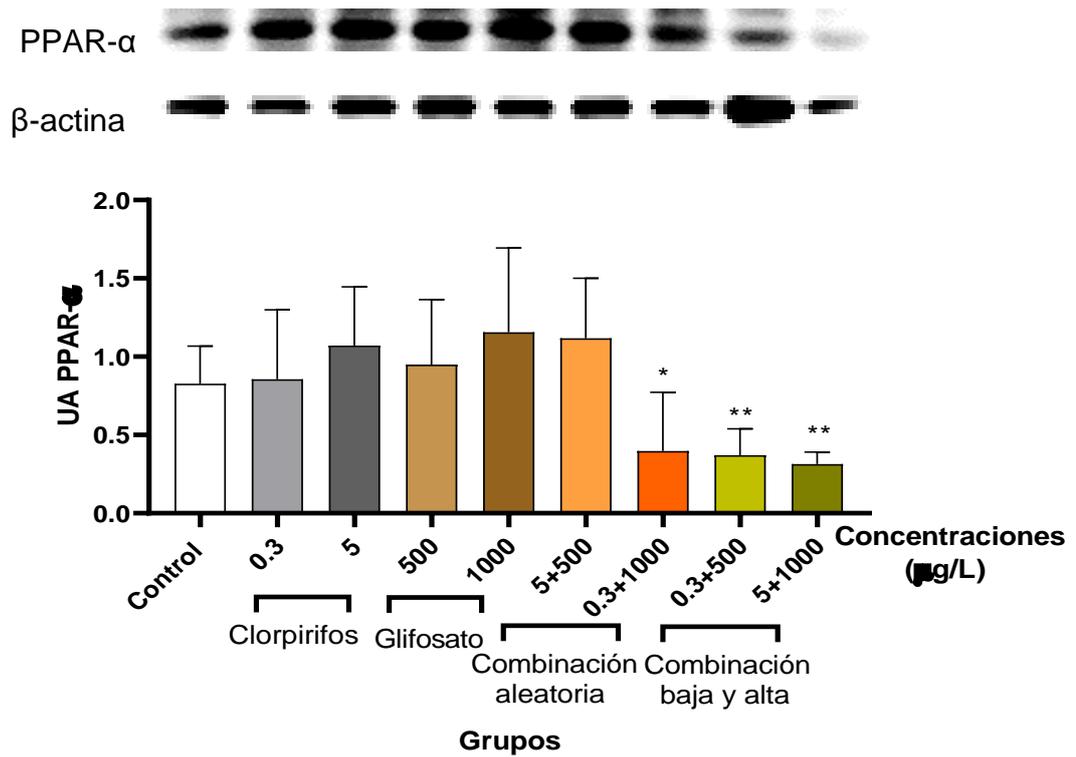


Figura 26. Expresión de PPAR- α en corazón de peces expuestos a los plaguicidas de presentación comercial. Los datos representan la media y rango (n=6). *p<0.05, **p<0.01, Kruskal Wallis, prueba post hoc U-Mann Whitney.

4. Discusión

El CPF y glifosato son plaguicidas ampliamente utilizados en el mundo, y especialmente en México para el control de plagas y malas hierbas. Se introducen en aguas superficiales y alimentos durante la fumigación o a través de la escorrentía de las lluvias y corrientes del aire. Aunque se ha reportado que pueden provocar alteraciones celulares y genéticas en organismos acuáticos y mamíferos, no se encuentran regulados en el país (Banaee et al., 2019). Es por ello, que se necesita más información sobre cómo pueden afectar ambos Xbs, los parámetros fisiológicos de los organismos y su metabolismo, y si a su vez esto puede desencadenar alteraciones en el sistema cardiovascular, que contribuya en desencadenar ECV. Se expusieron peces cebra (*Danio rerio*) a dosis de referencias establecidas por la EPA y EFSA. Esta especie como modelo experimental fue elegida para estudiar exposición a contaminantes y alteraciones a nivel cardiovascular, debido a la homología del genoma entre el pez cebra y el ser humano (Yang et al., 2019).

4.1. Consumo de oxígeno y excreción nitrogenada basal del pez cebra adulto

Los ritmos circadianos son procesos importantes en la fisiología y el comportamiento de los organismos pues desempeñan un papel regulador en procesos fisiológicos como los ciclos del sueño, secreción hormonal, consumo de oxígeno y excreción nitrogenada en el caso de peces. Alteraciones en el mismo pueden causar enfermedades, como trastornos metabólicos, envejecimiento prematuro y enfermedades psicológicas (Bass & Takahashi, 2010).

Los peces en el transcurso de 14 horas (horario diurno) presentan incrementos en el consumo de oxígeno y excreción nitrogenada. Aunque no se encuentran reportados en la literatura valores de estos parámetros fisiológicos para *Danio rerio*, si se conoce que son procesos que responden a la adaptación del ciclo circadiano en los organismos, y alteraciones en los mismos pueden ser consideradas signos de estrés (Prokkola & Nikinmaa, 2018).por la influencia de factores endógenos y/o exógenos (Zakharov & Khivintseva, 2020). Es importante mencionar que este experimento permitió conocer el rango de tiempo donde ambos parámetros fisiológicos se superponen, para realizar las tomas de muestras correspondientes para los animales expuestos.

4.2. La exposición a plaguicidas de grado técnico y presentación comercial afecta el consumo de oxígeno

El oxígeno es clave en el metabolismo de xenobióticos, particularmente en las reacciones de fase 1, que incluyen procesos de oxidación-reducción (Chance, 1965). Su incremento en los peces expuestos podría ser reflejo de un aumento en este tipo de metabolismo por la exposición al plaguicida. Además, el consumo de oxígeno también se relaciona con el metabolismo energético (Cartner et al., 2020), siendo la respiración celular fundamental en los procesos catabólicos para la obtención de energía en forma de ATP en los organismos aeróbicos. Es posible que como resultado de la exposición se produzca un mayor gasto energético tanto por la propia toxicidad del plaguicida, por ejemplo, la generación de EsOx; como por el hecho de tener activadas las rutas relacionadas con su excreción, eliminación y procesos que intentan compensar la toxicidad y mantener el estado de homeostasis interno de los peces (Re et al., 2004). Esto podría explicar el aumento observado en los grupos expuestos individualmente a los plaguicidas grado técnico.

Un estudio realizado por (Padmanabha et al., 2015), donde se expusieron a tilapias (*Oreochromis mossambicus*) a tres concentraciones de CPF (0.0022, 0.0044 y 0.022 ppm) durante 12, 24, 36 y 48 h, describió un aumento en el consumo de oxígeno en cada tiempo de exposición, resultado que los autores relacionaron como un efecto de intoxicación por plaguicidas.

Si bien algunos reportes de la literatura plantean que el GF no causa cambios significativos en el consumo de oxígeno, sugerimos que las diferencias con nuestro estudio se deben a que los reportes son realizados en modelos experimentales invertebrados. Tal es el caso de un estudio realizado por Melo et al., 2017 donde expusieron al poliqueto estuarino *Laeonereis acuta* a 3.25 mg/L y 5.35 mg/L de GF durante 24 y 96 h.

Por otro lado, los grupos co-expuestos, mostraron una disminución en el consumo, resultado que podría ser indicativo de un antagonismo de la mezcla de ambos plaguicidas. Analizando el antagonismo como proceso bioquímico, suele producirse como consecuencia de la competencia por receptores, ya sea por el mismo sitio en el receptor o una porción de este sitio con el cual el ligando coincide (antagonismo sintópico), o al interactuar con otros sitios del receptor (antagonismo alostérico). También puede producirse por antagonismo funcional al inhibir indirectamente los

efectos celulares o fisiológicos del agonista, a partir de una interacción de los plaguicidas en alguna parte de la ruta de señalización (Rang et al., 2016).

Estos resultados obtenidos con las mezclas indican que las respuestas a las combinaciones de los plaguicidas no responden de manera aditiva para esta respuesta fisiológica. Aunque no se encuentra tanta literatura que reporte la explicación de este efecto para ambos compuestos, Bonifacio et al., 2020 y Bonifacio & Hued, 2019, reportaron que la exposición del poecilido *Cnesterodon decemmaculatus* a CPF (0.84 y 8.4 nL/L) y GF (0.2 y 2 mg/L) de forma individual o la mezcla de ambas concentraciones bajas causó una potenciación de las alteraciones nucleares a nivel hepático y actividad locomotora. En cambio, los autores también observaron un efecto de antagonismo cuando se exponían a las combinaciones de concentraciones altas o alternas.

Sin embargo, son necesarios más estudios, incluso desde el punto de vista transcriptómico para describir la respuesta de genes que puedan estar participando o incluso, siendo regulados a la baja por la co-exposición a diferencia de la exposición individual de los plaguicidas.

El consumo de oxígeno en *Danio rerio* también se realizó para la presentación comercial de los plaguicidas. Se ha reportado que la formulación comercial de los plaguicidas tiende a ser más tóxica que el compuesto activo, debido a los ingredientes que se emplean para hacer la sustancia más soluble y funcional (Puglis & Boone, 2011). Con respecto a esta respuesta fisiológica se obtuvo una tendencia similar respecto al plaguicida de grado técnico, aunque el mayor aumento significativo fue en los grupos expuestos individualmente, que es posible que se deba a los tensoactivos o impurezas propias en las formulaciones, que producen una mayor toxicidad en comparación a los compuestos puros (Folmar et al., 1979). Para los grupos co-expuestos, nuevamente se observó un efecto antagónico por la combinación de ambos plaguicidas.

4.3. La exposición a plaguicidas de grado técnico y presentación comercial modifica la excreción de amonio.

El metabolismo de Xbs además de facilitar su eliminación también pretende mantener la homeostasis de los organismos expuestos a estos. En los peces teleósteos, como es el caso del pez cebra, el principal órgano de excreción de sustancias tóxicas y de productos de desechos como el amonio son las branquias (Menke et al., 2011),

encargadas además de la oxigenación de la sangre, el equilibrio ácido-base y la osmorregulación (Bucking et al., 2013). En las branquias, se encuentran las proteínas Rhesus (Rh) y la enzima Na^+/K^+ -ATPasa, encargadas de aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática para la salida del amonio, a partir de difusión pasiva y/o transporte facilitado. Las glicoproteínas son reconocidas como transportadores específicos de NH_3 , y se conocen como: la glicoproteína Rh B (Rhbg) y la glicoproteína Rh C (Rhcg). Se ha validado por un análisis de expresión funcional que estas proteínas son prevalentes en mamíferos, peces y algunos invertebrados (nematodos, artrópodos), necesarias para llevar a cabo la detoxificación de NH_3 (Williamson et al., 2024). Se ha planteado que la eliminación de cualquiera de las proteínas Rh o una afectación en la enzima Na^+/K^+ -ATPasa, puede afectar significativamente la excreción de amonio, lo que sugiere que, sin la presencia de estas, la excreción de amoníaco se vería afectada (Braun et al., 2009).

En peces se ha planteado, que Rhcg se une y desprotona a NH_4^+ , a partir de esto NH_3 es transportado a través de la membrana basolateral por Rhcg y Rhbg y excretado a través de la membrana plasmática apical por Rhcg. Este mecanismo es facilitado por la excreción de CO_2 en la superficie apical de las branquias a través del intercambio de la H^+ -ATPasa y el antiporte de Na^+/H^+ (difusión facilitada), así como a través de la Na^+/K^+ -ATPasa (transporte activo) en la superficie basolateral (Wright & Wood, 2009). Se ha reportado que el potencial nocivo de un plaguicida puede provocar alteraciones metabólicas que modifiquen la excreción de productos nitrogenados en el organismo (Newman, 2015). De ahí, que esto podría explicar los resultados obtenidos en la excreción nitrogenada para la exposición a grado técnico.

Si bien no se encuentran reportes en la literatura donde se analice el efecto de estos plaguicidas sobre los transportadores Rh, si se ha reportado que el CPF a concentraciones de 4 y 8 $\mu\text{g}/\text{L}$ en peces *Thalassoma pavo* por 48 y 96 h produce alteraciones morfológicas y ultraestructurales en sus branquias como proliferación intensa del epitelio y adelgazamiento del tejido, además de que el CPF moduló la expresión de Na^+/K^+ -ATPasa (Macirella et al., 2020a). Este efecto, también ha sido demostrado en otros modelos de peces (*Carassius auratus*) por exposición a CPF (Macirella et al., 2020b) y para otros plaguicidas organofosforados como tebuconazol (Macirella et al., 2019) y propiconazol (Li et al., 2020). De igual forma Führer et al., 2012, observaron un aumento de la excreción nitrogenada en mejillones *Aulacomya*

ater para concentraciones de 0.8 y 1.6 $\mu\text{g/L}$ de CPF, el cual ellos asociaron con un aumento en el uso de proteínas como sustrato durante el metabolismo oxidativo.

Por otra parte, también se ha reportado que el GF produce una inhibición de la actividad de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPasa}$ en carpa común (*Cyprinus carpio*) a concentraciones de 52.08 y 104.15 mg/L después de 1, 3 y 7 días de tratamiento, además de provocar EsOx, apoptosis y la promoción de citocinas pro-inflamatorias en las branquias de los peces (Ma et al., 2019).

Además, se observó infiltración celular e inflamación del filamento en las branquias en *Clarias gariepinus* expuestas a concentraciones de GF de 19, 42, 94, 207 y 455 mg/L durante 96 h de exposición (Ayoola, 2008).

Los resultados obtenidos para la presentación comercial demostraron nuevamente las diferencias entre las presentaciones de los plaguicidas. La disminución de la excreción para ambos grupos expuestos a CPF, se asoció con un menor metabolismo del alimento, esto debido a que dichos peces, durante la exposición, comieron menos alimento. Si bien esta asociación se registró de forma observacional durante el bioensayo, y debería demostrarse experimentalmente, creemos que podría deberse al propio efecto de este insecticida como alquilfosfato, que entre los efectos que produce se encuentran disminución del apetito y depresión. Tal es el caso de un estudio realizado por El-Bouhy et al., 2018 donde expusieron a tilapia (*Oreochromis niloticus*) a concentraciones de 1.32 y 2.64 $\mu\text{g/L}$ de CPF (Chlorzane) por 8 semanas y observaron una pérdida del apetito durante la exposición, a pesar de que no presentaban signos clínicos de intoxicación al plaguicida. Por otra parte, el GF, al ser un plaguicida hidrosoluble se elimina relativamente rápido del organismo (48 h), sin tendencia a bioacumularse (ATSDR, 2020), además de que se ha reportado que puede inhibir a la enzima glutamina sintetasa, que cataliza la formación de glutamina a partir de amoníaco y ácido glutámico. Específicamente la inhibición de la isoforma hepática conlleva a la acumulación de NH_3 en la sangre (Butterworth, 2019; Stalikas & Konidari, 2001), lo cual, podría explicar el incremento significativo en la excreción de NH_3 que observamos en el grupo expuesto a la dosis mayor de GF y para tres de las mezclas. Esto debido a que el NH_3 es un metabolito tóxico, y su exceso desencadena el funcionamiento de los sistemas de desintoxicación o utilización, principalmente mediante la formación de sustancias nitrogenadas menos tóxicas (Begum, 2004).

Los estudios que existen hasta el momento indican que el movimiento de desechos nitrogenados a través de los tejidos de los teleósteos como el pez cebra, es más

complicado de lo que se plantea, la gran mayoría de las investigaciones son correlativas y en estudios *in vitro*, de ahí que mayor cantidad de estudios sobre la toxicocinética y toxicodinámica de este tipo de exposición son necesarios para lograr un mayor entendimiento de estos resultados.

4.4. La exposición a los plaguicidas de grado técnico provoca retención de líquido en los peces y la presentación comercial disminuye la cantidad de agua corporal

El agua corporal es el líquido que supone el porcentaje mayoritario en el peso total y composición de un organismo. Su cuantificación permite conocer las relaciones cuantitativas entre los componentes corporales y cambios en los mismos provocados por diferentes factores, como la exposición a xenobióticos (Kaushik et al., 2011).

En nuestro estudio, dos de los grupos co-expuestos al grado técnico de los plaguicidas, presentaron un aumento en la cantidad de agua corporal, indicativo de que estas mezclas pueden estar provocando una retención de líquido en estos organismos. Si bien este efecto ha sido relacionado con alteraciones hormonales, en algunos casos se ha especulado que puede deberse a procesos de inflamación o afecciones cardíacas y renales (Macedo & Mehta, 2010).

En el caso de los peces, al ser las branquias el principal órgano encargado de la excreción, se cree que este efecto observado, podría estar relacionado con la excreción nitrogenada en estos grupos expuestos. Recordemos que específicamente el grupo expuesto a 0.3 µg/L CPF + 1000 µg/L GF, presentó una disminución de la excreción, fenómeno asociado a la osmorregulación (regulación de agua y el equilibrio de iones dentro de los fluidos corporales) en los organismos acuáticos. Es decir, a pesar de que la excreción nitrogenada es conocida como el proceso para la liberación de desechos tóxicos del organismo, también se encuentra vinculado con el mantenimiento de las concentraciones de componentes de fluidos corporales (Na⁺, K⁺ y Cl⁻) en niveles apropiados para llevar a cabo actividades metabólicas (Marshall, 2002). Es por ello, que, al disminuir la excreción de estos peces, podría estar indicando una afectación en el equilibrio hídrico de los peces. Como se mencionó anteriormente, la exposición a ambos plaguicidas (CPF y GF) se ha relacionado con daño a las branquias, uno de los órganos principales en la regulación de la concentración osmótica y excreción en peces adultos.

Por otra parte, dos de los grupos de exposición a los plaguicidas presentación comercial, presentaron disminución significativa en el porcentaje de agua corporal, específicamente aquellos expuestos a ambas dosis de CPF. Si bien las dosis de exposición a las que se han reportado signos clínicos relacionados con la inhibición de la enzima AChE en personas expuestas a CPF y algunos estudios en animales son del orden de miligramos y gramos, muy por encima a las dosis que empleamos en nuestro estudio, no descartamos la posibilidad de que la disminución significativa del agua corporal observada en nuestros resultados se deba a un cierto grado de inhibición de esta enzima como consecuencia de la unión del CPF a sus sitios catalíticos.

Esto concuerda con algunos reportes pioneros en el tema, encontrados en la literatura, donde toros expuestos por vía tópica a CPF por única exposición (1 h) mostraron extrema deshidratación y pérdida de peso, lo que los autores relacionaron con un cierto grado de inhibición de la acetilcolinesterasa, aun cuando los animales no tuvieron signos clínicos de intoxicación (Lein et al., 1982). Esta suposición se confirmó con el ensayo realizado para la determinación de la actividad enzimática de AChE, donde se pudo observar una disminución en la actividad de dicha enzima. Aunque para el grupo expuesto a 0.3 µg/L de CPF no se observaron diferencias significativas, si tuvo una tendencia a la baja. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que peces cebra adultos han mostrado hasta un 70% de inhibición de AChE en concentraciones de exposición de CPF de 0.1 y 35 µg/L (Tilton et al., 2011), lo que puede deberse a que el CPF es un compuesto de alquilfosfato que puede inhibir directamente la función de la AChE mediante la fosforilación del residuo de serina en el dominio activo de la enzima (Kasteel et al., 2020).

4.5. La exposición a glifosato anula el efecto inhibitorio del CPF sobre la AChE en los peces

La inhibición de la AChE es de los efectos más conocidos que se reportan cuando existe exposición a organofosforados. Esta inactivación de la AChE produce la liberación descontrolada de acetilcolina que impide la conducción nerviosa, y provoca síntomas agudos como visión borrosa, salivación, vómitos, confusión, pérdida de conciencia y dificultad respiratoria (Perry et al., 2020). Si bien no se encuentran reportes en la literatura, de que la exposición individual a GF, aumente la actividad de la AChE, si se ha reportado la ausencia de inhibición o aumento de la actividad de la

enzima en grupos co-expuestos a CPF y GF, que sugieren una interacción entre ambos compuestos, comportamiento que se observó en una de las mezclas para el grado técnico y también en la presentación comercial. Osten et al., 2005 y Bonifacio et al., 2016 si bien no concluyen la explicación de dicho efecto, si han reportado que el GF es capaz de suprimir la actividad inhibitoria del CPF sobre la AChE desde los primeros días de exposición. Específicamente en estos estudios se expusieron *Gambusia yucatanana* a 0.006 y 0.1 mg/L de CPF y 9.4 a 150 mg/L de GF durante 96 h y *Cnesterodon decemmaculatus* a 0.00084 y 0.0084 µL/L de CPF y 0.2 y 2 mg/L de GF durante 42 días, respectivamente. Lo anterior demuestra que este efecto parece depender de la combinaciones entre ambos plaguicidas, específicamente para concentraciones muy bajas del CPF.

Como parte del resto de los resultados de la presentación comercial, se mencionó anteriormente, que el grupo expuesto a 5 µg/L CPF presentó una disminución de la enzima, la cual se atribuyó al propio efecto del CPF como alquilfosfato (Kasteel et al., 2020), efecto que se mantuvo en uno de los grupos expuestos a concentraciones aleatorias de 5 µg/L CPF +500 µg/L GF.

4.6. La exposición a CPF y glifosato, grado técnico y presentación comercial induce daño oxidante en el hígado del pez cebra

Nuestros resultados mostraron que los plaguicidas tanto grado técnico como presentación comerciales producen daño oxidante en el pez cebra, evidenciado por alteraciones en los niveles de MDA, POAPs, GST, GGT y PON-1 en el hígado del pez cebra. A continuación, se discute la importancia de cada uno de estos biomarcadores y su relación con la exposición a plaguicidas.

Los POAPs son productos proteicos reticulantes que se forman durante el EsOx mediante la reacción de proteínas plasmáticas con oxidantes clorados. Su acumulación ha sido considerada un factor de riesgo para el desarrollo de ECV y renales, debido a la alteración del equilibrio redox por el aumento de ROS y el ambiente inflamatorio que puede desarrollarse, capaz de intensificar las alteraciones metabólicas (Hou & Liu, 2014).

Los resultados obtenidos para el grado técnico evidenciaron que la mayor concentración de CPF en los peces expuestos individualmente, produce una acumulación de POAPs, que podría deberse a que, al ser la dosis más alta del

plaguicida, es donde mayor daño oxidante se produce. Los niveles elevados de POAPs se han relacionado con patologías como aterosclerosis, diabetes mellitus y nefropatías (Cao et al., 2014). Asimismo, el daño a las proteínas por ROS produce carbonilos y modificaciones de aminoácidos, como resultado del daño directo de los radicales libres a varios grupos amino como lisina, arginina, prolina y treonina. Esto también puede conducir a la disfunción de canales de membrana e inactivación de enzimas (Strobel et al., 2011). Gupta et al., 2010 estudiaron el papel de las ROS en la inducción de daño al ADN y apoptosis por exposición a CPF en concentraciones de 0.015, 0.15, 1.5 y 15 µg/L en *Drosophila Melanogaster*, donde pudieron establecer que a concentraciones de 1.5 y 15 µg/L existía una correlación positiva entre la generación de ROS y el contenido de carbonilos proteicos, indicativo de daño a las proteínas celular en dichos organismos expuestos.

Por otra parte, la disminución observada de los POAPs para la menor concentración de GF, no es significativo de un efecto protector, sino que a esa concentración posiblemente se activan de forma más rápida y eficiente de los mecanismo de recambio y degradación de las proteínas (Fan et al., 2011), es decir, un reclutamiento de los mecanismos compensatorios a la respuesta antioxidante.

El aumento observado de POAPs para las dos concentraciones altas de los plaguicidas en la presentación comercial, como se mencionó anteriormente para el grado técnico, puede deberse a un mayor daño oxidante producido a las células por las altas concentraciones (Gupta et al., 2010). Esto podría ser un indicativo de una afectación a las enzimas de defensa antioxidante, e incluso de los sistemas de degradación de las proteínas oxidadas que no son capaces de eliminarlas, ya sea por su exceso o deterioro del propio proteasoma (Daggett, 1987), provocando su aumento en la célula. No se descarta la posibilidad de que la formulación de ambos plaguicidas pueda estar influyendo en dicho efecto. Para las mezclas de CPF y GF, se obtuvo un efecto contrario, observando de igual manera un efecto de antagonismo con respecto a las exposiciones individuales, que podría deberse a la activación más eficiente de los mecanismos tiempo-acción mencionados anteriormente para el grado técnico.

El MDA se ha utilizado durante muchos años como biomarcador de la peroxidación lipídica de los ácidos grasos, para determinar el EsOx en situaciones clínicas. En condiciones de estrés, el MDA tiene una alta capacidad de reacción con múltiples biomoléculas como proteínas o ADN, de ahí que su producción excesiva se ha

asociado con enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y el cáncer (Ayala et al., 2014). El aumento en el contenido de MDA se ha asociado con una mayor tasa de producción y ataque de ROS a moléculas celulares como lípidos y proteínas de membrana, lo que produce a su vez la inestabilidad de la membrana e induce peroxidación lipídica (Zhang et al., 2013). Esta explicación podría atribuirse al efecto observado en los hígados de los peces expuestos a la mayor concentración de GF tanto para el grado técnico y la presentación comercial. Esto debido a que el EsOx es uno de los mecanismos tóxicos donde se ha demostrado que la exposición a altas concentraciones de GF induce la sobre producción de ROS, ya sea en un modelo de rata (135 mg/Kg de GF por 14 días) (El-Shenawy, 2009), o en modelo de *Danio rerio* (1000 µg/ L de GF por 4 horas) (Lanzarin et al., 2021).

Por otra parte, la disminución significativa de MDA en los otros grupos expuestos podría deberse a una menor generación de productos oxidativos como consecuencia de una mayor acción antioxidante sobre las ROS. Este planteamiento no ha sido completamente demostrado, sin embargo, estudios han reportado correlaciones significativas entre el aumento de las defensas antioxidantes y los niveles bajos de MDA en organismos acuáticos expuestos a contaminantes (Ferreira et al., 2019; Silva et al., 2018).

Tal es el caso, de Ferreira et al., 2019, que reportaron este comportamiento en ostras expuestas a metales (Al, Cd y Zn) durante 45 días, resultado que explican por una reducción del EsOx debido a un aumento de la actividad de la catalasa. Además, Silva et al., 2018, realizaron exposición en peces macho adultos de tilapia de Nilo expuestos a parabenos durante 48 horas y observaron disminución en los niveles de MDA, que se debió al aumento de las defensas antioxidantes (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa), inhibiendo la peroxidación lipídica.

La GGT es una enzima hepática, empleada habitualmente en la clínica como marcador para la comprensión de las funciones fisiológicas e indicar lesión hepática. Su función principal es el catabolismo extracelular del glutatión, que desempeña un papel relevante en la protección de las células contra los oxidantes producidos durante el metabolismo (Kunutsor, 2016). Los resultados de este estudio mostraron una disminución significativa de la actividad de la enzima en los peces expuestos tanto para los grupos de grado técnico como presentación comercial. Si bien los reportes de GGT en la literatura por lo general están asociados con niveles altos de su actividad,

relacionados directamente con un daño hepático, una disminución significativa de GGT podría ser indicativo también de alteraciones hepáticas o gastrointestinales (Muñoz et al., 1988). Esto debido a que dicha enzima participa en los procesos de detoxificación y respuestas antioxidante ligado al substrato glutatión, a partir de la transferencia de la fracción gamma-glutamil del substrato a un Xb para hacerlo más soluble y depurarlo (Rojas et al., 2000). Esta disminución, podría estarse produciendo por tres posibles razones: inhibición en la biosíntesis de la enzima, como reportaron (Cattani et al., 2014), al exponer a ratas Wistar hembras a 1000 mg/Kg/d de GF desde el día 5 de gestación hasta el día 15 de lactancia.

Banaee et al., 2019 y Cattani et al., 2017 plantearon, además, que podría deberse a una disminución en los niveles de GSH, por lo que, al no existir la cantidad suficiente de substrato, la enzima no está llevando a cabo correctamente su función, lo cual observaron a partir de la exposición de *Cyprinus carpio* a 100 mg/L CdCl₂ por 30 días y ratas Wistar hembras a 70 mg/Kg/día de GF desde el día 5 de gestación hasta el día 15 de lactancia, respectivamente.

Por último, también puede estar indicando un daño en la membrana de los hepatocitos producto de procesos inflamatorios generados durante la biotransformación de los plaguicidas. Esto debido a que al ser GGT una enzima integral de membrana, no puede llevar a cabo su función si existen por ejemplo alteraciones en la asimetría de la membrana celular, fundamental en propiedades estructurales como el grosor, el empaquetamiento lipídico, la elasticidad o la fluidez (Søfteland & Olsvik, 2022). Søfteland & Olsvik, 2022 mostraron que la exposición a GF en concentraciones de 8.45 mg/L a 84.5 mg/L durante 48 h producía alteración en la fluidez de la membrana celular, al afectar la actividad de las fosfolipasas y lisofosfolípidos en un co-cultivo de hepatocitos y células de riñón de salmón del Atlántico. Al igual, Uzun & Kalender, 2013 realizaron un estudio donde se expusieron a ratas Wistar macho a 5.4 mg/kg de CPF durante 28 días, y pudieron observar alteración en la permeabilidad de la membrana de los hepatocitos, al detectar la presencia de enzimas citosólicas como lactato deshidrogenasa y alanina aminotransferasa en torrente sanguíneo.

La GST es una enzima metabólica de fase II que participa en la detoxificación de contaminantes incluidos los plaguicidas, a partir de catalizar la unión de grupos electrófilos de los Xbs con grupos sulfidrilos de GSH y aumentar su hidrofobicidad para que puedan ser excretados de los organismos (Kaplowitz, 1980). También se

considera que puede inhibir la lipoxidación, de ahí que es considerada una enzima que hace frente al EsOx (Tao et al., 2013). Un aumento en la actividad de la enzima podría ser indicativo de su respuesta antioxidante para desempeñar la función de eliminar los excesos de ROS y MDA o bien de los proceso de detoxificación a partir de la conjugación de GSH (Mekonnen et al., 2019; Zager & Johnson, 2022). Esto podría explicar el aumento observado en dos de los grupos expuestos al grado técnico de los plaguicidas.

Tal y como reportaron Fadhlouai & Lavoie, 2021 que al exponer a caracoles *Lymnaea* a 200 µg/L de GF durante 21 días, se observó un aumento en la actividad de GST, que atribuyeron a la desintoxicación y conjugación con GSH para una mayor solubilidad del compuesto y facilitar su excreción. Por otra parte, Damiens et al., 2004 y Mekonnen et al., 2019 también plantearon que compuestos lipofílicos como malatión y CPF pueden aumentar la actividad de GST como parte de este proceso de detoxificación, o bien para hacer frente a procesos de EsOx en el organismo y contrarrestar el daño inducido por las ROS, aun cuando no se observe un aumento de MDA, indicativo de un producción de radicales libres con inmediata eliminación, sin presentar consecuencias fisiológicas.

Con respecto a la disminución observada en dos de los grupos del grado técnico, podría deberse a dos posibles hipótesis: los mecanismos compensatorios tiempo - acción frente al impacto del EsOx (Fan et al., 2011) o agotamiento del GSH (Cattani et al., 2017). En el primer caso, debido a que la respuesta antioxidante se induce de forma más rápida para esas concentraciones, tal y como plantearon Zhang et al., 2023 en su estudio realizado en carpa común (*Cyprinus carpio*) expuesta individualmente y en mezcla a 25 µg/L CPF y 3,5 mg/L GF. Con respecto al agotamiento de GSH, es indicativo que la enzima no cuenta con suficiente sustrato para convertir y llevar a cabo la detoxificación, recordando que en ambos grupos también se ve afectada la actividad de GGT, enzima de detoxificación que emplea GSH como sustrato. Este agotamiento en el contenido de GSH, se ha relacionado con la generación de ROS en organismos expuestos a Xbs, tal como reportaron Villaverde et al., 2004 en su estudio *in vitro*, donde observaron que la exposición a talio provocaba una disminución de GSH a partir del aumento de ROS, desencadenando la inhibición de enzimas dependiente del glutatión como glutatión reductasa o glutatión peroxidasa.

El comportamiento observado en la presentación comercial (aumento de la actividad de GST), muy posiblemente puede deberse como respuesta antioxidante de la enzima

frente al estrés que pueden estar produciendo las mayores concentraciones de los plaguicidas y su mezcla. Además, gran parte de este estrés se produce durante la biotransformación de dichos compuestos, que ya se conoce que GST cataliza la conjugación de plaguicidas como el CPF y varios productos de la biotransformación de fase I con GSH, provocando un aumento de su actividad (Mekonnen et al., 2019). Es importante mencionar que este efecto solo se observó para la presentación comercial, por lo que podría estar influido por la pureza del reactivo. Tal es el caso de estudios realizados como, por ejemplo, Duarte-Restrepo et al., 2020 en crustáceo *Litopenaeus vannamei* expuesto por cuatro días a 1.3 µg/L de CPF (Lorsban), así como por Santos et al., 2018 en peces jundiara expuestos a 0.37 mg/L de GF (Roundup) durante 96 h y Bianchini & Monserrat, 2007 en cangrejos *Chasmagnathus granulatus* expuesto a 0.05 mg/kg/día de metil-paratión (Folidol 600) por tres días. Con respecto, al aumento obtenido para la mezcla de ambas concentraciones es indicativo de una magnificación de los efectos por la unión de ambas concentraciones de los plaguicidas individuales.

La PON-1 es una esterasa asociada a la HDL, que desempeña un papel en varias enfermedades, incluidas la diabetes mellitus y la aterosclerosis. Su baja actividad se ha asociado con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares (Shunmoogam et al., 2018).

La disminución de la actividad de la enzima PON-1 en hígado debido a la exposición a los plaguicidas, pero fundamentalmente a CPF, puede producir una acumulación de los metabolitos tóxicos de los plaguicidas como el CPF-oxón, aumentando las posibilidades de efectos nocivos en el organismo (Sogorb et al., 2014).

Como ya se conoce, el EsOx juega un papel fundamental en la toxicidad de los compuestos organofosforados a través de la formación de ROS durante su metabolismo, que resulta en el desarrollo de reacciones inflamatorias (Fortunato et al., 2006). Algunos estudios han reportado que estas situaciones de estrés en condiciones inflamatorias participan en la regulación negativa del gen *PON1* (Lee et al., 2007; Ray et al., 2010). Van Lenten et al., 2001 demostraron que los fosfolípidos oxidados que se encuentran en las LDL ligeramente oxidados alteran la expresión de dicho gen a partir de la citocina inflamatoria IL-6.

Aunque aún no son claros los mecanismos por los cuales los compuestos organofosforados son capaces de regular el gen *PON1*. Medina-Díaz et al., 2017 y Shih et al., 2006, plantearon tres posibles mecanismos que podrían estar involucrados

en esta regulación transcripcional negativa. Como es la modulación del promotor PON1 por citocinas proinflamatorias (IL-6) liberadas durante la biotransformación de los compuestos organofosforados, otro posible mecanismo es la modulación por citoquinas, que disminuye la expresión del gen PPAR- δ (receptor que regula positivamente la expresión de genes antioxidantes, como la superóxido dismutasa y catalasa), desencadenando la disminución de la síntesis de HDL y, como consecuencia, la expresión del gen PON1; y por último la represión de la expresión génica por FGFR4 hepático mediante la proteína heterodímero pequeño (SHP), que ejerce su actividad sobre el factor de transcripción alfa nuclear hepático (HNF- α), presente en el promotor PON-1. Estas hipótesis fueron planteadas después de una exposición en células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) a metilparatión y CPF (2, 4, 6, and 8 μ M) por 24, 48, and 72 h y observar una disminución en los niveles de ARNm y de la actividad de la enzima PON-1 (Medina-Díaz et al., 2017). Nuestros resultados muestran que las respuestas y mecanismos adaptativos frente al EsOx de los peces dependen de las concentraciones y las mezclas, la pureza del contaminante, el tiempo de exposición y el modelo de exposición.

4.7. La exposición a plaguicidas de grado técnico y presentación comercial modifican los niveles proteicos de AT1R, AT2R y PPAR- α

El AT1R y AT2R son dos subtipos de receptores de Ang acoplados a proteínas G que median las acciones de la Ang II, principal regulador que controla la presión arterial. Se ha considerado que presentan efectos opuestos en el sistema cardiovascular, mientras el AT1R se ha relacionado con la vasoconstricción, retención de sodio, proliferación celular y procesos pro-inflamatorios, AT2R se ha vinculado con la regeneración y reparación de tejidos, la vasodilatación y anti-proliferación (Kaschina & Unger, 2003). Se conoce que la sobreactivación del eje Ang II-AT1R en el corazón causa hipertrofia cardíaca y otros daños cardiovasculares, debido a que la morfología cardíaca exhibe una hipertrofia masiva y las estructuras de las aurículas y los ventrículos se vuelven significativamente más grandes (Lu et al., 2015).

Al analizar el aumento de AT1R en los grupos expuestos tanto al grado técnico como presentación comercial, podemos sugerir que esta sobreexpresión del AT1R, puede deberse a una mayor generación de ROS mediante la activación de la NAD(P)H oxidasa, que es la principal fuente de producción de O_2^- en las células vasculares

(Zalba et al., 2001). Esto promueve un ambiente oxidante, inflamatorio y profibrótico y a su vez un incremento en los niveles de ROS y del receptor AT1R (Kranzhöfer et al., 1999). Esta hiperactividad del receptor puede afectar la función de órganos y tejidos periféricos (Forrester et al., 2018), de la hipertensión arterial y de procesos profibróticos, proinflamatorios y proliferativos a nivel vascular, cardíaco y renal (Miller & Arnold, 2019a; Paz Ocaranza et al., 2020).

Por otra parte, el aumento en los niveles proteicos de AT2R observado en los grupos expuestos, podría estar indicando un efecto compensatorio que intenta contrarrestar los efectos debido a la sobreactivación de AT1R (Kaschina & Unger, 2003). Si bien los niveles del AT2R en etapa adulta son bajos en condiciones fisiológicas, su expresión puede aumentar en situaciones patológicas como la obesidad, la inflamación, la hipertensión arterial o daño vascular (Steckelings et al., 2010), a través de la síntesis de *NO*, induciendo así efectos vasodilatadores, antifibróticos y antiinflamatorios que contrarrestan, en parte, los efectos mediados por la activación del AT1R (Miura et al., 2010). Este efecto fue demostrado en ratas *Zucker* macho obesas donde al estimularlas farmacológicamente al AT2R se mejoró su respuesta diurética por un aumento de *NO*, efecto que los autores relacionaron con un incremento en la actividad del eje ECA-2/Ang (1-7)/Receptor Mas y una reducción del eje ECA/ AT1R, observando un descenso de la presión arterial y una sobreexpresión del AT2R (Hakam & Hussain, 2005).

Las disminuciones significativas observadas en los niveles proteicos de los receptores AT1 y AT2 en los grupos co-expuestos al grado técnico de los plaguicidas y la presentación comercial podrían estar indicando una desensibilización de los receptores (Forrester et al., 2018; Turu et al., 2019). Este efecto se ha demostrado para periodos prolongados donde han existido niveles elevados de Ang-II, que producen una disminución en la intensidad de su respuesta; sin embargo, creemos que podría ser indicativo de que la exposición aguda por 5 días a las mezclas de los plaguicidas constituye tiempo suficiente para desencadenar dicha respuesta.

Los estudios experimentales hasta el momento, que involucran ambos receptores (AT1 y AT2), han sido realizados en modelos mamíferos expuestos a contaminantes atmosféricos (material particulado) o en relación con enfermedades como la hipertensión, Covid-19 y Parkinson, sin embargo, no se ha explorado si la exposición a plaguicidas afecta ambos componentes del SRA, ya sea en modelos de roedores o en *Danio rerio*. Se ha reportado, además, que la exposición a plaguicidas

organofosforados puede desencadenar la remodelación tisular en el tejido cardíaco. Por ejemplo, los músculos cardíacos de ratas hembra expuestas a 8, 10, 12 y 20 mg/kg de PC de diazinón presentaron grandes áreas de fibras musculares degeneradas con pérdida de estrías transversales (Abdou & El Mazoudy, 2010). En otro estudio, ratas albinas macho expuestas a CPF a dosis de 6.75 mg/kg de PC manifestaron degeneración en las fibras miocárdicas con vacuolización citoplasmática y separación de miofibrillas cardíacas (Wakf et al., 2018). Zafiroopoulos et al., 2014 reportaron que la exposición a niveles bajos de CPF (8.7 mg/ Kg/d) desencadenó fibrosis, infiltración hemorrágica de tejidos miocárdicos y degeneración de células musculares en conejas neozelandesas.

Cuando los mecanismos adaptativos de supervivencia cardíaca no pueden mantener la homeostasis celular, la alteración del metabolismo energético y la función contráctil, debido a factores desencadenantes de estrés como hipertensión, arritmias y enfermedades valvulares, el corazón adulto responde mediante una remodelación parcial o completa del programa genético cardíaco del estado adulto al fetal (Rajabi et al., 2007). Dentro de los genes que se ven afectados en este proceso, se encuentra PPAR- α .

La disminución de PPAR- α , obtenida en los grupos co-expuestos podría estar indicando un proceso de reprogramación cardíaca (Rajabi et al., 2007). Se ha reportado la disminución de este receptor en estado adulto se asocia directamente con un proceso remodelación del miocardio, donde el corazón ha vuelto a un estado fetal donde se requiere una mayor resistencia y por lo tanto cambios en el metabolismo. Se ha reportado que la activación de PPAR- α tiene un efecto directo sobre el corazón que inhibe la inflamación cardíaca, la deposición de colágeno y reduce el EsOx en la hipertensión inducida por Ang-II (Sher, 2006) a partir de la estimulación de la síntesis de eNOS, que conlleva al aumento NO que sugiere un efecto vasoprotector (Han et al., 2005).

Por otro lado, el aumento de PPAR- α obtenido para el grupo expuesto a la menor concentración de GF para el grado técnico, también constituye un factor de riesgo para el corazón, puesto que su aumento es indicativo de una acumulación de lípidos intramiocárdicos, fenómeno que ocurre en pacientes con diabetes y obesidad ya que participa en la expresión de genes implicados en el metabolismo de los lípidos, incluida la absorción y oxidación de ácidos grasos (Hamblin et al., 2009)

Además, el incremento observado en PPAR- α , corresponde también a la sobreactivación de AT1R, y se ha planteado que una sobreexpresión de este receptor de angiotensina constituye un estímulo mucho más fuerte en el proceso de remodelación cardíaca, incluso más que la sobreproducción de Ang-II (Tadevosyan et al., 2010), debido a que trae consigo un proceso fibrosis, hipertrofia e insuficiencia cardíaca relacionado con una reprogramación del miocardio.

En conjunto nuestros resultados demuestran modificaciones en las respuestas fisiológicas del pez, con daño oxidante hepático y alteraciones cardiotóxicas como evidencia de la toxicidad por la exposición a los plaguicidas CPF y GF, específicamente en nuestro caso por la sustancia activa (grado técnico).

5. Conclusiones

Este estudio realizado en el modelo de pez cebra proporciona evidencia sobre los efectos cardiotoxicos y de EsOx que produce la exposición a clorpirifos, glifosato y sus mezclas en concentraciones ambientalmente relevantes.

1. La exposición por 5 días a concentraciones de referencia a los plaguicidas CPF y GF provocó alteraciones en respuestas fisiológicas del pez cebra:
 - De forma individual los plaguicidas provocan un aumento del consumo de oxígeno para ambas presentaciones de los plaguicidas. La combinación de ambos plaguicidas tiene un efecto antagónico sobre el consumo de oxígeno.
 - La presentación comercial de GF provocó un aumento en la excreción nitrogenada.
 - Los grupos expuestos a la presentación comercial de CPF de forma individual presentaron una disminución en la cantidad de agua corporal, mientras que dos mezclas del grado técnico tuvieron un aumento del porcentaje de agua corporal.
2. Los grupos expuestos a 5 µg/L de CPF y a 1000 µg/L de GF de forma individual para ambas presentaciones de los plaguicidas aumentaron los niveles de POAPs y MDA en hígado, respectivamente.
3. La exposición a CPF y GF, individual y en combinación tanto para la presentación comercial como el grado técnico, disminuyen la capacidad antioxidante de la actividad enzimática de GGT y PON-1 en los peces a nivel hepático.
4. Las mayores concentraciones de los plaguicidas y su mezcla en la presentación comercial evidenciaron un aumento en la actividad enzimática de GST, mientras que dicha mezcla para el grado técnico presentó una respuesta diferencial.
5. La exposición individual y en combinación a los plaguicidas de ambas presentaciones afectaron los niveles proteicos de los receptores AT1 y AT2 en los corazones de los peces, especialmente la combinación de 5 µg/L de CPF con 1000 µg/L de GF, que produjo una disminución de los niveles proteicos de ambos receptores.
6. La co-exposición a la presentación comercial de los plaguicidas indujo el proceso de reprogramación cardíaca a partir de la disminución de los niveles proteicos de PPAR-α.

6. Perspectivas

1. Realizar la exposición a los plaguicidas a partir del alimento y por un tiempo más prolongado (exposición crónica) para una mayor representación de la exposición a nivel poblacional.
2. Determinar los marcadores de EsOx en órganos como el corazón a partir de la exposición a los plaguicidas, para conocer si se está produciendo un daño oxidante en el tejido y una afectación de la capacidad antioxidante
3. Evaluar los niveles proteicos de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en el corazón del pez cebra después de la exposición a los plaguicidas, como enzima fundamental en el SRA.
4. Evaluar el gen α -actina esquelética involucrada en el proceso de reprogramación génica cardíaca, a partir de la producción de angiotensina.
5. Llevar a cabo un estudio transgeneracional para conocer si estos efectos observados pueden producir afectaciones en futuras generaciones, a partir de modificaciones epigenéticas.
6. Realizar un estudio de transcriptómica para esclarecer los efectos observados en los grupos expuestos donde se observó un efecto de antagonismo, y conocer que genes pueden estar o incluso siendo regulados a la baja por la co-exposición.

7. Referencias

- Abdou, H. M., & El Mazoudy, R. H. (2010). Oxidative damage, hyperlipidemia and histological alterations of cardiac and skeletal muscles induced by different doses of diazinon in female rats. *Journal of Hazardous Materials*, *182*, 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.06.026>
- Aboubakr, M., Elshafae, S. M., Abdelhiee, E. Y., Fadl, S. E., Soliman, A., Abdelkader, A., Abdel-Daim, M. M., Bayoumi, K. A., Baty, R. S., Elgendy, E., Elalfy, A., Baioumy, B., Ibrahim, S. F., & Abdeen, A. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory potential of thymoquinone and lycopene mitigate the chlorpyrifos-induced toxic neuropathy. *Pharmaceuticals*, *14*(940), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ph14090940>
- Akgul, S. U., Oguz, F. S., Çalışkan, Y., Kekik, C., Gürkan, H., Türkmen, A., Nane, I., & Aydin, F. (2012, July). The effect of glutathion S-transferase polymorphisms and anti-GSST1 antibodies on allograft functions in recipients of renal transplant. *Transplantation Proceedings*, *44*(6), 1679–1684. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.04.004>
- Alipanah, H., Kabi Doraghi, H., Sayadi, M., Nematollahi, A., Soltani Hekmat, A., & Nejati, R. (2022). Subacute toxicity of chlorpyrifos on histopathological damages, antioxidant activity, and pro-inflammatory cytokines in the rat model. *Environmental Toxicology*, *37*, 880–888. <https://doi.org/10.1002/tox.23451>
- ATSDR. (2020). *Toxicological Profile for Glyphosate*.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D. M., Verdile, G., & Martins, R. N. (2012). Regular care and maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. *Journal of Visualized Experiments*, *69*(4196), 1–8. <https://doi.org/10.3791/4196>
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2014). Landes Bioscience. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Ayoola, S. O. (2008). Histopathological Effects of Glyphosate on Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). *J. Agric. & Environ. Sci*, *4*(3), 362–367.
- Aztatzi-Aguilar, O. G., Uribe-Ramírez, M., Arias-Montaña, J. A., Barbier, O., & De Vizcaya-Ruiz, A. (2015). Acute and subchronic exposure to air particulate matter induces expression of angiotensin and bradykinin-related genes in the lungs and heart: Angiotensin-II type-I receptor as a molecular target of particulate matter exposure. *Particle and Fibre Toxicology*, *12*(17), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12989-015-0094-4>
- Bambino, K., & Chu, J. (2017). Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 124, pp. 331–367). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.007>
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Gholamhosseini, A., Heidarieh, H., & Fereidouni, M. S. (2019). Acute exposure to chlorpyrifos and glyphosate induces changes in hemolymph biochemical parameters in the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, *222*, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.05.003>
- Banaee, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A., Haghi, B. N., Akhlaghi, M., & Derikvandy, A. (2019). Evaluation of single and combined effects of cadmium and microplastic particles on biochemical and immunological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, *236*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.066>
- Bass, J., & Takahashi, J. S. (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*, *330*(1349), 1349–1354. <https://doi.org/10.1126/science.1195027>
- Begum, G. (2004). Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus* (linn) and recovery response. *Aquatic Toxicology*, *66*, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.08.002>

- Begum, H., Murugesan, P., & Tangutur, A. D. (2022, June 1). Western blotting: A powerful staple in scientific and biomedical research. *BioTechniques*, 73(1), 59–69. <https://doi.org/10.2144/btn-2022-0003>
- Bejarano, F., & Rojas-García, AE. (2023, March). Informe sobre el clorpirifos en México. Razones para su prohibición. *Red de Acción Sobre Plaguicidas y Alternativas En México (RAPAM)*, México, 1–25.
- Bhattacharyya, T., Nicholls, S. J., Topol, E. J., Zhang, R., Yang, X., Schmitt, D., Fu, X., Shao, M., Brennan, D. M., Ellis, S. G., Brennan, M.-L., Allayee, H., Lusic, A. J., & Hazen, S. L. (2008). Relationship of Paraoxonase 1 (PON1) Gene Polymorphisms and Functional Activity With Systemic Oxidative Stress and Cardiovascular Risk. *JAMA Network*, 299(11), 1265–1276. <https://doi.org/10.1001/jama.299.11.1265>
- Bianchini, A., & Monserrat, J. M. (2007). Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: Protective role of Sesamol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(1), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.03.006>
- Bonifacio, A. F., Cazenave, J., Bacchetta, C., Ballesteros, M. L., De Los Ángeles Bistoni, M., Amé, M. V., Bertrand, L., & Hued, A. C. (2016). Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecological Indicators*, 67, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.02.011>
- Bonifacio, A. F., & Hued, A. C. (2019). Single and joint effects of chronic exposure to chlorpyrifos and glyphosate based pesticides on structural biomarkers in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere*, 236. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.042>
- Bonifacio, A. F., Zambrano, M. J., & Hued, A. C. (2020). Integrated ecotoxicological assessment of the complex interactions between chlorpyrifos and glyphosate on a non-target species *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Chemosphere*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127782>
- Bradford, M. M. (1976, January 29). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 72, 248–254.
- Braun, M. H., Steele, S. L., Ekker, M., & Perry, S. F. (2009). Nitrogen excretion in developing zebrafish (*Danio rerio*): A role for Rh proteins and urea transporters. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 296(5). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90656.2008>
- Breck, J. E. (2014). Body composition in fishes: Body size matters. In *Aquaculture* (Vol. 433, pp. 40–49). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.049>
- Bucking, C. (2017). A broader look at ammonia production, excretion, and transport in fish: a review of impacts of feeding and the environment. In *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* (Vol. 187, pp. 1–18). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00360-016-1026-9>
- Bucking, C., Lemoine, C. M. R., & Walsh, P. J. (2013). Waste Nitrogen Metabolism and Excretion in Zebrafish Embryos: Effects of Light, Ammonia, and Nicotinamide. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 319(7), 391–403. <https://doi.org/10.1002/jez.1802>
- Butterworth, R. F. (2019). Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis: Pathology and Pathophysiology. In *Drugs* (Vol. 79, Issue 1, pp. 17–21). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40265-018-1017-0>
- Campbell, F. M., Kozak, R., Wagner, A., Altarejos, J. Y., Dyck, J. R. B., Belke, D. D., Severson, D. L., Kelly, D. P., & Lopaschuk, G. D. (2002). A role for peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: Reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPAR α are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), 4098–4103. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106054200>
- Cano-García, A., Ochoa-Fuentes, Y. M., Ceballos-Ceballos, A. G., & Cerna-Chávez, E. (2023). Residuos de glifosato en cereales de desayuno de origen internacional y

- nacional comercializados en Saltillo, Coahuila. *Horizonte Sanitario*, 22(2), 383–391. <https://doi.org/10.19136/hs.a22n2.5489>
- Cao, W., Hou, F. F., & Nie, J. (2014). AOPPs and the progression of kidney disease. In *Kidney International Supplements* (Vol. 4, pp. 102–106). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/kisup.2014.19>
- Cartner, S. C., Eisen, J. S., Farmer, S. C., Guillemain, K. J., Kent, M. L., & Sanders, G. E. (2020). Biology, husbandry, diseases and research applications. In *The Zebrafish in Biomedical Research* (pp. 1–696). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817491-3.00014-3>
- Cassis, L., Helton, M., English, V., Burke, G., & Burke Angiotensin, G. (2002). Angiotensin II regulates oxygen consumption. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 282, 445–453. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00261.2001.-Previous>
- Cattani, D., Cesconetto, P. A., Tavares, M. K., Parisotto, E. B., De Oliveira, P. A., Rieg, C. E. H., Leite, M. C., Prediger, R. D. S., Wendt, N. C., Razzera, G., Filho, D. W., & Zamoner, A. (2017). Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. *Toxicology*, 387, 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.001>
- Chance, B. (1965, September 1). Reaction of" Oxygen with the Respiratory Chain in Cells and Tissues The Journal of General Physiology. *Journal of General Physiology*, 163–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1085/jgp.49.1.163>
- Chu, B., Marwaha, K., Sanvictores, T., & Ayers, D. (2022, September 12). *Physiology, Stress Reaction*. National Library of Medicine.
- Costa, L. G., Cole, T. B., Jansen, K. L., & Furlong, C. E. (2008). The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism. In B. Mackness (Ed.), *PARAOXONASE (PON1) AND ORGANOPHOSPHATE TOXICITY* (pp. 209–220). Springer.
- Daggett, V. (1987). Protein Degradation: The Role of Mixed-Function Oxidases. *Pharmaceutical Research*, 4(4), 278–284.
- Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F., & Roméo, M. (2004). Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 138, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.05.010>
- Dardiotis, E., Aloizou, A. M., Siokas, V., Tsouris, Z., Rikos, D., Marogianni, C., Aschner, M., Kovatsi, L., Bogdanos, D. P., & Tsatsakis, A. (2019). Paraoxonase-1 genetic polymorphisms in organophosphate metabolism. *Toxicology*, 411, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.10.012>
- de Melo Tarouco, F., de Godoi, F. G. A., Velasques, R. R., da Silveira Guerreiro, A., Geihs, M. A., & da Rosa, C. E. (2017). Effects of the herbicide Roundup on the polychaeta *Laeonereis acuta*: Cholinesterases and oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135, 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.014>
- Deng, Y., Zhang, Y., Lu, Y., Zhao, Y., & Ren, H. (2016). Hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by the chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl metabolite, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, in orally exposed mice. *Science of the Total Environment*, 544, 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.162>
- Desimal, I., Mukono, J., Unair, K. C., & Mulyorejo Surabaya-60115, J. (2013). THE EFFECTS OF ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES EXPOSURE TO LIVER FUNCTION AND CHOLINESTERASE SERUM ACTIVITY AMONG APPLE GROWERS APPLYING PESTICIDES. *The Indonesian Journal of Public Health*, 10(1), 70–76.
- Díaz-Vallejo, J., Barraza-Villarreal, A., Yáñez-Estrada, L., & Hernández-Cadena, L. (2021). Plaguicidas en alimentos: Riesgo a la salud y marco regulatorio en Veracruz, México. *Salud Publica de Mexico*, 63(4), 486–497. <https://doi.org/10.21149/12297>
- Djouadi, F., Weinheimer, C. J., Saffitz, J. E., Pitchford, C., Bastin, J., Gonzalez, F. J., & Kelly, D. P. (1998). Hepatic and Cardiac Metabolism in PPAR-deficient Mice A Gender-related Defect in Lipid Metabolism and Glucose Homeostasis in Peroxisome Proliferator-activated Receptor-deficient Mice fatty acids • estrogens • myocardial diseases •

- hypoglycemia • cytoplasmic and nuclear receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(6), 1083–1091. <https://doi.org/10.1172/JCI3949>
- dos Santos Teixeira, J. M., da Silva Lima, V., de Moura, F. R., da Costa Marisco, P., Sinhorin, A. P., & Sinhorin, V. D. G. (2018). Acute toxicity and effects of Roundup Original® on pintado da Amazônia. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(25), 25383–25389. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2630-x>
- Duarte-Restrepo, E., Jaramillo-Colorado, B. E., & Duarte-Jaramillo, L. (2020). Effects of chlorpyrifos on the crustacean *Litopenaeus vannamei*. *PLOS ONE*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231310>
- Dunn, J. O. C., Mythen, M. G., & Grocott, M. P. (2016). Physiology of oxygen transport. *BJA Education*, 16(10), 341–348. <https://doi.org/10.1093/bjaed/mkw012>
- Durrington, P. N., Bashir, B., & Soran, H. (2023). Paraoxonase 1 and atherosclerosis. In *Frontiers in Cardiovascular Medicine* (pp. 1–14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1065967>
- Eaton, D. L., Daroff, R. B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L. G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W. C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., & Spencer, P. S. (2008). Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 38, pp. 1–125). <https://doi.org/10.1080/10408440802272158>
- El-Bouhy, Z., Abd El-Hakim, Y., & Mohamed, E. (2018). Chronic Effect of Chlorpyrifos on Biochemical, Immunological Changes and DNA Damage in Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zagazig Veterinary Journal*, 46(1), 51–59. <https://doi.org/10.21608/zvjz.2018.7623>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- El-Nahhal, Y., & El-Nahhal, I. (2021). Cardiotoxicity of some pesticides and their amelioration. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 44726–44754. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14999-9>/Published
- El-Shenawy, N. S. (2009). Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.06.001>
- (EPA), A. de P. A. de los E. U. (2023, May 4). *Dosis de referencia*. Términos. [https://espanol.epa.gov/espanol/terminos-d#:~:text=Dosis%20de%20referencia%20\(Reference%20Dose,durante%20un%20ciclo%20de%20vida.](https://espanol.epa.gov/espanol/terminos-d#:~:text=Dosis%20de%20referencia%20(Reference%20Dose,durante%20un%20ciclo%20de%20vida.)
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991, December 20). CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF 4-HYDROXYNONENAL, MALONALDEHYDE AND RELATED ALDEHYDES. *Free Radical Biology & Medicine*, 11, 81–128.
- Fadhlaoui, M., & Lavoie, I. (2021). Effects of temperature and glyphosate on fatty acid composition, antioxidant capacity, and lipid peroxidation in the gastropod *lymnaea* sp. *Water (Switzerland)*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/w13081039>
- Fan, X.-J., Yu, H., & Ren, J. (2011). Homeostasis and Compensatory Homeostasis: Bridging Western Medicine and Traditional Chinese Medicine. *Current Cardiology Reviews*, 7, 43–46.
- Farías, J. G., Molina, V. M., Carrasco, R. A., Zepeda, A. B., Figueroa, E., Letelier, P., & Castillo, R. L. (2017). Antioxidant therapeutic strategies for cardiovascular conditions associated with oxidative stress. In *Nutrients* (Vol. 9, Issue 966, pp. 1–23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu9090966>
- Ferdinandy, P., Schulz, R., & Baxter, G. F. (2007). Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 59, pp. 418–458). <https://doi.org/10.1124/pr.107.06002>
- Ferreira, C. P., Lima, D., Paiva, R., Vilke, J. M., Mattos, J. J., Almeida, E. A., Grott, S. C., Alves, T. C., Corrêa, J. N., Jorge, M. B., Uczay, M., Vogel, C. I. G., Gomes, C. H. A. M., Bainy, A. C. D., & Lüchmann, K. H. (2019). Metal bioaccumulation, oxidative stress and

- antioxidant responses in oysters *Crassostrea gasar* transplanted to an estuary in southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 685, 332–344. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.384>
- Folmar, L. C., Sanders, H. O., & Julin, A. M. (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 8, 269–278.
- Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., & Eguchi, S. (2018). ANGIOTENSIN II SIGNAL TRANSDUCTION: AN UPDATE ON MECHANISMS OF PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY. *Physiol Rev*, 98, 1627–1738. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2017>.
- Führer, E., Rudolph, A., Espinoza, C., Díaz, R., Gajardo, M., & Camaño, N. (2012). Integrated use of biomarkers (O:N ratio and acetylcholinesterase inhibition) on *Aulacomya ater* (Molina, 1782) (Bivalvia: Mytilidae) as a criteria for effects of organophosphate pesticide exposition. *Journal of Toxicology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/951568>
- Fujioka, K., & Casida, J. E. (2007). Glutathione S-transferase conjugation of organophosphorus pesticides yields S-phospho-, S-aryl-, and S-alkylglutathione derivatives. *Chemical Research in Toxicology*, 20(8), 1211–1217. <https://doi.org/10.1021/tx700133c>
- Fyhrquist, F., & Saijonmaa, O. (2008). Renin-angiotensin system revisited. In *Journal of Internal Medicine* (Vol. 264, Issue 3, pp. 224–236). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01981.x>
- García Hernández, J., Leyva Morales, J. B., Martínez Rodríguez, I. E., Hernández Ochoa, M. I., Aldana Madrid, M. L., Rojas García, A. E., Betancourt Lozano, M., Perez Herrera, N. E., & Perera Rios, J. H. (2018). Estado actual de la investigación sobre plaguicidas en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(Special Issue 1), 29–60. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.esp01.03>
- Garelnabi, M., & Younis, A. (2015). Paraoxonase-1 enzyme activity assay for clinical samples: Validation and correlation studies. *Medical Science Monitor*, 21, 902–908. <https://doi.org/10.12659/MSM.892668>
- Giommi, C., Ladisa, C., Carnevali, O., Maradonna, F., & Habibi, H. R. (2022). Metabolomic and Transcript Analysis Revealed a Sex-Specific Effect of Glyphosate in Zebrafish Liver. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052724>
- Gonçalves, Í. F. S., Souza, T. M., Vieira, L. R., Marchi, F. C., Nascimento, A. P., & Farias, D. F. (2020). Toxicity testing of pesticides in zebrafish—a systematic review on chemicals and associated toxicological endpoints. In *Environmental Science and Pollution Research* (Vol. 27, pp. 10185–10204). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07902-5>
- González Jiménez, E. (2013, February). Composición corporal: Estudio y utilidad clínica. *Endocrinología y Nutrición*, 60(2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2012.04.003>
- Grzegorzewska, A. E., Adamska, P., Iwańczyk-Skalska, E., Ostromecka, K., Niepolski, L., Marcinkowski, W., Mostowska, A., Warchoł, W., Żaba, C., & Jagodziński, P. P. (2021). Paraoxonase 1 concerning dyslipidaemia, cardiovascular diseases, and mortality in haemodialysis patients. *Scientific Reports*, 11(6773), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86231-0>
- Gupta, S. C., Mishra, M., Sharma, A., Deepak Balaji, T. G. R., Kumar, R., Mishra, R. K., & Chowdhuri, D. K. (2010). Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1415–1423. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.05.013>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974, May 1). Glutathione S-transferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(2), 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)42083-8)
- Hakam, A. C., & Hussain, T. (2005). Renal angiotensin II type-2 receptors are upregulated and mediate the candesartan-induced natriuresis/diuresis in obese Zucker rats. *Hypertension*, 45(2), 270–275. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000151622.47814.6f>

- Hall, J. E., & Hall, M. E. (2021). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (J. Shreiner, J. Eddy, G. Onderlinde, & M. Reid, Eds.; 14 th). Elyse O'Grady. <http://evolve.elsevier.com/Hall/physiology/>
- Hamblin, M., Chang, L., Fan, Y., Zhang, J., Chen, Y. E., Bright, J., Erol, A., Faadiel Essop, M., Han, W., & Yoon, D.-Y. (2009). Comprehensive Invited Review PPARs and the Cardiovascular System. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, *11*(6), 1415–1452. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2280>
- Han, L., Shen, W. J., Bittner, S., Kraemer, F. B., & Azhar, S. (2017, May 1). PPARs: Regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part I: PPAR- α . *Future Cardiology*, *13*(3), 259–278. <https://doi.org/10.2217/fca-2016-0059>
- Han, S. H., Quon, M. J., & Koh, K. K. (2005, November). Beneficial vascular and metabolic effects of peroxisome proliferator-activated receptor- α activators. *Hypertension*, *46*(5), 1086–1092. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000187900.36455.4c>
- Haque, E., & Ward, A. C. (2018). Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity. In *Nanomaterials* (Vol. 8, Issue 561, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nano8070561>
- Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. In *Egyptian Journal of Aquatic Research* (Vol. 46, pp. 207–220). National Institute of Oceanography and Fisheries. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.007>
- Horzmann, K. A., & Freeman, J. L. (2018). Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish. In *Toxicological Sciences* (Vol. 163, Issue 1, pp. 5–12). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy044>
- Hou, F. F., & Liu, Y. (2014). New insights into the pathogenesis and therapeutics of kidney fibrosis. In *Kidney International Supplements* (Vol. 4, Issue 1, p. 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/kisup.2014.1>
- IARC, I. A. for R. on C. (2020). *IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans*. <https://doi.org/https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications>
- INECC, C. G. de C. y S. A. (2018, December). *El herbicida glifosato y su uso en la agricultura con organismos genéticamente modificados*. 1–21. <http://www.gob.mx/ineccDiciembre,2018>
- Ip, Y. K., & Chew, S. F. (2018). Air-breathing and excretory nitrogen metabolism in fishes. *Acta Histochemica*, *120*, 680–690. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.08.013>
- Junco Shibayama Warren, X., Oka, S., Zablocki, D., & Sadoshima, J. (2017). Metabolic reprogramming via PPAR signaling in cardiac hypertrophy and failure: From metabolomics to epigenetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *313*, 584–596. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00103.2017.-Studies>
- Kaplowitz, N. (1980). *Physiological significance of glutathione S-transferases*. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1980.239.6.g439> [10.1152/ajpgi.1980.239.6.g439](https://doi.org/10.1152/ajpgi.1980.239.6.g439)
- Kaschina, E., & Unger, T. (2003, July 8). Angiotensin AT1/AT2 receptors: Regulation, signalling and function. *Blood Pressure*, *12*(2), 70–88. <https://doi.org/10.1080/08037050310001057>
- Kasteel, E. E. J., Nijmeijer, S. M., Darney, K., Lautz, L. S., Dorne, J. L. C. M., Kramer, N. I., & Westerink, R. H. S. (2020). Acetylcholinesterase inhibition in electric eel and human donor blood: an in vitro approach to investigate interspecies differences and human variability in toxicodynamics. *Archives of Toxicology*, *94*, 4055–4065. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02927-8>
- Katerji, M., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. (2019). Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: Research applications in the cancer field. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2019/1279250>
- Kaushik, S., Georga, I., & Koumoundouros, G. (2011). Growth and body composition of zebrafish (*danio rerio*) larvae fed a compound feed from first feeding onward: Toward implications on nutrient requirements. *Zebrafish*, *8*(2), 87–95. <https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0696>

- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford assay for determining protein concentration. In *Cold Spring Harbor Protocols* (Vol. 2020, Issue 4). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- Kim, S., & Iwao, H. (2000). Molecular and Cellular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Cardiovascular and Renal Diseases. *Pharmacological Reviews*, 52(1), 11–34. <http://www.pharmrev.org>
- Kopjar, N., Žunec, S., Mendaš, G., Micek, V., Kašuba, V., Mikolić, A., Lovaković, B. T., Milić, M., Pavičić, I., Čermak, A. M. M., Pizent, A., Lucić Vrdoljak, A., & Želježić, D. (2018). Evaluation of chlorpyrifos toxicity through a 28-day study: Cholinesterase activity, oxidative stress responses, parent compound/metabolite levels, and primary DNA damage in blood and brain tissue of adult male Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions*, 279, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.029>
- Kotur-Stevuljević, J., Vekić, J., Stefanović, A., Zeljković, A., Ninić, A., Ivanišević, J., Miljković, M., Sopić, M., Munjas, J., Mihajlović, M., Spasić, S., Jelić-Ivanović, Z., & Spasojević-Kalimanovska, V. (2019). Paraoxonase 1 and atherosclerosis-related diseases. In *BioFactors* (Vol. 46, Issue 2, pp. 1–13). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1002/biof.1549>
- Kranzhöfer, R., Schmidt, J., Pfeiffer, C. A. H., Hagl, S., Libby, P., & Kübler, W. (1999). Angiotensin Induces Inflammatory Activation of Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19, 1623–1629. <http://www.atvbaha.org>
- Krzastek, S. C., Farhi, J., Gray, M., & Smith, R. P. (2020). Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential. In *Translational Andrology and Urology* (Vol. 9, Issue 6, pp. 2797–2813). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tau-20-685>
- Kunutsor, S. K. (2016). Gamma-glutamyltransferase—friend or foe within? In *Liver International* (Vol. 36, pp. 1723–1734). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/liv.13221>
- La Rosa, E.-D., Y, L.-M. O., & León, N. (2018). ANÁLISIS MULTI-RESIDUAL DE PLAGUICIDAS DE USO AGRÍCOLA EN NARANJAS (*Citrus-sinensis* Osbeck) DE MONTEMORELOS, NUEVO LEÓN, MÉXICO. *Agroproductividad*, 11(1), 136–141.
- Lanzarin, G., Venâncio, C., Félix, L. M., & Monteiro, S. (2021). Inflammatory, oxidative stress, and apoptosis effects in zebrafish larvae after rapid exposure to a commercial glyphosate formulation. *Biomedicines*, 9(1784), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121784>
- Lee, C. H., Kamijima, M., Kim, H., Shibata, E., Ueyama, J., Suzuki, T., Takagi, K., Saito, I., Gotoh, M., Hibi, H., Naito, H., & Nakajima, T. (2007). 8-Hydroxydeoxyguanosine levels in human leukocyte and urine according to exposure to organophosphorus pesticides and paraoxonase 1 genotype. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 80(3), 217–227. <https://doi.org/10.1007/s00420-006-0128-1>
- Lein, D. H., Maylin, G. A., Hillman, R. B., Rebhun, W. C., Henion, J. D., & Ebel Jr, J. G. (1982). *Chlorpyrifos (Dursban 44r) toxicity in dairy bulls* (Lennart Krook, Vol. 72). Herbet F. Schryver.
- Li, B., Zhang, J., Ma, J., Qiao, L., Ren, B., Chen, M., & Ren, Z. (2020). The continuous physiological changes of zebrafish (*Danio rerio*) based on metabolism under controlled thallium stress. *Chemosphere*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124974>
- Lu, J., Wang, W., Zhang, C., Xu, W., Chen, W., Tao, L., Li, Z., Cheng, J., & Zhang, Y. (2022). Characterization of glyphosate-induced cardiovascular toxicity and apoptosis in zebrafish. *Science of the Total Environment*, 851, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158308>
- Lu, J., Wu, L., Jiang, T., Wang, Y., Zhao, H., Gao, Q., Pan, Y., Tian, Y., & Zhang, Y. (2015a). Angiotensin AT2 receptor stimulation inhibits activation of NADPH oxidase and ameliorates oxidative stress in rotenone model of Parkinson's disease in CATH.a cells. *Neurotoxicology and Teratology*, 47, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.11.004>
- Lu, J., Wu, L., Jiang, T., Wang, Y., Zhao, H., Gao, Q., Pan, Y., Tian, Y., & Zhang, Y. (2015b). Angiotensin AT2 receptor stimulation inhibits activation of NADPH oxidase and

- ameliorates oxidative stress in rotenone model of Parkinson's disease in CATH.a cells. *Neurotoxicology and Teratology*, 47, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.11.004>
- 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. *Environmental Pollution*, 252, 1288–1300. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.040>
- Macedo, E., & Mehta, R. (2010). Fluid Overload: Diagnosis and Management. In C. Ronco, M. R. Costanzo, R. Bellomo, & A. S. Maisel (Eds.), *Contributions to Nephrology* (Vol. 164). <https://doi.org/10.1159/000313723>
- Maciag, M., Wnorowski, A., Mierzejewska, M., & Plazinska, A. (2022). Pharmacological assessment of zebrafish-based cardiotoxicity models. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 148, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112695>
- Macirella, R., Curcio, V., & Brunelli, E. (2020). Morpho-functional alterations in the gills of a seawater teleost, the ornate wrasse (*Thalassoma pavo* L.), after short-term exposure to chlorpyrifos. *Toxics*, 8(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/toxics8040097>
- Macirella, R., Madeo, G., Sesti, S., Tripepi, M., Bernabò, I., Godbert, N., La Russa, D., & Brunelli, E. (2020). Exposure and post-exposure effects of chlorpyrifos on *Carassius auratus* gills: An ultrastructural and morphofunctional investigation. *Chemosphere*, 251. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126434>
- Macirella, R., Tripepi, M., & Brunelli, E. (2019). Morphological and immunohistochemical modifications in zebrafish (*Danio rerio*) gills after short-term exposure to the fungicide tebuconazole. *Zebrafish*, 16(1), 65–76. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1638>
- Mali, H., Shah, C., Raghunandan, B. H., Prajapati, A. S., Patel, D. H., Trivedi, U., & Subramanian, R. B. (2023). Organophosphate pesticides an emerging environmental contaminant: Pollution, toxicity, bioremediation progress, and remaining challenges. In *Journal of Environmental Sciences (China)* (Vol. 127, pp. 234–250). Chinese Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.04.023>
- Marshall, W. S. (2002). Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: Retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*, 293(3), 264–283. <https://doi.org/10.1002/jez.10127>
- Masi, S., Uliana, M., & Viridis, A. (2019). Angiotensin II and vascular damage in hypertension: Role of oxidative stress and sympathetic activation. In *Vascular Pharmacology* (Vol. 115, pp. 13–17). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2019.01.004>
- Matuz-Mares, D., Riveros-Rosas, H., Vázquez-Meza, H., & Vilchis-Landeros, M. M. (2021). Glutathione participation in the prevention of cardiovascular diseases. In *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 1220, pp. 1–19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox10081220>
- McHardy, S. F., Wang, H. Y. L., McCowen, S. V., & Valdez, M. C. (2017, April 3). Recent advances in acetylcholinesterase Inhibitors and Reactivators: an update on the patent literature (2012-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27(4), 455–476. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1272571>
- Medina-Díaz, I. M., Ponce-Ruiz, N., Ramírez-Chávez, B., Rojas-García, A. E., Barrón-Vivanco, B. S., Elizondo, G., & Bernal-Hernández, Y. Y. (2017). Downregulation of human paraoxonase 1 (PON1) by organophosphate pesticides in HepG2 cells. *Environmental Toxicology*, 32(2), 490–500. <https://doi.org/10.1002/tox.22253>
- Medina-Díaz, I. M., Rubio-Ortíz, M., Martínez-Guzmán, M. C., Dávalos-Ibarra, R. L., Rojas-García, A. E., Robledo-Marengo, M. L., Barrón-Vivanco, B. S., Girón-Pérez, M. I., & Elizondo, G. (2011). Organophosphate pesticides increase the expression of alpha glutathione S-transferase in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 2074–2079. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.08.010>
- Mekonnen, T. F., Panne, U., & Koch, M. (2019). Glucosylation and glutathione conjugation of chlorpyrifos and fluopyram metabolites using electrochemistry/mass spectrometry. *Molecules*, 24(898). <https://doi.org/10.3390/molecules24050898>
- Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P. M., & Woutersen, R. A. (2011). Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic Pathology*, 39(5), 759–775. <https://doi.org/10.1177/0192623311409597>

- Milesi, M. M., Lorenz, V., Durando, M., Rossetti, M. F., & Varayoud, J. (2021). Glyphosate Herbicide: Reproductive Outcomes and Multigenerational Effects. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.672532>
- Miller, A. J., & Arnold, A. C. (2019a). The renin–angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. In *Clinical Autonomic Research* (Vol. 29, pp. 231–243). Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG. <https://doi.org/10.1007/s10286-018-0572-5>
- Miller, A. J., & Arnold, A. C. (2019b, April 1). The renin–angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications. *Clinical Autonomic Research*, 29(2), 231–243. <https://doi.org/10.1007/s10286-018-0572-5>
- Mishra, M., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2017, October 13). Protein purification and analysis: Next generation western blotting techniques. *Expert Review of Proteomics*, 14(11), 1037–1053. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1388167>
- Muñoz-Arrebola, Salido, P. ; Madrid, G. M. ; Redondo, J. A. ; & Roncero, ; (1988). ACTIVIDAD DE LA GGT EN EL PROCESO ULCERATIVO DUODENAL INDUCIDO POR INDOMETACINA. *Acta Veterinaria*, 2, 9–14.
- Ndrepepa, G., Colleran, R., & Kastrati, A. (2018). Gamma-glutamyl transferase and the risk of atherosclerosis and coronary heart disease. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 476, pp. 130–138). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.11.026>
- Newman, M. C. (2015). *Fundamentals of Ecotoxicology* (Fourth Edition). Taylor & Francis.
- Nickenig, G., Strehlow, K., Bäumer, A. T., Baudler, S., Waßmann, S., Sauer, H., & Böhm, M. (2000). Negative feedback regulation of reactive oxygen species on AT1 receptor gene expression. *British Journal of Pharmacology*, 131, 795–803. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703623>
- Osten, J. R. Von, Ortíz-Arana, A., Guilhermino, L., & Soares, A. M. V. M. (2005). In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere*, 58, 627–636. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.065>
- Padmanabha, A., Reddy, H. R. V, Khavi, M., Prabhudeva, K. N., Rajanna, K. B., & Chethan, N. (2015). ACUTE EFFECTS OF CHLORPYRIFOS ON OXYGEN CONSUMPTION AND FOOD CONSUMPTION OF FRESHWATER FISH, *OREOCHROMIS MOSSAMBICUS* (PETERS). *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(4), 3380–3384. <https://www.researchgate.net/publication/322138051>
- Pahwa, S., Sharma, R., & Singh, B. (2017). Role of Glutathione S-Transferase in Coronary Artery Disease Patients with and Without Type 2 Diabetes Mellitus. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*, 11(1), 1–4. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2017/23846.9281>
- Paradis, P., Dali-Youcef, N., Paradis, F. W., tan Thibault, G., & Nemer, M. (2000). Medical Research Council of Canada. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 931–936. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.931>
- Paz Ocaranza, M., Riquelme, J. A., García, L., Jalil, J. E., Chiong, M., Santos, R. A. S., & Lavandero, S. (2020). Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. In *Nature Reviews Cardiology* (Vol. 17, pp. 116–129). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0244-8>
- Pei, J. F., Yan, Y. F., Tang, X., Zhang, Y., Cui, S. S., Zhang, Z. Q., Chen, H. Z., & Liu, D. P. (2016). Human paraoxonase gene cluster overexpression alleviates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Science China Life Sciences*, 59(11), 1115–1122. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0131-4>
- Peillex, C., & Pelletier, M. (2020). The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *Journal of Immunotoxicology*, 17(1), 163–174. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2020.1804492>
- Perry, J., Cotton, J., Rahman, M. A., & Brumby, S. A. (2020). Organophosphate exposure and the chronic effects on farmers: A narrative review. *Rural and Remote Health*, 20(1). <https://doi.org/10.22605/RRH4508>

- Pitisuttithum, P., Chan, W. K., Goh, G. B. B., Fan, J. G., Song, M. J., Charatcharoenwitthaya, P., Duseja, A., Dan, Y. Y., Imajo, K., Nakajima, A., Ho, K. Y., Goh, K. L., Wong, V. W. S., & Treeprasertsuk, S. (2020). Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular risk in nonalcoholic fatty liver disease: The Gut and Obesity Asia initiative. *World Journal of Gastroenterology*, *26*(19), 2416–2426. <https://doi.org/10.3748/WJG.V26.I19.2416>
- Pohanka, M., Hrabínová, M., Kuca, K., & Simonato, J. P. (2011). Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *International Journal of Molecular Sciences*, *12*, 2631–2640. <https://doi.org/10.3390/ijms12042631>
- Prasanna, C., Anithasmruthi, C., & Venkatarathnamma, V. (2020). A Study on Oxygen Consumption in Freshwater Fish *Labeo Rohita* Exposed to Lethal and Sub Lethal Concentrations of Ethion 50%Ec. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, *14*(4), 122–127. <https://doi.org/https://doi.org/10.37506/ijfmt.v14i4.11454>
- Prokko, J. M., & Nikinmaa, M. (2018). Circadian rhythms and environmental disturbances - Underexplored interactions. *Journal of Experimental Biology*, *221*. <https://doi.org/10.1242/jeb.179267>
- Puglis, H. J., & Boone, M. D. (2011). Effects of technical-grade active ingredient vs. commercial formulation of seven pesticides in the presence or absence of UV radiation on survival of green frog tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *60*, 145–155. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9528-z>
- Rajabi, M., Kassiotis, C., Razeghi, P., & Taegtmeier, H. (2007). Return to the fetal gene program protects the stressed heart: A strong hypothesis. *Heart Failure Reviews*, *12*, 331–343. <https://doi.org/10.1007/s10741-007-9034-1>
- Ramalingam, L., Menikdiwela, K., LeMieux, M., Dufour, J. M., Kaur, G., Kalupahana, N., & Moustaid-Moussa, N. (2017). The renin angiotensin system, oxidative stress and mitochondrial function in obesity and insulin resistance. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1863, pp. 1106–1114). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2016.07.019>
- Rang, H. P., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2016). *Rang & Dale's Pharmacology* (Eighth). Elsevier.
- Ray, A., Liu, J., Ayoubi, P., & Pope, C. (2010). Dose-related gene expression changes in forebrain following acute, low-level chlorpyrifos exposure in neonatal rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *248*, 144–155. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.07.026>
- Re, A. D., Díaz, F., Sierra, E., & Gómez-Jiménez, S. (2004, April). Oxygen consumption, ammonium excretion and osmoregulatory capacity of *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) exposed to different combinations of temperature and salinity. *Ciencias Marinas*, *30*(3), 443–453.
- Reinoso, R. F., Telfer, B. A., & Rowland, M. (1997, June 1). Tissue Water Content in Rats Measured by Desiccation. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 87–92. [https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(97\)00053-1](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(97)00053-1)
- Rojas, E., Valverde, M., Kala, S. V, Kala, G., & Lieberman, M. W. (2000, September 21). Accumulation of DNA damage in the organs of mice deficient in g-glutamyltranspeptidase. *Mutation Research*, *447*, 305–316. www.elsevier.com/locate/molmut Community address: www.elsevier.com/locate/mutres
- Sarfraz, I., Rasul, A., Ucak, I., Lai, N. S., Asrar, M., & Adem, Ş. (2022). Enzyme assay techniques and protocols. In *Analytical Techniques in Biosciences: from Basics to Applications* (pp. 191–199). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822654-4.00012-9>
- Senoner, T., & Dichtl, W. (2019). Oxidative stress in cardiovascular diseases: Still a therapeutic target? In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 2090, pp. 1–25). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11092090>
- Sheikh, M., Tajdini, M., Shafiee, A., Sotoudeh Anvari, M., Jalali, A., Poorhosseini, H., & Amirzadegan, A. (2017). Association of serum gamma-glutamyltransferase and premature coronary artery disease. *Netherlands Heart Journal*, *25*, 439–445. <https://doi.org/10.1007/s12471-017-0964-5>

- Sher, L. (2006). PPAR- α activators may play role for the regression of ventricular hypertrophy in hypertensive and hyperlipidemic patients. *Medical Hypotheses*, 66(5), 1043–1044. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.12.003>
- Shih, D. M., Kast-Woelbern, H. R., Wong, J., Xia, Y. R., Edwards, P. A., & Lusis, A. J. (2006). A role for FXR and human FGF-19 in the repression of paraoxonase-1 gene expression by bile acids. *Journal of Lipid Research*, 47(2), 384–392. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500378-JLR200>
- Shunmoogam, N., Naidoo, P., & Chilton, R. (2018). Paraoxonase (PON)-1: A brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. In *Vascular Health and Risk Management* (Vol. 14, pp. 137–143). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S165173>
- Silva, D. C., Serrano, L., Oliveira, T. M. A., Mansano, A. S., Almeida, E. A., & Vieira, E. M. (2018). Effects of parabens on antioxidant system and oxidative damages in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.076>
- Singh, S., Kumar, V., Gill, J. P. K., Datta, S., Singh, S., Dhaka, V., Kapoor, D., Wani, A. B., Dhanjal, D. S., Kumar, M., Harikumar, S. L., & Singh, J. (2020). Herbicide glyphosate: Toxicity and microbial degradation. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 7519, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207519>
- Soares, D., Silva, L., Duarte, S., Pena, A., & Pereira, A. (2021). Glyphosate use, toxicity and occurrence in food. In *Foods* (Vol. 10, Issue 2785). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods10112785>
- Søfteland, L., & Olsvik, P. A. (2022). In vitro toxicity of glyphosate in Atlantic salmon evaluated with a 3D hepatocyte-kidney co-culture model. *Food and Chemical Toxicology*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113012>
- Sogorb, M. A., Estévez, J., & Vilanova, E. (2014). Biomarkers in biomonitoring of xenobiotics. In *Biomarkers in Toxicology* (pp. 965–973). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404630-6.00057-9>
- Soler, M. J., Lloveras, J., & Batlle, D. (2008). Enzima conversiva de la angiotensina 2 y su papel emergente en la regulación del sistema renina-angiotensina. *Medicina Clínica*, 131(6), 230–236. <https://doi.org/10.1157/13124619>
- Soudani, N., Chaâbane, M., Ghorbel, I., Elwej, A., Boudawara, T., & Zeghal, N. (2019). Glyphosate disrupts redox status and up-regulates metallothionein I and II genes expression in the liver of adult rats. Alleviation by quercetin. *General Physiology and Biophysics*, 38, 123–134. https://doi.org/10.4149/gpb_2018043
- Stalikas, C. D., & Konidari, C. N. (2001, October 3). Analytical methods to determine phosphonic and amino acid group-containing pesticides. *Journal of Chromatography A*, 907, 1–19. www.elsevier.com/locate/chroma
- Steckelings, U. M., Rompe, F., Kaschina, E., Namsolleck, P., Grzesiak, A., Funke-Kaiser, H., Bader, M., & Unger, T. (2010). The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. In *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* (Vol. 11, Issue 1, pp. 67–73). <https://doi.org/10.1177/1470320309347791>
- Steven, S., Frenis, K., Oelze, M., Kalinovic, S., Kuntic, M., Jimenez, M. T. B., Vujacic-Mirski, K., Helmstädter, J., Kröller-Schön, S., Münzel, T., & Daiber, A. (2019). Vascular inflammation and oxidative stress: Major triggers for cardiovascular disease. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2019, pp. 1–26). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/7092151>
- Strobel, N. A., Fassett, R. G., Marsh, S. A., & Coombes, J. S. (2011). Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. In *International Journal of Cardiology* (Vol. 147, pp. 191–201). <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.08.008>
- Suratman, S., Edwards, J. W., & Babina, K. (2015). Organophosphate pesticides exposure among farmworkers: Pathways and risk of adverse health effects. *Reviews on Environmental Health*, 30(1), 65–79. <https://doi.org/10.1515/reveh-2014-0072>

- Tadevosyan, A., Maguy, A., Villeneuve, L. R., Babin, J., Bonnefoy, A., Allen, B. G., & Nattel, S. (2010). Nuclear-delimited angiotensin receptor-mediated signaling regulates cardiomyocyte gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(29), 22338–22349. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121749>
- Tahara, N., Brush, M., & Kawakami, Y. (2016). Cell Migration During Heart Regeneration in Zebrafish. *Developmental Dynamics*, *245*, 774–787. <https://doi.org/10.1002/dvdy>
- Tao, Y., Pan, L., Zhang, H., & Tian, S. (2013). Assessment of the toxicity of organochlorine pesticide endosulfan in clams *Ruditapes philippinarum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *93*, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.036>
- Testai, E., Buratti, F. M., & Di Consiglio, E. (2010). Chlorpyrifos. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, Third Edition: Volume 1* (Vol. 1, pp. 1505–1526). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00070-7>
- Tilton, F. A., Bammler, T. K., & Gallagher, E. P. (2011). Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *153*, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.07.008>
- Turu, G., Balla, A., & Hunyady, L. (2019). The role of β -arrestin proteins in organization of signaling and regulation of the AT1 angiotensin receptor. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00519>
- Tzamaloukas, A. H., Murata, G. H., Vanderjagt, D. J., & Glew, R. H. (2003, November 18). Estimates of body water, fat-free mass, and body fat in patients on peritoneal dialysis by anthropometric formulas. *Kidney International*, *63*, 1605–1617. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00900.x>
- UNAM. (2009). *Manual de prácticas bioquímica clínica (Clave 1807)*.
- Uzun, F. G., & Kalender, Y. (2013). Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: The role of quercetin and catechin. *Food and Chemical Toxicology*, *55*, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.056>
- Vaish, S., Gupta, D., Mehrotra, R., Mehrotra, S., & Basantani, M. K. (2020). Glutathione S-transferase: a versatile protein family. In *3 Biotech* (Vol. 10, Issue 321, pp. 1–19). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02312-3>
- van der Pol, A., Hoes, M. F., de Boer, R. A., & van der Meer, P. (2020). Cardiac foetal reprogramming: a tool to exploit novel treatment targets for the failing heart. In *Journal of Internal Medicine* (Vol. 288, pp. 491–506). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/joim.13094>
- Van Lenten, B. J., Wagner, A. C., Navab, M., & Fogelman, A. M. (2001). Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and apoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(3), 1923–1929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004074200>
- Venturino, A., Pechen, A. M., Parolo, E., Quintana, M. M., Indaco, M., Guiñazú, N., Vera, B., Jaureguiberry, S., Mester, A. C., Lascano, C. I., Bieczynski, F., & Parra Morales, L. B. (2021). *Informe Técnico- Científico sobre los Usos e Impactos del Insecticida Clorpirifos en Argentina* (A. Venturino, A. M. Pechen, Álvarez Melina, H. Agostini, & Harte Agustín, Eds.). <https://www.researchgate.net/publication/353224916>
- Verbalis, J. G. (2003). Disorders of body water homeostasis. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, *17*(4), 471–503. [https://doi.org/10.1016/S1521-690X\(03\)00049-6](https://doi.org/10.1016/S1521-690X(03)00049-6)
- Verdouw, H., Van Echteld, J. A., & Dekkers, E. M. L. (1977). Ammonia Determination based on Indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, *12*, 399–402. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354\(78\)90107-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354(78)90107-0)
- Villaverde, M. S., Hanzel, C. E., & Verstraeten, S. V. (2004). In vitro interactions of thallium with components of the glutathione-dependent antioxidant defence system. *Free Radical Research*, *38*(9), 977–984. <https://doi.org/10.1080/10715760400000950>
- Vlaiculescu, A., & Varrone, C. (2022). Sustainable and eco-friendly alternatives to reduce the use of pesticides. In *Pesticides in the Natural Environment: Sources, Health Risks, and*

- Remediation* (pp. 329–364). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90489-6.00014-8>
- Wakf, A. M. El, M El Habibi, E. S., Barakat, N. M., Attia, A. M., Hussein, A. M., & Ali, I. I. (2018). Cardiovascular Toxic Effects of Chlorpyrifos: A Possible Protective Role for Pomegranate Extracts. *Journal of Clinical Toxicology*, *8*. <https://doi.org/10.4172/2161-0495.1000374>
- Wang, X., Shen, M., Zhou, J., & Jin, Y. (2019). Chlorpyrifos disturbs hepatic metabolism associated with oxidative stress and gut microbiota dysbiosis in adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, *216*, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.11.010>
- Wang, X., Zhou, J., Shen, M., Shen, J., Zhang, X., & Jin, Y. (2019). Chlorpyrifos exposure induces lipid metabolism disorder at the physiological and transcriptomic levels in larval zebrafish. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *51*(9), 890–899. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmz074>
- Wei, Y., Jiao, Y., An, D., Li, D., Li, W., & Wei, Q. (2019). Review of dissolved oxygen detection technology: From laboratory analysis to online intelligent detection. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 19, Issue 3995, pp. 1–38). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/s19183995>
- Whitfield, J. B. (2001). Gamma glutamyl transferase. In *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* (Vol. 38, Issue 4, pp. 263–355). CRC Press LLC. <https://doi.org/10.1080/20014091084227>
- Williamson, G., Harris, T., Bizior, A., Hoskisson, P. A., Pritchard, L., & Javelle, A. (2024). Biological ammonium transporters: evolution and diversification. *FEBS Journal*, 1–25. <https://doi.org/10.1111/febs.17059>
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Jungers, P., & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, *49*, 1304–1313. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>
- Wołejko, E., Łozowicka, B., Jabłońska-Trypuć, A., Pietruszyńska, M., & Wydro, U. (2022). Chlorpyrifos Occurrence and Toxicological Risk Assessment: A Review. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 19, Issue 12209, pp. 1–25). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph191912209>
- Wright, P. A., & Wood, C. M. (2009, August 1). A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: Role of rhesus (RH) glycoproteins. *Journal of Experimental Biology*, *212*(15), 2303–2312. <https://doi.org/10.1242/jeb.023085>
- Yang, Y., Dong, F., Liu, X., Xu, J., Wu, X., & Zheng, Y. (2019). Dysregulation of circadian rhythm in zebrafish (*Danio rerio*) by thifluzamide: Involvement of positive and negative regulators. *Chemosphere*, *235*, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.153>
- Zafiroopoulos, A., Tsarouhas, K., Tsitsimpikou, C., Fragkiadaki, P., Germanakis, I., Tsardi, M., Maravgakis, G., Goutzourelas, N., Vasilaki, F., Kouretas, D., Hayes, A. W., & Tsatsakis, A. M. (2014). Cardiotoxicity in rabbits after a low-level exposure to diazinon, propoxur, and chlorpyrifos. *Human and Experimental Toxicology*, *33*(12), 1241–1252. <https://doi.org/10.1177/0960327114532384>
- Zager, R. A., & Johnson, A. C. M. (2022). Early loss of glutathione -s- transferase (GST) activity during diverse forms of acute renal tubular injury. *Physiological Reports*, *10*(15352). <https://doi.org/10.14814/phy2.15352>
- Zakharov, A., & Khivintseva, E. (2020). Clinical Use of Melatonin in the Treatment of Sleep Disorders. In *Melatonin - The Hormone of Darkness and its Therapeutic Potential and Perspectives* (pp. 1–17). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92656>
- Zalba, G., San José, G., Moreno, M. U., Fortuño, M. A., Fortuño, A., Beaumont, F. J., & Díez, J. (2001). Oxidative Stress in Arterial Hypertension Role of NAD(P)H Oxidase. *Hypertension*, 1395–1399. <http://www.hypertensionaha.org>
- Zhang, D., Ding, W., Liu, W., Li, L., Zhu, G., & Ma, J. (2023). Single and Combined Effects of Chlorpyrifos and Glyphosate on the Brain of Common Carp: Based on Biochemical and

Molecular Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12934).
<https://doi.org/10.3390/ijms241612934>
Zhang, D. L., Hu, C. X., Li, D. H., & Liu, Y. D. (2013). Lipid peroxidation and antioxidant responses in zebrafish brain induced by *Aphanizomenon flos-aquae* DC-1 aphantoxins. *Aquatic Toxicology*, 144–145, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.011>