

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Programa de Posgrado en Ciencias
en Acuicultura**

**Efecto del herbicida Roundup® Activo en el sistema digestivo
de *Paracheiroidon axelrodi* cultivado en sistemas de
recirculación acuícola**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Acuicultura

Presenta:

Martha Liliana Cifuentes Torres

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por
Martha Liliana Cifuentes Torres

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Hernán Hurtado Giraldo
Director de tesis

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirector de Tesis

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Dra. MA Elena Solana Arellano

M. en C. Edwin Gómez Ramírez



Dr. Benjamín Barón Sevilla
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Martha Liliana Cifuentes Torres** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Efecto del herbicida Roundup® Activo en el sistema digestivo de *Paracheirodon axelrodi* cultivado en sistemas de recirculación acuícola

Resumen aprobado por:

Dr. Hernán Hurtado Giraldo
Codirector de tesis

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Codirector de tesis

En la actualidad el uso del glifosato en Colombia para el control de malezas y la erradicación de cultivos ilícitos de coca y amapola ha incrementado, razón por la cual se han encontrado residuos de este herbicida en varios cuerpos de agua en concentraciones hasta de 5 mg l⁻¹. Cada vez son más las investigaciones que evidencian un efecto nocivo de este producto, en ecosistemas acuáticos del país, incluso en concentraciones subletales (menores a 5 mg l⁻¹), causando alteraciones adversas en varias especies de peces nativos, entre ellas el neón cardenal (*Paracheirodon axelrodi*), especie de importancia económica para Colombia por ser la que más se exporta como pez ornamental. Es por esto que se planteó analizar el efecto de una presentación comercial de glifosato (Roundup® Activo) en el tracto digestivo de *P. axelrodi*. Se evaluaron cuatro tratamientos, TR1: 0 mg l⁻¹, TR2: 0.1 mg l⁻¹, TR3: 1 mg l⁻¹ y TR4: 5 mg l⁻¹. Los peces fueron expuestos al Roundup® Activo durante 30 días y se mantuvieron durante 15 días más en recuperación. Las unidades experimentales estuvieron constituidas por acuarios de 20 l y la densidad fue de 20 peces por acuario. Se alimentaron tres veces al día (9:00, 12:00 y 16:00 h) con alimento comercial "Tetra color®". Se midieron parámetros de calidad de agua, como el oxígeno disuelto (OD), el pH, el nitrógeno amoniacal total (NAT), los nitritos (N-NO₂) y la temperatura. Se registraron variables de crecimiento (peso y longitud) y a partir de estos datos se estimaron algunos parámetros productivos. A los 0, 30 y 45 días se sacrificaron y disectaron seis peces por tratamiento, para la extracción del tracto digestivo y su posterior procesamiento para el análisis por microscopía óptica de alta resolución (MOAR). Se realizó una descripción histológica del tratamiento control (TR1) y, con base en esto, se describieron las alteraciones encontradas en el estómago e intestino de *P. axelrodi* expuestos a las concentraciones subletales del herbicida. Se llevó a cabo la morfométrica del espesor de las capas constitutivas de los órganos objeto de estudio empleando el software Image J. Los parámetros de calidad de agua se mantuvieron dentro del rango adecuado para la especie. Los parámetros productivos y de crecimiento mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo significativamente mayores para el TR1. La supervivencia fue dosis y tiempo dependiente, con porcentajes mayores para el TR1 (95%), para el TR2, TR3 y TR4 fue de 53.3%, 38.3% y 0%, respectivamente, al cabo de 45 días de experimentación. EL TR4 se vio fuertemente afectado por la concentración de Roundup® Activo empleada, por lo cual al cabo de una semana se presentó un 90% de mortalidad. La concentración letal 50 (CL₅₀) calculada fue de 6.41 mg l⁻¹ a las 96 h de experimentación. Se evidenciaron algunas diferencias significativas en el espesor de las capas del estómago e intestino y los tiempos evaluados (exposición y recuperación). Los principales daños evidenciados fueron festoneo, hiperplasia e hipertrofia, inflamación, ruptura, incremento en la secreción de mucus y migración de células similares a mastocitos en todas las capas constitutivas. El TR4 mostró lesiones más graves a las observadas en los peces de los otros tratamientos. No se evidenció mejoría en los órganos durante el período de recuperación. De acuerdo con lo observado durante el presente estudio se puede decir que el glifosato bajo la presentación de Roundup® Activo produce daños histopatológicos y morfométricos en los órganos del tracto digestivo de *P. axelrodi*.

Palabras clave: concentración subletal, glifosato, histopatología, *Paracheirodon axelrodi*, surfactante, toxicidad.

Abstract of the thesis present by **Martha Liliana Cifuentes Torres** as a partial request to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Effect of herbicide Roundup® Active in the digestive system of *Paracheiroduon axelrodi* grown in aquacultural recirculating systems

At present, the use of the glifosato in Colombia for the control of undergrowths and the eradication of illicit cultures of coca and poppy has increased, extending residues of this herbicide in several water bodies in concentrations up to of 5 mg l⁻¹. The investigations have demonstrated a harmful effect of this product, even in sub lethal concentrations (less than to 5 mg l⁻¹), in aquatic ecosystems of the country, causing adverse alterations in several species of native fish, among them *Paracheiroduon axelrodi*, with economic importance for Colombia for being the most exported ornamental fish. This work evaluate the effect of a commercial presentation of glyphosate (Roundup Active) in the digestive tract of *P. axelrodi* in four treatments, TR1: 0 mg l⁻¹, TR2: 0.1 mg l⁻¹, TR3: 1 mg l⁻¹ and TR4: 5 mg l⁻¹ (with three repetitions for each treatment). The fish were exposed to the herbicide for 30 days and were kept for 15 days in recovery, period during which the contaminant was not added. The experimental units were 20 l aquaria each one with 20 fish fed three times per day (9:00, 12:00 and 16:00 h) with the commercial food "Tetra color". Water quality parameters as the dissolved oxygen (OD), pH, total ammonia nitrogen (NAT), nitrites (N-NO₂) and the temperature were measured. The growth variables (weight and length) were registered and from this information some productive parameters were estimated. At day 0, 30 and 45 the fishes were sacrificed and of each treatment six organisms were dissected to extract the digestive tract, later processes for the optical microscopy of high resolution (MOAR) analysis. A histological description of the control treatment (TR1) was made, to describe the changes found in the stomach and intestine of *P. axelrodi*. The morphometric thickness of the constitutive organs strata was studied using the software Image J. Aquaria water quality were kept inside parameters range of the species. Fish growth parameters showed, significantly differences between treatments foremost TR1. After 45 days of experimentation survival was dose and time dependent; the TR1 with 95 %, and TR2, TR3 and TR4 with 53.3 %, 38.3 % and 0 %, respectively, The TR4 was strongly affected by the Roundup's concentration used, after a week 90 % of the organisms died. The lethal concentration 50 (CL₅₀) was 6.41 mg l⁻¹ after 96 h of experimentation. Comparing the exposure and fish recovery some significant differences were observed in the thickness of the stomach and intestine strata. The conspicuous damages were festoon, hyperplasia and hypertrophy, inflammation, break, increase in the mucus secretion and migration of similar cells to mast cells in all the constitutive strata. The TR4 showed more serious injuries when compare to the other treatments. During the recovery period the organs neither improve. In agreement with the observed results, it is possible to establish that the glyphosate in the Roundup's presentation produces histopathologic and morphometric damages in the organs of the digestive tract of *P. axelrodi*.

Keywords: *Paracheiroduon axelrodi*, glyphosate, toxicity, surfactant, histopathology, sublethal concentration.

Dedicatoria

A mi hermosa familia, mi mamá Martha Torres, mi papá Germán Cifuentes, mis hermanas Adriana y Alexandra y mis sobrinos, Germán Andrés, Alberto Andrés y Guadalupe, con quienes he superado muchos obstáculos y con quienes he descubierto que lo que más importante en la vida es la familia. Porque sin ellos no habría culminado esta etapa de mi vida y porque mi mayor meta es ayudarlos a cumplir sus sueños. A mi amada patria, Colombia, país que en definitiva es Inigualable.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo económico durante el desarrollo de mi Maestría.

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) por permitirme llevar a cabo mis estudios de Maestría en Ciencias en Acuicultura.

A la Universidad Militar Nueva Granada por permitirme usar sus instalaciones, sus equipos y materiales, para llevar a cabo la parte práctica de mis tesis.

A todo el personal administrativo del Departamento de Acuicultura por su amabilidad y colaboración.

A todos los docentes del posgrado de Acuicultura y Ciencias de la vida que me impartieron clase durante la Maestría.

A mi director Hernán Hurtado Giraldo por ser un ejemplo y una guía durante el desarrollo de toda mi vida profesional. Por sus consejos, su conocimiento y por creer en mí y en mis capacidades. Por siempre estar dispuesto a escuchar mis dudas y a resolverlas con amor y paciencia. Por permitirme ser parte de su grupo de Investigación y por tener siempre presente que importa más el desarrollo personal y profesional de sus estudiantes que el reconocimiento académico de sí mismo.

A mi codirectora, la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por su apoyo y colaboración durante todo el proceso que conllevó la realización de mi tesis.

A mis Sinodales, las Dras. Mónica Hernández Rodríguez y Elena Solana Arellano, por sus aportes y experiencia, los cuales fueron indispensables para el desarrollo de este trabajo.

A Edwin Gómez Ramírez, porque, además de ser uno de mis sinodales, es un gran amigo que siempre me ha brindado su apoyo, comprensión y cariño. Por sus conocimientos, su experiencia y sus consejos. Por ser la persona que me introdujo en el mundo de la Acuicultura y por enseñarme que puedo llegar a ser mejor cada día y que puedo lograr todo lo que me propongo.

A mis mejores amigas en el mundo, Laurita Rincón y Anita Torres, porque ellas me han acompañado desde mis estudios de licenciatura y porque sin importar la distancia siempre estuvieron a mi lado sin juzgarme y apoyando las decisiones que he tomado. Por sus palabras de aliento y por sus hermosos detalles. Porque de corazón sé que siempre contaré con ustedes ¡Las adoro mis niñas!

A Steph Revilla por ser mi amiga, por sus consejos y por su apoyo. Por acompañarme desde que nos conocimos y compartir conmigo sus sueños y anhelos. Por ser una niña trabajadora y entusiasta y por permanecer a mi lado sin importar la distancia. Por ayudarme a salir de mi encierro y a recuperar mi alegría.

A Bianca Jedamzik por su apoyo, sus conocimientos, sus consejos y por ser mi amiga durante esta etapa de mi vida.

A los demás miembros de mi maravilloso grupo de trabajo: Leslie Guzmán, Mónica Ortiz, Caroline Ocampo, Nicol Bello, Gloria González, Gretta López, Giovanny Muñoz, Camilo Riaño y Mónica Melo, por su colaboración y apoyo, por todas las sonrisas y los buenos momentos. Por hacer más entretenido mi trabajo y por sus enseñanzas. Por escucharme siempre que tenía algo que decir.

A mis abuelos, Abel y Benilda, a mis tías, Miriam, Clara, Luz Marina y Consuelo, a mis tíos Javier y Fernando, a Nubia y a Jorge, por sus oraciones y por su colaboración durante mi estancia en México.

A mi prima Johana Rojas, por ser mi cómplice, mi amiga, mi hermana, mi compañía. Por acompañarme en mis locas aventuras y en mis malos y buenos momentos. Por permitirme estar a su lado y compartir conmigo sus tristezas, alegrías, sueños, miedos y logros. ¡Estoy orgullosa de ti!

A Gabo Vaca, por ser mi mayor apoyo. Por su paciencia y comprensión. Por su compañía y amor incondicionales. Por sus cuidados y preocupación cuando estaba triste o enferma. Por su positivismo, su carisma, su perseverancia y su inmenso corazón. Por confiar y creer en mí sin importar nada. Por incluirme en su vida, en sus sueños y en su futuro. Por permitirme soñar y creer de nuevo. Por regalarme tantos momentos maravillosos, tantas risas y tanta felicidad.

A mi familia hermosa, mi mamita, mi papito, mis hermanitas y mis bebés hermosos. Porque su amor fue mi mayor motivación y la razón por la cual logré culminar esta meta. Porque, aunque fue difícil siempre

conté son sus palabras de aliento y con su compañía. Porque me hicieron quien soy ahora y porque gracias a ellos seguiré cumpliendo mis sueños. Porque siempre serán mi motivo para continuar y siempre estaré orgullosa de cada uno de ellos.

A Dios, por permitirme llegar hasta este punto y por poner en mi camino las personas indicadas, aquellas que siempre traen una enseñanza a mi vida. Por todos los buenos y malos momentos, porque todos ellos han formado el ser humano que soy ahora.

Tabla de contenido

Resumen en español	i
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción	
1.1. Glifosato: generalidades	1
1.2. Uso del glifosato en el mundo	2
1.3. Glifosato en el suelo y en los sedimentos	4
1.4. Contaminación en ambientes acuáticos por glifosato.....	5
1.5. Efecto del glifosato y del Roundup® en peces	6
1.6. Neón cardenal (<i>Paracheirodon axelrodi</i>)	7
1.7. Sistema digestivo en peces	9
1.8. Efecto del glifosato en el sistema digestivo	11
Capítulo 2. Justificación	13
Capítulo 3. Hipótesis	14
Capítulo 4. Objetivo	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos.....	15
Capítulo 5. Materiales y métodos	16
5.1. Material biológico	16
5.2. Formulación comercial de glifosato: Roundup®Activo	17
5.3. Diseño experimental	17
5.4. Parámetros productivos	18
5.5. Exposición y recuperación	19
5.6. Procesamiento de los tejidos para Microscopia óptica de Alta Resolución (MOAR)	19
5.6.1. Fijación	19

5.6.2. Postfijación	20
5.6.3. Deshidratación	20
5.6.4. Inclusión en resina epóxica	20
5.6.5. Cortes y tinción	21
5.7. Fotos y morfometría	21
5.8. Concentración letal 50	21
5.9. Análisis estadístico	25
Capítulo 6. Resultados	26
6.1. Parámetros de calidad de agua	26
6.2. Parámetros productivos	27
6.3. Supervivencia y Concentración Letal 50	28
6.4. Descripción histológica	30
6.5. Morfometría de las capas de los órganos del tracto digestivo	33
6.6. Daños evidenciados por la técnica de MOAR en los órganos del tracto digestivo de <i>P. axelrodi</i> expuestos a Roundup® Activo	39
Capítulo 7. Discusión	47
7.1. Parámetros de calidad de agua	47
7.2. Parámetros productivos	48
7.3. Supervivencia y Concentración Letal 50	50
7.4. Daños en los órganos del tracto digestivo de <i>P. axelrodi</i> expuestos a Roundup® Activo	51
Capítulo 8. Conclusiones	55
Capítulo 9. Recomendaciones	57
Lista de referencias bibliográficas	58

Lista de figuras

Figura		Página
1	Moléculas del glifosato y de sal isopropilamina	1
2	Vía del shikimato con el sitio de inhibición por el glifosato	3
3	Fotografía de Neón Cardenal (<i>Paracheirodon axelrodi</i>)	8
4	Distribución geográfica de Neón Cardenal (<i>Paracheirodon axelrodi</i>)	9
5	Sistema de recirculación acuícola para recibimiento y cuarentena de <i>Paracheirodon axelrodi</i>	16
6	Esquema de montaje de las unidades experimentales	18
7	Detalle del Sistema Digestivo de <i>Paracheirodon axelrodi</i>	20
8	Supervivencia de <i>Paracheirodon axelrodi</i> durante los períodos de exposición y recuperación	29
9	Valores Probit vs Log de concentración para Roundup®Activo a 96 h de exposición	30
10	Valores Probit vs Log de concentración para Roundup®Activo a 30 h de exposición	30
11	Estómago de <i>Paracheirodon axelrodi</i>	32
12	Estómago e Intestino de <i>Paracheirodon axelrodi</i>	34
13	Intestino de <i>Paracheirodon axelrodi</i>	35
14	Detalle de los tipos celulares del estómago de <i>Paracheirodon axelrodi</i>	36
15	Detalle de los tipos celulares del intestino de <i>Paracheirodon axelrodi</i>	37
16	Daños evidenciados en el estómago de <i>Paracheirodon axelrodi</i> expuestos a Roundup®Activo durante 30 días	40
17	Daños evidenciados en el estómago de <i>Paracheirodon axelrodi</i> expuestos a 5 mg l ⁻¹ de Roundup®Activo durante 30 días	41
18	Daños evidenciados en el intestino de <i>Paracheirodon axelrodi</i> expuestos a Roundup®Activo durante 30 días	43
19	Daños evidenciados en el intestino de <i>Paracheirodon axelrodi</i> expuestos a 5 mg l ⁻¹ de Roundup®Activo durante 30 días	44
20	Daños evidenciados en el estómago de <i>Paracheirodon axelrodi</i> durante el	

	período de recuperación (45 días)	45
21	Daños evidenciados en el intestino de <i>Paracheirodon axelrodi</i> durante el período de recuperación (45 días)	46

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Parámetros de producción.....	18
2	Proporciones de resina Poli/Bed 812 y óxido de propileno	20
3	Datos de mortalidad obtenidos después de la exposición de <i>P. axelrodi</i> al herbicida Roundup®Activo por un período de 96 h y 30 días.....	22
4	Datos empleados para realizar la gráfica de la CL50 de <i>P. axelrodi</i> al herbicida Roundup®Activo por un período de 96 h.....	23
5	Datos empleados para realizar la gráfica de la CL50 de <i>P. axelrodi</i> al herbicida Roundup®Activo por un período de 30 días.....	23
6	Equivalencia de los valores Probit (Pr) y el porcentaje de población afectada o muerta	24
7	Parámetros fisicoquímicos de las unidades experimentales donde se mantuvo a <i>Paracheiroduon axelrodi</i> durante los tiempos de exposición y recuperación	24
8	Datos de crecimiento de <i>Paracheiroduon axelrodi</i> durante el tiempo de exposición y recuperación.....	25
9	Parámetros productivos de <i>Paracheiroduon axelrodi</i> expuestos a diferentes concentraciones de Roundup®Activo	26
10	Espesor de las capas del estómago de <i>Paracheiroduon axelrodi</i>	36
11	Espesor de las capas del intestino de <i>Paracheiroduon axelrodi</i>	37

Capítulo 1. Introducción

1.1. Glifosato: Generalidades

El nombre químico del glifosato es N–fosfonometilglicina, un ácido que pertenece al grupo de los herbicidas organofosforados y cuyo principal producto de degradación es el metabolito ácido fosfónico aminometil (AMPA, por sus siglas en inglés) (Contardo-Jara *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2011). En grado técnico, el glifosato es un polvo cristalino incoloro, inoloro, poco soluble en agua (1.2% a 25 °C) e insoluble en otros solventes debido a los fuertes puentes de hidrógeno intramoleculares que genera (Swedish International Development Cooperation Agency, 2009; Pérez *et al.*, 2011). A pesar de esto, varias sales derivadas del glifosato tienen una solubilidad mayor sin perder la capacidad herbicida que caracteriza al compuesto original. Un ejemplo de estas es la isopromilamina, la cual es una de las formulaciones comúnmente empleadas (Figura 1) (Heath, 1995; Pérez *et al.*, 2011).

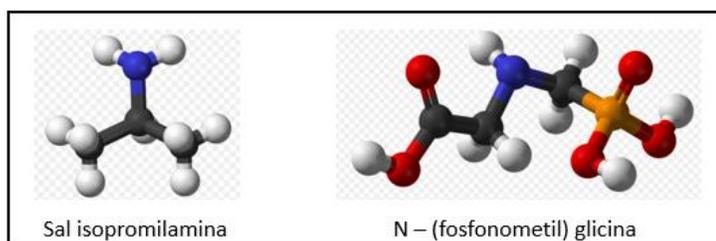


Figura 1. Moléculas del glifosato y de la sal isopromilamina. Los códigos de color son: Negro=Carbono, Blanco=Hidrógeno, Rojo=Oxígeno, Azul=Nitrógeno, Naranja=Fósforo. Modificado de León (2011).

Las formas comerciales del glifosato generalmente contienen algunos ingredientes inertes o adyuvantes, los cuales principalmente son agentes tensioactivos o surfactantes y compuestos antiespumantes (Jeyaratnam y Maroni, 1994; Swedish International Development Cooperation Agency, 2009). Los surfactantes son sustancias químicas que reducen la tensión superficial del líquido en el que están disueltos y disminuyen la permeabilidad de las membranas, perturbando el transporte a través de éstas; los compuestos antiespumantes son aditivos químicos que reducen y dificultan la formación de espuma en procesos industriales (Storm, 2012; Mesnage *et al.*, 2013). Algunos ingredientes inertes incluidos en formulaciones de glifosato son el polioxietileno alquilamina (POEA), el propilenglicol, la glicerina, el sulfito de sodio, el benzoato de sodio, el ácido sórbico, la sal de sodio de o-fenilfenol, el metil p–hidroxibenzoato, el 3–yodo–2–propinil butyl carbamato, entre otros (Swedish International

Development Cooperation Agency, 2009). Numerosas investigaciones han demostrado que los adyuvantes les confieren mayor toxicidad a los pesticidas sobre los organismos, razón por la cual es poco común que en las etiquetas de los productos se listen los componentes en su totalidad. Una de las formulaciones comerciales de glifosato más empleadas a nivel mundial es el Roundup®, el cual contiene sal isopropilamina (IPA) (35–50%), además de los ingredientes inertes, entre los que resalta el POEA el cual es altamente tóxico y está presente en un 15-18% del producto (Pérez *et al.*, 2011; Sihtmäe *et al.*, 2013; Mesnage *et al.*, 2013).

El mecanismo de acción del glifosato es de tipo sistémico, lo que indica que se moviliza por el floema, llegando a todos los órganos de la planta. Al ser aplicado entra en contacto con la superficie de las hojas, para luego ser absorbido por las células y transportado hacia las fuentes de síntesis y almacenamiento de azúcares, tales como los brotes, las raíces y los tejidos meristemáticos (Pérez *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2011). Una vez allí interviene en la ruta del ácido shikímico (Figura 2) durante la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos, por medio de la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil shikimato-3 fosfato sintetasa (EPSP), lo que impide la producción de ácido corísmico, el cual es precursor de diversos compuestos aromáticos en bacterias, hongos y plantas (Duke y Powles, 2008; McQueen *et al.*, 2012). Los compuestos aromáticos esenciales generados por estos organismos son usados en la síntesis de proteínas y en la elaboración de productos secundarios de las plantas, entre los que cabe mencionar los promotores e inhibidores de crecimiento, los precursores de lignina, los flavonoides, los taninos y otros compuestos fenólicos (Pérez *et al.*, 2011; Relyea, 2005).

1.2. Uso del glifosato en el mundo

El glifosato es el herbicida más usado a nivel mundial con un incremento dramático en su producción de 10,000 t en 1992 a 620,000 t en el 2008 (Coupe *et al.*, 2011; Bøhn *et al.*, 2014). Según Salazar y Aldana (2011) y Mink *et al.* (2012), en la actualidad 130 países entre ellos Estados Unidos, Brasil, Argentina, Paraguay, Perú, México y Colombia, registran el uso del glifosato para el control de malezas de cultivos como el maíz, el frijol, el trigo, el tomate, la vid, el sorgo, la papa, la caña de azúcar, el café, el plátano y algunos cítricos, entre otros. Sin embargo, el verdadero aporte a las estadísticas del uso del glifosato se atribuye a la introducción de los cultivos genéticamente modificados (GM), específicamente aquellos resistentes al glifosato (GR), los que comenzaron a comercializarse en Estados Unidos desde el año 1996. El primer cultivo GR introducido en el mercado fue la soja, seguida por el algodón, el maíz, la canola, la alfalfa y la remolacha azucarera (Pérez *et al.*, 2011; Bøhn *et al.*, 2014). Los países que reportan las mayores extensiones cultivadas de estas semillas para el año 2013 - 2014 son Estados Unidos con 73.1

millones de ha, Argentina con 24.3 millones de ha, Paraguay con 4.2 millones de ha y Brasil con 1.9 millones de ha, en donde también se evidencia un uso elevado de glifosato (Pérez *et al.*, 2010; Coupe *et al.*, 2012).

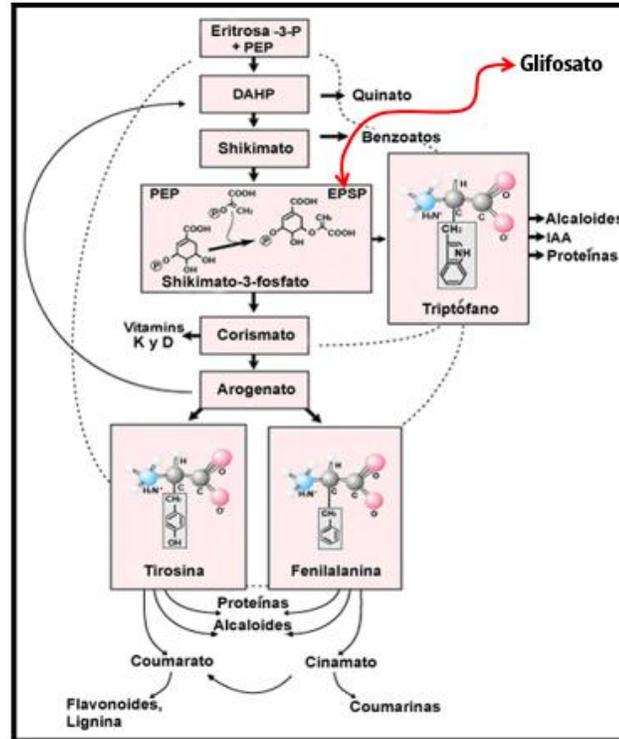


Figura 2. Vía del shikimato con el sitio de inhibición por el glifosato. Los productos generados y sobre los cuales hay un efecto inhibitorio. Modificado de <http://passel.unl.edu/pages/> (2015).

En México el uso de plaguicidas para el año 2009 fue de 122,990 t, siendo el glifosato el herbicida más consumido por su bajo costo, sus diversas formas de comercialización bajo los nombres de Aquamaster, Faena, Mamba, Sankill, Glyphos, Roundup y Ramrod, en sus múltiples presentaciones incluidas el concentrado, el gránulo, líquido y polvo soluble, la solución concentrada y la solución acuosa, las cuales se expenden en concentraciones de 350 g l^{-1} a 720 g kg^{-1} de ingrediente activo (IA) (Salazar y Aldana, 2011; García-Gutierrez y Rodríguez-Mesa, 2012). Según la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), el glifosato se considera un herbicida ligeramente tóxico (grado IV de toxicidad), con un DL_{50} en ratas superior a 5000 mg kg^{-1} , ingesta diaria admisible (IDA) de 0.3 mg kg^{-1} y límite máximo residual (LMR) en maíz y frijol, de 0.1 y 0.2 mg kg^{-1} respectivamente (COFEPRIS, 2009).

En Colombia el glifosato es usado comúnmente para el control de malezas, para la maduración de caña de azúcar y de algunos granos y para la erradicación, por medio de la aspersión aérea, de cultivos ilícitos

de coca, marihuana y amapola (Gómez *et al.*, 2012). Este herbicida es comercializado principalmente bajo la presentación de Roundup® Activo y debido a su continuo uso como controlador de casi cualquier tipo de cultivo, llegó a ocupar el primer lugar en ventas de plaguicidas del país (Vargas, 2002; Sherret, 2005; Gómez *et al.*, 2012).

Para el período de 1992 a 1998 se estima que se gastaron alrededor de \$ 53,211,497 dólares en el programa de fumigación, de los cuales \$24,483,783 dólares (46.0%) se utilizaron para comprar el glifosato y \$28,727,714 dólares (54.0%) para financiar la operación. Con este dinero se estipula que se controló un total de 19,472 ha de amapola y 46,400 ha de coca (Vargas, 2002). Estadísticas más recientes reportan que para el año 2014 se fumigaron alrededor 55,532 ha de coca, principalmente en los Departamentos de Antioquía y Caquetá, Colombia (UNODC, 2015).

En septiembre del año 2015, el gobierno de Colombia prohibió las aspersiones de glifosato en cultivos ilícitos de coca y amapola. A pesar de esto, se ha cuestionado el impacto que tendrá esta medida en la salud pública y en el medio ambiente, si se considera que el mayor aporte a las estadísticas sobre el uso de este herbicida se atribuye a los cultivos lícitos y de consumo humano, los cuales contribuyen entre un 86 a 90 % (Solomon *et al.*, 2007). Esta situación es preocupante, teniendo en cuenta que en la actualidad se encuentran residuos de glifosato en varios cuerpos de agua del territorio colombiano en concentraciones de aproximadamente 5 mg l⁻¹ (Gómez *et al.*, 2012), siendo el límite permisible 0.9 mg l⁻¹ (Administración de Obras Sanitarias del Estado, 2006), lo cual podría ocasionar alteraciones adversas en varias especies de peces nativos como la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), el yamú (*Brycon amazonicus*), el bocachico (*Prochilodus magdalenae*) y el neón cardenal (*Paracheirodon axelrodi*), entre otros (Gómez *et al.*, 2012).

1.3. Glifosato en el suelo y en los sedimentos

Las sales derivadas del glifosato son altamente solubles en agua (10,000 a 15,700 mg l⁻¹ a 25 °C) y se fijan con relativa facilidad a las partículas de suelo. La vida media estimada para este herbicida tiene un amplio rango que va de 1.7 a 142 días, lo que es debido a algunos factores, siendo el más importante la biología del suelo, de la cual dependerá la degradación del herbicida (Annett *et al.*, 2014). Otros factores que afectan la disponibilidad del glifosato en el suelo son la composición mineralógica, el pH, el contenido de fosfatos y la cantidad de materia orgánica, además del tipo de metabolito en contacto con el suelo, es decir, si se trata de glifosato puro, AMPA o productos comerciales (Borggaard y Gimsing, 2008; Annett *et al.*, 2014). Comparativamente con otros pesticidas, el glifosato tiene una sorción muy

alta debido a los tres grupos funcionales con los que cuenta (carboxilo, amino y fosfato), característica que facilita su absorción por los diferentes minerales del suelo. Además, al ser un ácido poliprótico a pH de 4 – 8 forma aniones mono y divalentes los cuales son altamente afines por cationes trivalentes tales como Al^{3+} y Fe^{3+} (Borggaard y Gimsing, 2008).

Barja y Dos Santos (2005) determinaron que el pH y el contenido de materia orgánica son inversamente proporcionales a la absorción de glifosato en el suelo, de esta manera a medida que incrementa el pH y el contenido de materia orgánica mayor es la disponibilidad del herbicida, facilitando su lixiviación y escorrentía a las fuentes de agua subterráneas o superficiales cercanas. Otro factor que afecta la fijación de glifosato en el suelo es el contenido de moléculas fosfatadas, las cuales compiten por los sitios de absorción con este herbicida (por el grupo fosfato que posee), de esta manera, cuando la concentración de fósforo es alta, como en el caso de suelos fertilizados con fosfatos, el glifosato no es fijado al sedimento (Tu *et al.*, 2001; Duke y Powles, 2008; Annett *et al.*, 2014).

1.4. Contaminación de ambientes acuáticos por glifosato

El uso intensivo de glifosato en agricultura ha ocasionado que este herbicida entre en contacto con los efluentes de manera accidental por medio de lixiviación, pulverización y escorrentía (Vendrell *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2011). Pérez *et al.* (2010), detectaron concentraciones de glifosato en arroyos y ríos superiores a 1.5 mg l^{-1} , las cuales se mantuvieron en el agua por un período de 14 días, concordando con lo reportado por Giesy *et al.* (2000). Sin embargo, otros autores afirman que han encontrado trazas de glifosato luego de 30 a 90 días (Livingston, 1977; Cox, 1998; Gómez *et al.*, 2012). Feng *et al.* (1990), estimaron concentraciones de glifosato que oscilaban entre 1.1 y 1.9 mg l^{-1} después de 27 h de aplicación. Por su parte, Edwards *et al.* (1980) observaron concentraciones de 5.2 mg l^{-1} de glifosato en el agua de escorrentía de un cultivo con labranza cero tratado con 8.6 kg ha^{-1} del herbicida, estimándose que 1.85% de la cantidad aplicada al campo llega a los efluentes luego de una tormenta en el día de aplicación.

Los herbicidas basados en el glifosato que son empleados en ambientes acuáticos para controlar la proliferación de algas mostraron mayor movilidad y concentración que los herbicidas de uso agrícola (Orta, 2002; Dill *et al.*, 2008). Se ha calculado que 58% de los herbicidas acuáticos pueden llegar a distancias entre los 8 y 14.4 km corriente abajo de los sitios de introducción, lo que incrementa el grado de afectación en el ambiente de este tipo de productos (Duke y Powles, 2008). A pesar de esto son pocos los datos publicados sobre la concentración de glifosato en ambientes acuáticos. Algunos autores han

evidenciado que concentraciones que oscilan entre 1.24 mg l⁻¹ y 5.2 mg l⁻¹ tienen efectos negativos en diversos organismos acuáticos, los cuales, además tienen mayor susceptibilidad al glifosato que algunas especies terrestres (Comes *et al.*, 1976; Newton *et al.*, 1994).

El efecto del glifosato en algas y plantas acuáticas ha sido evaluado por diversos autores, encontrando que hay amplios rangos de susceptibilidad entre las especies evaluadas, que varían de 0.22 mg l⁻¹ para la diatomea *Skeletonema costatum* a 590 mg l⁻¹ en la microalga *Chlorella pyrenoidosa* (Tsui y Chu, 2003; Maule y Wright, 1984). Respecto a las macrofitas, la sensibilidad demostrada por estos organismos estuvo en el rango de 0.22 mg l⁻¹ para *Myriophyllum aquaticum* a 20.5 mg l⁻¹ para *Lemma gibba* (Turgut y Formin, 2002; Sobrero *et al.*, 2007).

En invertebrados acuáticos el efecto del glifosato también ha sido objeto de estudio, encontrándose que la concentración letal 50 (CL₅₀) para el copépodo marino *Acartia tonsa* fue de 49.3 mg l⁻¹, mientras que para el cladóceros *Ceriodaphnia dubia* fue de 415 mg l⁻¹ (Tsui y Chu, 2003). Tate *et al.* (2000), estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de glifosato (0.1, 1 y 10 mg l⁻¹) en el caracol *Pseudosuccinea columella*, encontrando alta toxicidad para todos los valores propuestos, además de un incremento en la actividad enzimática y anomalías en la puesta de huevos y en la reproducción.

1.5. Efecto del glifosato y del Roundup® en peces

Los estudios sobre el efecto del glifosato en peces se han desarrollado principalmente en los últimos 10 años debido al creciente interés y el renovado conocimiento de las consecuencias de estos en la estructura y función de los sistemas biológicos, al impactar los diferentes niveles de organización desde el molecular hasta el ecosistémico (Mauck y Olson, 1976; Van der Oost *et al.*, 2003). A nivel tisular, los estudios histológicos del efecto de Roundup® en concentraciones subletales (0.5 mg l⁻¹) en *Jenynsia multidentata* han indicado alteraciones tales como lesiones necróticas y proliferativas, aneurismas e infiltración de leucocitos en branquias e hígado, además de disminución en la capacidad reproductiva de los machos de esta especie (Murty, 1986; Hued *et al.*, 2012). En *Cyprinus carpio* expuestos a 5 mg l⁻¹ de glifosato, se observó hiperplasia epitelial y edema subepitelial branquial (Neškovic *et al.*, 1996). Jiraungkoorskul *et al.* (2002) encontraron denudación, fusión de lámelas secundarias, hiperplasia e hipertrofia, aneurisma e incremento en la secreción de mucus en las branquias al exponer a *Oreochromis niloticus* a 36 mg l⁻¹ de Roundup®. Gómez (2012) observó en *P. brachipomus* hiperplasia de las células interlamelares, desprendimiento de células epiteliales, algunos cambios degenerativos y proliferativos

de las células apicales, desarreglos de las células pilares, edema y festoneado del epitelio lamelar, además una leve hipertrofia e hiperplasia de las células de moco y cloro en el espacio interlamelar.

Alteraciones histológicas ocasionadas por presentaciones comerciales de glifosato también han sido reportadas para hígado en *C. carpio*, *O. niloticus*, *Prochilodus lineatus*, *Carassius auratus*, *Anabas testudineus* y *Heteropneustes fossilis*, además de incremento en los niveles de cortisol, glucosa y catalasa, disminución significativa en la superóxido dismutasa, la glutatión S-transferasa y la glutatión reductasa (Samanta *et al.*, 2014; Ma y Li, 2015). A concentraciones de 5 y 15 mg l⁻¹ de Roundup® se ha indicado un incremento en el tamaño de los hepatocitos con núcleos picnóticos y presencia de vacuolas en *O. niloticus* (Jiraungkoorskul *et al.*, 2003) y hepatotoxicidad en *Piaractus mesopotamicus* (Shiogiria *et al.*, 2012). Estudios del efecto de concentraciones subletales (0.1 mg l⁻¹ y 1 mg l⁻¹) de Roundup® en alevines de *P. brachipomus* demostraron desplazamiento de núcleos de los hepatocitos hacia la periferia, aparición de vacuolas picnóticas y cambios microcirculatorios, como congestión de vasos sanguíneos y aumento en la heterogeneidad de los hepatocitos (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011; Gómez, 2012).

En juveniles de *P. axelrodi* expuestos a concentraciones subletales de Roundup® (0.1 mg l⁻¹, 1 mg l⁻¹ y 5 mg l⁻¹) se han reportado daños en el cerebro, el hígado y las branquias. El principal efecto atribuido a Roundup® en el cerebro fue la presencia de células similares a mastocitos (CSM) en varios núcleos neuronales, lo cual es un indicativo de estrés, puesto que estas células están involucradas en los procesos inflamatorios, en la respuesta ante las alergias y en la generación de moléculas apoptóticas (Riaño-Quintero, 2016). En relación con el hígado se observó hipertrofia en los hepatocitos, congestión vascular, núcleos picnóticos y migrados y un aumento en el número y tamaño de las vesículas hialinas y lipídicas (Perdomo-Ballén *et al.*, 2015). Por otro lado, las branquias presentaron desarreglo de células pilares (lo que causaba congestión vascular), hipertrofia e hiperplasia de células de mucus y células ricas en mitocondrias, edemas y desprendimiento epitelial (Arteaga *et al.*, 2015).

1.6. Neón cardenal (*Paracheirodon axelrodi*)

P. axelrodi pertenece al orden Characiforme, esta especie se caracteriza por su pequeño tamaño (de 3 a 4 cm de longitud en etapa adulta), por poseer una franja horizontal de color azul y otra de color rojo intenso y por tener una pequeña aleta adiposa en su parte dorsal, escamas de tipo cicloide, una línea lateral de 32 a 33 grupos de receptores, una mandíbula superior con una hilera de dientes con cinco cúspides y una mandíbula inferior con tres a cuatro cúspides (Figura 3). Aunque el dimorfismo sexual es poco evidente, se indica que las hembras maduras son de mayor tamaño y de forma más abultada en el

abdomen que los machos, además de que pueden diferenciarse por su línea de color azul verdosa, la cual en las hembras es de forma curva y en los machos es una línea recta (Landines *et al.*, 2007).



Figura 3. Fotografía de Neón Cardenal (*Paracheirodon axelrodi*). Barra 0.5 cm. Tomada de Riaño-Quintero (2016).

Esta especie se distribuye en Colombia en las zonas de la Orinoquía y Amazonía (Figura 4). Se ubica en cuerpos de agua de baja profundidad, con velocidad de corriente lenta, poca incidencia lumínica, conductividad eléctrica de 3 a 10 μS , pH entre 4.5 y 5.0 y dureza de carbonatos de 5.2 a 7.6 $\text{mg l}^{-1} \text{CaCO}_3$ (Geisler y Annibal, 1986). Los individuos de esta especie son activos durante el día y viven en grupos numerosos en los hábitats naturales. La dieta de *P. axelrodi* consta de crustáceos muy pequeños, huevos, algas y detritus. La mayoría de crustáceos consumidos son cladóceros y copépodos. Los tipos de algas que comen incluyen diatomeas (*Pinnularia* y *Navicula*) y algunas algas verdes como *Chlamydomonas*. También pueden comer hormigas, larvas de dípteros, ácaros, trozos de fruta y larvas de peces (Walker, 2004).



Figura 4. Distribución geográfica (línea en verde) de Neón Cardenal (*Paracheirodon axelrodi*). Tomada de <http://www.elacuariodulce.com/t3021-paracheirodon-axelroditetra-cardenal-o-neon-cardenal>.

1.7. Sistema digestivo en peces

El sistema digestivo lleva a cabo cuatro funciones, que son: (1) la digestión del alimento, (2) la osmorregulación, (3) la secreción de hormonas involucradas en la regulación de la digestión, el metabolismo y otras funciones del cuerpo y, (4) la defensa del organismo ante la invasión de patógenos, sustancias y metabolitos tóxicos del medioambiente (Ostrander, 2000; Merrifield y Ringo, 2014). El tracto gastrointestinal de los peces se divide en cuatro regiones: la cabeza, el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior (Harder, 1975). La cabeza está compuesta por los dientes, la boca y la faringe, su función principal es la adquisición y el procesamiento mecánico del alimento. El intestino anterior está comprendido por el esófago y el estómago, órganos en donde se lleva a cabo la digestión mecánica y química del alimento. El intestino medio contiene la porción más grande del intestino y es el lugar donde continúa el procesamiento químico del alimento y en el que ocurre principalmente la absorción de los nutrientes. La región del intestino posterior, es la sección final del intestino en la que se encuentra el recto, porción del órgano que se encarga de la excreción de heces (Gartner y Hiatt, 2007; Kerr, 2010; Grosell *et al.*, 2011).

El esófago es un órgano de transición que conecta la faringe con el estómago o el intestino (en peces que carecen de estómago) (Brown, 1957; Hoar *et al.*, 1979; Halver y Hardy, 2002; Grosell *et al.*, 2011). Morfológicamente el esófago se compone de cuatro capas: la mucosa, la submucosa, la muscular y la serosa (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011). La capa mucosa se caracteriza por la presencia de pliegues longitudinales que facilitan el paso del alimento. Usualmente esta capa se compone de epitelio estratificado, células caliciformes y una fuerte membrana basal. Las células caliciformes protegen y lubrican la capa mucosa del daño químico y mecánico generado durante el proceso de deglución por medio de la secreción de mucus (Hoar *et al.*, 1979; Halver y Hardy, 2002; Grosell *et al.*, 2011). La segunda capa, la submucosa se compone de tejido conectivo vascularizado (Grosell *et al.*, 2011). La capa muscular, puede presentar musculo estriado con varias orientaciones, dependiendo de los hábitos alimenticios del pez. Finalmente, la capa serosa se encuentra generalmente constituida por tejido conectivo laxo (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011).

El estómago es una porción del tracto digestivo con un revestimiento de células distintivo, en donde es secretado ácido y algunas enzimas digestivas como las pepsinas, para el procesamiento químico del alimento. En términos histológicos, el estómago tiene cuatro capas (al igual que el esófago): la mucosa, la submucosa, la muscular y la serosa. Adicionalmente, el estómago se divide en dos porciones, una

cardíaca (anterior) y otra fúndica o pilórica (posterior), las cuales son separadas por una región transicional y se diferencian en que la primera contiene glándulas gástricas, mientras que la segunda carece de éstas (Hoar *et al.*, 1979; Halver y Hardy, 2002; Grosell *et al.*, 2011). La mucosa de la zona cardíaca presenta epitelio columnar intercalado con invaginaciones o criptas gástricas que desembocan en túbulos o alveólos. Además, la mucosa está compuesta por células oxinticopépticas, como las parietales y las zimogénicas, que contienen gránulos acidofílicos y se encargan de la secreción de mucinas, ácidos, pepsinas y otros compuestos que ayudan a la digestión química del alimento (Halver y Hardy, 2002; Grosell *et al.*, 2011).

El intestino es un órgano que varía ampliamente en longitud y estructura dependiendo de los hábitos alimenticios de las diferentes especies. En términos histológicos, el intestino contiene epitelio columnar simple con numerosas microvellosidades terminales y células caliciformes. Otros tipos celulares que se encuentran comúnmente en el intestino son los enterocitos, las células enteroendocrinas y las células rodlet (Grosell *et al.*, 2011).

El tracto digestivo de *P. axelrodi* se caracteriza por poseer una boca terminal relativamente grande. Para evitar el daño ocasionado por el tipo de alimentos que consume, el esófago de esta especie está provisto por una capa mucosa y por células caliciformes (Amin *et al.*, 1992; Olaya *et al.*, 2007). La capa muscular del estómago y del intestino está formada por músculo liso con dos orientaciones, característica que facilita movimientos peristálticos en varias direcciones y acción enzimática eficiente que permite una mejor absorción de nutrientes (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011). El intestino de *P. axelrodi* tiene un gran número de células caliciformes, lo cual permite que haya una mejor protección y lubricación para la excreción de las heces (Muñoz *et al.*, 2006).

1.8. Efecto del glifosato en el sistema digestivo

Investigaciones recientes han demostrado que el glifosato tiene diversos efectos negativos sobre el sistema digestivo en peces, cerdos, ganado, ovejas, gallinas y humanos. El contacto de estos organismos con el glifosato puede darse de manera directa, al ingerir agua de fuentes contaminadas con el herbicida o de manera indirecta, al consumir alimento elaborado con semilla de soya, maíz y/o trigo GR (Hued *et al.*, 2012; Samsel y Seneff, 2013). Uno de los efectos adversos observados es la perturbación del balance de la flora intestinal, lo que implica una disminución en la población de bacterias benéficas, como *Enterococcus*, *Bifidobacteria* y *Lactobacillus*, y un incremento en la población de bacterias patógenas, entre ellas *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Clostridium*. Esta última es de especial importancia, ya que

excreta sustancias como el p – Cresol y el fenol, las cuales son altamente tóxicas, cancerígenas y pueden ocasionar daños en el sistema nervioso central, el sistema cardiovascular, los pulmones, el riñón y el hígado (Samsel y Seneff, 2013; Seneff *et al.*, 2015).

Otra secuela del efecto del glifosato que ha sido ampliamente documentada es la interferencia en la citocromo P450 (CYP), la cual cumple diversas funciones, entre ellas el metabolismo de medicamentos y sustancias tóxicas y la producción de ácido biliar, hormonas esteroideas y ácidos grasos. Un estudio en ratas demostró que el glifosato disminuye los niveles de CYP y la actividad monooxigenasa en el hígado y el intestino. Además, la exposición intraperitoneal de Roundup en ratas, en concentraciones agudas y por pequeños intervalos de tiempo, induce daños irreversibles en los hepatocitos y en los riñones (Williams *et al.*, 2000; Sihtmäe *et al.*, 2013). En humanos se evidenció que la CYP3A, la cual se expresa en las microvellosidades intestinales y cumple un papel importante en el metabolismo de medicamentos, es afectada por el glifosato causando una disminución en su expresión. De igual manera, se ha visto que las personas con síndrome de hígado graso no alcohólico podrían haber sido expuestas a concentraciones de glifosato, lo cual se presume que ocasionaría la inhabilidad para metabolizar el colesterol a través del hígado, debido al deterioro en la CYP. Otras enfermedades que han sido relacionadas con la exposición al glifosato en humanos son la esofagitis eosinofílica y la inflamación de diversos órganos por la acumulación de sulfatos (Samsel y Seneff, 2013; Seneff *et al.*, 2015).

El daño en las microvellosidades asociado a la exposición a glifosato, además de las implicaciones estructurales, tiene importancia funcional, puesto que se ha evidenciado que debido a esto puede verse deteriorada la capacidad para absorber una serie de importantes nutrientes, incluyendo las vitaminas B6 y B12, el ácido fólico, así como el hierro, el calcio y el cobalto (Shehata *et al.*, 2013). También se ha mencionado que el glifosato puede quelar algunos minerales, impidiendo su disponibilidad lo que ocasiona enfermedades por la carencia de los mismos. De igual manera se sabe que la exposición al glifosato altera la síntesis de triptófano, tirosina y metionina, lo que genera una disminución de la síntesis del neurotransmisor monoamina y de la serotonina en el cerebro, lo que se asocia con trastornos de la conducta, depresión, dispepsia funcional y trastornos gastrointestinales (por efecto de la sobreexpresión o inhibición de la serotonina) (Samsel y Seneff, 2013; Seneff *et al.*, 2015).

Un estudio realizado por Senapati *et al.* (2009), evidenció que la exposición de peces carnívoros al glifosato genera una disminución en la actividad de las enzimas proteasa, lipasa y amilasa en el esófago, estómago e intestino, además de que perturba las capas mucosas y ocasiona desarreglos en la estructura

de las microvellosidades de las paredes del intestino. Adicionalmente se observó una exagerada secreción de mucinas a lo largo del tracto alimenticio y una limitación en el rompimiento de complejos proteicos, lo cual puede causar una respuesta autoinmune y daños en el revestimiento del intestino delgado. Se ha evidenciado que estos síntomas son similares a los que se pueden reportar para humanos (Samsel y Seneff, 2013; Seneff *et al.*, 2015).

Capítulo 2. Justificación

P. axelrodi es una especie de pez ornamental de gran importancia económica en Colombia. Debido a que su distribución se localiza en cuerpos de agua de algunas de las regiones en las cuales se realizan aspersiones con presentaciones comerciales de glifosato, es importante estudiar el efecto del herbicida Roundup® Activo en el aparato digestivo de esta especie, teniendo en cuenta los daños mencionados en otros grupos de organismos. La escasa información publicada al respecto y la inexistencia de estudios que establezcan el nivel de recuperación celular de los individuos posterior a la exposición con el herbicida, hace necesario profundizar en este campo con la finalidad de lograr evidencia científica que sustente la necesidad de modificar la legislación respecto al uso de este herbicida en Colombia.

Capítulo 3. Hipótesis

El efecto de la exposición de *P. axelrodi* al herbicida Roundup®Activo será dosis-dependiente, lo que ocasionará daños en el tracto digestivo e influenciará negativamente el crecimiento y la supervivencia.

Capítulo 4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones del herbicida Roundup® Activo sobre el aparato digestivo, el crecimiento y la supervivencia de *P. axelrodi*.

4.2. Objetivos específicos

- Describir los cambios histopatológicos de las células y tejidos del tracto digestivo de *P. axelrodi* expuestos a concentraciones de Roundup® Activo (0.1, 1 y 5 mg l⁻¹).
- Determinar las variaciones morfométricas de las células y de las capas del tracto digestivo de *P. axelrodi* expuestos a concentraciones de Roundup® Activo.
- Evaluar la dinámica de crecimiento y los parámetros productivos de neón cardenal (*P. axelrodi*) expuestos a concentraciones de Roundup® Activo.
- Evaluar el efecto de tres concentraciones de Roundup® Activo sobre la supervivencia de neón cardenal (*P. axelrodi*).

Capítulo 5. Materiales y métodos

5.1. Material biológico

Los juveniles de neón cardenal *P. axelrodi* (2.3 – 2.7 cm de longitud total) se adquirieron en tiendas especializadas en acuarística, en Bogotá y Villavicencio, Colombia. Se compraron 400 peces (160 en exceso) que fueron colocados en un sistema de recirculación acuícola (SRA) de 250 litros, con aireación (2000 cc min⁻¹) y flujo de agua bajos (700 l h⁻¹) (Figura 5). Los parámetros de calidad de agua se mantuvieron en las concentraciones adecuadas para los organismos: pH de 6.0 – 6.5, OD de 4.5 mg l⁻¹, temperatura de 26°C – 28°C, NAT – N <1 mg l⁻¹ y NO₂ – N < 0.3 mg l⁻¹ (Beltrão y Rocha, 2006).



Figura 5. Sistema de recirculación acuícola empleado para el recibimiento y cuarentena de los individuos de *Paracheirodon axelrodi*.

Una vez transcurrió el período de cuarentena, los peces fueron trasladados a las unidades experimentales (acuarios de 20 L), acondicionadas con aireación constante y sin filtro durante el período de exposición al Roundup® Activo. La densidad empleada fue de 20 peces por acuario. Los organismos fueron alimentados tres veces al día (9:00, 12:00 y 16:00 h) con un alimento comercial “Tetra color®” con 45.7% de proteína cruda (PC) ajustada al 5% de la biomasa total. El fotoperíodo fue de 12:12 h (luz: oscuridad), mientras que la temperatura se mantuvo entre los 27°C – 28°C. Dos veces a la semana se midieron parámetros de calidad de agua como: oxígeno disuelto (OD), pH (Hanna® HI9829), nitrógeno amoniacal total (NAT) (kits para acuario marca API®) y nitritos (N-NO₂) (kits para acuario marca API®) y se registró la mortalidad de los individuos durante el período de exposición y de recuperación.

5.2. Formulación comercial de glifosato: Roundup® Activo

El estudio se llevó a cabo con el herbicida Roundup® Activo (formulación comercial), cuyo ingrediente activo es el glifosato en una concentración de 363 g L^{-1} , equivalente a 446 g L^{-1} de sal potásica de N-(fosfometil)-glicina. La naturaleza y concentración del surfactante son desconocidas, puesto que la casa comercial Monsanto no reporta datos de la misma en la etiqueta del producto.

Para evitar daños en el ambiente, generados por el herbicida empleado, el agua usada en el experimento fue mantenida en tanques de plástico por un período de 30 días, período durante el cual se estima que se transforma el herbicida (haciendo que sea menos tóxico), después de este tiempo el agua fue desechada.

5.3. Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA) efecto fijo balanceado con tres réplicas por tratamiento (Figura 6). Se evaluaron cuatro tratamientos (TR): TR1 (0 mg L^{-1} de glifosato), TR2 (0.1 mg L^{-1} de glifosato), TR3 (1 mg L^{-1} de glifosato) y TR4 (5 mg L^{-1} de glifosato). En cada unidad experimental (acuarios de 20 L) se mantuvo una densidad de 20 peces por acuario, con un peso promedio de $0.19 \pm 0.09 \text{ g}$, longitud total promedio de $2.7 \pm 0.23 \text{ cm}$ y longitud estándar promedio de $2.3 \pm 0.21 \text{ cm}$. Las concentraciones empleadas se tomaron a partir de estudios realizados previamente por el laboratorio de Ictiología de la Universidad Militar Nueva Granda, Colombia, en donde ya se habían observado daños celulares en *P. axelrodi* en órganos como las branquias, el hígado y el cerebro (Arteaga *et al.*, 2015; Perdomo-Ballén *et al.*, 2015 ; Riaño-Quintero, 2016).

Los peces fueron expuestos durante 30 días al herbicida Roundup® Activo. Este período se estableció por reportes previos, en donde se estipula que la vida media del herbicida es de 3 a 4 semanas (Gómez-Ramírez, 2013) y por trabajos de toxicología realizados en la especie objeto de estudio (Arteaga *et al.*, 2015; Perdomo-Ballén *et al.*, 2015 ; Riaño-Quintero, 2016).

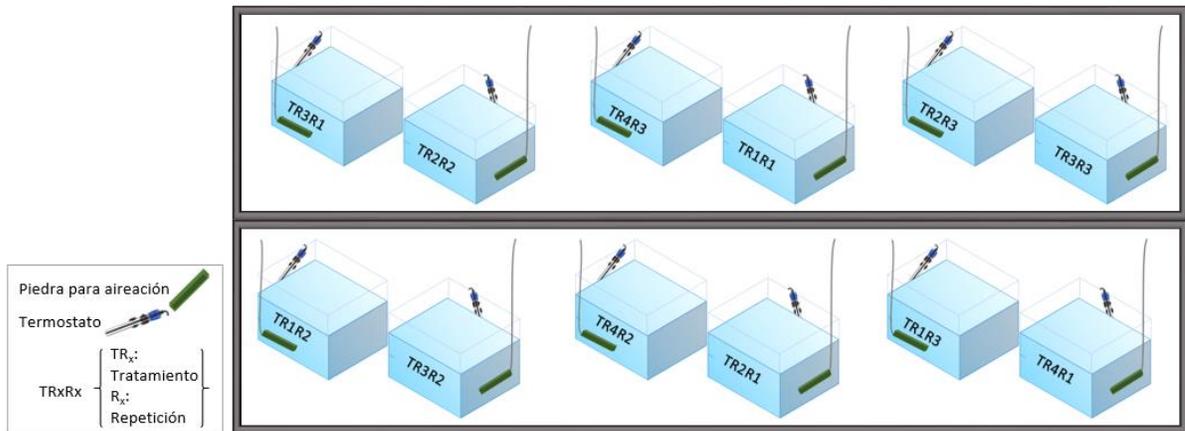


Figura 6. Esquema del montaje de las unidades experimentales con la distribución aleatoria de los tratamientos y las repeticiones.

5.4. Parámetros productivos

Al inició (tiempo 0) y al final (8 días para el TR4 y 45 días para los demás tratamientos) se registró el crecimiento de los peces (peso y longitud). Así mismo se estimaron algunos parámetros productivos, los cuales se calcularon a partir de las formulas propuestas por: Pineda (1999), Salazar y Ocampo (2002) y Mercado *et al.* (2006) (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros productivos a evaluar en el pez neón cardenal.

Parámetro	Fórmulas
Ganancia en peso	$GP = peso\ final - peso\ inicial$ (1)
Tasa de crecimiento absoluto	$TCA = \frac{peso\ final - peso\ inicial}{tiempo\ final - tiempo\ inicial}$ (2)
Tasa de crecimiento específico	$TCE = 100 * \frac{\ln(peso\ final - peso\ inicial)}{tiempo}$ (3)

5.5. Exposición y recuperación

Durante los 30 días de exposición se realizaron recambios diarios del 50% del volumen de agua en todas las unidades experimentales. Posteriormente se adicionó la mitad de la concentración inicial de

Roundup® y el volumen de agua restante para completar el volumen inicial en cada una de las unidades experimentales.

Una vez transcurrido el tiempo de exposición se inició con el período de recuperación de los organismos (15 días). Durante este período se colocó en cada una de las unidades experimentales, un filtro biológico de cuentas plásticas, con la finalidad de mantener los compuestos nitrogenados en las concentraciones adecuadas.

5.6. Procesamiento de los tejidos para microscopia óptica de alta resolución (MOAR)

Para el sacrificio de los peces se siguieron los protocolos de ética establecidos (CCAC guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing, 2005), en donde se sugiere el uso de anestésicos como la benzocaina (0.5 g l^{-1}) y la disección medular a nivel cervical. Al iniciar el experimento se sacrificaron seis peces para verificar el estado de los mismos y una vez que se cumplió el período de exposición y de recuperación se tomaron de manera aleatoria seis peces por tratamiento (dos por acuario) para su posterior procesamiento, siguiendo el protocolo para MOAR establecido en el laboratorio de ictiología de la UMNG (Gómez-Ramírez, 2013).

5.6.1. Fijación

Luego de sacrificar a los peces, se realizó la extracción del sistema digestivo (Figura 7), separando el estómago e intestino, para permitir una mayor penetración del fijador. Para esta técnica se usó la solución fijadora Karnovsky modificada, la cual contiene Glutaraldehido al 2.5% y Formaldehido al 2% en buffer fosfato pH 7.2. Los órganos del tracto digestivo se mantuvieron en esta solución durante 24 horas. A continuación, se realizaron tres lavados, de 10 minutos cada uno, con buffer fosfato.

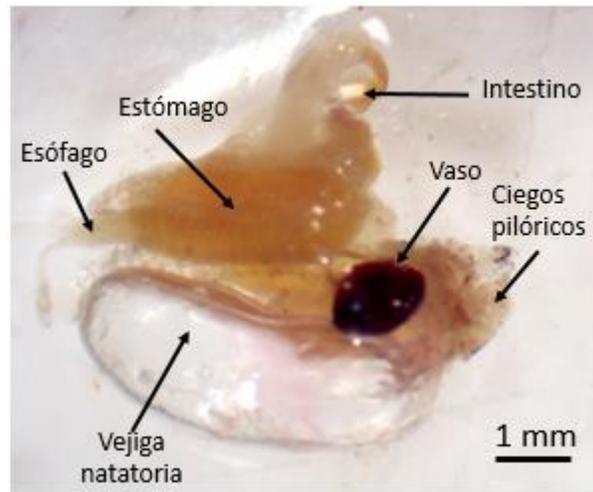


Figura 7. Detalle del sistema digestivo de *Paracheirodon axelrodi*.

5.6.2. Postfijación

Para esta fase del proceso se expuso cada una de las muestras a Tetraóxido de osmio al 2% por tres horas. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con buffer fosfato.

5.6.3. Deshidratación

Los órganos se introdujeron en concentraciones ascendentes de alcohol. Se inició con tres lavados de cinco minutos cada uno con alcohol al 70%, luego se hizo un lavado de cinco minutos con alcohol al 90%, posteriormente se empleó alcohol al 95% por 10 minutos y finalmente se realizaron dos lavados de 10 minutos con alcohol al 100%.

5.6.4. Inclusión en resina epóxica

Posterior a la deshidratación, las muestras fueron impregnadas en mezclas con diferentes proporciones de resina Poli/Bed®812 y óxido de propileno (Tabla 2). Después se realizó la polimerización con resina Poli/Bed®812 en una incubadora Fisher-Scientific a 60°C durante 48 horas.

Tabla 2. Proporciones de resina Poli/Bed®812 y óxido de propileno.

Proporción	Tiempo
Poli/Bed®812 1:2 Óxido de propileno	30 minutos

Poli/Bed®812 1:1 Óxido de propileno	30 minutos
Poli/Bed®812 2:1 Óxido de propileno	30 minutos
Poli/Bed®812	1 hora

5.6.5. Cortes y tinción

Las muestras fueron posicionadas en la resina epóxica de manera tal que se obtuvieran cortes en diferentes orientaciones (transversales y longitudinales). Se realizaron cortes de 0.5 - 1 μm de espesor con un micrótopo de rotación Slee Cut 4060. Se usó la coloración de azul de toluidina al calor siguiendo el protocolo modificado de Caldas *et al.* (1993), que tiñe los núcleos de azul intenso y el citoplasma azul claro. Finalizado el proceso de tinción se procedió al montaje permanente con laminillas y Entellan®.

5.7. Fotos y morfometría

La observación microscópica se llevó a cabo con un microscopio óptico (ZEISS) equipado con una cámara digital Axioskop (ZEISS), con la cual se tomaron las fotos. Se realizó morfometría del espesor de las capas mucosa, submucosa y muscular para el estómago e intestino, usando el software de libre distribución Image J. La medición se llevó a cabo con imágenes en un aumento de 400 X, las cuales fueron calibradas previamente. Se midieron tres cortes por pez, dejando entre cada corte medido una distancia de aproximadamente 20 μm .

5.8. Concentración letal 50

La CL_{50} (concentración necesaria para causar la muerte a un 50% de una población estudiada) se calculó para dos períodos de tiempo, 96 h y 30 días. El primer período fue considerado debido a que la mayoría de los estudios toxicológicos evalúan la CL_{50} por 96 h, lo cual más adelante serviría para comparar los resultados obtenidos con la referencia bibliográfica previamente publicada. El segundo período fue estimado teniendo en cuenta que la exposición al herbicida fue por 30 días.

Para llevar a cabo el análisis de la concentración letal media (CL_{50}) se empleó el método de análisis Probit, el cual permite ajustar los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad con la que se relaciona una variable independiente (en este caso la concentración del herbicida) y una variable dependiente (mortalidad de los organismos) por medio de una regresión lineal. Para esto, la mortalidad

se debe transformar a unidades Probit y la concentración del herbicida (en g L⁻¹) se transforma logarítmicamente. Estas transformaciones facilitan el ajuste a una línea de regresión, en la cual se puede interpolar la concentración perteneciente al Probit 0.5, el que corresponderá a la cantidad de sustancia capaz de generar un efecto deletéreo en la mitad de la población (Gamez-Rojas y Ramírez-Riveros, 2008; Soares y Coelho, 2012; Vincent, 2015).

Las concentraciones empleadas para determinar la CL₅₀ fueron 0.1 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ y 5 mg L⁻¹ por dos períodos de tiempo (96 h y 30 días), durante los cuales se cuantificó la cantidad de peces muertos, teniendo en cuenta que la densidad inicial fue de 20 peces por acuario (Tabla 3).

Tabla 3. Datos de mortalidad obtenidos después de la exposición de *P. axelrodi* al herbicida Roundup® Activo por un período de 96 h y 30 días.

Concentración (mg l ⁻¹)	Peces muertos	
	96 h	30 días
0.1	1	4
0.1	1	3
0.1	1	4
1	1	8
1	2	10
1	2	4
5	8	20
5	10	20
5	10	20

A partir de los datos de la tabla 3 se calculó el porcentaje de efecto empleando la siguiente ecuación:

$$p = \frac{r}{n} * 100$$

(4)

Donde,

p = porcentaje de efecto

r = organismos muertos o afectados

n = número total de organismos expuestos al ensayo

Una vez se calculó el porcentaje de efecto o mortalidad para los dos tiempos evaluados: 96 h (tabla 4) y 30 días (tabla 5), se reemplazó este valor por su respectiva equivalencia en Probit (tabla 6) y se llevó a cabo la representación gráfica del Probit obtenido vs el logaritmo de la concentración en $g\ L^{-1}$.

Tabla 4. Datos empleados para realizar la gráfica de la CL_{50} de *P. axelrodi* al herbicida Roundup®Activo por un período de 96 h. La concentración de exposición al herbicida está dada en $g\ L^{-1}$. Los valores Probit son los equivalentes al porcentaje de efecto previamente calculado.

Concentración ($g\ L^{-1}$)	Log Concentración	% efecto (p)	Probit
0.0001	-4	5	3.36
0.0001	-4	5	3.36
0.0001	-4	5	3.36
0.001	-3	5	3.36
0.001	-3	10	3.72
0.001	-3	10	3.72
0.005	-2.30	40	4.75
0.005	-2.30	50	5
0.005	-2.30	50	5

Tabla 5. Datos empleados para realizar la gráfica de la CL_{50} de *P. axelrodi* al herbicida Roundup®Activo por un período de 30 días. La concentración de exposición al herbicida está dada en $g\ L^{-1}$. Los valores Probit son los equivalentes al porcentaje de efecto previamente calculado.

Concentración ($g\ L^{-1}$)	Log Concentración	% efecto (p)	Probit
0.0001	-4	20	3.72
0.0001	-4	10	3.96
0.0001	-4	15	4.16
0.001	-3	50	4.16
0.001	-3	40	4.75
0.001	-3	20	5
0.005	-2.30	100	8.09
0.005	-2.30	100	8.09
0.005	-2.30	100	8.09

Teniendo los datos del Log Concentración y los valores Probit se construyó una gráfica a partir de la cual se calculó la concentración letal media. A partir de esta gráfica se obtuvo la ecuación de la recta ($y = mx + b$). Reemplazando las letras por la equivalencia de acuerdo al modelo Probit se obtuvo:

$$Probit = mx + b \quad (5)$$

Donde,

$Probit = 5$ (valor correspondiente al 50% de efecto)

x = logaritmo de la concentración

m = valor obtenido en la ecuación de la recta

b = valor obtenido en la ecuación de la recta

Luego se despejaron los valores del log de la concentración y se reemplazó $Probit = 5$, obteniéndose la ecuación:

$$Log\ concentración = \frac{5 - b}{m} \quad (6)$$

Lo que es igual a:

$$Concentración = 10^{\frac{5-b}{m}}$$

Donde,

$Log\ concentración\ ó\ concentración$ = valor a determinar

m = valor obtenido en la ecuación de la recta

b = valor obtenido en la ecuación de la recta

Tabla 6. Equivalencia del porcentaje de población afectada o muerta con el valor Probit respectivo. Modificada de Finney, 1952.

%Efecto	Probit								
0	0	20	4.16	40	4.75	60	5.25	80	6.28
1	0	21	4.19	41	4.77	61	5.28	81	6.34
2	2.67	22	4.23	42	4.8	62	5.31	82	6.41
3	2.95	23	4.26	43	4.83	63	5.33	83	6.48
4	3.12	24	4.29	44	4.85	64	5.36	84	6.55
5	3.25	25	4.33	45	4.87	65	5.39	85	6.64
6	3.36	26	4.36	46	4.9	66	5.41	86	6.75
7	3.52	27	4.39	47	4.92	67	5.44	87	6.88

8	3.59	28	4.42	48	4.95	68	5.47	88	7.05
9	3.66	29	4.45	49	4.97	69	5.5	89	7.33
10	3.72	30	4.48	50	5	70	5.84	90	7.35
11	3.77	31	4.5	51	5.03	71	5.88	91	7.37
12	3.82	32	4.53	52	5.05	72	5.92	92	7.41
13	3.87	33	4.56	53	5.08	73	5.95	93	7.46
14	3.92	34	4.59	54	5.1	74	5.99	94	7.51
15	3.96	35	4.61	55	5.13	75	6.04	95	7.58
16	4.01	36	4.64	56	5.15	76	6.08	96	7.65
17	4.05	37	4.67	57	5.18	77	6.13	97	7.75
18	4.08	38	4.69	58	5.2	78	6.18	98	7.88
19	4.12	39	4.72	59	5.23	79	6.23	99	8.09

5.9. Análisis estadístico

Se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos de la calidad de agua de las unidades experimentales, de los parámetros productivos estimados, de la supervivencia y de la morfometría de las capas del estómago e intestino de *P. axelrodi*. Para ello se hicieron pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas. Luego se realizaron pruebas de análisis de varianzas de una vía (ANOVA) y finalmente, para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos se empleó la prueba de Tukey. Las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ en el software estadístico Statistica 10.0.

Capítulo 6. Resultados

6.1. Parámetros de calidad de agua

Los parámetros de calidad de agua (Tabla 7) se mantuvieron en las concentraciones adecuadas para el cultivo de la especie. En términos generales no se evidencian diferencias significativas entre los tratamientos, a excepción del NAT del TR4 (5 mg L⁻¹) durante el período de exposición, el cual mostró ser significativamente mayor a los demás tratamientos ($p = 0.001$). Para el tiempo de recuperación no se obtienen datos para el TR4 (5 mg L⁻¹) debido a la alta mortalidad de los organismos durante el período de exposición.

Tabla 7. Promedio \pm la desviación estándar de los parámetros fisicoquímicos de las unidades experimentales en donde se mantuvo a *Paracheirodon axelrodi* durante los tiempos de exposición y recuperación al Roundup®Activo. Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Parámetro	Tiempo de experimentación	Tratamientos			
		(Concentración: mg L ⁻¹ de glifosato en el herbicida Roundup®Activo)			
		0 (TR1)	0.1 (TR2)	1.0 (TR3)	5.0 (TR4)
NAT (mg L ⁻¹)	Exposición (30 días)	0.02 \pm 0.016 ^a	0.06 \pm 0.016 ^a	0.06 \pm 0.064 ^a	0.19 \pm 0.001 ^b
	Recuperación (15 días)	0.22 \pm 0.036 ^a	0.27 \pm 0.036 ^a	0.33 \pm 0.072 ^a	NA
N - NO ₂ (mg L ⁻¹)	Exposición (30 días)	0.03 \pm 0.001 ^a	0.06 \pm 0.032 ^a	0.05 \pm 0.032 ^a	0.05 \pm 0.016 ^a
	Recuperación (15 días)	0.17 \pm 0.036 ^a	0.17 \pm 0.036 ^a	0.17 \pm 0.036 ^a	NA
pH	Exposición (30 días)	6.65 \pm 0.118 ^a	6.54 \pm 0.198 ^a	6.61 \pm 0.065 ^a	6.64 \pm 0.066 ^a
	Recuperación (15 días)	6.53 \pm 0.110 ^a	6.49 \pm 0.138 ^a	6.34 \pm 0.057 ^a	NA
OD (mg L ⁻¹)	Exposición (30 días)	4.85 \pm 0.178 ^a	4.75 \pm 0.083 ^a	4.71 \pm 0.084 ^a	4.78 \pm 0.079 ^a
	Recuperación (15 días)	4.91 \pm 0.024 ^a	4.86 \pm 0.044 ^a	4.89 \pm 0.189 ^a	NA

6.2. Parámetros productivos

Los datos de crecimiento para estimar los parámetros productivos se registran en la Tabla 8. Es importante resaltar que los parámetros calculados para el TR4 (5 mg l⁻¹) fueron estimados durante un período de ocho días debido a la alta mortalidad que reportó este tratamiento, para los demás tratamientos (TR1: 0 mg L⁻¹, TR2: 0.1 mg L⁻¹ y TR3: 1 mg L⁻¹) el tiempo empleado fue de 45 días, los cuales también se debieron a la mortalidad de los organismos.

En el TR1 (0 mg l⁻¹) se observó un incremento en peso del 72% de su peso inicial, mientras que para el TR2 (0.1 mg l⁻¹) fue tan sólo de 17.5% y para el TR3 (1 mg l⁻¹) de 13.8%. El TR4 (5 mg l⁻¹) obtuvo el menor crecimiento registrado, debido a que sólo se tuvieron datos de una semana del experimento, debido a la alta mortalidad. Las diferencias entre los incrementos en longitud entre los tratamientos no son tan grandes, comparativamente con el incremento en peso (Tabla 8).

Tabla 8. Promedio \pm desviación estándar de los datos de crecimiento de *Parcheirodon axelrodi* durante el tiempo de exposición y recuperación (45 días en total). PF (peso final), LTF (longitud total final), longitud estándar final (LET). Peso inicial: 189 mg, Longitud total inicial: 2.74 cm, Longitud estándar inicial: 2.33 cm

Tratamiento/ concentración de Roundup® Activo (mg L ⁻¹)	PF (mg)	Peso Incremento (GP) (mg / %)	LTF (cm)	LT Incremento (cm / %)	LEF (cm)	LE Incremento (mg / %)
TR1: 0	325 \pm 59	136 ^a / 72.0	3.0 \pm 0.244	0.26 / 9.5	2.55 \pm 0.19	0.22 / 9.4
TR2: 0.1	222 \pm 17	33 ^b / 17.5	2.87 \pm 0.17	0.13 / 4.7	2.49 \pm 0.24	0.16 / 6.9
TR3: 1	215 \pm 12	26 ^b / 13.8	2.83 \pm 0.19	0.1 / 3.65	2.33 \pm 0.14	0
TR4: 5	191 \pm 17	2 ^c / 1.1	2.75 \pm 0.55	0.01 / 0	2.25 \pm 0.49	0

En el TR1 (0 mg l⁻¹), se obtuvieron los valores más altos en la ganancia en peso (GP), la tasa de crecimiento absoluto (TCA) y la tasa de crecimiento específico (TCE), éstos fueron significativamente diferentes de los otros tratamientos ($p < 0.001$). Mientras que en el TR4 (5 mg l⁻¹) se obtuvieron los valores estadísticamente más bajos ($p < 0.001$). Finalmente, TR2 y TR3 no presentan diferencias significativas entre ellos (Tabla 9).

Tabla 9. Promedio \pm desviación estándar de los datos parámetros productivos de *Paracheirodon axelrodi* expuestos a diferentes concentraciones de Roundup Activo®. Tasa de crecimiento absoluto (TCA), tasa de crecimiento específico (TCE). Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tratamiento (concentración de Roundup® Activo mg L ⁻¹)	TCA (mg/día)	TCE (%/día)
TR1: 0	3 \pm 4.3 ^a	1.14 \pm 0.390 ^a
TR2: 0.1	0.73 \pm 0.1 ^b	0.36 \pm 0.173 ^b
TR3: 1	0.57 \pm 0.3 ^b	0.28 \pm 0.133 ^b
TR4: 5	0.25 \pm 0.03 ^c	0.06 \pm 0.007 ^c

6.3. Supervivencia y concentración letal 50

La supervivencia de los organismos estuvo fuertemente influenciada por la concentración de Roundup® Activo a la que se vieron expuestos (Figura 8), observándose que para el TR4 (5 mg l⁻¹) la supervivencia fue de 0 % al transcurrir tan sólo nueve días de experimentación. Para los otros tres tratamientos (TR1, 0 mg l⁻¹), el TR2 (0.1 mg l⁻¹) y el TR3 (1 mg l⁻¹), la supervivencia durante el período de exposición (30 días) fue de 95%, 81.7% y 63.3%, respectivamente, siendo TR1 mayor que TR3 ($p = 0.014$). Durante el período de recuperación (15 días) la supervivencia de los organismos siguió siendo significativamente mayor para el TR1 (95%), comparativamente con los TR2 (53.3%) y TR3 (38.3%) ($p < 0.001$).

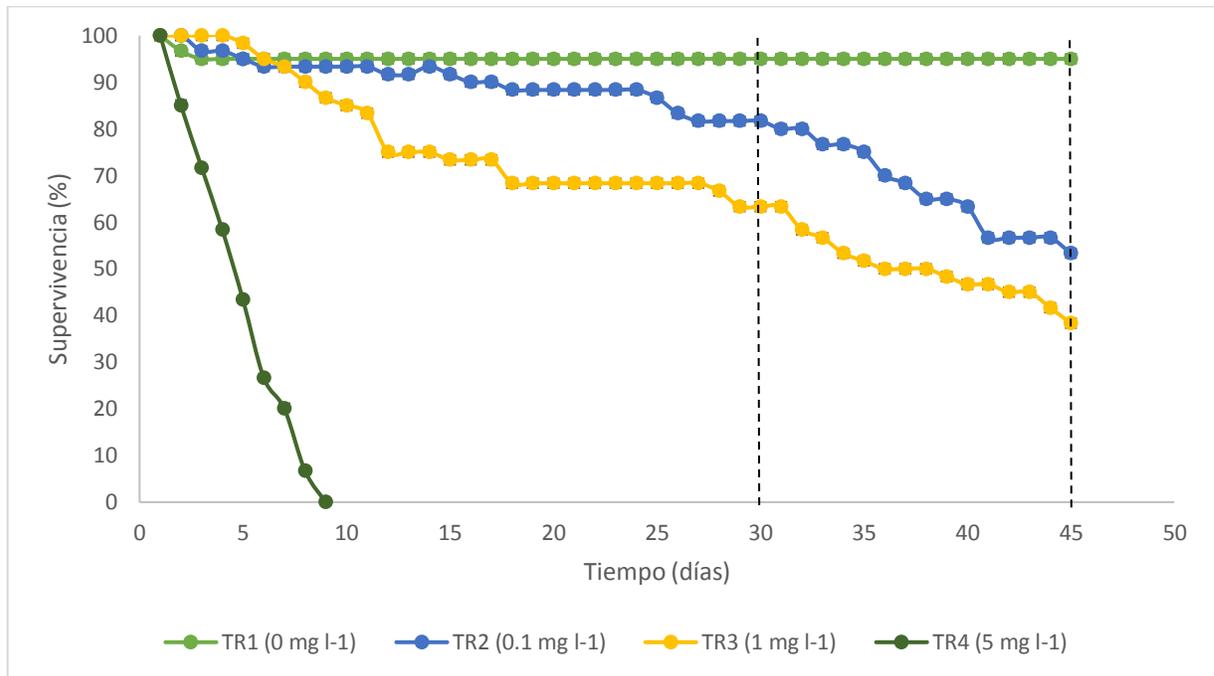


Figura 8. Supervivencia (%) de *Paracheirodon axelrodi* durante el período de exposición (30 días) y recuperación (15 días). Los tiempos de exposición y recuperación están separados por líneas punteadas.

La determinación de la CL_{50} por medio del método Probit para un período de exposición de 96 h y de 30 días dio como resultado una concentración de 12.49 mg l^{-1} y de 0.46 mg l^{-1} de Roundup® Activo, respectivamente. La obtención de estos valores se llevó a cabo empleando la ecuación de la recta obtenida en las gráficas de dispersión, en las que se relacionó el porcentaje de efecto (Probit) con el logaritmo de la concentración (Figura 9 y 10).

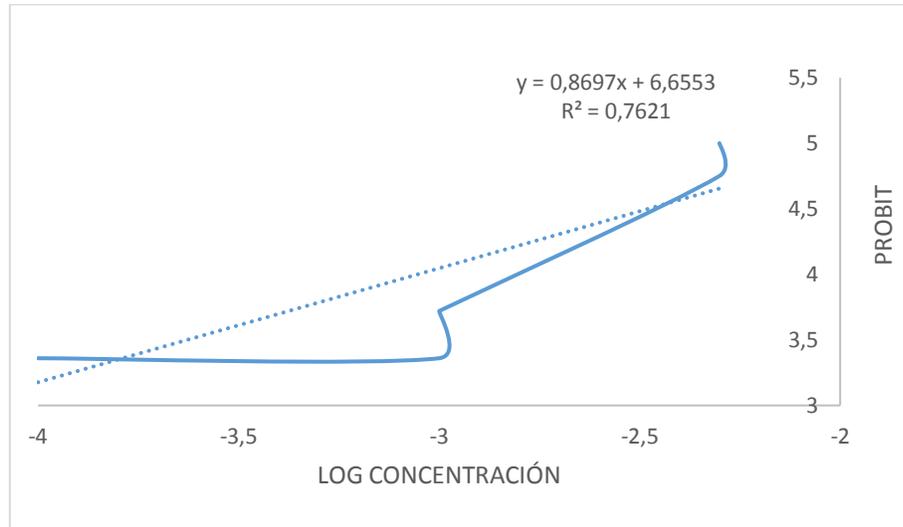


Figura 9. Valores Probit vs Log de concentración para Roundup® Activo a 96 h de exposición. Se observa la ecuación de la recta empleada para calcular la CL₅₀. La línea sólida representa los valores reales. La línea punteada representa la regresión.

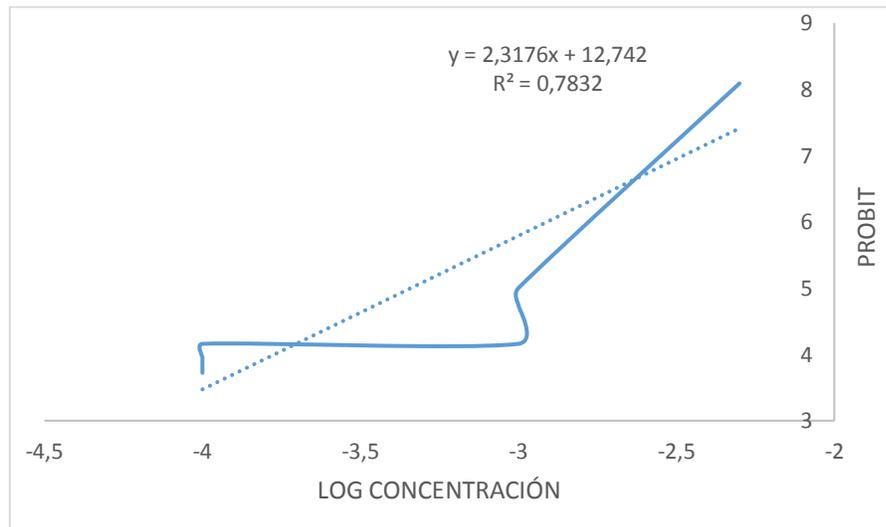


Figura 10. Valores Probit vs Log de concentración para Roundup® Activo a 30 días de exposición. Se observa la ecuación de la recta empleada para calcular la CL₅₀. La línea sólida representa los valores reales. La línea punteada representa la regresión.

6.4. Descripción histológica

El estómago e intestino de *P. axelrodi* presentan cuatro capas constitutivas: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Figura 11 y 12). La mucosa (M) del estómago está compuesta de epitelio cilíndrico simple con presencia de numerosas células columnares (Figura 11B, 14A). A lo largo de la mucosa del estómago se observaron algunos gránulos de mucus (GM) (Figura 11B). De igual manera, esta capa

presenta un gran número de glándulas gástricas (GG) tubulares con varias células secretoras, entre ellas las células parietales (CP) y las células zimogénicas (CZ) (Figuras 12A, 13A, 14A, 14B). Dentro de las glándulas gástricas son notorios los gránulos de zimógeno (GZ), los que se tiñen fuertemente con el azul de toluidina (Figuras 11 B, 14A). La submucosa del estómago presenta tejido conectivo laxo, seguidamente se encuentra la capa de músculo liso con dos orientaciones, una circular interna y una longitudinal externa (Figura 11A, 12A).

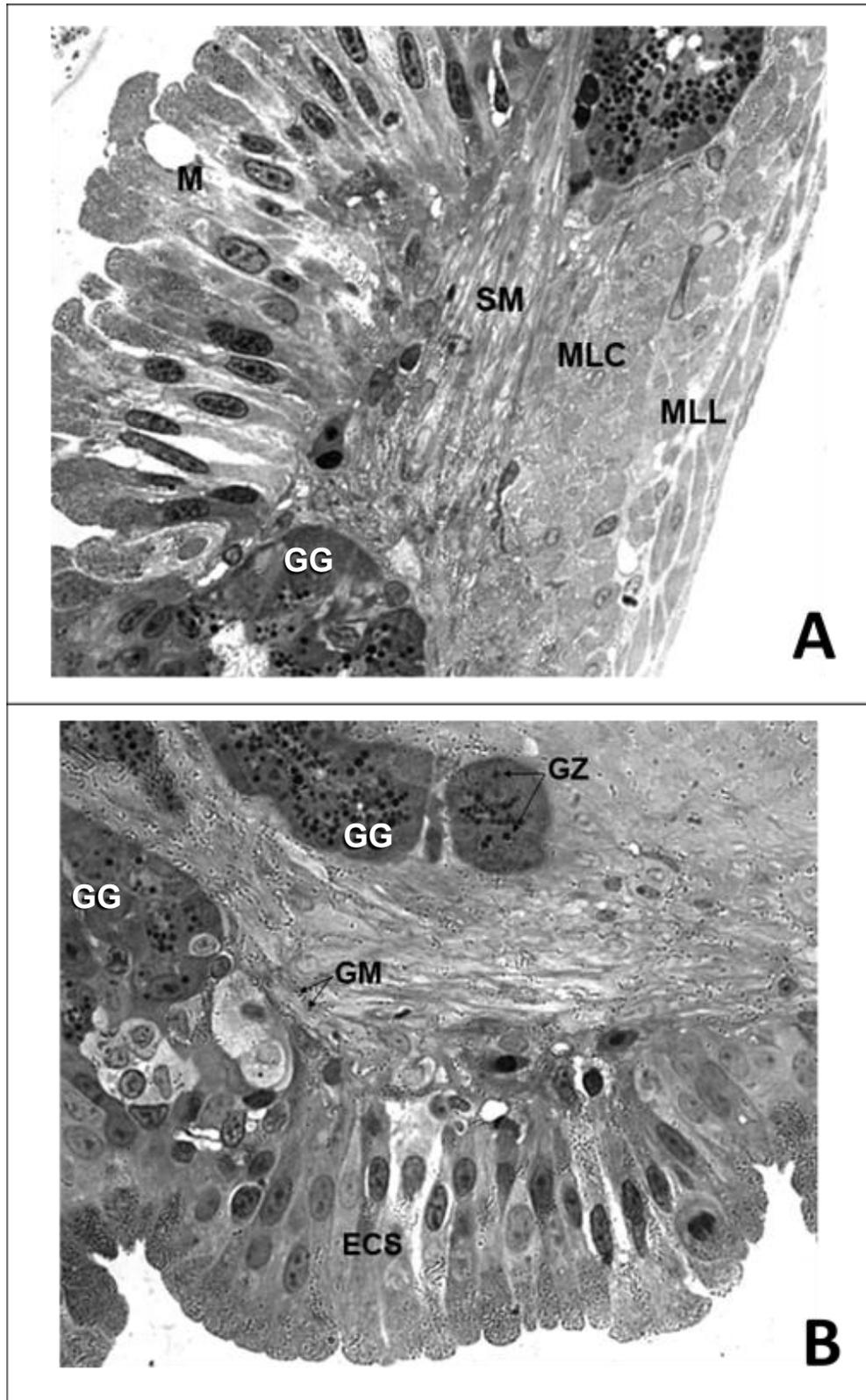


Figura 11. Estómago de *Paracheirodon axelrodi*. A: Capas constitutivas del estómago 400x. B: Detalle de la mucosa del estómago 400x. (ECS) epitelio cilíndrico simple, (M) mucosa, (SM) submucosa, (MLC) músculo liso circular, (MLL) músculo liso longitudinal, (GG) glándulas gástricas, (GM) gránulos de mucus, (GZ) gránulos de zimógeno.

La capa mucosa del intestino, al igual que la del estómago, presenta epitelio cilíndrico simple (ECS), con la diferencia de que tiene un gran número de pliegues y cuenta con numerosas células de mucus o caliciformes (CC) (Figura 13A, 13B, 15A, 15B). Además, se pueden observar enterocitos, células enteroendocrinas y células zimógenas (Figura 13A, 15A, 15B). Los enterocitos (E) se caracterizan por ser alargados, estrechos y tener un núcleo ubicado justo a la mitad de la célula (Figura 15B). Las células enteroendocrinas (CE) se diferencian por la presencia de vesículas secretoras en el citoplasma, mientras que las zimogénicas (CZ) se reconocen por su densa coloración a causa del zimógeno que contienen (Figura 15A, 15B).

Posteriormente de la capa mucosa se encuentra la submucosa, la cual está compuesta por tejido linfoide. Por último, de igual manera que en el estómago se puede observar una capa de músculo liso circular (interno) y longitudinal (externo), de menor grosor a la encontrada en el estómago.

En relación con la serosa, tanto para el estómago como para el intestino fue difícilmente distinguible, debido a su pequeño grosor. A pesar de ello fue identificada en unos pocos cortes, pero, al no ser observada en la mayoría de los mismos fue descartada tanto para la descripción como para el cálculo del espesor de la misma, para su posterior comparación entre los tratamientos.

6.5. Morfometría de las capas de los órganos del tracto digestivo

En el estómago se observaron algunas diferencias significativas entre los tratamientos durante el período de exposición (Tabla 10). El epitelio de la mucosa de los organismos del TR4 (5 mg l⁻¹) mostró valores de espesor significativamente menores (110.83 µm) a los obtenidos en los demás tratamientos, donde se tuvieron espesores de 124.17 a 132.3 µm, sin diferencias significativas entre éstos. Para la submucosa se evidenció que TR1 (0 mg l⁻¹) es significativamente mayor (102.45 µm) que TR2 (75.54 µm), TR3 (73.85 µm) y TR4 (79.73 µm) (p=0.007) mientras que para la capa muscular no se evidencian diferencias significativas en los valores de espesor de las capas en los diferentes tratamientos (p> 0.05). Durante el período de recuperación solamente se realizó la comparación entre los TR1 (0 mg l⁻¹), TR2 (0.1 mg l⁻¹) y TR3 (1 mg l⁻¹), debido a la alta mortalidad del TR4 durante el período de exposición al herbicida. En estos organismos, la capa mucosa y muscular son diferentes entre todos los tratamientos (p<0.001), evidenciándose que el TR2 tiene valores significativamente menores para la capa mucosa, mientras que en el TR3, el tejido muscular tuvo el menor espesor (145.79±10.27). Por su parte, la capa submucosa mostró que el espesor de los órganos medidos en el TR1 es significativamente mayor (p<0.001) que el de aquellos provenientes de los TR2 y TR3, siendo este último significativamente menor.

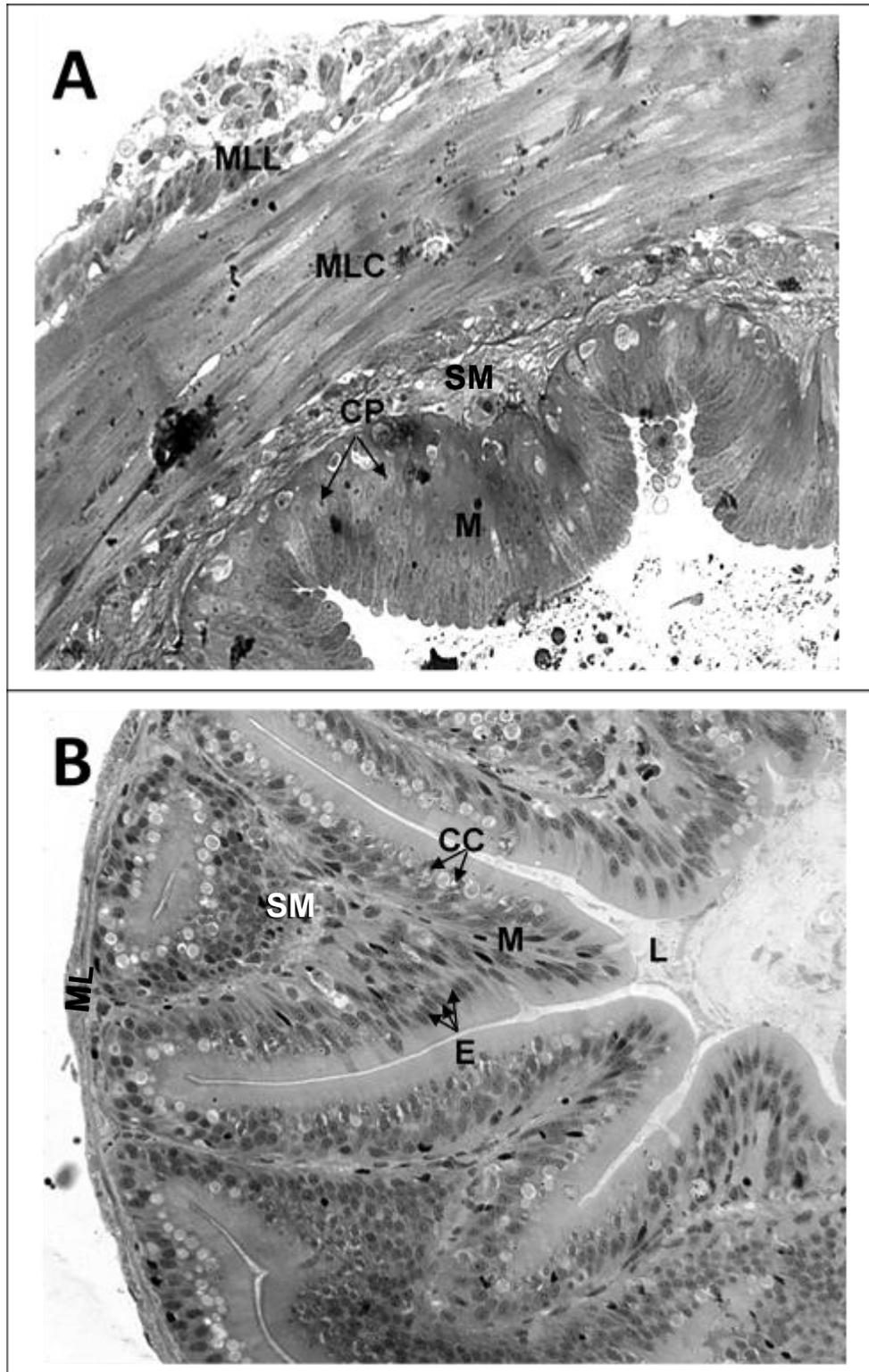


Figura 12. Estómago e intestino de *Paracheirodon axelrodi*. A: Detalle de la capa muscular y de un tipo celular del estómago 400x. B: Capas constitutivas del intestino y algunos tipos celulares 400x. (M) mucosa, (SM) submucosa, (ML) músculo liso, (MLC) músculo liso circular, (MLL) músculo liso longitudinal, (CP) células parietales, (CC) células caliciformes, (E) enterocito, (L) lumen.

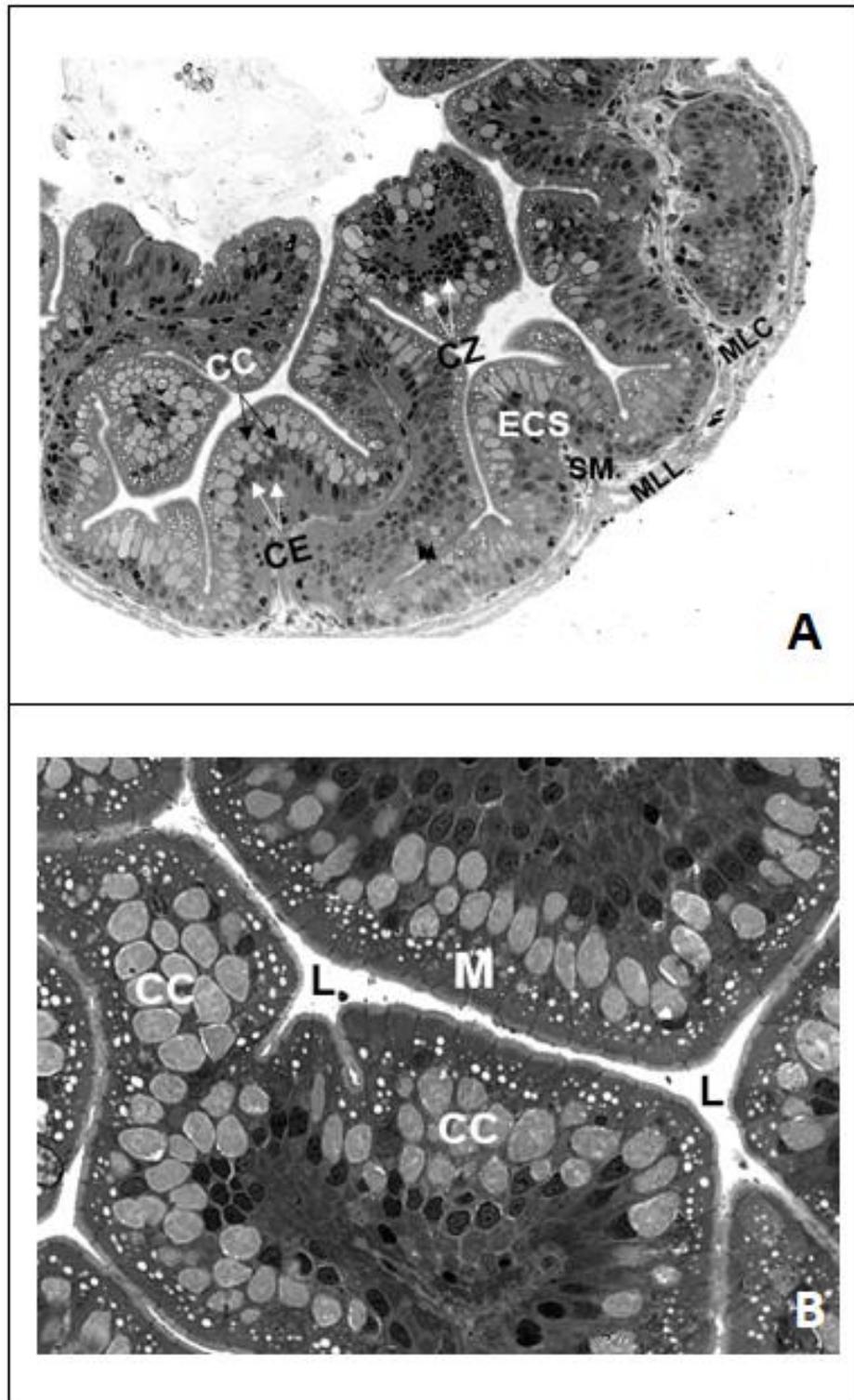


Figura 13. Intestino de *P. axelrodi*. A: Detalle de la capa constitutivas y de algunos tipos celulares 400x. B: Detalle de las células caliciformes 1000x. (M) mucosa, (SM) submucosa, (MLC) músculo liso circular, (MLL) músculo liso longitudinal, (ECS) epitelio cilíndrico simple, (CE) células enteroendocrinas, (CZ) células zimogénicas, (CC) células caliciformes, (L) lumen.

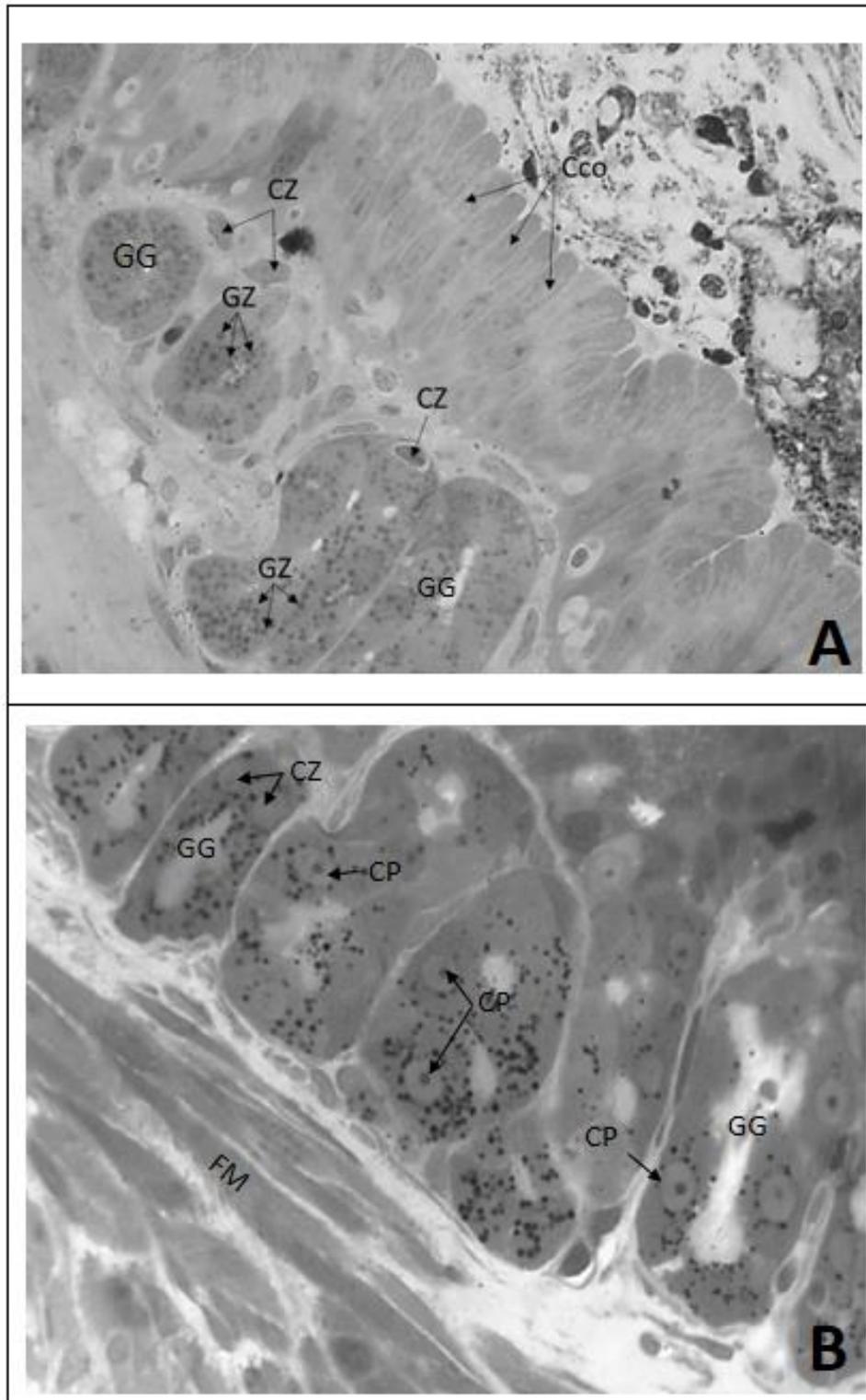


Figura 14. Detalle de los tipos celulares del estómago de *Paracheirodon axelrodi*. A: Células columnares (Cco), células zimogénicas (CZ) y glándulas gástricas (GG) 1000 x. B: Detalle de las células zimogénicas (CZ), glándulas gástricas (GG), células parietales (CP) y fibras musculares (FM) 1000 x.

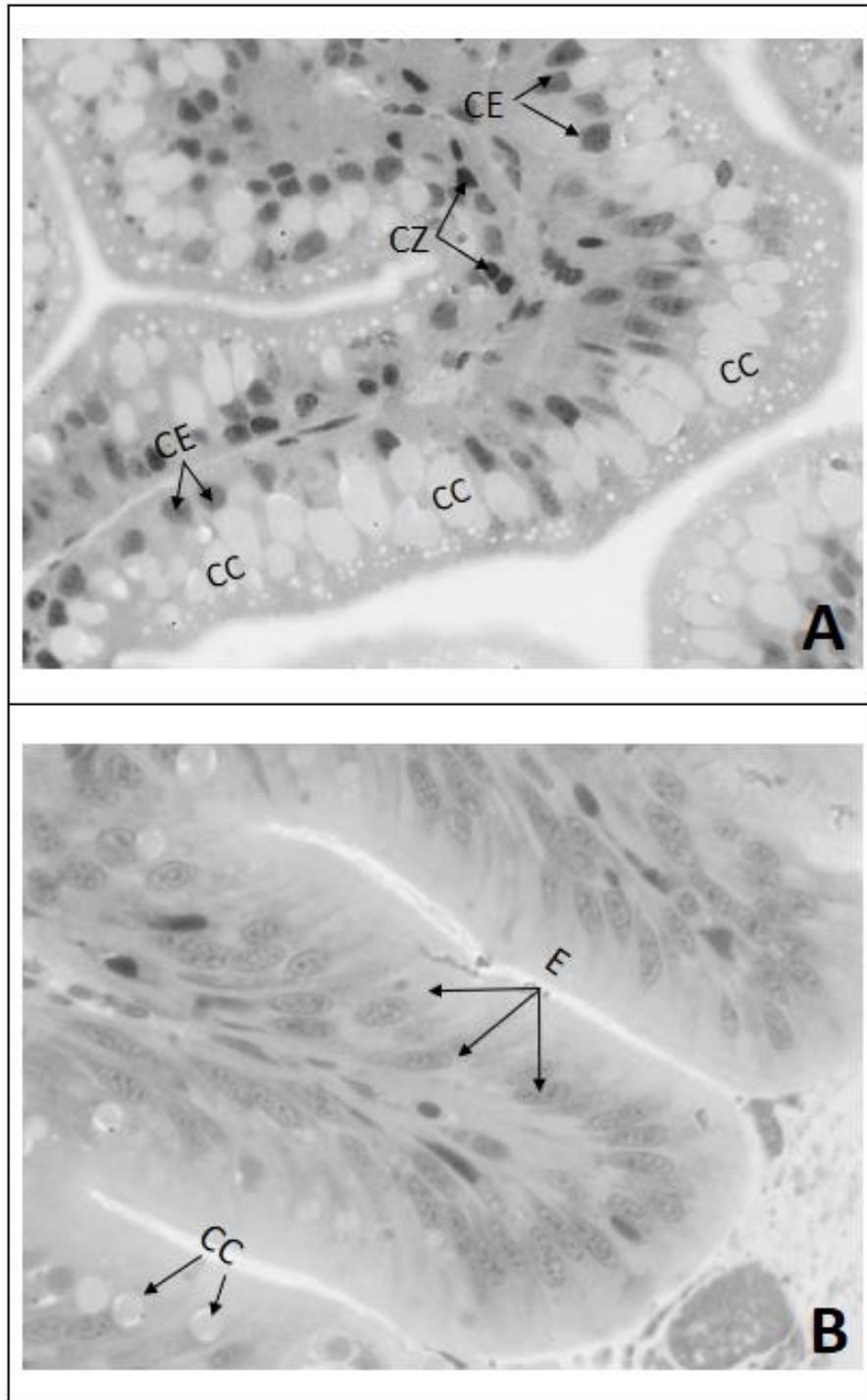


Figura 15. Detalle de los tipos celulares del intestino de *Paracheirodon axelrodi*. A: Células enteroendocrinas (CE), células zimogénicas (CZ) y células caliciformes (CC) 1000x. B. Detalle de las células caliciformes (CC) y enterocitos (E) 1000x.

Respecto a la comparación entre tiempos para las capas del estómago (Tabla 10), se observa que el TR1 (0 mg l⁻¹) no presenta diferencias significativas entre los tiempos para ninguna de las capas. Por el contrario, el TR2 (0.1 mg l⁻¹) muestra que la capa mucosa y muscular son diferentes significativamente entre los dos tiempos evaluados, siendo menor ($p < 0.001$) el espesor de las capas mucosa (71.7 μm) y muscular (172.22 μm) ($p = 0.000$) para el período de recuperación que para el período de exposición. Para el TR3 (1 mg l⁻¹), la capa mucosa ($p < 0.001$) y muscular ($p < 0.001$) muestran diferencias significativas, siendo menores los valores para el período de recuperación que para el de exposición, en ambos casos. Entre tanto, la submucosa no muestra diferencias significativas entre los dos tiempos.

Tabla 10. Espesor de las capas del estómago de *Paracheirodon axelrodi* durante el experimento. Cada valor representa la media \pm desviación estándar. Letras mayúsculas se utilizaron para la comparación entre los períodos de evaluación (exposición y recuperación) y letras minúsculas para la comparación entre tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Período experimental	Tratamiento (concentración de Roundup® Activo mg l ⁻¹)	Espesor capa (μm)		
		Mucosa	Submucosa	Muscular
Exposición (30 días)	TR1:0	132.3 \pm 14.3 ^{aA}	102.45 \pm 22.07 ^{aA}	245.6 \pm 19.86 ^{aA}
	TR2: 0.1	124.33 \pm 8.59 ^{aA}	75.55 \pm 17.53 ^{bA}	219.3 \pm 21.82 ^{aA}
	TR3: 1	124.17 \pm 13.09 ^{aA}	73.85 \pm 15.82 ^{bA}	234.35 \pm 18.18 ^{aA}
	TR4: 5	110.83 \pm 10.67 ^{b*}	79.73 \pm 12.36 ^{b*}	223.83 \pm 38.45 ^{a*}
Recuperación (15 días)	TR1: 0	128.10 \pm 4.10 ^{aA}	118.19 \pm 10.33 ^{aA}	209.03 \pm 36.82 ^{aA}
	TR2: 0.1	71.71 \pm 11.42 ^{bB}	78.85 \pm 12.88 ^{bA}	172.22 \pm 14.23 ^{bB}
	TR3: 1	87.29 \pm 7.65 ^{cB}	69.29 \pm 8.89 ^{bA}	145.79 \pm 10.27 ^{cB}

* Este tratamiento no tuvo comparación entre tiempos por mortalidad de los individuos.

En lo que respecta a las capas del intestino (Tabla 11), durante el período de exposición, se observa que el espesor de la mucosa no presenta diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que la submucosa muestra que el TR1 (0 mg l⁻¹) y el TR3 (1 mg l⁻¹) son significativamente menores (132.32 μm y 112.05 μm respectivamente) a TR4 (5 mg l⁻¹) (165.10 μm) ($p < 0.001$). Entre tanto, TR1, TR2 (0.1 mg l⁻¹) y TR3 no reportan diferencias significativas entre sí. Para el caso de la capa muscular, los tratamientos TR1, TR2 y TR3 no muestran diferencias significativas ($p < 0.001$), pero sí con respecto al TR4, el cual es significativamente mayor (36.80 μm). Para el período de recuperación, la capa mucosa y submucosa no reporta diferencias significativas entre los tratamientos TR1, TR2 y TR3. En contraposición, la capa muscular muestra que el TR3 (36.63 μm) es significativamente mayor al TR1 (27.41 μm) ($p = 0.011$). Sin embargo, el TR2 no presenta diferencias significativas comparativamente con los otros dos tratamientos.

Finalmente, la comparación entre los dos tiempos evaluados reporta que para todos los tratamientos la capa mucosa y submucosa no presentan diferencias significativas entre sí. Sin embargo, para el caso de la capa muscular, aunque los tratamientos TR1 y TR2 no muestran diferencias significativas entre el período de exposición y recuperación, el TR3 es significativamente mayor durante el segundo periodo comparativamente con el primero ($p=0.004$).

Tabla 11. Espesor de las capas del intestino de *Paracheirodon axelrodi* durante el experimento. Cada valor representa la media \pm desviación estándar. Letras mayúsculas se utilizaron para la comparación entre los períodos de evaluación (exposición y recuperación) y letras minúsculas para la comparación entre tratamientos. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$).

Período experimental	Tratamiento (concentración de Roundup®Activo mg l ⁻¹)	Espesor capa (μm)		
		Mucosa	Submucosa	Muscular
Exposición (30 días)	TR1: 0	80.47 \pm 10.21 ^{aA}	132.32 \pm 30.54 ^{aA}	31.215 \pm 4.71 ^{aA}
	TR2: 0.1	75.53 \pm 8.65 ^{aA}	141.35 \pm 26.56 ^{abA}	26.04 \pm 5.21 ^{aA}
	TR3: 1	81.30 \pm 5.88 ^{aA}	112.05 \pm 19.07 ^{aA}	23.14 \pm 8.21 ^{aA}
	TR4: 5	79.90 \pm 11.90 ^{a*}	165.10 \pm 27.95 ^{b*}	36.80 \pm 10.27 ^{b*}
Recuperación (15 días)	TR1: 0	74.68 \pm 10.94 ^{aA}	129.02 \pm 19.25 ^{aA}	27.41 \pm 4.20 ^{aA}
	TR2: 0.1	78.67 \pm 14.07 ^{aA}	117.63 \pm 19.27 ^{aA}	27.91 \pm 9.01 ^{abA}
	TR3: 1	77.68 \pm 12.56 ^{aA}	124.08 \pm 19.25 ^{aA}	36.63 \pm 7.87 ^{bB}

* Este tratamiento no tuvo comparación entre tiempos por mortalidad de los individuos.

6.6. Daños evidenciados por la técnica MOAR en los órganos del tracto digestivo de *P. axelrodi* expuestos a Roundup®Activo

En el estómago, los tratamientos expuestos al Roundup®Activo durante 30 días mostraron una distribución normal de las capas constitutivas, además de la presencia de las células características de cada una de ellas. En términos de daños se evidenció festoneo, hiperplasia, hipertrofia, inflamación y migración de células similares a mastocitos (CSM) en todos los tratamientos (Figuras 16 y 17). Adicionalmente para el TR4 (5 mg l⁻¹) se pudo registrar un aumento en la secreción de mucus, la cual es notoria por algunas regiones que se encuentran fuertemente teñidas en el epitelio (Figura 17A). Además, se observó que los daños fueron dosis-dependientes, siendo más leves en el TR2 (0.1 mg l⁻¹) y TR3 (1 mg l⁻¹) y más graves en el TR4.

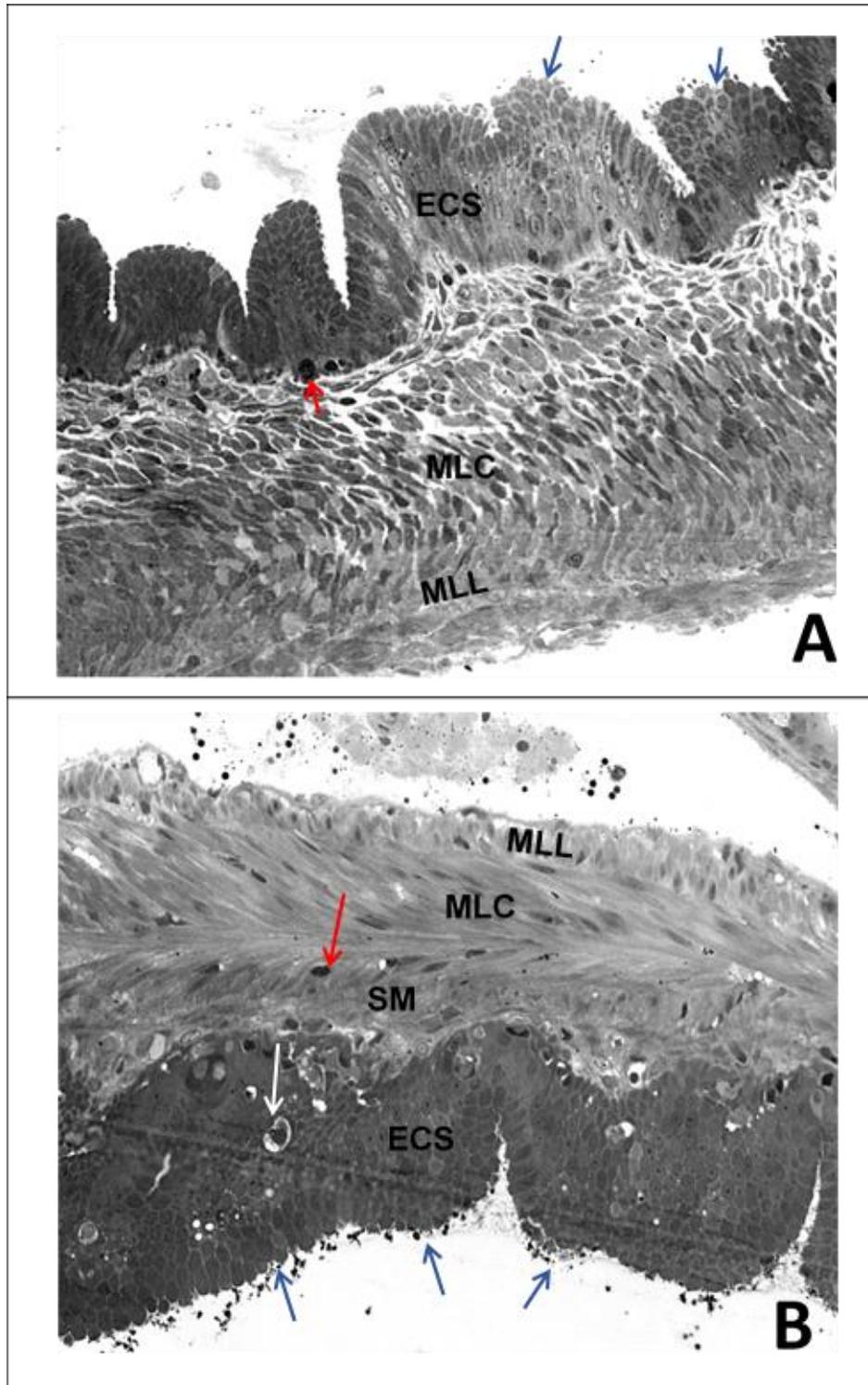


Figura 16. Daños evidenciados en el estómago de *Paracheirodon axelrodi*, expuestos a Roundup® Activo durante 30 días. A: TR2 (0.1 mg l^{-1}) de Roundup® Activo en donde se observa festoneado de las células epiteliales (flechas azules) y migración de células similares a mastocitos (CSM) en la parte basal del epitelio (flechas rojas) 400x. B: TR3 (1 mg l^{-1}) de Roundup® Activo, en donde se puede ver un mayor grado en el festoneado del epitelio, además de CSM en la submucosa e hiperplasia de algunas células (flechas blancas) 400x. (ECS) epitelio cilíndrico simple, (SM) submucosa, (MLC) músculo liso circular, (MLL) músculo liso longitudinal.

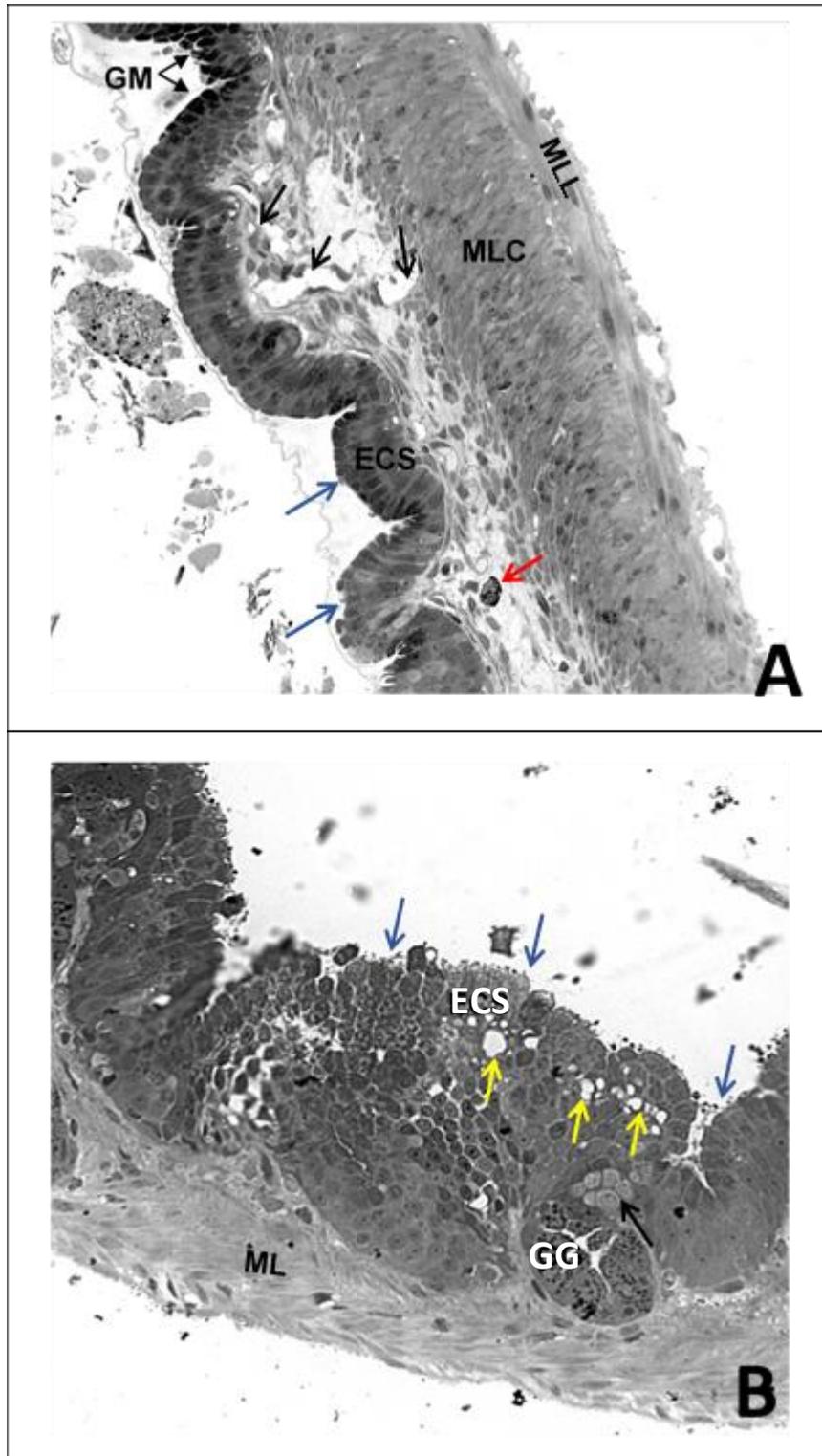


Figura 17. Daños evidenciados en el estómago de *Paracheirodon axelrodi*, expuestos a 5 mg l^{-1} de Roundup® Activo (TR4) durante 30 días. A: Se observa el festoneado del tejido epitelial (flechas azules), aumento en la concentración de gránulos de mucus (GM), migración de células similares a mastocitos (CSM) (flecha roja) e hipertrofia en la submucosa (flechas negras) 400x. B: Detalle del festoneado (flechas azules), inflamación (flechas amarillas) e hiperplasia (flecha negra) de las células epiteliales 1000 X. (ECS) epitelio cilíndrico simple, (ML) músculo liso, (MLC) músculo liso circular, (MLL) músculo liso longitudinal, (GG) glándulas gástricas.

El intestino de los organismos expuestos al Roundup®Activo presentó una distribución de las capas y tipos celulares similar a la observada en los organismos del tratamiento control. Sin embargo, se pudo evidenciar algunos daños los cuales incluyen ruptura del epitelio, hipertrofia, hiperplasia, inflamación y migración de CSM en los TR2 (0.1 mg l^{-1}) y TR3 (1 mg l^{-1}) (Figura 18). Para el TR4 (5 mg l^{-1}) (Figura 19), los principales daños observados fueron inflamación e hiperplasia. Cabe resaltar que las alteraciones observadas en el tratamiento 4 fueron severas comparativamente con los otros tratamientos, evidenciándose gran deterioro de la capa mucosa y submucosa. De igual manera, es notoria la disminución en la cantidad de células caliciformes, para todos los tratamientos expuestos al herbicida, comparativamente con el control.

Por lo que se refiere a los daños registrados durante el período de recuperación (15 días restantes) es notorio que los organismos no muestran signos de mejoría. En algunos casos se evidencian aún más daños que los presentados durante el período de exposición, entre ellos una mayor migración de células similares a mastocitos (CSM), una mayor degeneración del epitelio y un incremento en la secreción de mucus. Esto es principalmente notorio para el TR3 (1 mg l^{-1}), el cual, además presenta una mayor hipertrofia e hiperplasia en el intestino y una mayor migración de CSM en el estómago, comparativamente con el TR2 (0.1 mg l^{-1}) (Figuras 20 y 2).

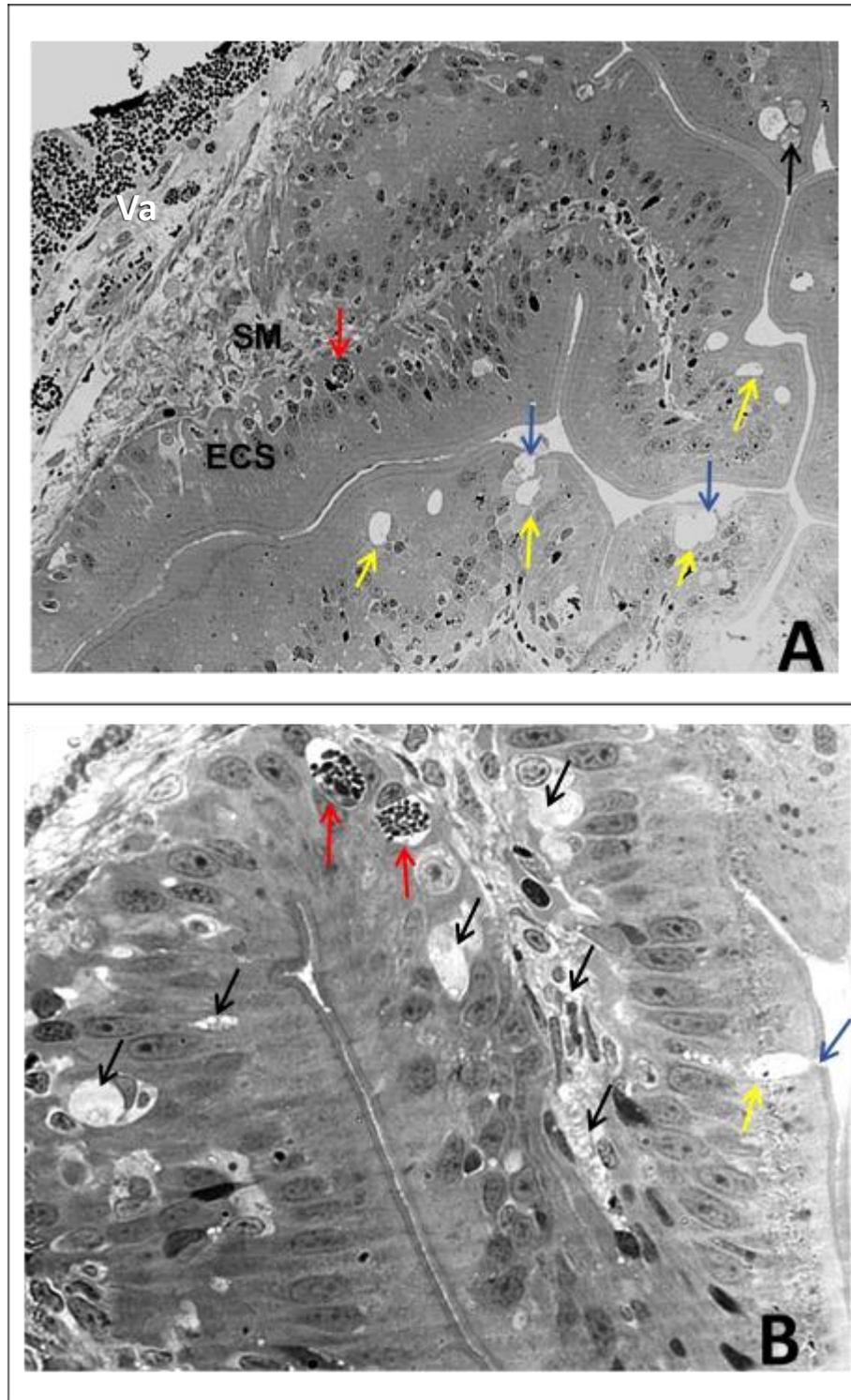


Figura 18. Daños en el intestino de *Paracheirodon axelrodi*, expuestos a Roundup®Activo durante 30 días. A: TR2 (0.1 mg l^{-1}) de Roundup®Activo en donde se observa ruptura de las células epiteliales (flechas azules), migración de células similares a mastocitos (CSM) en la parte basal del epitelio (flecha roja), hipertrofia (flecha negra) e inflamación (flechas amarillas) de algunas células 400x. B: TR3 (1 mg L^{-1}) de Roundup®Activo, en donde se puede ver ruptura del epitelio (flecha azul), migración de CSM (flechas rojas), hiperplasia (flechas negras) e inflamación (flecha amarilla) de algunas células 1000x. (ECS) epitelio cilíndrico simple, (SM) submucosa, (Va) vaso linfático.

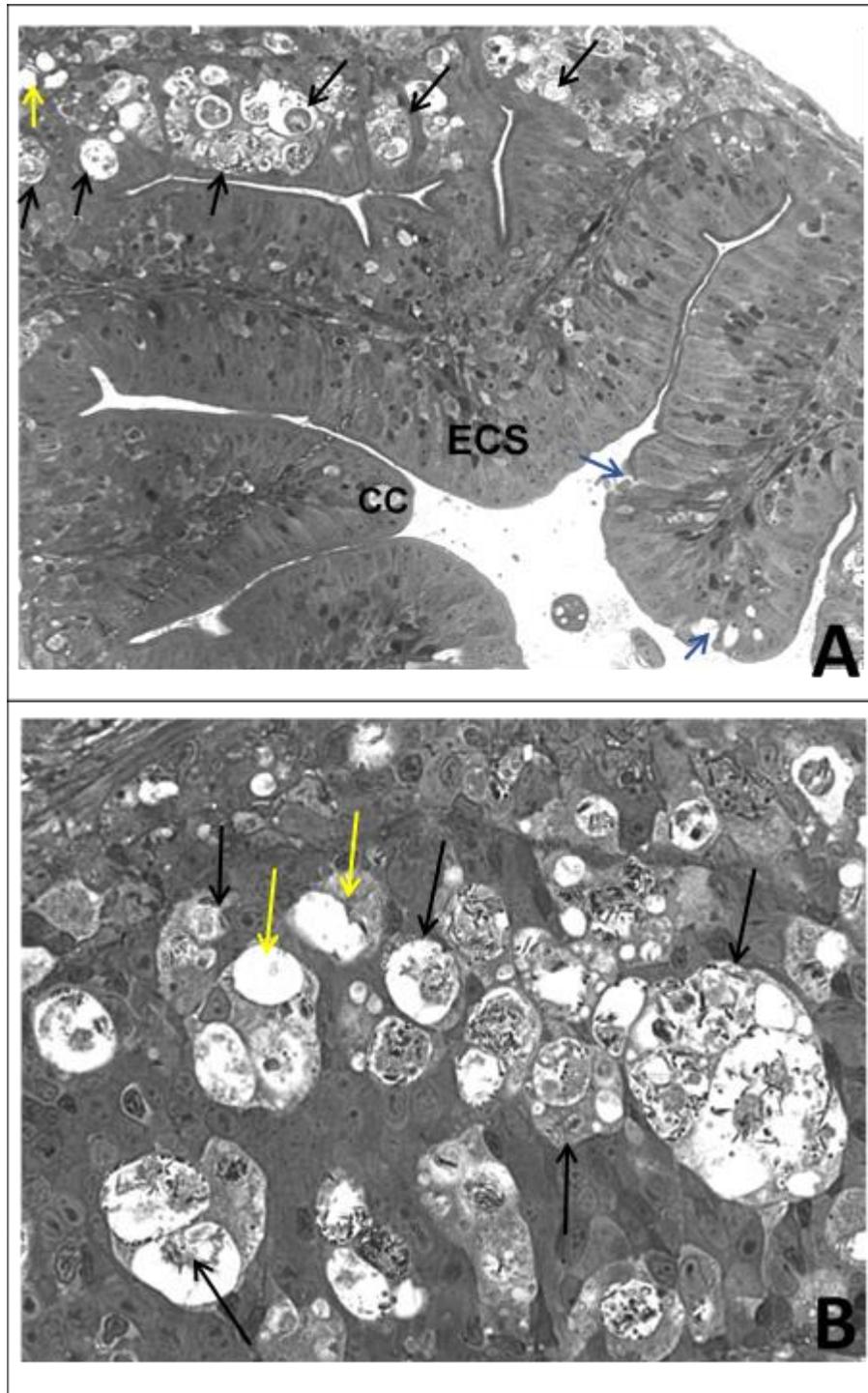


Figura 19. Daños en el intestino de *Paracheirodon axelrodi*, expuestos a 5 mg l^{-1} de Roundup® Activo (TR4) durante 30 días. A: Inflamación (flecha amarilla), hiperplasia (flechas negras) y ruptura del epitelio (flechas azules) 400 X. B: Detalle de inflamación (flechas amarillas) e hiperplasia de algunas células 1000 X. (ECS) epitelio cilíndrico simple, (CC) células caliciformes.

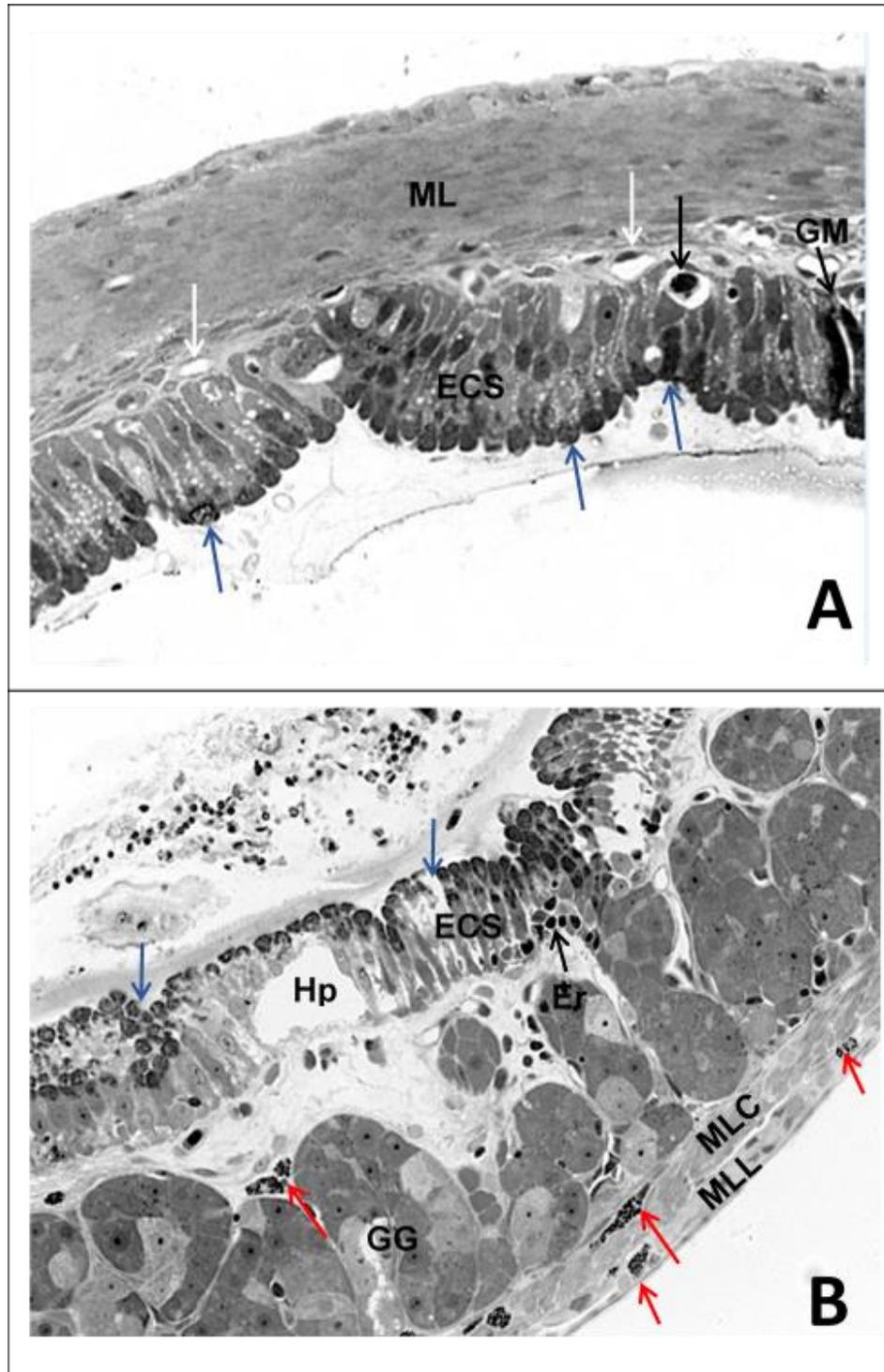


Figura 20. Daños en el estómago de *Paracheirodon axelrodi* durante el período de recuperación (15 días). A: TR2 (0.1 mg l^{-1}) de Roundup®Activo en donde se observa festoneado del epitelio (flechas azules), hiperplasia (flecha negra) e hipertrofia (flecha blanca) de algunas células epiteliales. También puede verse la acumulación de gránulos de mucus (GM) 400x. B: TR3 (1 mg l^{-1}) de Roundup®Activo, en donde se puede observar los daños en el epitelio, el cual está claramente desordenado y roto (flechas azules). También se evidencia migración de células similares a mastocitos (CSM) (líneas rojas) en la capa mucosa e hipertrofia (Hp) en la capa mucosa 400x. (ECS) epitelio cilíndrico simple, (ML) músculo liso, (MLC) músculo liso circular, (MLL) músculo liso longitudinal, (GG) glándulas gástricas, (Er) eritrocitos.

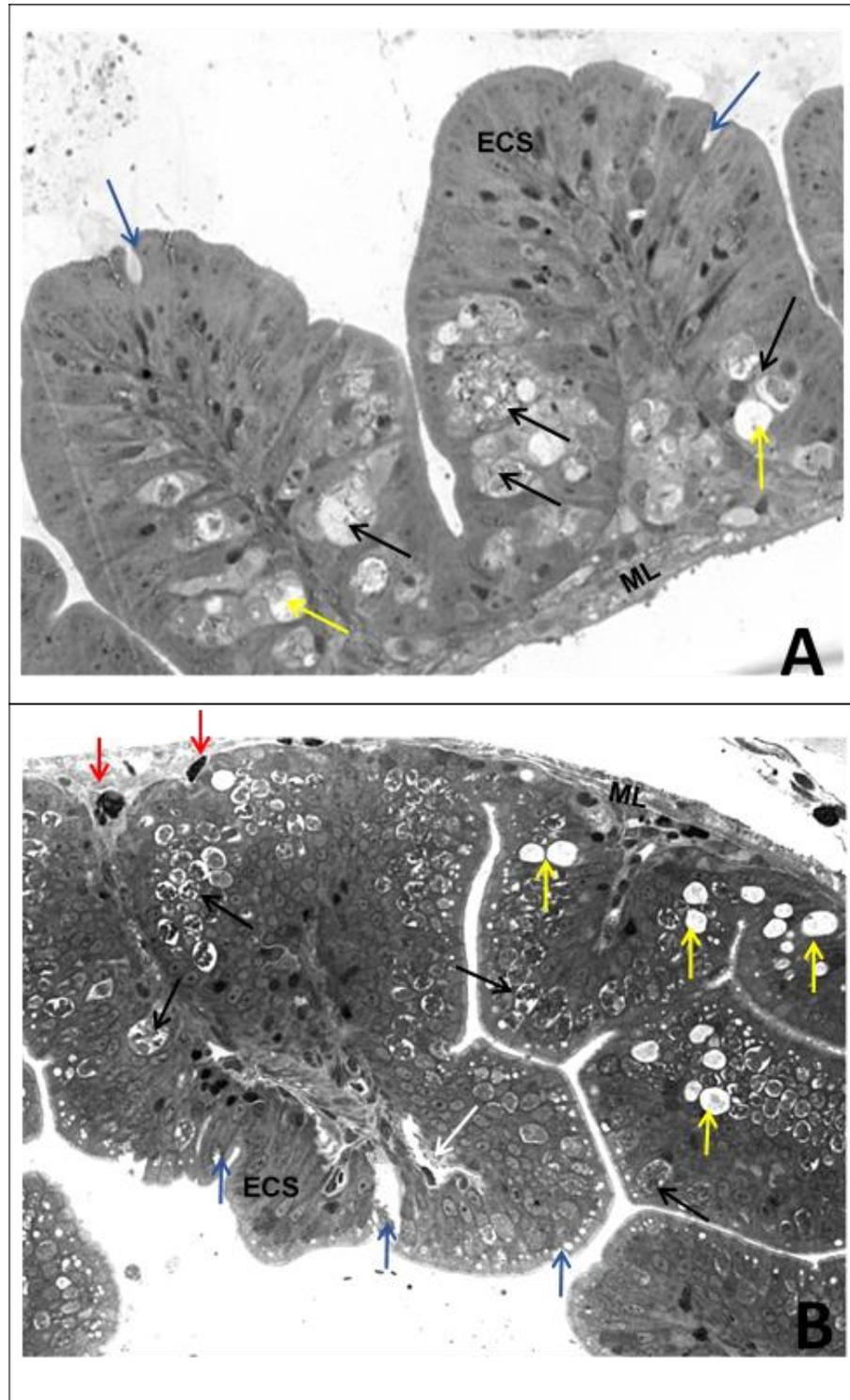


Figura 21. Daños e inflamación en el Intestino de *Paracheirodon axelrodi* durante el período de recuperación (15 días). A: TR2 (0.1 mg l^{-1}) de Roundup® Activo en donde se observa hipertrofia de las células en el epitelio (líneas negras), además de inflamación de algunas de ellas (flechas amarillas). También puede verse la ruptura de esta capa en varios puntos (flechas azules) 400x. B: TR3 (1 mg l^{-1}) de Roundup® Activo, en donde se puede observar hipertrofia (flechas negras), hiperplasia (flecha blanca) e inflamación (flechas amarillas) y ruptura en el epitelio (flechas azules) 400x. (ECS) epitelio cilíndrico simple, (ML) músculo liso.

Capítulo 7. Discusión

7.1. Parámetros de calidad de agua

Los parámetros de calidad de agua se mantuvieron dentro de los rangos adecuados para la especie, según lo reportado por Anjos y Anjos (2006), Oliveira *et al.* (2008) y García-Cruz *et al.* (2014). Sin embargo, es importante mencionar que la concentración de NAT del TR4 (5 mg l^{-1}) durante el período de exposición fue de 0.19 mg l^{-1} , valor significativamente mayor a los demás tratamientos. Esto puede atribuirse a la concentración de Roundup® Activo empleada, ya que, según lo reportado por Arteaga *et al.* (2015) puede ocasionar un incremento en las células de cloro y de moco en las branquias, lo que llevaría a limitaciones en el intercambio de metabolitos en el agua, permitiendo que la excreción de compuestos nitrogenados fuera mayor. Un comportamiento similar al evidenciado en este trabajo fue reportado por Gómez-Ramírez (2013), quien usó concentraciones subletales de Roundup® Activo en *P. brachypomus*, encontrando diferencias significativas en el NAT de los tratamientos 2 (0.1 mg L^{-1}) y 3 (1 mg L^{-1}) con respecto al control.

Un incremento en la concentración de compuestos nitrogenados fue registrado durante el período de recuperación, debido a que no hubo recambios diarios durante esta etapa de la investigación. A pesar de esto, los valores obtenidos no se encuentran fuera del rango adecuado para la especie. De igual manera se reportan pequeñas variaciones (no significativas) en el pH y en el OD. La ligera disminución del pH puede relacionarse con el incremento de bacterias nitrificantes, las cuales cumplen la función de transformar el NAT a N-NO_2 y posteriormente a N-NO_3 . Durante este proceso, por cada gramo de NAT convertido a N-NO_3 se consumen 7.05 g alcalinidad (como CaCO_3), lo que lleva a que los carbonatos presentes en el agua disminuyan, ocasionando la disminución en el pH (Timmons *et al.*, 2009). Respecto al OD, el aumento en su concentración se debe a la adición de una línea de aireación en cada una de las unidades experimentales, la cual le proporcionaba aire al filtro biológico. Cabe resaltar que el incremento en OD tampoco provoca efectos desfavorables en los peces, ya que se encuentra dentro de los intervalos aptos para la especie.

7.2. Parámetros productivos

Son pocos los estudios en los que se evalúan los parámetros productivos de *P. axelrodi* en condiciones de cultivo, por ello es difícil concluir si el crecimiento de los peces en el presente trabajo fue el apropiado. Para el caso del tratamiento control (TR1: 0 mg l⁻¹) los parámetros productivos obtenidos fueron de 136 mg de ganancia en peso (GP), 3 mg día⁻¹ de tasa de crecimiento absoluto (TCA) y 1.14 % día⁻¹ de tasa de crecimiento específico (TCE). Estos datos difieren de los reportados por García y Peña (2014), quienes obtuvieron una GP de 280 mg (mayor a la obtenida en el presente trabajo), una TCA de 2.3 mg día⁻¹ (relativamente menor a la reportada en el presente estudio) y TCE de 0.45 % día⁻¹ (menor a la observada en este trabajo) y con lo encontrado por Sealey *et al.* (2009) quienes registraron una GP de 168 mg (mayor a la registrada en este trabajo).

Las variaciones entre los datos obtenidos en el presente trabajo y los reportados por otros autores radican en el tiempo de cultivo y en el tipo de alimento que fue suministrado para cada caso. García y Peña (2014) mantuvieron a los juveniles de neón cardenal en un SRA por un período de 281 días, durante los cuales alimentaron a los peces con Truchina® al 35%, alimento que probablemente no cumplía en su totalidad con las exigencias nutricionales de los mismos, mientras que Sealey *et al.* (2009) cultivó a los organismos de *P. axelrodi* por 72 días, suministrando alimento al 45% de Proteína Cruda (PC), especialmente diseñado para suplir las necesidades alimenticias del neón cardenal. Para el presente estudio el mantenimiento de los organismos del tratamiento control (TR1: 0 mg l⁻¹) fue de 45 días, tiempo durante el cual se alimentó con una dieta comercial al 47.5% de PC. Esto llevó a que la GP obtenida fuera de 136 mg, la TCA fuera de 3 mg·día⁻¹ y la TCE fuera de 1.14 %·día⁻¹. Los resultados indican que durante el tiempo de cultivo en las unidades experimentales, los peces del tratamiento control incrementaron 72% en peso y, aunque los parámetros productivos fueron relativamente menores a los reportados en la literatura, son buenos teniendo en cuenta el tiempo de cultivo.

En los tratamientos que tuvieron exposición a Roundup®Activo se evidenció que los parámetros de crecimiento fueron significativamente menores a los reportados en el tratamiento control (0 mg l⁻¹) y menores a los registrados por los autores anteriormente mencionados. El escaso crecimiento puede atribuirse a la aplicación del herbicida en las diferentes unidades experimentales, ocasionando además una mayor mortalidad, especialmente en el TR4, en donde un 90% de los individuos murió a los ocho días de exposición. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Frontera *et al.* (2011), Banee *et al.* (2013) y Salbego *et al.* (2014) quienes trabajaron con *Cherax quadricarinatus*, *Leporinus obtusidens* y

Oncorhynchus mykiss, respectivamente. Estos autores, evaluaron el efecto de pesticidas organofosforados en el crecimiento, la actividad enzimática y las reservas energéticas, encontrando que los factores que más influyeron en la disminución del crecimiento fueron alteraciones en el comportamiento relacionado con la alimentación, disminución en la tasa de alimentación, disfunción en los procesos metabólicos, disminución de las reservas de energía en uno o más tejidos y reducción de los niveles de oxígeno en los tejidos.

En estudios previos realizados por Gómez-Ramírez (2013), Perdomo-Ballen *et al.* (2015) y Arteaga *et al.* (2015) en *P. brachypomus* y en *P. axelrodi*, se evidenciaron daños en el hígado y en las branquias de los peces bajo concentraciones subletales de Roundup® Activo (0.1 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ y 5 mgL⁻¹). El hígado mostró, entre otros daños, congestión vascular, la cual puede asumirse como una respuesta al estrés que pudo ocasionar la exposición al Roundup® Activo, conduciendo a un aumento en el flujo sanguíneo para incrementar las concentraciones de glucosa desde el hígado hacia otros tejidos, en donde es necesaria para afrontar una condición de estrés, como lo es la exposición ante un agente tóxico (Jiraungkoorskul *et al.*, 2002; Fanta *et al.*, 2003; Satyanarayan, *et al.*, 2012). Esta respuesta fisiológica concuerda con lo mencionado anteriormente, en donde una reducción en el crecimiento pudo atribuirse a una disminución en las reservas de energía en uno o más tejidos.

En cuanto a las branquias, éstas presentaron hipertrofia e hiperplasia de células de mucus y de cloro y desprendimiento epitelial, entre otras alteraciones (Gómez-Ramírez 2013; Arteaga *et al.*, 2015), cuya finalidad es incrementar la superficie respiratoria, impidiendo de esta manera que se difunda el tóxico en el organismo (Cengiz y Unlu, 2006; Hued *et al.*, 2012; Gómez-Ramírez, 2013). Sin embargo, aunque el objetivo final es protegerse, cualquier incremento en el espesor de las branquias ocasiona a su vez una disminución en el intercambio de gases, lo que puede generar bajas en la concentración de oxígeno en varios tejidos, reducción en el crecimiento e incremento en la mortalidad de los individuos (Banaee, 2013).

Otros órganos que tienen principal importancia en el metabolismo de xenobióticos y que son fuertemente afectados por estos compuestos son el estómago y el intestino, ya que se consideran un sitio “blanco” para patógenos y xenobióticos (Grosell *et al.*, 2011; Akan *et al.*, 2013). En el presente estudio diversos daños fueron evidenciados en el estómago e intestino de *P. axelrodi*, entre ellos hiperplasia, hipertrofia e inflamación de las células epiteliales y ruptura y festoneo del epitelio. Al estar estos órganos involucrados en la regulación de parámetros bioquímicos, en la degradación de proteínas,

lípidos y carbohidratos y en la síntesis y secreción de enzimas digestivas, es claro que la alteración en la estructura de los mismos puede ocasionar disminución en el crecimiento por la incapacidad para extraer todos los nutrientes durante el procesamiento del alimento (Banaee, 2013).

7.3. Supervivencia y Concentración letal 50

La supervivencia de *P. axelrodi* se vio fuertemente influenciada por la concentración de Roundup® activo. El efecto evidenciado fue dosis-dependiente y tiempo-dependiente, observándose mayores daños en la concentración de 5 mg L⁻¹ durante el período de exposición y en las concentraciones de 0.1 mg L⁻¹ y 1 mg L⁻¹ durante el período de recuperación. Estos resultados son similares a los registrados por Younis *et al.* (2013) en *Oreochromis niloticus* expuestos a concentraciones subletales de Cadmio y a lo evidenciado por Cengiz *et al.* (2001) en *Gambusia affinis* expuestos a concentraciones subletales de Thiodan. En estos estudios, a pesar de que el pesticida empleado difiere, se observaron daños en branquias, hígado, riñón e intestino. Estas alteraciones incluyen apoptosis, dilatación de la lámina propia, infiltración de células inflamatorias, incremento en las células encargadas de secretar mucus, hiperplasia e hipertrofia, vacuolización, edemas, desintegración de epitelios y necrosis. Estos daños al ser múltiples afectan el desarrollo y mantenimiento de los individuos, afectando procesos vitales para su crecimiento como lo son el intercambio de gases, el almacenamiento de glicógeno, la eliminación de sustancias tóxicas y la absorción del alimento (Frontera *et al.*, 2011).

La CL₅₀ obtenida para *P. axelrodi* en este estudio, después de 96 h de exposición a Roundup® Activo, fue de 12.49 mg L⁻¹ y luego de 30 días de exposición fue de 0.46 mg L⁻¹. El valor obtenido para las 96 h de exposición se encuentra dentro del rango establecido por Folmar *et al.* (1979) de 2.3 mg L⁻¹ a 43 mg L⁻¹, quienes lo determinaron en cuatro especies de peces (*Salmo gairdneri*, *Pimephales promelas*, *Ictalurus punctatus/bluegills* y *Lepomis macrochirus*) en diferentes condiciones de calidad de agua. Éstos autores concluyeron que la toxicidad del Roundup® Activo incrementa a temperaturas superiores a los 22 °C y a pH entre 6.6 y 8.0. Para el caso del valor estimado después de 30 días de exposición, no hay registros previos durante el mismo período de tiempo, sin embargo, es importante mencionar que este valor es mucho menor al encontrado en los cuerpos de agua (5 mg L⁻¹) en los que se distribuye la especie, lo que implica que efectos como los evidenciados en este trabajo pueden estarse presentando en el medio natural.

Comparativamente con otras especies de peces, *P. axelrodi* resulta ser más sensible al glifosato, teniendo en cuenta que para *P. brachyomus* la CL_{50} fue de 94.47 mg L^{-1} (Ramírez-Duarte *et al.*, 2008), para *J. multidentata* fue de 19.02 mg L^{-1} (Hued *et al.*, 2012), en *Prochilodus lineatus* fue de 13.69 mg L^{-1} (Langiano y Martínez, 2008) y para *C. carpio* fue de 620 mg L^{-1} (Neškovic *et al.*, 1996). La variabilidad en los resultados obtenidos puede deberse, a los parámetros de calidad de agua (como se mencionó anteriormente) y a la presentación comercial que se esté empleando, ya que el surfactante puede generar una mayor o menor toxicidad (Folmar *et al.*, 1979; Barragán-Rondón *et al.*, 2014).

El valor estimado durante 96 h (12.49 mg l^{-1}) duplica el valor que se ha reportado en los ríos donde se distribuye la especie, en donde se han registrado concentraciones de 5 mg l^{-1} . Esta situación es realmente preocupante al observar la alta mortalidad obtenida en tan solo 96 h de exposición. Sin embargo, es aún más preocupante el valor obtenido para los 30 días de exposición, tiempo durante el cual se supone que se degrada el glifosato, el cual indica que tan sólo con 0.46 mg l^{-1} se puede causar la muerte del 50% de los organismos en los causes.

7.4. Daños en los órganos del tracto digestivo de *P. axelrodi* expuestos a Roundup® Activo

El tracto digestivo es una de las principales rutas de absorción de xenobióticos en organismos acuáticos. Se ha demostrado que el efecto de este tipo de sustancias en el tracto gastrointestinal de los peces puede variar de leves cambios en la motilidad, secreción y funciones de absorción, a efectos más graves asociados a la integridad de la mucosa, el flujo de sangre o el control neuromuscular (Grosell *et al.*, 2011). En el presente estudio los daños evidenciados fueron recurrentes entre los tratamientos expuestos al herbicida, siendo más leves en el TR2 (0.1 mg l^{-1}) y más graves en el TR4 (5 mg l^{-1}). Para TR2 y TR3 (1 mg l^{-1}), durante el tiempo de exposición se observó en el estómago e intestino festoneado y ruptura del tejido epitelial, migración de células similares a mastocitos (CSM), hipertrofia e hiperplasia en la capa mucosa y submucosa e inflamación de las células epiteliales y de la submucosa. En TR4 (5 mg l^{-1}), además de las alteraciones evidenciadas para los tratamientos TR2 y TR3, hubo un incremento en la secreción de mucus.

Todos los daños registrados en este estudio han sido reportados previamente por varios autores, empleando diferentes xenobióticos. Para el caso de *P. brachyomus* expuestos a concentraciones de

Roundup® de 30, 60 y 120 mg L⁻¹ se observó hiperplasia de las células de mucus en el estómago (Ramírez-Duarte *et al.*, 2008). Erhunmwunse *et al.* (2014) encontraron infiltración de células inflamatorias y cambios necróticos y degenerativos en la mucosa y submucosa del intestino de *C. gariepinus* expuestos a concentraciones de glifosato de 18, 32, 54 y 72 mg l⁻¹. El intestino de *Oncorhynchus mykiss* y *Gambusia affinis* bajo el efecto de concentraciones de 0.1 mg l⁻¹ y 0.2 mg l⁻¹ de Diazinon y 0.5 mg l⁻¹ de Thiodan y deltamethrin, respectivamente, presentó necrosis de las células de la mucosa, infiltración de linfocitos en la lámina propia y hemorragias masivas (Cengiz *et al.*, 2001; Cengiz y Unlu, 2006; Banaee, 2013). Finalmente, en *Channa punctatus* expuestos a concentraciones de Endosulfan de 0.0002 mg l⁻¹ y 0.0004 mg l⁻¹ se observó fusión de las microvellosidades, ruptura del epitelio, hemorragias en la mucosa y submucosa, inflamación celular y vacuolización (Ghanbahadur, 2012; Haloi *et al.*, 2013; Karthigayani *et al.*, 2014; Ramachadran, 2014).

Las implicaciones que conllevan los resultados encontrados en el tracto digestivo de *P. axelrodi* expuestos a concentraciones subletales de Roundup® Activo pueden ser explicadas como un mecanismo protector de los peces en respuesta a las agresiones químicas o tóxicas. Sin embargo, cuando estas agresiones suelen ser recurrentes y se mantienen por cierto tiempo (más de 10 días) pueden llegar a ser muy graves, presentándose por ejemplo hipertrofia e hiperplasia, festoneo y degradación del epitelio, aumento en la secreción de mucus, almacenamiento de los xenobióticos, perturbación enzimática, acumulación de acetilcolina en los tejidos y reducción en el suministro de oxígeno, entre otros (Mohanta, *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2015).

La secreción excesiva de mucus encontrada en el epitelio gástrico de *P. axelrodi* en el presente estudio, indica que la exposición al herbicida desencadenó la actividad de las células de mucus, dispersas en el epitelio. Estas células cumplen una función fundamental en el tracto intestinal, ya que el mucus secretado, además de estar compuesto por proteínas glicosiladas, las cuales tiene una alta capacidad de almacenar agua, contienen inmunoglobulinas y otros componentes antimicrobianos, tales como enzimas y péptidos que estarían involucrados en los mecanismos de defensa del organismo. Esto permite especular que debido a la entrada del Roundup® Activo en el tracto alimentario de los peces, pudo haber una serie de cambios que indujeron la secreción de mucus “facilitando” la compensación, dilución y/o neutralización del tóxico (Ramírez-Duarte *et al.*, 2008; Senapati *et al.*, 2009; Grosell *et al.*, 2011).

Grosell *et al.* (2011) mencionan que la excesiva secreción de mucinas, como respuesta a las agresiones ocasionadas por el herbicida, altera el pH gástrico, causando que la actividad de enzimas como la

proteasa aumente, e indicando un incremento en la degradación de proteínas para producir el exceso de energía necesario para superar la condición de estrés a la cual se ve expuesto el organismo. Otras enzimas que alteran su actividad, ante la necesidad de energía extra, son la amilasa y la lipasa. Diferentes autores han evaluado la expresión de estas enzimas en peces expuestos a tóxicos, encontrando una sobreexpresión de las mismas, lo que implica perturbación de los procesos digestivos normales (Samsel y Seneff, 2013; Erhunmwunse *et al.*, 2014; Salbego *et al.*, 2014). En el caso de la amilasa, su papel fundamental es el de producir energía a partir de la degradación de polisacáridos, como el almidón, a azúcares más simples. En estudios previos se demostró que la actividad de la amilasa fue máxima en el intestino, posiblemente debido a que las enzimas son secretadas de manera inactiva hacia este órgano en forma de zimógeno y una vez allí comienzan su digestión. Es importante resaltar que estos gránulos de zimógeno se almacenan en las glándulas gástricas, encontradas en el estómago y que alteraciones en el epitelio, como las observadas en el presente trabajo, pueden afectar su disponibilidad y por consiguiente la digestión. En cuanto a las lipasas, éstas se encargan de generar energía a partir de los lípidos, los cuales son considerados como moléculas que almacenan energía y están involucradas en la señalización celular (Braunbeck y Appelbaum, 1999; Filippov *et al.*, 2013; Sandrini *et al.*, 2013; Samanta *et al.*, 2014).

Respecto a las alteraciones relacionadas con la degradación de las vellosidades, ruptura y festoneo del epitelio, Banerjee y Bhattacharya (1995) demostraron que daños celulares de este tipo conllevan a una sobreexpresión de la fosfatasa ácida, enzima involucrada en los procesos de regeneración y reparación de tejidos dañados. Entre tanto, Sastry y Malik (1979) y Braunbeck y Appelbaum (1999) encontraron que las lesiones celulares, como las descritas anteriormente, suelen ir acompañadas de liberación de hidrolasas ácidas, las cuales facilitan la autólisis de la célula y de radicales libres, que ocasionan inflamación en las capas del estómago y degradación de la mucosa. También se ha descrito que la ruptura de las vellosidades intestinales puede causar la pérdida de quilomicrones, afectándose de esta manera la absorción intestinal (Braunbeck y Appelbaum, 1999; Cengiz *et al.*, 2001).

En cuanto a las modificaciones en el grosor de las capas del tracto digestivo, se ha sugerido que la disminución de la capa mucosa y submucosa (como en el caso del presente trabajo) conlleva a implicaciones importantes en la absorción de nutrientes y en la actividad enzimática (Banerjee y Bhattacharya, 1995). De acuerdo a lo sugerido por Chlopecka *et al.* (2014), el espesor del músculo liso tanto del estómago como del intestino puede variar por la exposición corta o prolongada al glifosato, ocasionando cambios en la motilidad y causando a su vez, graves problemas en la salud de los peces,

como lo son modificaciones en los procesos de absorción, secreción y velocidad del tracto gastrointestinal. Además, estos autores creen que la actividad de la enzima ATPasa puede verse inhibida por el efecto de la exposición prolongada al glifosato, lo que provocaría un desequilibrio en los iones de calcio, comprendiendo así alteraciones en los movimientos musculares.

La infiltración de células similares a mastocitos (CSM) es un daño recurrente en las especies de peces expuestas a presentaciones comerciales de glifosato (Gómez-Ramírez, 2013; Riaño-Quintero, 2016). La aparición de estas células implica que el tejido afectado está sujeto a una condición de estrés la cual debe ser controlada. Es por ello que las CSM forman parte de la respuesta inmune, participando tanto en la respuesta innata como en la adaptativa y generando de esta manera inflamación de los tejidos implicados (Cengiz y Unlu, 2006; Annett *et al.*, 2014). Al enfrentar una condición de estrés, las CSM pueden liberar el contenido presente en sus gránulos, el cual incluye histamina, heparina, serotonina, proteasas, fosfatasas ácidas y alcalinas, prostaglandinas, factor de necrosis tumoral, entre otras. Sin embargo, la liberación de estas sustancias proinflamatorias puede llevarse a cabo sin la degranulación de estas células (Theoharides y Cochran, 2004; Wilhelm *et al.*, 2015).

El presente estudio mostró que los cambios histopatológicos pueden ser detectados fácilmente a niveles subletales de Roundup® Activo. Por lo tanto, se puede sugerir que los estudios de alteraciones patológicas en órganos en contacto con sustancias tóxicas son útiles como un biomarcador del efecto de la exposición a contaminantes. Las alteraciones histopatológicas, tales como las observadas en este estudio y los resultados de trabajos anteriores, puede dar lugar a graves problemas fisiológicos como los mencionadas a lo largo de este capítulo, conduciendo, en última instancia a la muerte de los peces.

Capítulo 8. Conclusiones

- Los parámetros de calidad de agua se mantuvieron en las condiciones adecuadas para la especie, lo que implica que no hubo ningún efecto de estos sobre la mortalidad de los individuos.
- El crecimiento y los parámetros productivos de *P. axelrodi* se vieron afectados por el Roundup®, siendo menores en las concentraciones de 0.1 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ y 5 mg L⁻¹.
- La concentración letal 50 (CL₅₀) de 12.49 mg L⁻¹ de glifosato en el producto comercial Roundup® Activo, es mayor a las concentraciones encontradas en los ríos en los que se distribuye *P. axelrodi*, situación que es preocupante, teniendo en cuenta las alteraciones observadas en el tracto gastrointestinal y la elevada mortalidad.
- Las principales alteraciones morfológicas observadas en *P. axelrodi* fueron inflamación, hipertrofia e hiperplasia, migración de células similares a mastocitos (CSM), festoneo y ruptura del epitelio, siendo las capas más afectadas la mucosa y la submucosa.
- El espesor de las capas constitutivas del estómago e intestino fueron diferentes entre los tratamientos, lo cual puede considerarse como un efecto negativo del Roundup® sobre estos órganos.
- La morfometría e histología no mostraron evidencias de recuperación en el estómago e intestino de *P. axelrodi*. En el estómago se observó una disminución en el grosor de las capas mucosa y submucosa, un incremento en la secreción de mucus y daños en el epitelio. En el intestino, hay un incremento en la capa muscular, además de un incremento en células inflamatorias, hiperplasia e hipertrofia.
- La concentración de 5 mg L⁻¹ de Roundup® Activo ocasionó la mortalidad del 90% de los peces en tan sólo ocho días de exposición, lo que indica su fuerte efecto en la salud de los peces.
- Los daños evidenciados en el tracto digestivo de *P. axelrodi* son dosis-dependientes y tiempo-dependientes.

- El Roundup® Activo altera de manera importante el estómago e intestino de *P. axelrodi*, afectando las células epiteliales y ocasionando la migración de células de tipo inflamatorio.

Capítulo 9. Recomendaciones

Realizar exposiciones con glifosato puro, surfactante, producto comercial (Roundup®) y AMPA (molécula resultante de la descomposición de glifosato), con el fin de determinar cuál de estos compuestos resulta ser más tóxico y así aclarar cuál genera efectos negativos más graves en los organismos acuáticos.

Realizar la medición de la expresión de enzimas digestivas para poder determinar el destino de las mismas y permitir concluir el efecto del glifosato sobre las reservas energéticas de los peces ante situaciones de estrés como la exposición a este tipo de xenobióticos.

Determinar mediante inmunohistoquímica algunos compuestos presentes en los gránulos de las CSM para conocer cuáles están presentes en *P. axelrodi* y así relacionarlas con la actividad inmune desencadenada por Roundup®.

Establecer los cambios histológicos e inmunohistoquímicos en el tracto digestivo de *P. axelrodi* en diferentes edades (desde alevines a adultos) para determinar el efecto del glifosato en el desarrollo de los individuos.

Lista de referencias bibliográficas

- Administración de Obras Sanitarias del Estado. (2006). *Norma interna de calidad de agua potable*. Recuperado el 25 de Agosto de 2015, de http://www.haceclick.com.uy/documentos/OSE_Normativa.pdf
- Ahmed, I.; Ahmmed, M. K.; Ghosh, S. K.; Islam, M. y Shahjahan, M. (2015). Histo-architectural changes of intestinal morphology in zebra fish (*Danio rerio*) exposed to Sumithion. *Agriculture, livestock and fisheries*, 2(3), 499–506.
- Akan, J., Mohammed, C., LamiJafiya, Z. y Audu, S. (2013). Organophosphorus Pesticide Residues in Different Tissues of Fish Samples from Alau Dam, Borno State, Nigeria. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 5 (5): 519 – 526. DOI: 10.5829/idosi.wjfm.2013.05.05.73111
- Amin, A. B., Mortensen, L. y Poppe, T. (1992). Histology atlas: normal structure of Salmonids. Akvapatologisk Laboratorium A. S., Norway.
- Anjos, HDB y Anjos, C. (2006). Biología reproductiva e desenvolvimento embrionário e larval do cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 (Characiformes: Characidae), em laboratório. *Pesca, São Paulo*, 32(2), 151–160.
- Annett, R., Habibi, H. R. y Hontela, A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, 34, 458–479. <http://doi.org/10.1002/jat.2997>
- Arteaga, E., Gómez-Ramírez, E. y Hurtado-Giraldo, H. (2015). Alteraciones histopatológicas en branquias de neón cardenal (*Paracheirodon axelrodi*) expuestos a concentraciones subletales de Roundup Activo, Fortaleza, Brasil, Noviembre 16 – 19, 2015.
- Banaee, M. (2013). Physiological Dysfunction in Fish After Insecticides Exposure. En: Banaee, M. Insecticides - Development of Safer and More Effective Technologies, Behbahan University of Technology, Iran. pp. 105–143. <http://doi.org/10.5772/54742>
- Banerjee, S. y Bhattacharya, S. (1995). Histopathological changes induced by chronic nonlethal levels of elsan, mercury and ammonia in the liver of *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31, 62–68. <http://doi.org/10.1006/eesa.1995.1044>
- Barja, B. C. y Dos Santos Afonso, M. (2005). Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study. *Environmental Science y Technology*, 39(2), 585–92.
- Barragán-Rondón, I., Mendez-Marín, G., Chacón, R., Naranjo, L. y Eslava-Mocha, P. (2014). Efectos del Roundup® y Cosmoflux® 411f sobre la respuesta inmune frente al desafío con *Aeromonas hydrophila* en cachama blanca (*Piaractus brachyomus*). *Orinoquia*, 18(2), 1 – 10.
- Beltrão, D. y Rocha, C. (2006). Biología reproductiva e desenvolvimento embrionário e larval do cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* Shultz, 1956 (Characiformes: Characidae), em laboratório B. *Inst. Pesca*. 32(2): 151-160.
- Bøhn, T., Cuhra, M., Traavik, T., Sanden, M., Fagan, J. y Primicerio, R. (2014). Compositional differences in soybeans on the market: Glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. *Food Chemistry*. 153, 207 – 215. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.054>
- Borggaard, O. K. y Gimsing, A. L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: A review. *Pest Management Science*, 64, 441–456. <http://doi.org/10.1002/ps.1512>
- Braunbeck, T. y Appelbaum, S. (1999). Ultrastructural alterations in the liver and intestine of carp *Cyprinus carpio* induced orally by ultra-low doses of endosulfan. *Diseases of Aquatic Organisms*,

- 36 (3): 183 – 200.
- Brown, M. E. (1957). *The physiology of fishes* (1st ed.). Academic press INC, New York.
- CCAC guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing. (2005). Recuperada el 15 de septiembre de 2015, de <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf>
- Caldas, M.L., Ricaurte, O., Rodríguez, G. y Amaya, J. (1993). Microscopía óptica de alta resolución “MOAR”. Instituto Nacional de Salud, Bogotá.
- Chlopecka, M., Mendel, M., Dziekan, N. y Karlik, W. (2014). Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses – In vitro study. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 113: 25 – 30.
- Cengiz, E. İ., Ünlü, E. y Balcı, K. (2001). The histopathological effects of Thiodan® on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 36(1), 75–85. <http://doi.org/10.1081/PFC-100000918>
- Cengiz, E. I. y Unlu, E. (2006). Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21(3), 246–253. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2005.08.005>
- COFEPRIS. (2009). Catálogo de Plaguicidas. Recuperado el 23 de Agosto de 2015, de http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/catalogo_de_plaguicidas
- Comes, R. D., Bruns, V. F. y Kelly, A. D. (1976). Residues and persistence of glyphosate in irrigation water. *Weed Sci.*, 24, 47-67.
- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E. y Wiegand, C. (2009). Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*. 151(1), 57 – 63. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.07.027>
- Coupe, R. H., Kalkhoff, S. J., Capel, P. D. y Gregoire, C. (2011). Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. *Pest Management Science*, 68, 16 – 30. <http://doi.org/10.1002/ps.2212>
- Cox, C. (1998). Glyphosate (Roundup). *Journal Pestic Reform*, 18:3–17, 18, 3 - 17.
- Dill, G. M.; CaJacob, C. A. & Padgette, S. R. (2008). Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Manag. Sci.*, 64, 326–331
- Duke, S. O. y Powles, S. B. (2008). Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319 – 325. <http://doi.org/10.1002/ps.1518>
- Edwards, W. M.; Triplett, G. B. & Kramer, R. M. (1980). A watershed study of glyphosate transport in runoff. *J. Environ. Qual.*, 9, 661-665
- Erhunmwunse, N. O., Ewere, E. E., Ainerua, M. O. y Alohan, F. I. (2014). Biomarker of Exposure : Alterations in GIT of Post Juvenile Africa Cat Fish (*Clarias gariepinus*) Exposed to sub-lethal concentrations of Glyphosate Herbicide (IPA 360g / L). *International Journal of Innovation and Scientific Research*, 4(1), 1–5.
- Fanta, E., Rios, F. S. A., Romao, S., Vianna, A. C. C., Asagrande y Freiberger, S. (2003). Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(2), 119–130. [http://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00044-1](http://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00044-1)
- Feng, J. C.; Thompson, D. G. y Reynolds, P. E. (1990). Fate of Glyphosate in a Canadian Forest Watershed. 1. Aquatic Residues and Off Target Deposit Assessment. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1110 – 1118.

- Filippov, A., Golovanova, I. y Aminov, A. (2013). Effects of organic pollutants on fish digestive enzymes: A review. *Inland Water Biology*, 6 (2): 155 – 160.
- Finney, D. J. (1952). Probit Analysis. (2nd ed). , Cambridge University Press, England.
- Folmar, L. C., Sanders, H. O. y 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(3), 269–278. <http://doi.org/10.1007/BF01056243>
- Frontera, J. L., Vatnick, I., Chaulet, A. y Rodríguez, E. M. (2011). Effects of glyphosate and polyoxyethylenamine on growth and energetic reserves in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(4), 590–598. <http://doi.org/10.1007/s00244-011-9661-3>
- Geisler, R. y Annibal, S. (1986). Ecology of the cardinal-tetra *Paracheirodon axelrodi* in the River Basin of the Rio Negro/Brazil as well as breeding- related factors. *Animal Research and Development*, 23: 7-39.
- Gamez-Rojas, Catalina y Ramírez-Riveros, E. (2008). Determinación de la dosis letal 50 en Daphnia. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Universidad de La Salle. 208 p.
- García-Gutierrez, C. y Rodríguez-Mesa, G. D. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*, 8(3), 1 - 10.
- García-Cruz, E. L.; Peña-Osorio, K. T.; Gómez-Ramírez, E. y Hurtado-Giraldo, H. (2014). Efecto del pH sobre la proporción oocitaria de *Paracheirodon axelrodi*, en cautiverio. *Orinoquía*, 18(2), 25–37.
- Gartner, L. y Hiatt, J. (2007). Color textbook of Histology (3rd ed). Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Ghanbahadur, A. (2012). Histopathological effect of organochloride endosulphan on intestine and stomach of larvivorous fish *Rasbora daniconius*. *International Journal of Science*, 1(2), 126 - 128.
- Giesy, J. P., Dobson, S. y Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Rev Environ Contam Tox*, 167, 35 - 120.
- Gómez Ramírez, E. (2013). Efecto de una presentación comercial de glifosato en alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Tesis de maestría en Acuicultura. Universidad de los Llanos. 92 p.
- Gómez - Ramírez, E., Obando, M. J., Tovar, M. O., Caldas, M. L. y Hurtado - Giraldo, H. (2011). Estudio Histológico del Tracto Digestivo del Neón Cardenal *Paracheirodon axelrodi* (Characidae). *International Journal of Morphology*, 29(3), 782-786.
- Gómez - Ramírez, E., Guzmán , L., Eslava, P. y Hurtado - Giraldo, H. (2012). Efecto de concentraciones subletales de Roundup Activo en el riñón de alevinos de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 8, 256 - 267.
- Grosell, M., Farrell, A. P. y Brauner, C. J. (2011). The multifunctional Gut of fish (1st ed). Elsevier, San Diego.
- Haloi, K., Kalita, M. y Nath, R. (2013). The Study on the Histopathological Changes of Stomach of *Channa punctatus* Bloch. By used Pesticide Endosulfan. *Global Journal of Science Frontier Research Biological Sciences*, 13(2), 1 – 6.
- Halver, J. E. y Hardy, R. W. (2002). Fish nutrition (3rd ed). Elsevier Science, Orlando.
- Harder, W. (1975). Anatomy of fishes. Schweizerbart'sche, Verlagsbuchhandlung.
- Heath, A. (1995). Water pollution and fish physiology (2nd ed). Lewis Publishers, Florida.
- Hoar, W. S., Randall, D. J. y Brett, J. R. (1979). Fish physiology (1st ed). Academic Press INC, Orlando.
- Hued, A. C., Oberhofer, S. y De Los Ángeles Bistoni, M. (2012). Exposure to a commercial glyphosate

- formulation (Roundup) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, cyprinodontiformes). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 107–117. <http://doi.org/10.1007/s00244-011-9686-7>
- Jeyaratnam, J. y Maroni, M. (1994). Organophosphorous compounds. *Toxicology*, 91, 15 - 27.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S. y Pokethitiyook, P. (2002). Histopathological Effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *ScienceAsia*, 28, 121–127.
- Karthigayani, T., Denis, M., Rexlin, A. y Remy, A. (2014). Histological study of the intestine and liver tissues in the fish *Oreochromis mossambicus* exposed to cypermethrin. *Journal of Modern Biotechnology*, 3(4), 48–54.
- Kerr, J. (2010). *Functional histology* (2nd ed.). Mosby Elsevier, Chatswood.
- Landines, M., Ureña, F., Mora, J., Rodríguez, M., Sanabria, A., Herazo, M. y Botero, J. (2007). Producción de peces ornamentales en Colombia. INCODER, Bogotá.
- Langiano, V. d. C. y Martínez, C. B. R. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. 147: 222 – 231. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.09.009>
- Livingston, R. J. (1977). Review of current literature concerning acute and chronic effects of pesticides on aquatic organisms. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, 7, 1 - 325. doi:10.1080/10643387709381655
- Ma, J. y Li, X. (2015). Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. *Chemosphere*, 128, 293–298. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.017>
- Mauck, W. L. y Olson, L. E. (1976). Toxicity of natural pyrethrins and five pyrethroids to fish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 4, 18 - 29.
- Maule, A. y Wright, S. J. (1984). Herbicide effects on the population growth of some green algae and cyanobacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 57, 369 - 376.
- McQueen, H., Callan, A. C. y Hinwood, A. L. (2012). Estimating maternal and prenatal exposure to glyphosate in the community setting. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. <http://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.12.002>
- Mercado, B., García, J., Rosado, R., Olaya, C., Segura, F., Bru, S. y Tornecilla, G. (2006). Cultivo de dorada (*Brycon sinuensis*, Dahl, 1955) en jaulas flotantes a diferentes niveles de proteína. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19: 204-211.
- Merrifield, D. y Ringo, E. (2014). *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics* (1st ed.). Wiley Blackwell, Hoboken.
- Mesnage, R., Bernay, B. y Séralini, G. E. (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, 314(2-3), 122–128. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>
- Mink, P. J., Mandel, J. S., Scurman, B. K. y Lundin, J. I. (2012). Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.05.012>
- Mohanta, M. K., Saha, A. K., Hasan, A. y Roy, A. K. (2010). Effects of Tannery Effluents on Survival and Histopathological Changes in Different Organs of *Channa punctatus*. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 1(2), 294–302.
- Muñoz, A., Caldas, M. L. y Hurtado, H. (2006). Análisis histomorfológico del sistema digestivo y glándulas

- anexas en alevinos de cachama blanca, *Piaractus brachypomus* (Characidae: Piaractus). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 2: 137-64.
- Murty, A. S. (1986). Toxicity of Pesticides to fish. CRC Press, Boca Raton.
- Neškovic, N. K., Poleksic, V., Elezovic, I., Karan, V. y Budimir, M. (1996). Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate on Carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 56, 295–302.
- Newton, M.; Horner, L. H.; Cowell, J. E.; White, D. E. y Cole E. C. (1994). Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American forests. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 1795-1802.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). (2015). Monitoreos de Cultivos de coca 2014. Recuperado el 25 de Agosto de 2015, de https://www.unodc.org/documents/colombia/2015/Agosto/censo_de_cultivos_de_coca_2014_BR.pdf
- Olaya, C.M., Ovalle, C., Gómez, E., Rodríguez, D., Caldas, M.,L. y Hurtado, H. 2007. Histología y morfometría del sistema digestivo del Silúrido bagre tigrilo (*Pimelodus pictus*). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 54: 311 - 323.
- Oliveira, S. R. de, Souza, R. T. Y. B. de, Nunes, É. da S. S., Carvalho, C. S. M. de, Menezes, G. C. de, Marcon, J. L. y Affonso, E. G. (2008). Tolerance to temperature, pH, ammonia and nitrite in cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi*, an amazonian ornamental fish. *Acta Amazonica*, 38(4), 773–779. <http://doi.org/10.1590/S0044-59672008000400023>
- Orta, L. (2002). Contaminación de las aguas por plaguicidas. *Fitosanidad*, 6(3), 55 - 62.
- Ostrander, G. K. (2000). The Laboratory Fish. Academic Press, San Diego. doi:10.1006/bklf.2000
- Perdomo-Ballén, C., Gómez-Ramírez, E. y Hurtado-Giraldo, H. (2015). Efecto post exposición a concentraciones subletales de una presentación comercial de glifosato (Roundup Activo) sobre el hígado de Neón cardenal (*Paracheirodon axelrodi*). Fortaleza, Brasil. Noviembre 16 – 19, 2015.
- Pérez, G. L., Vera, S. M. y Miranda, L. A. (2011). Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. En A. Kortekamp, Herbicides and Environment. InTech, Rijeka. pp 746.
- Pérez, A. G. L., Torremorell, a, Mugni, H., Rodríguez, P., Vera, M. S., Allende, L., Zagarese, H. (2010). Effects of the Herbicide Roundup on Freshwater Microbial Communities : A Mesocosm Study *Ecological Appl.*, 17(8), 2310–2322.
- Pineda, R. (1999). Elaboración y evaluación de dietas a partir de harinas de barrilete (*Euthynnus linneatus*) y rasposa (*Haemulon maculiconda*) como alimento de bagre (*Letalurus punctatus*) en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría en Acuicultura. Universidad de colima. 102 p.
- Ramachandra, R., Namburi, R.,B., Ortega-Martinez, O., Shi, X., Zaia, J. y Dupont, S.,T. (2014). Brittlestars contain highly sulfated chondroitin sulfates/dermatan sulfates that promote fibroblast growth factor 2-induced cell signaling. *Glycobiology*, 24:195-207.
- Ramírez-Duarte, W. F., Rondón-Barragán, I. S. y Eslava-mocha, P. R. (2008). Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on “cachama blanca” (*Piaractus brachypomus*). *Pesq. Vet. Bras.*, 28(11), 547–554. <http://doi.org/10.1590/S0100-736X2008001100002>
- Relyea, R. a. (2005). The Lethal Impact of Rounup on Aquatic and Terrestrial Amphibeans. *Ecological Applications*, 15(4), 1118–1124. <http://doi.org/10.1890/04-1291>
- Riaño-Quintero, C. A. (2016). Efecto de una presentacion comercial de glifosato sobre el área preóptica e

- hipotalamo de neón cardenal (*Paracheirodon axelrodi*). Tesis de licenciatura en Biología Aplicada. Universidad Militar Nueva Granada. 61 p.
- Salazar, N. J. y Aldana, M. L. (2011). Herbicida Glifosato : Usos , Toxicidad Y Regulación. *Revista de Ciencias Biológicas Y de La Salud de La Universidad de Sonora*, 13(2), 23–28.
- Salazar, M. y Ocampo, D. (2002). Tasa de crecimiento del pez ángel *Pterophyllum scalare* (Perciformes: Chichlidae) en condiciones de laboratorio. *Acta universitaria*, 12: 28-33.
- Salbego, J., Pretto, A., Machado da Silva, Vera Maria Loro, V. L., Lazzari, R., Gioda, C. R. y Baldisserotto, B. (2014). Glyphosate on digestive enzymes activity in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ciência Rural*, 44(9), 1603–1607. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131399>
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K. y Ghosh, A. R. (2014). Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.107: 120 - 125 <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.025>
- Samsel, A. y Seneff, S. (2013). Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. *Interdisciplinary toxicology*. 6 (4): 159 – 184. <http://doi.org/10.2478/intox-2013-0026>
- Samsel, A. y Seneff, S. (2013). Glyphosate’s Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. *Entropy*, 15, 1416–1463. <http://doi.org/10.3390/e15041416>
- Sandrini, J. Z., Rola, R. C., Lopes, F. M., Buffon, H. F., Freitas, M. M., Martins, C. de M. G. y da Rosa, C. E. (2013). Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. *Aquatic Toxicology*. 130 – 131: 171 – 173. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.006>
- Sastry, K. V. y Malik, P. V. (1979). Toxicology Studies on the Effect of D i m e c r o n on the Digestive System of a Fresh Water Fish , *Channa punctatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 407, 397–407.
- Satyanarayan, S., Satyanarayan, J. P. K. A. y Verma, S. (2012). Histopathological changes due to some chlorinated hydrocarbon pesticides in the tissues to *Cyprinus carpio*. *Journal of Pharmacy*, 2(6), 60–66.
- Sealey, W. M., Barrows, F. T., Casten, M. y Hardy, R. W. (2009). Dietary Protein Source and Level Affects Growth in Neon Tetras. *North American Journal of Aquaculture*, 71(4), 320–324. <http://doi.org/10.1577/A08-017.1>
- Senapati, T., Mukerjee, A. K. y Ghosh, A. R. (2009). Observations on the effect of glyphosate based herbicide on ultra structure (SEM) and enzymatic activity in different regions of alimentary canal and gill of *Channa punctatus* (Bloch), *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*, 5(1), 233–242.
- Seneff, S., Swanson, N. y Li, C. (2015). Aluminum and Glyphosate Can Synergistically Induce Pineal Gland Pathology : Connection to Gut Dysbiosis and Neurological Disease. *Agricultural Sciences*, 6, 42–70.
- Shiogiria, N.S., Paulinob, M.G. y Silvia, P. (2012). Acute exposure of aglyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34, 388–396.
- Shehata, A. A., Schrödl, W., Aldin, A. A., Hafez, H. M. y Krüger, M. (2013). The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Current*

- Microbiology*, 66: 350 – 358. <http://doi.org/10.1007/s00284-012-0277-2>
- Sherret, L. (2005). Futility in action : Coca Fumigation in Colombia. *Journal of Drug Issues*, 151–168.
- Sihtmäe, M., Blinova, I., Künnis-Beres, K., Kanarbik, L., Heinlaan, M. y Kahru, A. (2013). Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Applied Soil Ecology*. 72: 215 – 224. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.005>
- Soares, V. B. y Coelho, G. L. V. (2012). Safety study of an experimental apparatus for extraction with supercritical CO₂. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29(3), 677–682. <http://doi.org/10.1590/S0104-66322012000300023>
- Sobrero, M. C., Rimoldi, F. y Ronco, A. E. (2007). Effects of the glyphosate active ingredient and a formulation on *Lemma gibba* L. at different exposure levels and assessment end- points. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 79, 537 - 543.
- Solomon K. R., Anadón A., Carrasquilla G., Cerdeira A., Marshall J. y Sanin L. 2007. Coca and puppy eradication in Colombia: Environmental and human health assesment of aerially applied glyphosate. *Review Environmental Contamination Toxicology*. 190: 4 – 125.
- Storm, J. E. (2012). Organophosphorus Pesticides. *Patty's Toxicology*, 95, 1077–1234. doi:10.1002/0471435139.tox095.pub2
- Swedish International Development Cooperaodction Agency, S. (2009). Recuperado el 15 de Agosto de 2015, de www.panap.net
- Tate, T.; Jackson, R. y Christian, F. (2000). Effects of glyphosate and dalapon on total free amino acid profiles of *Pseudosuccinea columella* Snails. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 64, 258–262
- Theoharides T, Alysandratos K, Angelidou A, Delivanis A, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A and Kalogeromitros D. 2012. Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1822 (2012) 21–33.
- Timmons, M., Ebeling, J. y Piedrahita, R. (2009). Acuicultura en Sistemas de Recirculación (1^{ra} ed.). Cayuga Aqua Ventures, LLC, Nueva York.
- Tsui, M. T. y Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52, 1189-1197.
- Tu, M., Hurd, C., Robison, R. y Randall, J. M. (2001). Glyphosate. *Weed Control Methods Handbook, The Nature Conservancy*, 7, 1–10.
- Turgut, C. y Formin, A. (2002). Sensitivity of the rooted macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdcourt to seventeen pesticides determined on the basis of EC50. *Environ. Contam. Toxicol.*, 69, 601 - 608.
- Vargas, R. (2002). The anti-drug policy, aerial spraying of illicit crops and their social, environmental and political impacts in Colombia. *The Journal of Drug Issues*, 22: 11 – 60.
- Van der Oost, R., Beyer, J. y Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ Toxicol Pharmacol*, 13, 57 - 149.
- Vendrell, E., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G. L., Rodríguez, P., Mugni, H., Pizarro, H. (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19, 710 - 719.
- Vincent, K. (2015). Probit Analysis. Recuperado el 07 de julio de 2016, de <http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/Probit/ProbitAnalysis.pdf>
- Walker I. (2004). The food spectrum of the cardinal tetra (*Paracheirodon axelrodi*, Characidae) in its natural habitat. *Acta Amazonica*. 34: 69-73.

- Williams, P., James, R. y Roberts, S. (2000). Principles of toxicology: environmental and industrial applications (2nd ed.). Wiley-Interscience Publication, New York.
- Wilhelm M, Silver R and Silverman A. (2005). Central nervous system neurons acquire mast cell products via transgranulation. *European Journal of Neuroscience*, 22, 2238 – 2248.
- Younis, E. M., Warith, A.-W., Al-Asgah, N. A., Ebaid, H. y Mubarak, M. (2013). Histological Changes in the Liver and Intestine of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* , Exposed to Sublethal Concentrations of Cadmium. *Pakistan Journal of Zoology*, 45(3), 833–841.