

## Efectos del Roundup® y Cosmoflux® 411f sobre la respuesta inmune frente al desafío con *Aeromonas hydrophila* en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)

The effects of Roundup® and Cosmoflux® 411f on the immune response of white cachama (*Piaractus brachypomus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*

Efeitos do Roundup® e Cosmoflux® 411f sobre a resposta imune diante ao desafio com *Aeromonas hydrophila* pirapitinga

Iang S. Rondón-Barragán<sup>1\*</sup>; Gira A. Marín-Mendez<sup>2\*\*</sup>; Roberto A. Chacón<sup>2\*\*</sup>; Leidy Naranjo<sup>2\*\*</sup>; Pedro R. Eslava-Mocha<sup>3</sup>

<sup>1\*</sup> MVZ, MSc.

<sup>2\*\*</sup> MVZ.

<sup>3</sup> MV, MSc

\* Grupo de Investigación en Sanidad de Organismos Acuáticos, IALL.

\*\* Grupo de Investigación en Inmunobiología y Patogénesis, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Sanidad Animal, Universidad del Tolima.

Email: iangrondon@gmail.com.

Recibido: Junio 28 de 2012.

Aceptado: Octubre 1 de 2013.

### Resumen

Los herbicidas y pesticidas han mostrado afectar organismos no blancos de su acción. Dichos efectos incluyen alteración endocrina, así como teratogénesis, lesiones en sistema respiratorio, digestivo, inmune y nervioso. Particularmente, se ha documentado que las alteraciones del sistema inmune pueden generar efectos importantes sobre la capacidad del pez para sobrevivir en el medio. El presente trabajo evaluó el efecto de la exposición subletal al Roundup® (glifosato) y al surfactante acompañante (Cosmoflux® 411F) sobre la respuesta inmune al desafío bacteriano con *Aeromonas hydrophila* en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Se evidenció que el Roundup®, así como la mezcla de este con el surfactante, disminuyen la resistencia de los animales al desafío con la bacteria y que el periodo de latencia es menor en los animales expuestos respecto al control. De la misma manera se evidenció un aumento de la actividad oxidativa en los animales expuestos. Los animales expuestos a las concentraciones subletales de glifosato, así como a la mezcla con el surfactante evidenciaron una mayor susceptibilidad frente a la infección experimental con *A. hydrophila*. Dichos efectos fueron mayores en el grupo expuesto a la mezcla, por lo cual se atribuye un efecto sinérgico ejercido por el surfactante en la misma.

**Palabras clave:** cachama blanca, Cosmoflux® 411F, infección experimental, glifosato, inmunotoxicología, respuesta inmune

## Abstract

It has been showed herbicides affect organisms which were not the target for their action. Such effects would include endocrine alteration, as well as teratogenesis and damage to the respiratory, digestive, and immune and nervous systems. It has been documented that alterations to the immune system could produce significant effects on a fish's ability to survive in its environment. The present work was aimed at evaluating the effect of sub-lethal exposure to Roundup® (glyphosate) and an accompanying surfactant (Cosmoflux® 411F) on the immune response to challenging white cachama/red-bellied pacu (*Piaractus brachypomus*) with the heterotrophic, Gram-negative, rod-shaped bacteria *Aeromonas hydrophila*. It was shown that Roundup®, as well as a mixture of this with the surfactant, reduced the animals' resistance to challenge with the bacteria and that the latency period was shorter in exposed animals regarding control. Likewise, increased oxidative activity was observed in the exposed animals. Animals exposed to sub-lethal concentrations of glyphosate, as well as the mixture with the surfactant, had greater susceptibility to experimental infection with *A. hydrophila*. Such effects were greater in the group exposed to the mixture, there by attributing a synergic effect to the surfactant.

**Key words:** White cachama/red-bellied pacu, Cosmoflux® 411F, experimental infection, glyphosate, immunotoxicology, immune response.

## Resumo

Os agro-toxicos tem demonstrado afetar não alvos da sua ação. Os efeitos incluem alteração endócrina, assim como teratogénesis, lesões nos sistemas respiratório, digestório, imune e nervoso. Especialmente, se tem documentado que as alterações no sistema imune podem gerar efeitos importantes sobre as alterações sobre a capacidade do peixe para sobreviver ao médio. O presente trabalho avaliou o efeito da exposição subletal a Roundup® (glifosato) e ao surfactante acompanhante (Cosmoflux® 411F) sobre a resposta imune ao desafio bacteriano com *Aeromonas hydrophila* em pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). Foi evidenciado que o Roundup® e a mistura com o surfactante, diminuem a resistência dos animais ao desafio com a bactéria e que o período de latência é menor nos animais expostos em relação ao controle. Da mesma maneira, houve aumento da atividade oxidativa nos animais expostos 'a concentrações subletais de glifosato, assim como á mistura com o surfactante evidenciaram maior susceptibilidade diante a infecção experimental com *A. hydrophila*. Estes efeitos for am maiores no grupo exposto com a mistura pelo qual se atribui um efeito sinérgico exercido pelo surfactante na mesma.

**Palavras-chave:** Pirapitinga, infecção experimental, Cosmoflux® 411F, glifosato, imunotoxicologia, resposta imune.

## Introducción

La utilización de herbicidas ha aumentado en los últimos años en la agricultura mundial (Gianessi, 2013), y en Colombia se reportan valores de uso de 23.882 toneladas para el año

2011 (FAOSTAT, 2015). Sin embargo, estos y otros agroquímicos (e.g. pesticidas) pueden ejercer efectos deletéreos sobre poblaciones no blanco de su aplicación (Boutin *et al.*, 2014; Egan *et al.*, 2014; Grundy *et al.*, 2010; Kortekamp, 2011; Marshall *et al.*, 2001), bien

sea por aplicación directa, lixiviación, escorrentía o deriva del viento, en el caso de las aspersiones aéreas (Borggaard y Gimsing, 2008).

El efecto de los herbicidas sobre poblaciones naturales ha sido evaluado previamente (McComb *et al.*, 2008; Relyea, 2005; Relyea, 2012) y ha evidenciado que pueden alterar la dinámica de diversos ecosistemas. Dentro de ellos, los ecosistemas acuáticos se convierten en receptores finales de los agroquímicos utilizados para el control de malezas, plagas y cultivos indeseados, lo que puede alterar cadenas tróficas y por ende, ecosistemas dependientes de ellas (Borggaard y Gimsing, 2008; Meza-Joya *et al.*, 2013; Relyea, 2005). La exposición a herbicidas en organismos acuáticos, principalmente peces, ha mostrado tener efectos perjudiciales tales como alteraciones endocrinas, metabólicas y enzimáticas; daños en el desarrollo embrionario, alteración de las superficies respiratorias; y lesiones en el sistema nervioso central y el sistema inmune (Annet *et al.*, 2014; Eslava *et al.*, 2007; Gluszczak *et al.*, 2006; Gluszczak *et al.*, 2007; Jiraung koorskul *et al.*, 2002; Ortiz-Santaliestra *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2008; Rondón-Barragán *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2007).

El glifosato (GP) es un herbicida sistémico, no selectivo de amplio espectro, usado para el control de plantas anuales y perennes (Kaczewer, 2002), que actúa inhibiendo la producción de aminoácidos aromáticos en las plantas, mediante la inhibición de una enzima de la vía del chikimato (Haney *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2000). La vía del ácido chikímico está ausente en mamíferos, peces, aves, reptiles e insectos (Murtaza y Stallings, 2001).

En peces, el GP posee una CL50 mayor a 10 mg/L, mientras el Roundup® (i.e. presentación comercial del GP más aditivos) tiene un rango de 2 a 55 mg/L, por lo cual ha

sido considerado más tóxico (WHO, 1994). En ensayos realizados en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), se ha estimado un valor de 97.47 mg/L (Ramírez *et al.*, 2008). Los efectos subletales del GP sobre los peces incluyen nado errático, dificultad respiratoria y alteraciones en la alimentación, migración y reproducción (Morgan *et al.*, 1991; McComb *et al.*, 2008; Eslava *et al.*, 2007).

Los productos comerciales del glifosato (e.g. Roundup®, Roundup Ultra®, Glyphomax®), además del principio activo GP, contienen emulsificantes, solventes y surfactantes (e.g. POEA) que le permiten adherirse fuertemente a la superficie de las hojas facilitando su absorción. El POEA, incluido en la formulación comercial del glifosato, presenta un efecto sinérgico con éste, mostrando mayor toxicidad que el glifosato mismo; interfiere con la respiración cutánea de las ranas y la respiración branquial en renacuajos y peces, y su toxicidad tiende a ser mayor con periodos de exposición más prolongados (Folmar *et al.*, 1979). Rondón *et al.*, (2007) han descrito los efectos tóxicos asociados a la exposición al surfactante Cosmoflux® 411F, el cual es adicionado al Roundup®, con una CL50 a 96 horas de 4417.99 mg/L en cachama blanca. Allí se evidencian lesiones branquiales, hepáticas y lesiones en el sistema nervioso central similares a las descritas para el Roundup®. Además, al conocimiento de los investigadores no existen suficientes estudios sobre los efectos del surfactante, solo o en combinación con Roundup; de este modo, no existe evidencia científica que respalde la seguridad de su uso sobre la población, cultivos de pan coger y fuentes de agua.

Algunos trabajos han puesto en evidencia los efectos de la exposición a herbicidas en detrimento de la calidad de la respuesta inmune en diversos grupos de animales, incluyendo organismos acuáticos (Kiesecker, 2002; Elandalousi *et al.*, 2008; Sung y Ye, 2009). Particularmente en peces, se ha

encontrado que una mezcla de herbicidas, genera un bloqueo del sistema de defensa antioxidante enzimático, causando daño celular y estrés oxidativo; lo cual interfiere con la actividad fagocítica y la actividad lisosómica, y genera inmunosupresión (Fatima *et al.*, 2007). Así mismo, Rice *et al.* (1996) reportan disminución en la inmunocompetencia de peces expuestos a dichos compuestos. Recientemente, Salazar-Lugo *et al.*, (2009) mostraron que en tambaqui (*Colossoma macropomum*) sometidos a Paraquat, se evidenció una disminución significativa en la capacidad bactericida de los leucocitos, así como una disminución en la concentración de leucocitos circulantes, principalmente neutrófilos. No obstante, para el glifosato son pocos los estudios que respalden la inocuidad de su uso en ambientes con organismos acuáticos.

Los componentes del sistema inmune y la dinámica de su respuesta han demostrado ser altamente sensibles a la exposición de agroquímicos y compuestos tóxicos en el ambiente (Salazar-Lugo *et al.*, 2009), por lo cual se constituyen en biomarcadores de contaminación y facilitan el estudio de la inmunotoxicología. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto del glifosato y surfactantes acompañantes, así como de su mezcla, sobre la respuesta inmune frente al desafío bacteriano con *A. Hydrophila*, en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*).

## Materiales y métodos

### Animales

Se utilizaron alevinos de cachama blanca, de  $4 \pm 0,65$  g de peso, clínicamente sanos, obtenidos del Instituto de Acuicultura de los Llanos Orientales (IALL), criados en estanques en tierra y provenientes de un mismo desove.

## Condiciones experimentales

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad del Tolima, (Ibague, Tolima, Colombia) y en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de la Universidad del Tolima.

Los animales fueron alojados en acuarios de vidrio a una densidad menor o igual a 1g/L siguiendo los lineamientos de la OECD (1992) para la aclimatación y experimentación, acondicionados con aireación constante, sin filtro. Los alevinos fueron alimentados dos veces al día con concentrado MOJARRA al 30% (SOLLA) con una ración correspondiente al 2% de la biomasa total. Diariamente, durante el periodo de aclimatación (15 días) y en el transcurso de la fase experimental, fueron medidos los parámetros de calidad de agua correspondientes a pH, sólidos disueltos, temperatura (pH Meter Multiparametric Hanna Instruments®) y oxígeno disuelto (OXXI 330i/set Germany). Del mismo modo, se realizó recambio diario del 50% del volumen de agua con mantenimiento de la concentración correspondiente en cada grupo experimental mediante la adición de la cantidad de la sustancia requerida para conservar la concentración inicial. Previo al período de aclimatación, los peces fueron sometidos a un baño con cloruro de sodio (NaCl) al 3 % durante 20 minutos con el objetivo de eliminar ectoparásitos de acuerdo con lo descrito por Floyd (1995).

## Sustancias experimentales

El RoundupSL es un herbicida elaborado por MONSANTO COMPANY, compuesto por un 48 % de sal Isopropilamina de glifosato, surfactante POEA y agua. Los componentes descritos del RoundupSL son los mismos del Roundup® Ultra, difiriendo en la concentración de sus componentes. El Cosmoflux® 411F es un surfactante elaborado por la empresa colombiana COSMOAGRO.

De aquel no se describe la composición exacta, pero se sabe que contiene como ingredientes activos una mezcla de sustancias tensoactivas, estéreo específicas no-iónicas basadas en alcoholes lineales etoxilados propoxilados con pequeñas cantidades de un compuesto ariletoxilado, y se le adiciona aceite isoparafínico.

### Ensayo de desafío

En experimentos previos se determinó un efecto significativo de concentraciones subletales de 1000 µg/L de Roundup® y de la mezcla 1000 µg/L de Roundup® + 22.7 µg/L de Cosmoflux® 411F sobre la actividad oxidativa de cachama blanca (Rondón-Barragán *et al.*, 2012). Así, estas concentraciones subletales fueron utilizadas para evaluar el efecto sobre la susceptibilidad de los peces frente al desafío bacteriano con cepas de *A. hydrophila* aisladas de brotes de enfermedad septicémica en tilapia roja (*Oreochromis sp.*), que ya se encuentran caracterizadas de acuerdo a su crecimiento en medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Estas fueron identificadas por medio del Kit comercial BBL Crystal® (BD Diagnostic Systems, USA) (AhTiAi09-44 UNAL – Lab Patología Veterinaria). A las cepas les fue incrementada su virulencia mediante cuatro pases por cachama blanca a través de la inoculación intraperitoneal de 100 µl (1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL) para posterior aislamiento de las bacterias a partir de órganos como hígado y riñón. Una vez obtenida la cepa virulenta, se ajustó la concentración a través de diluciones seriadas (10-1) en solución salina al 0,85% y posterior incubación a 28°C por 24 horas para conteo en placa en agar triptona soya (TSA).

Los sujetos experimentales fueron distribuidos en 3 grupos para el ensayo de desafío bacteriano: Tratamiento 0 (T0), sin exposición al tóxico; T1, expuestos a 1000 µg/L de Roundup® (GP); T2, 1000 µg/L de Roundup® + 22.7 µg/L de Cosmoflux® 411F (GPCF).

Todos los grupos experimentales fueron inoculados intraperitonealmente con 100 µL de una suspensión de 8 x 10<sup>11</sup> UFC/mL de *A. hydrophila*. Durante el periodo de 7 días de desafío se realizó la evaluación clínica y fueron muestreados animales con signos de pérdida del eje de nado, así como la mortalidad de cada grupo. Al final del periodo experimental, fueron tomadas muestras de hígado y riñón de cada animal sobreviviente para el re-aislamiento de la bacteria en agar BHI suplementado con sangre de ovejo al 5%. Se siguieron los lineamientos descritos por Yanong (2003). Al final se calculó el porcentaje de sobrevivencia relativo (PSR), de acuerdo con lo descrito por Ellis (1988).

$$1 - \frac{(\text{Porcentaje de mortalidad en grupo tratado})}{(\text{Porcentaje de mortalidad en grupo control})} \times 100$$

### Explosión respiratoria: Ensayo de reducción del Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

Se evaluó la respuesta inmune (explosión respiratoria) mediante la medición de la reducción del NBT como se ha descrito en Monhanty y Sahoo (2010). Brevemente, se realizó extracción de la sangre por venipunción caudal a la altura de la inserción de la aleta anal, 1 a 1,5 cm por debajo de la línea lateral, mediante la utilización de una aguja número 30 con heparina sódica como anticoagulante. Para la manipulación de los animales se utilizó Eugenol®(4-alil, 2-metoxifenol, densidad 1,04 g/mL; The J Bird Moyer Co., Inc, EEUU) como anestésico, a una concentración de 40 mg/L. La toma se realizó a las seis horas de iniciado el experimento.

La evaluación indirecta de la explosión respiratoria se hizo a través de la medición de la reducción de NBT (Sigma®Chemicals, Germany) mediante el ensayo espectrofotométrico descrito por Monhanty y

Sahoo, (2010). Para ello, se dispusieron 100  $\mu\text{L}$  de sangre en una placa de microtítulos (fondo en U) y se le adicionó una solución de 100  $\mu\text{L}$  al 0,2% de NBT. La mezcla fue incubada a 25 °C por 30 min. Una muestra de 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión NBT-células sanguíneas fue tomada y agregada a un tubo con 1mL de N,N dimetilformamida. Dicha suspensión fue centrifugada a 2000 g x 5 minutos y transferida a una placa multipozos para la lectura de la densidad óptica en un lector de placas ELISA (espectrofotómetro), a 620 nm. Para el presente experimento se utilizó un lector ELx-800 (Biotek® Instruments, Inc. USA). Los cambios en la densidad óptica (DO) fueron relacionados con cambios en la actividad oxidativa de los fagocitos.

### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, efecto fijo balanceado con la técnica de ANOVA y MANOVA, donde la variable de respuesta fue la densidad óptica (DO). El modelo se ajustó de acuerdo al siguiente diagrama, donde  $\mu$  es la media,  $\tau$  el efecto tratamiento, y  $\epsilon_j(i)$  el error experimental:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_l + \epsilon_{ij}(l)$$

Se utilizaron pruebas de contraste de Tukey y análisis canónico de índice ortogonal con un 95% de confiabilidad. Se validaron los supuestos del modelo y se empleó un análisis descriptivo exploratorio unidimensional para hallar media, desviación y coeficiente de variación. Los datos son presentados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (ESM).

Los resultados fueron analizados mediante el software SAS/STAT® versión 9.0 y graficados mediante SPSS®, versión 17 para Windows.

### Resultados

Referente a los parámetros de calidad de agua, no se evidenciaron diferencias significativas entre tratamientos incluyendo el grupo control. Dichos parámetros estuvieron dentro del rango de confort descrito para la especie (Verjan *et al.*, 2001). Los animales experimentales no presentaron diferencias significativas intergrupales e intragrupalas en su peso.

### Ensayo de desafío

Los animales en el ensayo de desafío con *A. hydrophila* evidenciaron lesiones hemorrágicas en la base de las aletas, principalmente de la aleta pectoral, así como en la piel de manera multifocal. Algunos animales mostraron congestión y hemorragias petequiales en las narinas, compatibles con el cuadro clínico de septicemia hemorrágica descrito por otros autores (Tellez-Bañuelos, *et al.*, 2010; Kreutz, *et al.*, 2010). En los dos tratamientos, incluyendo el grupo control, se evidenció nado en espiral así como patrones erráticos de nado.

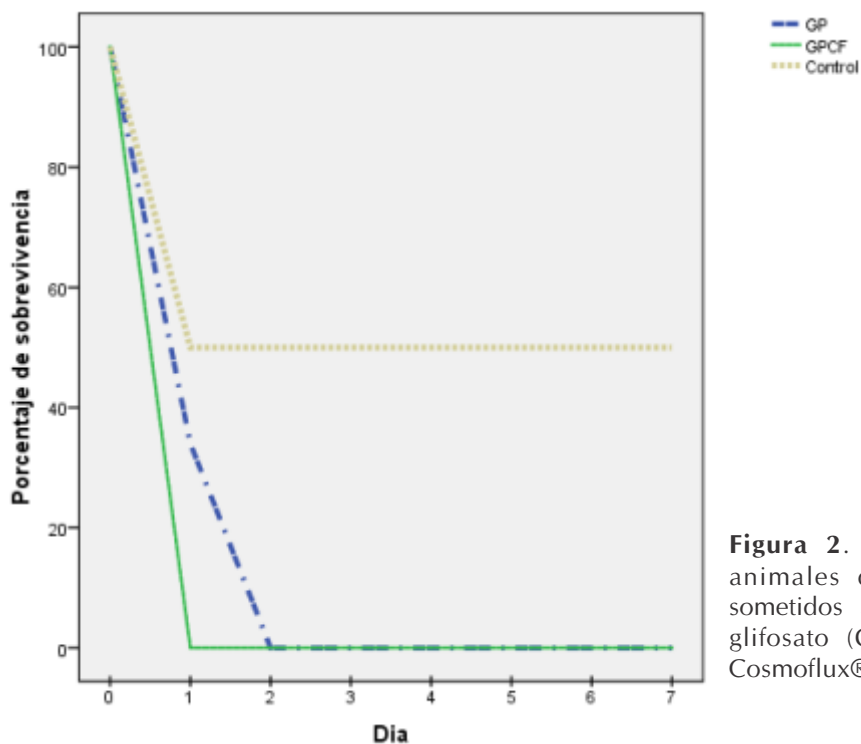
Al examen de necropsia, los animales mostraron ascitis de contenido serosanguinolento (Figura 1), así como congestión a nivel de las serosas de las vísceras abdominales. En algunos animales, el hígado se encontró congestionado y con una arborización evidente, mientras en otros se observó un color blanquecino. Así mismo se presentaron adherencias de las vísceras a la pared abdominal.

**Figura 1.** Animal inoculado intraperitonealmente con *Aeromonas hydrophila*, tratamiento 2. Nótese el líquido serosanguinolento en la cavidad abdominal (flecha) así como las hemorragias cutáneas a inmediatas a la inserción de las aletas anal y dorsal (cabezas de flecha).



A las 24 horas hubo mortalidad en todos los grupos, siendo esta mayor en los animales expuestos a Roundup®(GP) y a Roundup® más Cosmoflux® 411F (GPCF), comparada con el grupo control (T0). Al final de los 7 días la mortalidad fue del 100% (12/12) de los animales en los grupos expuestos al tóxico o a su mezcla, mientras que en el grupo control, la mortalidad fue solo del 50% (6/12) (Figura 2). Los animales sobrevivientes no evidenciaron signos clínicos de infección. No obstante, al examen de necropsia mostraron leve fluido serosanguinolento en la cavidad abdominal, así como congestión de las serosas. La bacteria pudo ser re-aislada de todos los animales experimentales.

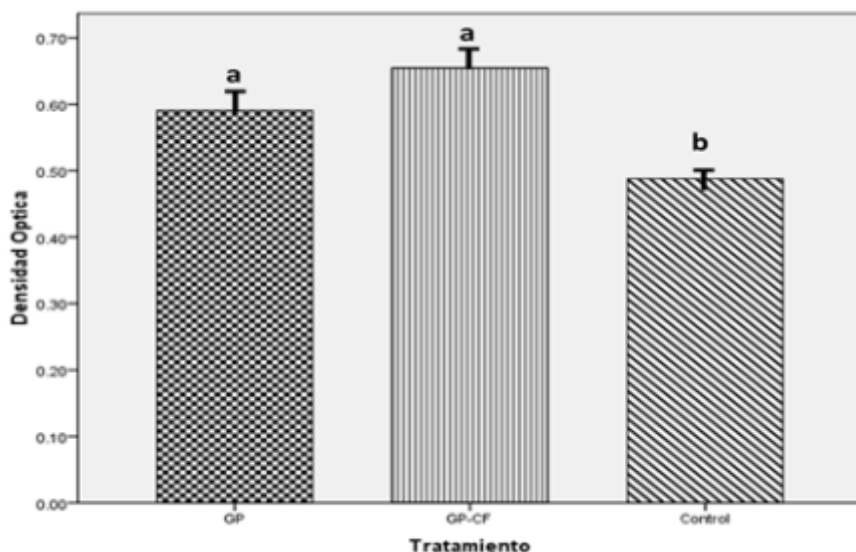
El porcentaje de sobrevivencia relativa para cada grupo indicó que los animales sometidos a las sustancias experimentales Roundup® y la mezcla Roundup® más Cosmoflux® 411F (proporción 44:1), evidenciaron porcentajes de supervivencias relativos significativamente menores (-100% cada uno) comparados con el grupo control.



**Figura 2.** Porcentaje de sobrevivencia de animales desafiados con *A. hydrophila* y sometidos a concentración de 1000 µg/L de glifosato (GP) así como de su mezcla con Cosmoflux® 411F (GPCF).

## Explosión respiratoria

Los animales expuestos al Roundup® así como a la mezcla Roundup® mas Cosmoflux® 411F, evidenciaron niveles de actividad oxidativa significativamente mayores comparados con el grupo control. Estos valores son mayores en los animales expuestos a la mezcla que al Roundup® únicamente (Figura 3).



**Figura 3.** Valores de explosión respiratoria (OD) a las 8 h de animales desafiados con *A. hydrophila* y sometidos a concentración de 1000  $\mu\text{g/L}$  de glifosato (GP), así como de su mezcla con Cosmoflux® 411F (GP-CF). Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

## Discusión

El efecto de la exposición a pesticidas y herbicidas sobre la capacidad de respuesta inmune contra agentes bacterianos ha sido evaluado con antelación. Así, se ha demostrado que animales expuestos a diferentes pesticidas poseen una mayor susceptibilidad y menor capacidad de respuesta frente a infecciones experimentales con *Aeromonas hydrophila* (Tellez-Bañuelos *et al.*, 2010; Kreutz *et al.*, 2010). Kreutz *et al.*, (2010) demostraron que la exposición subletal a glifosato incrementa la susceptibilidad de *Rhamdia quelen* a la infección experimental con *A. hydrophila*, lo que está acorde con lo hallado en este trabajo. Adicionalmente, Marín-Méndez *et al.*, (2014) evidenciaron que la exposición al pesticida triclorfon disminuye la actividad bactericida del suero de cachama blanca frente a esta misma bacteria.

## Explosión respiratoria

Durante la exposición a xenobióticos se pueden generar estados de estrés oxidativo en el que los niveles de especies de oxígeno reactivo (ROS) exceden la capacidad antioxidante de moléculas tales como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa y catalasa, entre otras. Además, existe evidencia en la literatura que el estrés oxidativo inducido en la sangre circulante está asociado con respuestas inflamatorias sistémicas (Zilinskas *et al.*, 2007) o metabolismo de depuración de tóxicos o alteraciones electrolíticas, que pueden ser inducidas tras la exposición al tóxico y que son mayores cuando este viene en mezcla con el surfactante adicional. Este exceso de ROS puede comprometer la integridad celular a través del daño oxidativo de los lípidos de la membrana celular, proteínas y ADN,



inactivación enzimática e incluso muerte celular (Costa *et al.*, 2008). Morowati (2000) mostró que la exposición a glifosato induce una elevación significativa de los niveles celulares de esterasas, debido a alteraciones en la permeabilidad celular y lisosomal que inducen muerte celular. Esto puede estar relacionado con un incremento en la liberación de contenidos lisosomales y por ende una reacción exagerada frente al control celular de las bacterias. Eso puede correlacionarse con los hallazgos del presente trabajo, donde la mayor actividad oxidativa fue hallada en los animales expuestos al glifosato o a su mezcla.

Sumado a los niveles de actividad oxidativa inducidos por el desafío bacteriano, los niveles elevados de actividad oxidativa de los animales expuestos pueden deberse a un estrés oxidativo generado por el Roundup® así como por la mezcla de Roundup® más Cosmoflux® 411F. En el presente trabajo la mayor actividad oxidativa se observó en los animales expuestos al herbicida más el surfactante, similar a lo hallado en previos estudios (Rondón-Barragán *et al.*, 2012). De la misma manera, se ha documentado que la exposición a pesticidas tales como el triclorfon en niveles subletales, también induce incremento de la actividad oxidativa en cachama blanca (Marín-Méndez *et al.*, 2014); de manera similar, Girón-Pérez *et al.* (2009) demostraron el mismo comportamiento en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) expuestas de diazinon. Recientemente, Fan *et al.*, (2013) describieron la inducción de estrés oxidativo en carpa (*Cyprinus carpio*) expuestas a Roundup®, glifosato y el surfactante POEA, siendo mayor dicho estrés en los animales expuestos al surfactante, principalmente, por elevación de radicales hidroxilo. Así mismo atribuyen este incremento de radicales a la hiperactividad muscular inducida por inhibición de la acetilcolinesterasa. No obstante, contrario a esto, la exposición a otros xenobióticos de

naturaleza similar han demostrado reducir de la actividad oxidativa (Yonar *et al.*, 2014).

El Roundup®, así como el glifosato grado técnico y los surfactantes acompañantes, inducen una depresión de la función del citocromo P450, citocromo b5; de las enzimas SOD, catalasa (CAT) Glutacion-S-transferasa y G-6-P deshidrogenasa, las cuales son vitales para el procesamiento de tóxicos en animales (Acquavella *et al.*, 2004; Ariyoshi *et al.*, 1990; Ariyoshi *et al.*, 1991; Fan *et al.*, 2013; Gehin *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2008; Elie-Caille *et al.*, 2010; Modesto y Martínez, 2010) y puede ser una posible explicación a los cambios oxidativos evidenciados en este trabajo. No obstante, la actividad enzimática antioxidante no fue medida en el presente estudio. Además, los surfactantes pueden modificar los arreglos de proteínas integrales de membrana tales como la glicoproteína P y presumiblemente los transportadores de glutatión (Board, 1993). Martínez-Coscollá *et al.*, (1993) mostraron que los surfactantes incrementan la absorción de xenobióticos en tejido epiteliales, de modo que la inhibición enzimática podría ser causada por una mayor entrada de xenobiótico a los tejidos.

La exposición a glifosato induce lesiones en las membranas celulares (disminución de las protrusiones) de células epiteliales, así como daños asociados a desorganización del cito esqueleto (Elie-Caille *et al.*, 2010). Estos daños de membrana se relacionan con liberación citosólica de componentes, así como con pérdida de la regulación iónica. Tales cambios en la permeabilidad celular inducidos por los surfactantes pueden tener efectos importantes en la actividad oxidativa de los animales expuestos. Como lo describe Toro (2009), los cambios en la carga eléctrica (flujo de electrones hacia el interior de la vacuola) y en el pH dentro de la vacuola fagocítica inducidos por la NADPH oxidasa y que facilitan la actividad enzimática de las sustancias contenidas en los gránulos,

requieren una compensación de la carga que se logra mediante la salida e ingreso de iones como cloro y potasio, respectivamente.

## Conclusiones

La exposición a niveles subletales de glifosato (Roundup®) y de la mezcla de este con Cosmoflux® 411F, aumentan la sensibilidad de la cachama blanca frente al desafío con *Aeromonas hydrophila*, aunado a una mayor actividad oxidativa (estrés oxidativo).

## Agradecimientos

A CORMACARENA por la financiación del proyecto Estudio sobre los efectos del glifosato y surfactantes acompañantes en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), convenio UNILLANOS – CORMACARENA 2007. No. 2.8.205.007-07. Al Laboratorio de Toxicología de la Universidad del Tolima, dirigido por el Profesor Ángel Céspedes. A Jacson Tapiero, Rodrigo Palomino, Anyi Torres, Tania Hernández, Viviana Ramírez y Luis Ortiz por su valiosa colaboración para el desarrollo del trabajo.

## Referencias

Acquavella JF, Bruce H, Alexander BH, Mandel JS, Gustin C, Baker B. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the farm family exposure study. *Environ Health Perspect.* 2004; 112: 321–326.

Annett R, Habibi HR, Hontela A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J Appl Toxicol.* 2014; 34: 458–479

Ariyoshi T, Hasegawa H, Matsumoto H, Arizono K. Effects of surfactants on the

contents of metallothionein, heme, and hemoproteins and on the activities of hemeoxygenase and drug-metabolizing enzymes in rats pretreated with phenobarbital or  $\beta$ -naphthoflavone. *Bull Environ Contam Toxicol* 1991; 46:120-127.

Ariyoshi T, Shiiba S, Hasegawa H, Arizono K. Profile of metal-binding proteins and hemeoxygenase in red carp treated with heavy metals, pesticides and surfactants. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1990; 44:643-649

Becker EL, Koza EP, Sigman M. Organophosphorus of lysosomal enzyme secretion from polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1978; 35:373-380.

Board PG. Inhibition of erythrocyte glutathione conjugate transport by polyethoxylated surfactants. *FEBS Lett.* 1993; 315:298-300

Borggaard OK, Gimsing AL. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Manag Sci.* 2008; 64: 441–456

Boutin C, Strandberg B, Carpenter D, Mathiassen SK, Thomas PJ. Herbicide impact on non-target plant reproduction: what are the toxicological and ecological implications?. *Environ Poll.* 2014; 185: 295-306.

Costa M, Monteiro D, Oliveira A, Rantin F, Kalinin A. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology.* 2008; 17:153-163.

Egan JF, Bohnenblust E, Goslee S, Mortensen D, Tooker J. Herbicide drift can affect plant and arthropod communities. *AgrEcosyst Environ.* 2014; 185:77–87

- Eile-Caille C, Heu C, Guyon C, Nicod L. Morphological damages of glyphosate-treated human keratinocyte cell line revealed by a micro- to nanoscale microscopic investigation. *CellBiolToxicol*. 2010; 26:331-339.
- Elandalousi LM, Leite RB, Rodrigues PM, Afonso R, Cancela ML. Effects of herbicide Roundup® on *Perkinsusolsen* *in vitro* proliferation and *in vivo* survival when infecting a permissive host, the claim *Ruditapes decussatus*. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2008; 80: 512-515.
- Ellis AE. 1988. In: Ellis AE, editor. *General principles of fish vaccination*. London: Academic Press, pp. 1- 19.
- Eslava-Mocha PR, Ramírez-Duarte WF, Rondón-Barragán IS. 2007. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: Impacto sobre peces nativos. Editorial Juan XXIII, Villavicencio-Meta, pp. 150.
- Fan J, Geng JJ, Ren HQ, Wang XR, Han C. Herbicide Roundup® and its main constituents cause oxidative stress and inhibit acetylcholinesterase in liver of *Carassius auratus*, *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. 2013; 48:10, 844-850
- FAOSTAT. FAO Statistics Division 2015. Disponible en : <http://faostat.fao.org/site/424/DesktopDefault.aspx?PageID=424#ancor>. (Consultado el 16 de Febrero de 2015)
- Fatima M, Mandiki SNM, Douxfils J, Silvestre F, Coppe P, Kestemont P. Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune–endocrine interactions in goldfish immune and antioxidant effects. *Aquat Toxicol*. 2007; 81: 159–167
- Floyd R. 1995. The use of salt in aquaculture. Fact Sheet VM 86. Series of the Department of Large Animal Clinical Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. (<http://hammock.ifas.ufl.edu>).
- Folmar L, Sanders H, John A. Toxicity of the herbicides glyphosate and several of its formulation to fish and aquatic invertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1979; 269-278.
- Gehin A, Guillaume YC, Millet J, Guyon C, Nicod L. Vitamins C and E reverse effect of herbicide-induced toxicity on human epidermal cells HaCat: a biochemometric approach. *Int J Pharmacol*. 2005; 288: 219-226.
- Gianessi LP. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. *Pest Manag Sci*. 2013; 69: 1099–1105.
- Girón-Pérez MI, Velázquez-Fernández J, Díaz-Resendiz K, Díaz-Salas F, Canto-Montero C, MedinaDíaz I, *et al*. Immunologic parameters evaluations in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentrations of diazinon. *Fish Shell fish Immunol*. 2009; 27(2): 383–385.
- Gluszczak L, Dos Santos D, Crestani M, Braga M, De Araújo F, Frescura M, Pimentel VL. Effect of glyphosate herbicide on acethylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Safety*. 2006; 65: 237-241.
- Gluszczak L, Dos Santos D, Silveira B, Rodrigues R, Chitolina MR, Morsch V, Loro V. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol Part C*. 2007; 146: 519–524

- Grundy AC, Mead A, Bond W, Clark G, Burston S. The impact of herbicide management on long-term changes in the diversity and species composition of weed populations. *Weed Research*. 2010; 51(2):187-200.
- Haney R, Senseman S, Hons F. Effect of Round Up Ultra on microbial Activity and biomass from selected soils. *J Environ Qual*.2002; 31(3): 730-735.
- Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grams S, Pokethitiyook P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia*. 2002; 28: 121-127.
- Kaczewer J. 2002. Toxicología del glifosato: Riesgos para la salud humana. Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Kiesecker JM. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: a link to amphibian limb deformities in nature?.*PNAS*. 2002; 99: 9900-9904
- Kortekamp A. 2011. Unexpected Side Effects of Herbicides: Modulation of Plant-Pathogen Interactions, Herbicides and Environment, Dr Andreas Kortekamp (Ed.), ISBN: 978-953-307-476-4, InTech, DOI: 10.5772/13217. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/unexpected-side-effects-of-herbicides-modulation-of-plant-pathogen-interactions> (Consultado 16 de febrero de 2015).
- Kreutz LC, Gil LJ, Marteninghe A, Dos Santos ED, Zanatta R. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish Shellfish Immunol*. 2010; 29: 694-697
- Marín Méndez GA, ChacónNovoa RA, Céspedes Rubio AE, Rondón Barragán IS. Efectos toxicológicos generados por la exposición a triclorfón en un modelo inducido experimentalmente en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev CES Med Zootec*.2014; 9(2): 190-202.
- Marshall J, Brown V, Boatman N, Lutman P, Squire, G. 2001. The impact of herbicides on weed abundance and biodiversity. PN0940. A report for the UK Pesticides Safety Directorate. IACR-Long Ashton Research Station.140 pp
- Martinez-Coscollá A, Miralles-Loyola E, Garrigues TM, Sirvent MD, Saliñas E, Casabó VG. Studies on the reliability of a novel absorption-lipophilicity approach to interpret the effects of the synthetic surfactant on drug and xenobiotic absorption. *Arzneim Forsch*. 1993; 43:699-705 (Abstract).
- McComb B, Curtis L, Chambers C, Newton M, Bentson K. Acute toxic hazard evaluation of glyphosate herbicide on terrestrial vertebrates of the Oregon Coast Range. *Env Sci Pollut Res*. 2008; 15:266-272.
- Meza-Joya FL, Ramírez-Pinilla MP, Fuentes-Lorenzo JL. Toxic, cytotoxic, and genotoxic effects of a glyphosate formulation (Roundup®SL–Cosmoflux®411F) in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei*. *Environ Mol Mutagen*.2013; 54: 362–373.
- Modesto KA, Martinez CBR.Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 2010.78, 294–299.
- Monhanty BR, Sahoo PK. Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeorohita* to *Edwardsiella tarda* infection.

- Fish & Shellfish Immunol. 2010; 28:613-621
- Morgan J, Vigers G, Farrell A, Janz D, Manville J. Acute avoidance reactions and behavioral responses of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to Garlon 4©, Garlon 3A© and Vision© herbicides. Environ Toxicol Chem. 1991. 10:73-79.
- Morowati M. 2000. Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm (*Pheretima elongata*) exposed to a field dose of the herbicide glyphosate. The Environmentalist. 2000; 20: 105-111
- Murtaza F, Stallings W. Closing down on Glyphosate inhibition – with a new structure for drug discovery. PNAS 2001; 8(6): 2944-2946.
- OECD. Test No 204 Adopted: 4 April 1984. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS "Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study. 1992.
- Ortiz-Santaliestra ME, Fernández-Benítez MJ, Lizana M, Marco A. Influence of a combination of agricultural chemicals on embryos of the endangered Gold-Striped Salamander (*Chioglossa lusitanica*). Arch Environ Contam Toxicol. 2011;60(4):672-80
- Ramírez-Duarte WF, Rondón-Barragán IS, Eslava-Mocha PR. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup® herbicide on "cachama blanca" (*Piaractus brachypomus*). Pesq Vet Bras. 2008; 28(11):547-554
- Relyea RA. New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. Ecol Appl. 2012; 22:634–647.
- Relyea RA. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. Ecol Appl. 2005; 15(2): 618–627.
- Rice CD, Kergosien DH, Adams SM. Innate immune function as a bioindicator of pollution stress in fish. Ecotoxicol Environ Safety 1996; 33: 186-192.
- Rondón-Barragán IS, Marin-Mendez GA, Chacon-Novoa RA, Naranjo-Suarez L, Pardo-Hernandez D, Eslava-Mocha PR. El glifosato (Roundup®) y Cosmoflux® 411F inducen estrés oxidativo en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Revista Orinoquia 2012; 16(suppl 1): 162-176.
- Rondón-Barragán IS., Ramírez-Duarte WF., Eslava-Mocha PR. Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux® 411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Rev Col Ciencias Pec. 2007; 20(4): 431-446.
- Salazar-Lugo R, Estrella A, Oliveros A, Rojas Villarroel E, Villalobos L, Lemus, M. Paraquat and temperatura affect nonspecific immune response of *Colossoma macropomum*. Environ Toxicol Pharmacol. 2009; 27: 312-326.
- Suárez RO, González JF. Actividad colinesterasa cerebral, muscular, hepática y plasmática en juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*): efecto inhibitor del clorpirifos (LORSBAN 4EC®). Rev Med Vet Zoot. 2007; Suppl 54(2):180.
- Sung H-H, Ye Y-Z. Effect of nonylphenol on giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) via oral treatment: Toxicity and messenger RNA expression on hemocyte genes. Aquat Toxicol. 2009; 91: 270-277

- Tellez-Bañuelos MC, Santerre A, Casas J, Zaitseva G. Endosulfan increases seric interleukin-2 like (IL-2L) factor and immunoglobulin M (IgM) of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Aeromona shydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 2010; 28:401-405.
- Toro MFC. 2009. La respuesta inflamatoria. In: Rugeles, MT., Patino, PJ., Montoya, CJG. Edits. *Inmunología: Una ciencia activa*. 2da Edición. Fondo Editorial Biogénesis, Medellín, Colombia, pp. 110-112
- Verján N, Iregui CA, Rey AL, Donado P. Sistematización y caracterización de las lesiones branquiales de la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) de cultivo clínicamente sana: algunas interacciones hospedador-patógeno-ambiente. *Revista Aqua TIC* 2001; 15. [Disponible el 18/02/2015 en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=132>]
- Williams G, Kroes R, Munro L. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and Its active ingredient, Glyphosate, for humans. *Regul Toxicol and Pharm.* 2000; 31:117–165.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME, THE INTERNATIONAL LABOUR ORGANIZATION. 1994. Glyphosate. Environmental Health Criteria #159. Geneva, Switzerland.
- Yanong R. Necropsy Techniques for fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 2003; 13(2): 89-105
- Yonar SM, Ural MŞ, Silici S, Yonar ME. Malathion induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio*: protective role of propolis. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2014; 102(1): 202–209
- Zilinskas J, Zekonis J, Zekonis G, Valantiejiene A, Periokaite R. The reduction of nitroblue tetrazolium by total blood in periodontitis patients and the aged. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal.* 2007; 9:105-108.