



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

“FRANCISCO GARCÍA SALINAS”

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS



MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

TESIS

“Estrés oxidativo y expresión de péptidos antimicrobianos en *Apis mellifera* y su relación con la exposición a malatión y glifosato”

Presenta:

QFB. José Manuel Espinoza Domínguez

Directores de tesis:

Dra. Susana Godina González

Dra. Irma Elizabeth González-Curiel

Tutor

Dr. Guillermo Quiñones Reyes

Zacatecas, Zac., diciembre de 2023

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi comité tutorial por el apoyo y la paciencia, que me han tenido, así como su profesionalismo ante cualquier situación. Muchas gracias Dra. Susana, Dra. Irma y Dr. Guillermo no hay palabras suficientes que expresen mi gratitud. Se que fueron días difíciles para ustedes y para mí pero supieron salir adelante y enfrentar de la mejor manera la situaciones que se fueron presentando el apoyo que me dieron fue increíble, al estar desecho el no entender ni siquiera mi día a día se reflejó en las actividades diarias, todos estos problemas, atravesar una pandemia, un hecho histórico que a todos nos dejó lecciones duras que te hacen reflexionar, que yo pensaba que era cualquier cosa que a mí no me afecto la pandemia porque seguí una vida relativamente normal, pero no es así claro que afecto y claro que me cambio. Este hecho hizo que me conociera ya que me obligo a estar más conmigo mismo. Afecto la forma de estudiar y aprender, ya que tuvimos que adaptarnos a la tecnología. Pero a pesar de todo esto y entre otros obstáculos hoy estamos aquí.

Agradezco también a la Dra. Gretel y alumnas, Zoraida y Ale por ayudarme y permitirme realizar la detección de defensinas en su laboratorio.

Al Dr. Gildardo del IPN Reynosa por permitirme determinar la presencia de plaguicidas en miel, así como a M en C Alma. Les agradezco mucho.

A la Maestra Elvia Valdez y el Maestro Fernando López gracias por el apoyo y de su conocimientos e instrumentos de laboratorio que me facilitaron y ayudaron a realizar las determinaciones de la actividad de catalasa.

A mi familia por el apoyo, a mi novia por ayudarme a lidiar con el estrés por estar presente cuando me sentía derrotado, por darme ánimos de seguir adelante, por apoyarme y motivarme a no rendirme por mis propios obstáculos.

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biomarcadores de la Maestría en Ciencia y Tecnología Química (MCTQ) de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y en el laboratorio de Biología de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. Se contó con el apoyo del laboratorio de Biotecnología Farmacéutica del Instituto Politécnico Nacional de la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas y de la Asociación Ganadera Local Especializada en Apicultura (AGLEA) de Ojocaliente, Zacatecas. Finalmente, se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de maestría (CVU 1080015) otorgada.

I. Índice general

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Abejas melíferas	6
2.1.1 Anatomía y fisiología de <i>Apis mellífera</i>	6
2.1.2 Formación de miel por <i>Apis mellifera</i>	9
2.1.3 Composición química de miel de <i>Apis mellifera</i>	9
2.2 Plaguicidas.....	11
2.2.1 Clasificación de los plaguicidas	11
2.2.2 Organofosforados.....	12
2.2.3 Glifosato.....	15
3. MARCO TEÓRICO.....	17
3.1 Exposición de abejas a plaguicidas.....	17
3.2 Mecanismo de detoxificación de los plaguicidas por la abeja.....	18
3.3 Estrés oxidativo en la abeja.	20
3.4 Respuesta Inmune de las abejas ante plaguicidas.....	22
3.4.1 Expresión de péptidos antimicrobianos y estrés oxidativo frente a plaguicidas.	24
3.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
3.6 JUSTIFICACIÓN.....	27
3.7. HIPOTESIS.....	28
4. OBJETIVOS.....	29
4.1 Objetivo general	29
4.2. Objetivos específicos	29
5. METODOLOGÍA	30

5.1 Tipo de estudio	30
5.2 Modelo <i>in vivo</i>	30
5.3 Diseño experimental: exposición a plaguicidas.	30
5.4 Determinación de proteínas por el Método de Bradford.....	31
5.5 Determinación de la actividad de la catalasa en el intestino de la <i>Apis mellifera</i>	33
5.6 Expresión de péptidos antimicrobianos por RT-PCR.	33
5.7 Determinación de Malatión y Glifosato en la miel.	35
5.7.1 Extracción del Malatión y del Glifosato de la miel.....	35
5.7.2 Metodología de UPLC-MS.....	35
5.8 Análisis estadístico.	36
6. RESULTADOS.....	37
6.1 Efecto de los plaguicidas sobre el peso de los intestinos de abejas.	37
6.2 Evaluación de la actividad de la catalasa en el intestino de las abejas.	37
6.3 Efecto de los plaguicidas en la expresión de los péptidos antimicrobianos	39
6.4 Correlación de la actividad de catalasa y la expresión de péptidos antimicrobianos.....	41
6.5 Observaciones del estudio en campo.	42
6.6 Determinación de Malatión y Glifosato en miel.....	43
7. DISCUSIÓN.....	52
8. CONCLUSIONES.	56
9. PERSPECTIVAS	57
10. BIBLIOGRAFÍA	58
11. ANEXOS	63

II. Índice de figuras

Figura 1. Exposición de abejas a los plaguicidas.	5
Figura 2. Anatomía de la cabeza de una abeja.....	77
Figura 3. Anatomía del sistema digestivo de a. mellifera	88
Figura 4. Sistema circulatorio de A. mellifera	9
Figura 5. Estructura del malatión	12
Figura 6. Estructura química del glifosato.....	15
Figura 7. Factores que influyen para el colapso de colonias de A. mellifera expuestas a plaguicidas.	18
Figura 8. Vía general de detoxificación de xenobioticos.....	19
Figura 9. Actividad de las enzimas antioxidantes de A. mellifera durante la exposición a plaguicidas.	21
Figura 10. Expresión genética de enzimas antioxidantes durante la exposición a plaguicidas.	22
Figura 11. Esquematación de la respuesta inmune de A. mellifera.	23
Figura 12. Diseño experimental de exposición de A. mellifera al malatión y al glifosato.....	31
Figura 13. Efecto del malatión y el glifosato en el peso de intestinos de A. mellifera.	37
Figura 14. Determinación de la dilución óptima del extracto intestinal para la medición de la actividad de catalasa.	38
Figura 15. Efecto de la exposición a glifosato y malatión en la actividad de la catalasa.	39
Figura 16. Expresión de Def1 durante la exposición a malatión y glifosato.	40
Figura 17. Expresión de Def2 durante la exposición a plaguicidas.	41
Figura 18. Exposición de plaguicidas-colmenas.	42
Figura 19. Detección de estándar de malatión analizado por UPLC/MS.	44
Figura 20. Detección estándar de glifosato analizado por UPLC/MS.....	45
Figura 21. Cromatograma y espectro de masas del malatión en miel.....	46
Figura 22. Cromatograma y espectro de masas del glifosato en miel enriquecida con glifosato. ...	46
Figura 23. Identificación de malatión en muestras de miel de las colmenas experimentales.	48
Figura 24. Detección de malatión en miel de colmena control y en miel enriquecida con malatión	49
Figura 25. Identificación de glifosato en muestras de miel de las colmenas experimentales.....	50

III. Índice de tablas

Tabla 1. PRINCIPALES AZÚCARES PRESENTES EN LA MIEL DE A. MELLIFERA.....	10
Tabla 2. CLASIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS SEGÚN FAMILIA QUÍMICA.....	12
Tabla 3. REACCIONES METABÓLICAS DE DETOXIFICACIÓN	20
Tabla 4. PREPARACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE MEDICIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.....	32
Tabla 5. SECUENCIAS DE LOS CEBADORES USADOS PARA LAS REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN. ..	35
Tabla 6. CORRELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD DE CATALASA CONTRA EXPRESIÓN RELATIVA DE DEFENSINA 1 Y DEFENSINA 2.	42

Abreviaturas y acrónimos

CAT	Catalasa
DEF 1	Defensina 1
DEF 2	Defensina 2
OP	Organofosforados
AchE	Acetilcolinesterasa
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
OMS	Organización Mundial De La Salud
FAO	Organización para la Agricultura y la Alimentación
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SADER	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural
PAM	Péptido antimicrobiano
ATP	Adenosín Trifosfato
SOD	Super Oxido Dismutasa
GST	Glutación S transferasa
CYP450	Citocromo p 450
PRR	Receptores de reconocimiento a patrones
TLR	Receptores tipo Toll

ROS	Especies reactivas de oxígeno
UPLC-MS	Cromatografía líquida de ultra rendimiento: espectrómetro de masas
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con reverso transcripción
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Solución salina tamponada con fosfato

RESUMEN

El rápido crecimiento poblacional ha llevado a la evolución de la agricultura para garantizar el suministro de alimentos a la población. Sin embargo, para lograr este objetivo, se ha aumentado el uso de compuestos químicos que ayudan a asegurar la calidad de la cosecha, así, los plaguicidas organofosforados y herbicidas como el glifosato son ampliamente utilizados en la agricultura para mejorar la productividad y calidad de los cultivos. Desafortunadamente, estos compuestos también son una causa importante de los graves problemas de contaminación que enfrentamos actualmente, ya que su uso excesivo ha amenazado a múltiples polinizadores, entre ellos las abejas. Estos insectos se alimentan comúnmente de diversas especies de flores, pero al entrar en contacto con cultivos o malezas que han sido tratados con plaguicidas su población se observa merma a consecuencia de la exposición indirecta e involuntaria. Durante su proceso de detoxificación, las abejas generan especies reactivas de oxígeno, mecanismo que altera el equilibrio homeostático y disminuye la respuesta de protección ante patógenos, tales como los péptidos antimicrobianos, que son una de las primeras líneas de defensa del sistema inmunológico, así como la actividad de enzimas que ayudan a la eliminación de especies oxidantes, como la catalasa. Por lo tanto, en el presente trabajo, se evaluó, si la exposición al malatión y al glifosato pueden afectar la actividad de la catalasa (CAT) y la expresión de los péptidos antimicrobianos, defensina 1 (DEF1), defensina 2 (DEF2) en una exposición *in vivo*.

Brevemente, se emplearon colmenas de *Apis mellifera* a las cuales se les administró dosis subletales de malatión (9 µg/L) y glifosato (1 µg/L) de manera individual y en mezcla (1:1 Malatión: Glifosato) a través del alimento por 29 días; cada 5 días, se recolectaron abejas de cada uno de los grupos para evaluar la actividad de la CAT y la expresión génica de DEF1 y DEF2 en intestino por PCR. Asimismo, al final del experimento, se tomó una muestra de miel de cada colmena, para determinar si se encontraba el plaguicida correspondiente. Durante todo el experimento se documentó el comportamiento de las abejas.

Los resultados muestran que la actividad de la catalasa fue similar entre los diversos grupos de exposición respecto al grupo control. Sin embargo, la expresión de DEF1 se incrementó de manera temprana (D5) en respuesta a la mezcla; interesantemente, la DEF2 se incrementó de manera tardía (D20) en los grupos expuestos a glifosato y mezcla. Aunado a lo anterior, no se encontró correlación entre la actividad de la CAT y la expresión de DEF1 y DEF2, respectivamente. En la miel, no se detectó la presencia de glifosato y la mezcla; mientras que en la miel del grupo control, se identificó la presencia de malatión; sugiriendo una posible contaminación cruzada entre las colmenas. Adicionalmente, también se observó que las abejas que se expusieron a malatión presentaron un sesgo conductual diferente al grupo control.

ABSTRACT

Rapid population growth has led to the evolution of agriculture to guarantee the supply of food to the population. However, to achieve this objective, the use of chemical compounds that help ensure the quality of the harvest has increased, thus, organophosphate pesticides and herbicides such as glyphosate are widely used in agriculture to improve the productivity and quality of crops. Unfortunately, these compounds are also a major cause of the serious pollution problems we currently face, as their excessive use has threatened multiple pollinators, including bees. These insects commonly feed on various species of flowers, but when they come into contact with crops or weeds that have been treated with pesticides, their population is reduced as a result of indirect and involuntary exposure. During their detoxification process, bees generate reactive oxygen species, a mechanism that alters the homeostatic balance and decreases the protective response against pathogens, such as antimicrobial peptides, which are one of the first lines of defense of the immune system, as well as the activity of enzymes that help eliminate oxidative species, such as catalase. Therefore, in the present work, it was evaluated whether exposure to malathion and glyphosate can affect the activity of catalase (CAT) and the expression of the antimicrobial peptides, defensin 1 (DEF1), defensin 2 (DEF2) in an in vivo exposure.

Briefly, *Apis mellifera* hives were used to which sublethal doses of malathion (9 µg/L) and glyphosate (1 µg/L) were administered individually and in a mixture (1:1 Malathion: Glyphosate) through food. for 29 days; Every 5 days, bees from each of the groups were collected to evaluate CAT activity and gene expression of DEF1 and DEF2 in intestine by PCR. Likewise, at the end of the experiment, a honey sample was taken from each hive to determine if the corresponding pesticide was found. The behavior of the bees was documented throughout the experiment.

The results show that catalase activity was similar between the various exposure groups compared to the control group. However, DEF1 expression was increased early (D5) in response to the mixture; Interestingly, DEF2 increased late (D20) in the groups exposed to glyphosate and mixture. In addition to the above, no correlation was found between CAT activity and the expression of DEF1 and DEF2, respectively. In honey, the presence of

glyphosate and the mixture was not detected; while in the honey of the control group, the presence of malathion was identified; suggesting possible cross contamination between hives. Additionally, it was also observed that the bees that were exposed to malathion presented a different behavioral bias than the control group.

1. INTRODUCCIÓN

Las abejas, son responsables de la reproducción exitosa de más del 87% de las especies de plantas con flores; por lo tanto, son vitales para la salud de los ecosistemas y los servicios agrícolas en todo el mundo (1). Sin embargo, como consecuencia del daño ambiental, en los últimos años han experimentado una disminución en su población y en su diversidad, lo que implica devastadores efectos. Esta pérdida de insectos polinizadores genera preocupaciones sobre una posible crisis mundial para el sector agroalimentario (2). Al respecto, se han reportado diversos impactos devastadores que afectan directamente a las abejas domésticas como silvestre; entre ellos se encuentra, la pérdida de hábitat, la prevalencia de patógenos, la presencia de especies invasoras y el cambio climático (3). El uso de plaguicidas influye de manera directa en los polinizadores, así como por la disminución de la diversidad de su recurso alimenticio (4).

Diversos estudios, como el realizado por Ruiz y Cols. en el 2018, han evidenciado la presencia de diversos plaguicidas, entre ellos 15 compuestos organoclorados en miel y/o productos derivados de la misma (5). Otros estudios han detectado la presencia de plaguicidas en las abejas adultas, así como en las larvas de abejas (6). En la figura 1 se muestra algunas de las vías de exposición de las abejas.

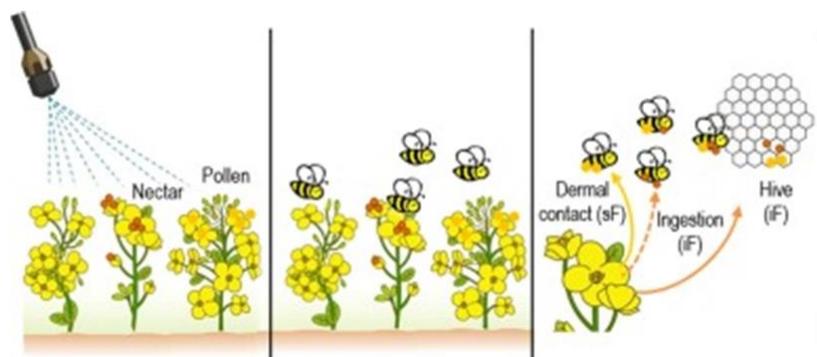


FIGURA 1. EXPOSICIÓN DE ABEJAS A LOS PLAGUICIDAS. (7)

2. ANTECEDENTES

2.1 Abejas melíferas

Poseen características distintivas entre razas, el desarrollo varía entre 18.5 a 21 días, estos insectos son susceptibles a depredadores, ruidos, calor intenso, escasez de agua o alimento, por lo que emigran. Las abejas viajan en busca de alimento donde se recolecta néctar, polen, agua y resinas de los árboles, realizando varios vuelos por día, a esta recolección se le llama pecoreo (8).

Las abejas tienen la capacidad de detectar y remover crías muertas o enfermas del interior de las celdas de un panal, cortando así ciclos de enfermedades. También remueven ácaros de su cuerpo usando sus patas y mandíbulas (9).

2.1.1 Anatomía y fisiología de *Apis mellífera*

El cuerpo de las abejas comienza por una cabeza unida al tórax a través de un cuello flexible, seguido por el abdomen. El tórax y el abdomen están conformados por 4 segmentos: protórax, mesotórax, metatórax y el propodeo (10). A continuación, se describe con detalle cada elemento que conforma el cuerpo de la abeja.

Cabeza: Se encuentra los ojos, órganos sensoriales (antenas), y aparato bucal (10), conformado de mandíbulas, maxilas y labio. Los maxilares y labio forman la probóscide, órgano que facilita la alimentación con líquidos (8).

Los ojos son de dos tipos, comenzando por los ojos simples también denominados ocelos, los cuales están situados en la parte superior de la cabeza formando un triángulo rectángulo; mientras el otro tipo de ojos, son conocidos como ojos compuestos formados por omatidios que son pequeñas unidades de visión, a modo de prismas hexagonales (Figura 2) (10, 11).

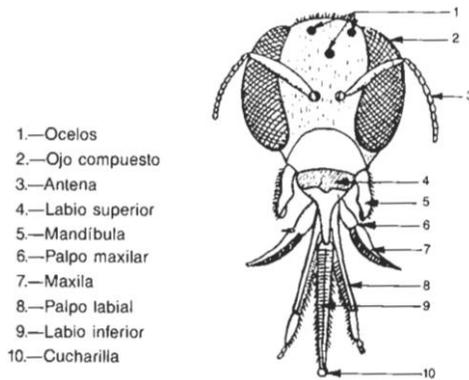


FIGURA 2. ANATOMÍA DE LA CABEZA DE UNA ABEJA, (10)

Tórax: En esta sección se insertan 3 pares de patas y dos pares de alas. En su interior se encuentran las glándulas postmaxilares, importantes en la formación de la miel. Las patas están adaptadas para recolección, cepillado y transporte de polen, con los que se les llama “cestillos” (10).

Abdomen: Formado por 7 segmentos, en su interior se encuentra parte del sistema digestivo, así como el buche, siendo este importante en la formación de miel. Se localizan cuatro pares de glándulas cereras, encargadas de elaborar materia prima para la construcción de panal. También glándulas de Nasanoff, las cuales son productoras de feromonas de alarma, que son secretadas cuando se sienten en peligro para poner en alerta el panal. Al final del abdomen se encuentra el aparato defensivo; las obreras y las reinas lo poseen y se encuentra ausente en los zánganos. Cuando es picada una persona la abeja muere ya que, al ser clavado el aguijón, se desprende parte del abdomen, las reinas nunca o muy rara vez pican ya que de alguna manera saben que de ellas depende la supervivencia de la colmena (10, 11).

Aparato digestivo. Constituido de boca, faringe, esófago, este es un tubo delgado a través de la cabeza y hasta el tórax donde la parte anterior del abdomen se dilata y se forma el buche, donde la abeja almacena el néctar recolectado de las flores. El buche termina en la válvula ventricular, la abeja deja pasar el néctar hasta el estómago y el resto de la miel

contenida en el buche es regurgitada en la colmena para su almacenamiento (Figura 3) (10, 11).

La comida de la abeja se dirige al estómago, a continuación, hay un estrechamiento que da lugar al intestino delgado que desemboca en los tubos de Malpighio que cumplen función similar a los riñones y por último se encuentra el recto (10).

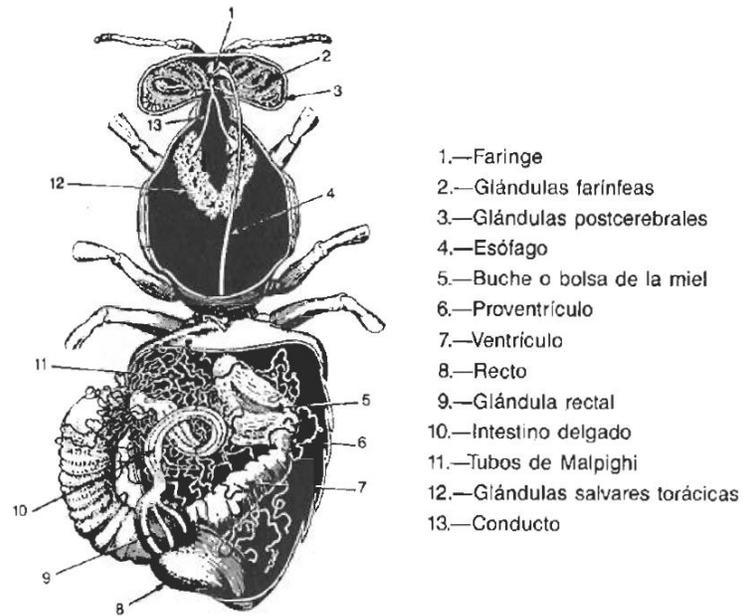


FIGURA 3. ANATOMÍA DEL SISTEMA DIGESTIVO DE A. MELLIFERA, (10)

Sistema circulatorio: La sangre de abejas se denomina hemolinfa, es líquida incolora, no coagulable, sin glóbulos rojos y alto contenido en magnesio (figura 4). Formada por un tubo dorsal, que recorre todo el cuerpo del insecto, posee una aorta y un corazón, el cual impulsa la sangre para circular. La función de este es el transporte de nutrientes y sustancias de desecho (10, 12).

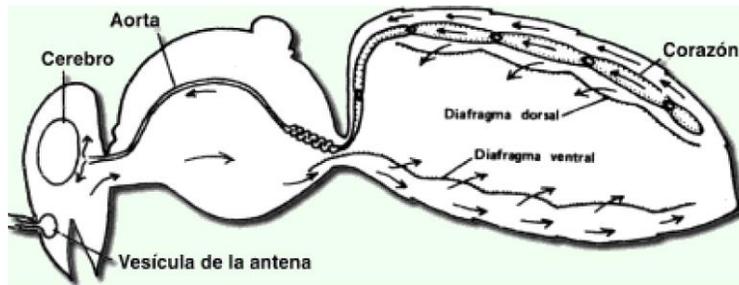


FIGURA 4. SISTEMA CIRCULATORIO DE *A. MELLIFERA*, (12)

2.1.2 Formación de miel por *Apis mellifera*.

La miel es formada a través del néctar, inicia cuando la abeja liba el néctar de las flores y lo almacena en su buche, agregando invertasa, la cual desdobra la sacarosa en azúcares simples como la glucosa y fructosa. Las abejas forrajeras transportan el néctar y lo entregan a las abejas obreras, estas lo depositan en celdas vacías, aquí se ventila el panal con el movimiento de sus alas, con la finalidad de pérdida de agua, hasta que tenga la consistencia y humedad adecuadas, menos del 20% (13).

Para la formación de la miel las abejas se ayudan de diferentes glándulas como la glándula hipofaríngea, esta glándula está en pleno funcionamiento en las 2 primeras semanas de vida en las abejas obreras, segrega la jalea real que es utilizada para alimentar a las larvas jóvenes en sus primeros 3 días de vida y para las larvas reales durante toda su vida. Las glándulas salivares segregan saliva que se usa principalmente en el desdoblamiento de los azúcares del néctar para formar miel (13, 14).

Las proteínas encontradas en la miel son secretadas por las abejas y se cree que la actividad antimicrobiana previene del deterioro microbiano de la miel. El contenido varía según la región y condiciones ambientales (15).

2.1.3 Composición química de miel de *Apis mellifera*.

Es importante resaltar que la miel muestra variaciones en su composición dependiendo de la región de procedencia. Esto por diversos factores ambientales, especies florales de donde

se recolecta el néctar y azúcares contenidos en este (11, 16). Compuesta principalmente por azúcares, predominando glucosa y fructosa, además de contener proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgánicos, cenizas, polen y otras sustancias. Los aminoácidos observados en miel son: prolina, fenilalanina, ácido glutámico, ácido aspártico, leucina, valina, isoleucina, alanina, arginina, cistina, glicina, histidina, lisina, metionina, serina, tirosina, treonina y triptófano (17).

El contenido de agua es muy importante, la miel madura tiene un contenido de humedad promedio de 18.5%, un nivel más alto es susceptible a fermentar, además, el contenido de agua en la miel influye en viscosidad, peso específico y color. Después de la extracción de la miel de la colmena, su contenido de humedad cambia dependiendo de las condiciones de almacenamiento (17, 18).

Las enzimas son añadidas principalmente por las abejas, una de las enzimas más importantes de la miel es la α -glucosidasa, responsable de muchos cambios que ocurren en la miel, convirtiendo el disacárido sacarosa en fructosa y glucosa. Se han encontrado azúcares adicionales, los cuales se describen en la tabla 1. Otras enzimas son la glucosa oxidasa, responsable de la propiedad antibacteriana de la miel, la catalasa que convierte el peróxido de hidrógeno a oxígeno y agua, la fosfatasa ácida, degrada el almidón, la diastasa que convierte la maltosa en glucosa (18).

TABLA 1. PRINCIPALES AZÚCARES PRESENTES EN LA MIEL DE A. MELLIFERA, (18).

Monosacáridos	Disacáridos	Trisacáridos	Sacáridos complejos
Fructosa	Gentibiosa	Centosa	Isomaltopentosa
Glucosa	Isomaltosa	Eriosa	Isomaltotetraosa
	Maltosa	Isomaltotriosa	
	Maltulosa	Isopanososa	
	Nigerosa	Laminaritriosa	
	Palatinosa	Maltotriosa	
	Sacarosa	Melezitosa	

En los últimos años se ha presentado un grave problema para los apicultores, agricultores y población en general, el colapso de las colonias de abejas, el cual es provocado por la disminución del número de abejas y se debe a diversos factores, entre los más destacados son las infecciones por patógenos, la pérdida de hábitat, presencia de especies invasoras, el cambio climático y el uso de agroquímicos, como los plaguicidas y herbicidas (3, 4).

2.2 Plaguicidas

Los plaguicidas incluyen diferentes compuestos químicos, que tienen distintas estructuras, así como mecanismos de acción específicos, que permiten mitigar las plagas objetivo o bien para prevenir posibles afecciones por organismos que afecten al cultivo (19).

Existe evidencia del uso de plaguicidas desde antes de Cristo, cuando se usaba azufre elemental para controlar las plagas, hoy en día se usa en viñedos de uva. Con el avance del tiempo, se comenzaron a utilizar metales tóxicos, como el arsénico. Así mismo, se han usado diversos plaguicidas que se extraen de productos naturales, pero desde finales del siglo XIX, y principios del siglo XX, se han identificado y sintetizado compuestos organoclorados con propiedades insecticidas (20).

2.2.1 Clasificación de los plaguicidas

Existen diferentes formas de clasificar a los plaguicidas, según su toxicidad, su vida media efectiva, su uso y por último, la de mayor interés sanitario, por la familia química. Donde se encuentran organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrinas y otros compuestos visibles en tabla 2 (21, 22).

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE PLAGUICIDAS SEGÚN FAMILIA QUÍMICA (21, 22).

Familia Química	Característica
Organoclorados	Se usan como insecticidas y herbicidas.
Organofosforados	Insecticidas, toxicidad selectiva.
Carbamatos	Insecticidas domésticos y agrícolas, herbicidas y fungicidas.
Piretrinas	Después de los organoclorados, son los menos utilizados. Insecticida.
Otros compuestos	Compuestos orgánicos e inorgánicos, plaguicidas, herbicidas.

2.2.2 Organofosforados

Los plaguicidas organofosforados (OP), esteres del ácido fosfórico, son compuestos orgánicos que contienen un fósforo en su estructura (23). Su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la enzima acetil colinesterasa.

Uno de los organofosforados de gran uso es el malatión, el cual tiene dos azufres unidos al fósforo (24). Se muestran la estructura de Malatión en la figura 5.

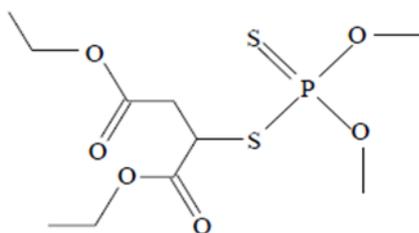


FIGURA 5. ESTRUCTURA DEL MALATIÓN, (22)

2.2.2.1 Malatión

El malatión tiene peso molecular de 330.4 g/mol, es un líquido incoloro o ligeramente marrón oscuro a amarillo, tiene un olor leve a mercaptano, posee un punto de ebullición 156-157°C a 0.7 a 760 mm/Hg, punto de fusión 3.85°C y un punto de inflamación 235°F, su solubilidad es de 143 mg/L a 20°C y tiene una densidad de 1.20076 g/cm³ (25).

El malatión es comúnmente usado en cosechas y jardines, así como para tratar pediculosis en seres humanos y pulgas en animales domésticos, se usa también para matar mosquitos y moscas de la fruta en extensas áreas libres. Las dosis adecuadas de uso y recomendadas son de 150mL/100L de agua; con dos aplicaciones en intervalos de 11 o 7 días, este OP, presenta una degradación rápida (26).

2.2.2.2 Normatividad sobre uso del malatión

A nivel internacional, los plaguicidas son evaluados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Agricultura y la alimentación (FAO), estas organizaciones desarrollan especificaciones para permitir que los productos de alta y mala calidad sean diferenciados. Además, se obtienen datos que permiten generar estándares internacionales los cuales se obtienen por investigación, desarrollo, comercialización y el uso responsable de los plaguicidas (27).

En México, las autoridades encargadas de evaluar los productos son la COFEPRIS, SAGARPA y la SEMARNAT, las cuales realizan estrictas evaluaciones antes de emitir un registro sanitario. A continuación, se enlistan algunos de los documentos que norman el uso, etiquetado y control de plaguicidas en nuestro país:

1. Manual para el buen uso y manejo de plaguicidas en campo.
2. NOM-232-SSA1-2009, Plaguicidas: que establece los requisitos del envase, embalaje y etiquetado de productos grado técnico y para uso agrícola, forestal, pecuario, jardinería, urbano, industrial y doméstico (28).

3. NOM-256-SSA1-2012, Condiciones sanitarias que deben cumplir los establecimientos y personal dedicados a los servicios urbanos de control de plagas mediante plaguicidas (29).
4. NOM-045-SSA1-1993, Plaguicidas. Productos para uso agrícola, forestal, pecuario, de jardinería, urbano e industrial. Etiquetado (30).
5. NOM-046-SSA1-1993, Plaguicidas-productos para uso doméstico-etiquetado (31).
6. NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción de miel y especificaciones (32).

2.2.2.3 Efectos en la salud en humanos a causa de organofosforados.

Existen diversos estudios sobre la alta toxicidad de estos compuestos en la salud humana, Gangemi, en un estudio de revisión, recopiló información en donde se muestra que la exposición a este grupo de plaguicidas predispone a la evolución de enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedades cardio vasculares entre otras. Incluso, se encontró que a través de acción en el sistema inmunológico provoca complicaciones en enfermedades como Parkinson (19, 33).

Los OP presentan neurotoxicidad, al tener exposición accidental o deliberada a altas dosis, resultando en un problema realmente preocupante sobre todo en los países en vías de desarrollo, donde las regulaciones no son adecuadas y/o claras (33, 34).

La neurotoxicidad esta mediada por la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), esta enzima inactiva el neurotransmisor acetilcolina, temporalmente o de manera indefinida (20), provocando de esta manera una acumulación masiva de acetilcolina, resultando en una estimulación colinérgica excesiva, lo que lleva a deterioro en las funciones fisiológicas, como presión arterial, ritmo cardiaco y contracción muscular y por último puede provocar la muerte (34).

2.2.3 Glifosato

Es un herbicida de amplio espectro, no selectivo que inhibe la vía del shikimato, vía involucrada en la síntesis de los aminoácidos aromáticos: triptófano, tirosina, fenilalanina, vitales para el crecimiento de las plantas. La vía del shikimato está presente en algunas bacterias, algas y hongos, pero no en mamíferos, aves o peces (20), por esta razón se declaró en un inicio como material no tóxico para el humano, fue hasta principios de los años 2000s cuando se empezaron a observar efectos en humanos en la exposición crónica.

En la figura 6, se muestra la estructura del glifosato, se forma de una fracción de glicina y un grupo aminofosfato (35).

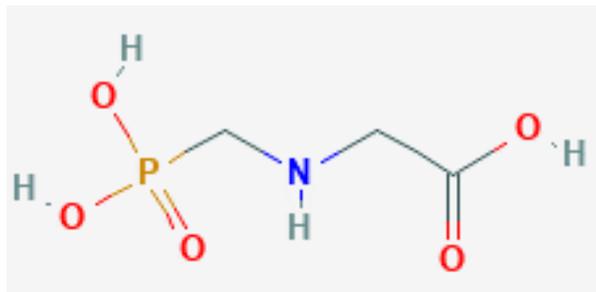


FIGURA 6. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL GLIFOSATO, (35)

Fue sintetizado en 1970 y la patente fue adquirida por Monsanto, con la finalidad de uso agrícola, distribuyéndolo con el nombre de Roundup desde 1974 (36). Este compuesto también constituye una de las causas más importantes de contaminación mundial, pues la agricultura masiva obliga a su uso para evitar el crecimiento de hierba no deseada, sin embargo, debido a que suelen desarrollar resistencia a este herbicida, se usa cada vez más en cantidades mayores (37).

Se han encontrado residuos del glifosato en plantas, suelo y aguas, la literatura indica que su concentración varía de acuerdo con la matriz (38).

2.2.3.1 Efectos en la salud en humanos a causa de glifosato.

El glifosato tiene la capacidad de trasladarse de la raíz al suelo, incrementando su persistencia en suelos, a los que se le aplicó previamente el herbicida (38). El ácido aminometilfosfónico, (AMPA), producto principal de degradación del glifosato, puede persistir más de un año en suelos con elevado contenido de arcilla, en suelo arenoso puede lavarse con facilidad, alterando la calidad del agua, (38-40).

La OMS, en el 2015, lo clasificó como probable carcinogénico en humanos. Se han reportado así mismos efectos reproductivos adversos en ratas Wistar, con disminución en el número de espermatozoides durante la etapa adulta, además de aumento en espermatozoides anormales y disminución de testosterona sérica (39). En los humanos, se ha reportado una correlación entre el uso de los glifosatos y distintas formas de cáncer, daño renal, afecciones mentales como autismo, Alzheimer y enfermedad de Parkinson (38, 39).

2.2.3.2 Normatividad sobre uso de glifosato

En México se ha generado una controversia con respecto al uso del glifosato, al considerarlo la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer como carcinógeno tipo 2A (24), por lo que han emitido comunicados en relación a su disminución progresiva y su prohibición a partir del 2024, de hecho, la COFEPRIS NOM-232-SSA1-2009 lo reclasifica como sustancia peligrosa, cuya toxicidad varía de acuerdo a su concentración (28).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Exposición de abejas a plaguicidas

Son muchos los agentes que han influido a la disminución de la población de abejas, así tenemos las infecciones por hongos, virus, parásitos, el cambio climático, los plaguicidas. Exposiciones a estos últimos compuestos tienen una respuesta muy particular, pues se ha reportado que las dosis altas se relacionan con alta mortalidad, dosis medias no tienen efectos letales notorios, sin embargo, a dosis subletales también hay un incremento en la mortalidad (41). Esta toxicidad está relacionada con diferentes efectos biológicos importantes para su viabilidad (42), como alteraciones en el comportamiento, como es en sus hábitos de recolección de alimento, en el proceso de aprendizaje y memoria, en la fertilidad de la reina y del zángano (41).

Otro de los puntos de respuesta final para evaluar son los mecanismos de detoxificación, pues a pesar de que las abejas poseen una capacidad alta para eliminar los xenobióticos, en comparación con otros insectos, la exposición a plaguicidas en conjunto con otros factores, como infecciones por ácaros, hongos, virus, aumenta el estrés oxidativo, disminuye las vías de detoxificación, socava la inmunidad, Figura 7 (3, 4, 43, 44); lo que incrementa la mortalidad y por ende, el colapso de colonias de abejas (4, 45). Los plaguicidas interfieren con la neurofisiología de los insectos y otros pueden afectar su desarrollo, la longevidad de los adultos, su respuesta inmune y su fecundidad (33). Actualmente se recomienda que su uso disminuya, con la finalidad que se minimice la posible pérdida de su población y contaminación de la miel (4, 45-47)

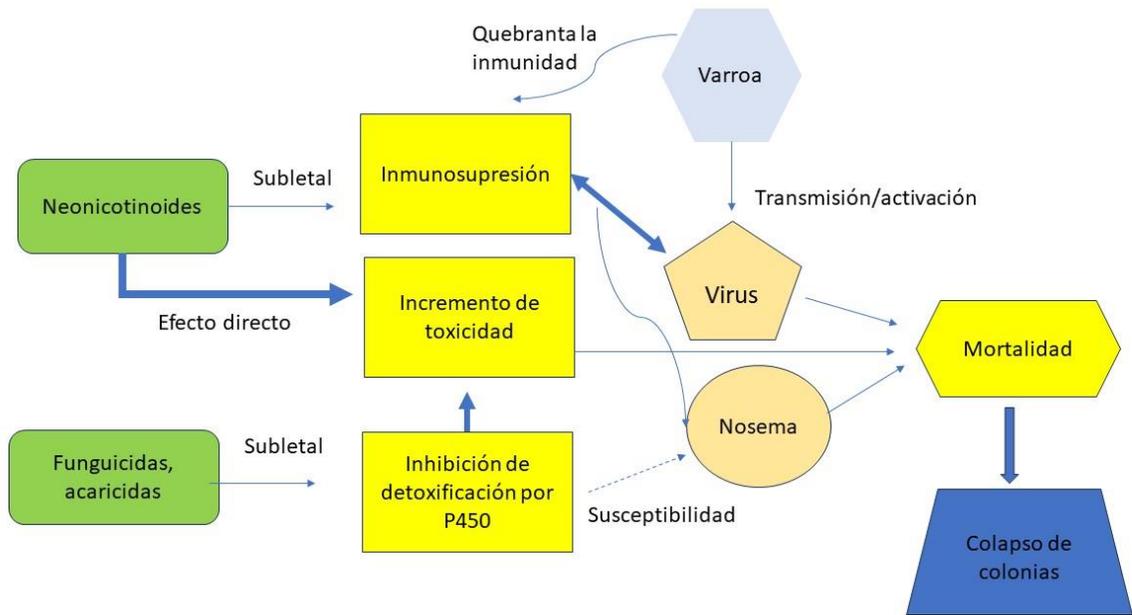


FIGURA 7. FACTORES QUE INFLUYEN PARA EL COLAPSO DE COLONIAS DE *A. MELLIFERA* EXPUESTAS A PLAGUICIDAS, (4).

3.2 Mecanismo de detoxificación de los plaguicidas por la abeja.

La principal vía de exposición de las abejas a los diferentes xenobióticos es oral, a través de la alimentación, a pesar de que no los detectan fácilmente, por tener una baja expresión de receptores gustativos, han desarrollado otros mecanismos para evadirlos. Al entrar un xenobiótico a la abeja, se generan diferentes efectos tóxicos, los cuales dependen de diferentes factores, como la etapa de la vida, estación del año, temperatura, estilo de alimentación y la exposición recurrente a xenobióticos. Adicionalmente, las abejas pueden estar expuestas a los plaguicidas por contacto directo durante la aplicación o con los residuos que quedan en superficie de plantas, que ingieren en néctar y polen recolectado (47, 48).

Las enzimas almacenadas en la miel y en el polen favorecen la actividad desintoxicante, lo que ayuda a la tolerancia a los xenobióticos. Los efectos que se observan durante la exposición a diferentes compuestos puede ser el resultado de diversas interacciones que

generan interacciones sinérgicas o antagónicas, así como inhibición o inducción de las enzimas de detoxificación, lo que repercute en aumento o disminución de la toxicidad (47).

A pesar de tener menos genes desintoxicantes que otros insectos, las abejas tienen una gran capacidad de tolerar xenobióticos, como los plaguicidas. En los procesos de detoxificación participan diferentes enzimas, las cuales podemos resumir su acción en tres fases (45). La fase 1 es llamada funcionalización, donde el xenobiótico se altera estructuralmente por las monooxigenasas del citocromo P450 y carboxilesterasas, a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, los xenobióticos se transforman en productos más reactivos. La fase 2, que se trata de reacciones de conjugación con la Glutación S-transferasas, donde la función es la conjugación de los productos de la fase 1, los solubiliza y transporta (figura 8). En la fase 3: de transporte, implica la acción de excreción de los xenobióticos de la célula. Las proteínas involucradas son proteínas de resistencia a múltiples drogas y transportadores de casete de unión a ATP (49, 50)(44, 45).

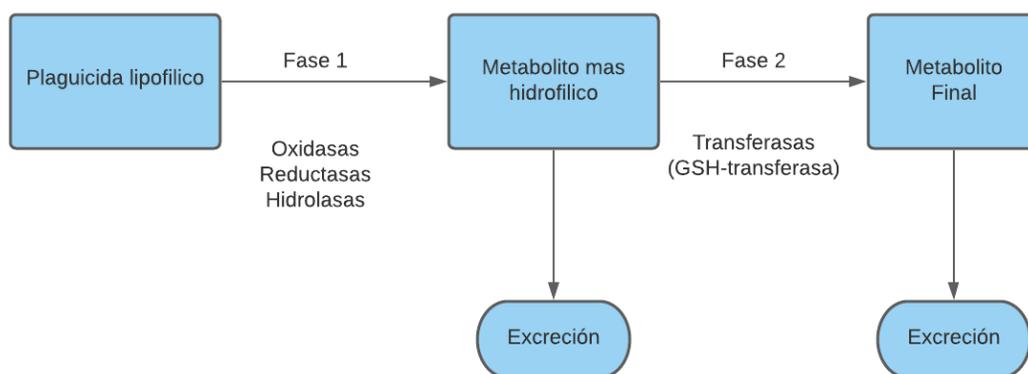


FIGURA 8. VÍA GENERAL DE DETOXIFICACIÓN DE XENOBIÓTICOS, (45, 49).

Uno de los resultados de las reacciones del citocromo P450 es la generación de especies reactivas de oxígeno, como anión super oxido, peróxido de hidrogeno y un radical libre sustrato, que se une con radical hidrógeno y genera un producto hidroxilado (49, 50).

En la figura anterior se muestra la vía general de desintoxicación. También existen principales reacciones metabólicas específicas (Tabla 3).

TABLA 3. REACCIONES METABÓLICAS DE DETOXIFICACIÓN, (45).

Oxidativo	No oxidativo
Desalquilación:	Hidrólisis de éster carboxílico, amidas, triéster fosfórico, carbamatos.
O-alquilhidroxilación,	Reducción de grupo nitro
N-alquilhidroxilación,	Hidratación con epóxido
S-alquilhidroxilación.	Deshidrocloración o desalquilación o desarilación vía glutatión.
Hidroxilación alifática:	
Epoxidación	
Hidroxilación aromática	
Oxidación de éster de organofosforados	
Oxidación de tioester	

3.3 Estrés oxidativo en la abeja.

La respuesta de las abejas a xenobióticos, como los plaguicidas, implica una respuesta compleja de detoxificación, estrés oxidativo y metabolismo de nutrientes (45), lo que, asociado a otros factores ambientales, aumenta el estrés oxidativo (51). Una de las especies reactivas de oxígeno que se producen es el peróxido de hidrógeno, que favorece la producción de otras especies oxidantes, sin embargo, para su eliminación se produce la catalasa, que es una enzima que degrada a esta molécula produciendo agua y oxígeno, que se encuentra en peroxisomas y mitocondrias (52). Carvalho, 2013 reportó que, durante la exposición de la abeja melífera a diferentes plaguicidas, la catalasa es altamente sensible a la mayoría de ellos (53).

El uso desmedido de los plaguicidas a través de los años ha favorecido que estos insectos desarrollen diversos mecanismos de tolerancia, muchos de ellos debido a las variaciones genéticas y selección de las más resistentes. Por ejemplo, abejas mayores y mal alimentadas fueron más susceptibles a un conjunto de plaguicidas que abejas jóvenes y bien nutridas;

esto sugiere que la capacidad antioxidante se encuentra comprometida, disminuye conforme la edad y la mala alimentación (47).

Cuando el ecosistema de las abejas está comprometido, se les somete a éstas a estrés oxidativo, por ejemplo, el uso inadecuado de herbicidas limita la flora de la cual la abeja se alimenta, comprometiendo la recolección de polen, esto implica que las abejas tengan que realizar mayores recorridos de recolección, implicando un mayor gasto energético y de esa manera, generando especies reactivas de oxígeno con la consecuente reducción en el tiempo de vida (45, 47).

En un estudio realizado por Li Z *et al*, 2020, donde expuso larvas de abejas a plaguicidas a través del alimento, se observó una actividad a la baja de las enzimas que participan en el estrés oxidativo: la catalasa, el superóxido dismutasa (SOD) y Glutación S transferasa (GST), como se muestra en la figura 9 (54).

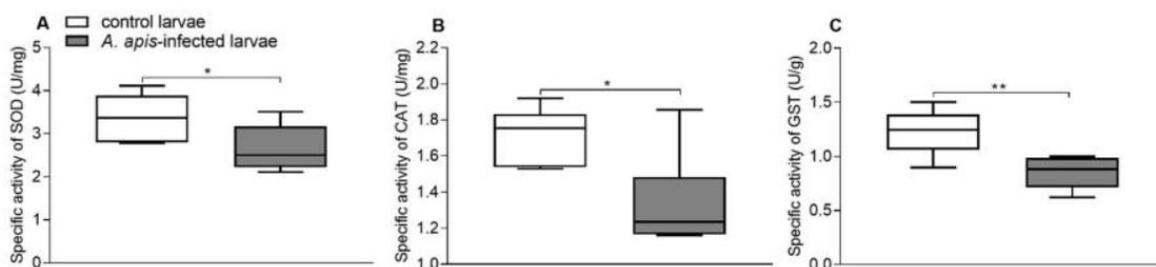


FIGURA 9. ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE *A. MELLIFERA* DURANTE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS, (54).

Gregorc et al, 2018, evaluó la expresión de genes que codifican a diferentes enzimas antioxidantes, observando que a los 20 días posteriores a la exposición a diferentes plaguicidas había una regulación a la baja de la expresión de genes que codifican para catalasa, entre otras enzimas, siendo esta la que mostró una mayor actividad en figura 10 (55).

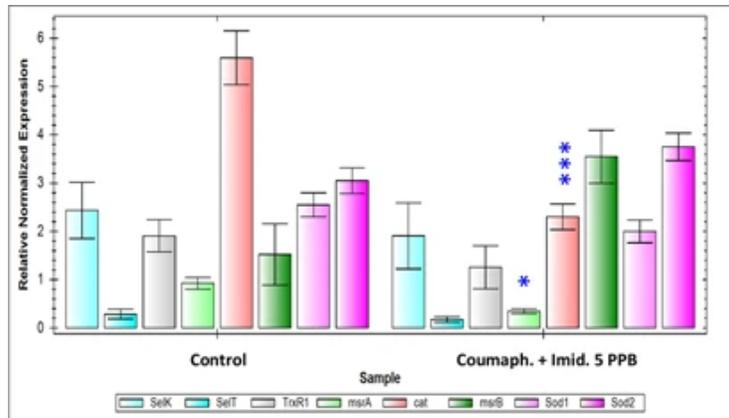


FIGURA 10. EXPRESIÓN GENÉTICA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES DURANTE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS, (55).

3.4 Respuesta Inmune de las abejas ante plaguicidas.

Uno de los factores importantes para la supervivencia de la abeja de miel es una adecuada respuesta inmunológica, cuyos factores humorales y celulares se ven alterados durante la exposición a patógenos como virus, parásitos, hongos. Se ha reportado que las condiciones en el medio ambiente afectan potencialmente en la longevidad de las abejas (56). En cuanto a la inmunología de las abejas, se sabe que, como todos los insectos, su respuesta inmune es innata, es decir, carecen de memoria inmunitaria y su especificidad es limitada (57). Cuenta con diferentes tipos de respuesta, como la celular, en la cual células fagocíticas, llamadas hemocitos tienen un papel importante en fagocitosis, encapsulación y nodulación de los patógenos. Otra respuesta importante es la humoral, en donde a través del reconocimiento de los patógenos por receptores se activan diferentes vías de señalización que conducen a la expresión de moléculas que favorecen la mielinización y de péptidos antimicrobianos y enzimas (48). Adicionalmente, las abejas pueden presentar cambios de comportamiento, como una mayor higiene, con la finalidad de eliminar patógenos, como los ácaros (Figura 11).

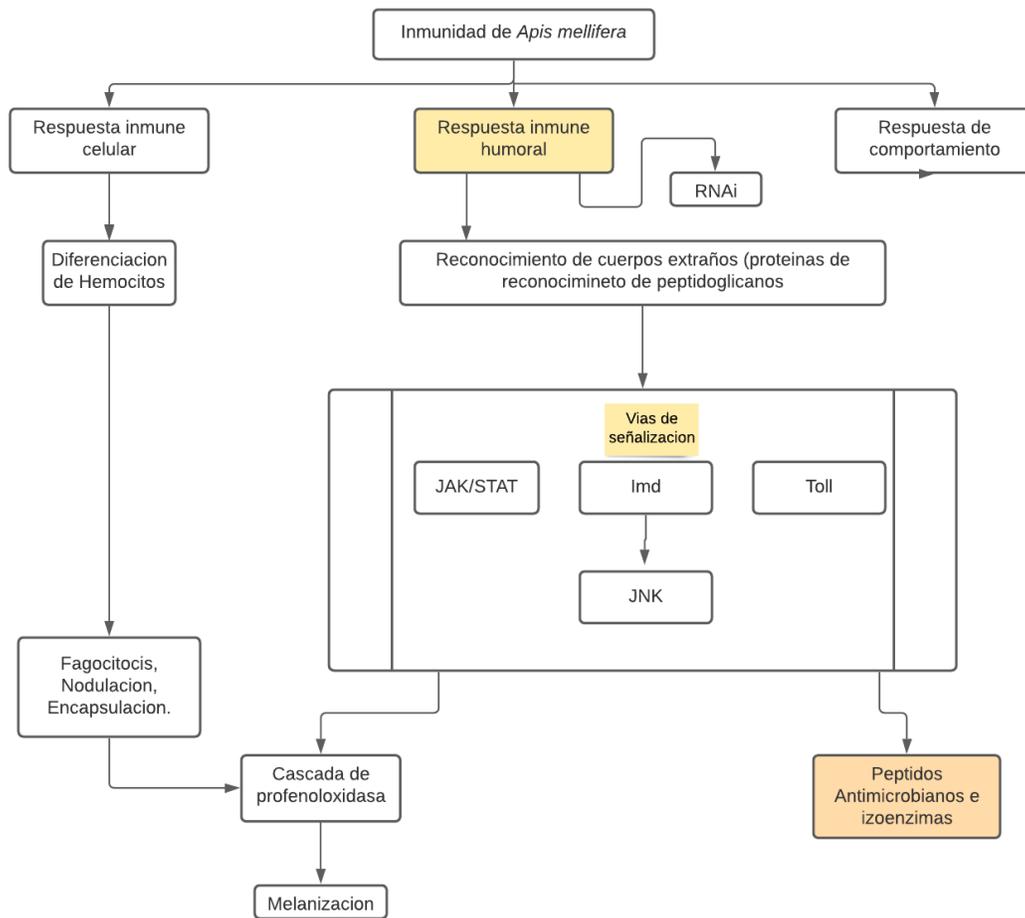


FIGURA 11. ESQUEMATIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE A. MELLIFERA, ADAPTACIÓN DE COLLISON, (48).

Dentro de los elementos claves en la respuesta inmune innata se encuentran los péptidos antimicrobianos (PAM), que tras la exposición a patógenos o bajo efecto estrés no infeccioso aumentan la expresión de los PAM (44, 58).

En las abejas melíferas se han detectado varias formas de estas moléculas, dentro de ellas tenemos las apidaceicinas 1a, 1b y 2, abacina, defensina 1, defensina 2 e himenoptaecina. Las defensinas, sobre todo la defensina 1 se ha detectado en la miel y en la jalea real (44). Los PAM se expresan de manera diferente de acuerdo a la forma de abeja que conforma la colonia, esto podría ser por la función y/o condiciones a las que esta se someten (59).

La coexposición a plaguicidas y a los agentes patógenos genera un mayor efecto tóxico sobre el insecto, como disminución de la longevidad de las abejas e incremento de la susceptibilidad a infecciones virales (47).

Chmiel, 2019, reportó que los neonicotinoides alteran la respuesta inmune en la mosca de la fruta (60). O'Neal en el 2019 reportó que el clorotalonil, un funguicida usado en diferentes cultivos como tomate, nueces, aumenta las infecciones virales en abejas melíferas (61), así como disminuye la respuesta antimicrobiana.

3.4.1 Expresión de péptidos antimicrobianos y estrés oxidativo frente a plaguicidas.

Los xenobióticos pueden inducir la expresión de diferentes péptidos antimicrobianos, a través de la interacción con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR's), como lo son los receptores tipo Toll (TLR), a través de diferentes vías de señalización como JNK y JAK/STAT. Se ha reportado que el glifosato es capaz de alterar la microbiota normal en el intestino de la abeja, siendo esta una causa probable también de enfermedades que se presentan en estos polinizadores, como lo son enfermedades ocasionadas por bacterias patógenas (62).

En abejas, el malatión induce enzimas de citocromo P450 como el cyp9q2, que puede estar involucradas con su metabolismo (63), esta fase genera la activación de xenobióticos que incluye generación de una gran variedad de especies oxidantes. Así mismo, se ha reportado que la activación de los PRR's induce una sobreexpresión de las especies oxidantes (64). De esta manera, de los ROS tiene varias fuentes de generación, como lo son el metabolismo normal, el metabolismo de los xenobióticos, en este caso los plaguicidas para su detoxificación y la inducción de los PRR's.

Con la finalidad de eliminar estas especies oxidantes, se induce la expresión y actividad de la catalasa, la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa (65, 66). Como ya se mencionó, la generación de especies reactivas de oxígeno, así como los propios plaguicidas pueden alterar directamente las vías de señalización que afectan la producción de péptidos

antimicrobianos y la actividad de la catalasa. Los biomarcadores son muy sensibles a la exposición a plaguicidas, dentro de estos tenemos las enzimas como catalasa y glutatión S transferasa, los cuales pueden ser usados potencialmente para el biomonitoreo de daño ambiental (67).

3.5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La supervivencia de las abejas melíferas constantemente se observa amenazada por diversos factores antropogénicos, aunados al desarrollo de la agricultura y la producción alimentaria. El uso de plaguicidas, con el objetivo de conseguir rentabilidad en los cultivos que abastecen de alimento a la población, se convierte en una constante amenaza a atender a corto plazo, debido a sus impactos negativos en la salud humana y en los polinizadores.

El efecto de los plaguicidas sobre los polinizadores, como las abejas, es amplio y diverso. Al respecto, de todos los sistemas que conforman a las abejas, el sistema inmune es el más vulnerable. En la literatura especializada, se ha reportado que el uso de plaguicidas de la familia de los neonicotinoides induce en las abejas una baja tolerancia a las infecciones virales, la cual puede estar asociada a una menor expresión de moléculas clave de la respuesta inmune como los péptidos antimicrobianos (PAM) y un incremento de la actividad de enzimas que se encargan de los procesos de detoxificación, como es el caso de la catalasa. Existen pocos estudios que muestren el efecto de los plaguicidas sobre los PAM en las abejas melíferas. Por tanto, en el presente trabajo, se dirige a investigar si el plaguicida organofosforado, malatión y el herbicida glifosato condicionan el incremento de la actividad de la catalasa y ésta se correlaciona directamente con la expresión de las defensinas 1 y 2, respectivamente.

3.6 JUSTIFICACIÓN

La abeja *Apis mellifera* posee sistemas que le permiten tolerar eficientemente los xenobióticos a través de un proceso de detoxificación y esta propiedad los ha colocado en un lugar privilegiado evolutivamente, respecto a otros insectos polinizadores. La exposición de las abejas a los plaguicidas, inducen diferentes tipos de especies reactivas de oxígeno, ya sea al ser metabolizados o al interaccionar con los receptores de reconocimiento de patrones de la respuesta inmune innata, para contrarrestarlos se inducen diversas enzimas antioxidantes como la catalasa, así como los péptidos antimicrobianos (PAM), entre ellos la defensina 1 (Def1) y la defensina 2 (Def2), que son moléculas en la primera línea de defensa de estos invertebrados. Esta respuesta de protección se puede ver alterada durante situaciones de estrés, como la exposición a dosis subletales de plaguicidas; por esta razón en este estudio se pretende valorar si la exposición a los plaguicidas malatión y glifosato incrementan la actividad de la catalasa y ésta se correlaciona directamente con la expresión de Def1 y Def2. De esta manera, se pretende contribuir al conocimiento sobre el efecto de la exposición oral a dosis subletales de malatión $9 \mu\text{g/L}$, glifosato ($1 \mu\text{g/L}$) solos y en mezcla durante una cinética corta, sobre una de las enzimas involucradas en la detoxificación (catalasa) y paralelamente sobre la expresión génica de Def 1 y Def 2 en *Apis mellifera*.

3.7. HIPOTESIS

El malatión y el glifosato inducen un incremento en la actividad de la catalasa y se correlaciona directamente con la expresión de los péptidos antimicrobianos, Def1 y Def2 en *Apis mellifera* expuestas a concentraciones subletales.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Valorar la exposición oral a los plaguicidas malatión y glifosato sobre la actividad de la catalasa y correlacionar su actividad con la expresión de Def1 y Def2 en *Apis mellifera*

4.2. Objetivos específicos

1. Medir la actividad enzimática de la catalasa en muestras de *Apis mellifera* de una colmena expuesta a malatión, glifosato y en mezcla por una técnica espectrofotométrica.
2. Determinar la expresión de los genes que codifican para las defensinas 1 y 2 en colmenas de *Apis mellifera* expuestas a malatión, glifosato y en mezcla por la técnica de RT-PCR en tiempo real.
3. Correlacionar la actividad de la catalasa y la expresión de DEF1/DEF2 en colmenas de *Apis mellifera* expuestas a malatión, glifosato y en mezcla
4. Determinar la presencia de malatión y glifosato en la miel recolectada de las colmenas de *Apis mellifera* al finalizar la exposición por UPLC-MS.

5. METODOLOGÍA

5.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental, comparativo, de carácter exploratorio *in vivo*, para evaluar la actividad de la catalasa y la expresión de Def1/Def2 en *Apis mellifera* al plaguicida malatión y al herbicida glifosato.

5.2 Modelo *in vivo*.

La especie *Apis mellifera* es la más utilizada en apicultura por ser la más productiva y domesticada. Al respecto, se contó con la participación de la Asociación Ganadera Local Especializada en Apicultura (AGLEA) de Zacatecas.

5.3 Diseño experimental: exposición a plaguicidas.

Se aislaron 4 grupos conformados por: 1. Control, 2. Malatión, 3. Glifosato 4. Mezcla 1:1 Malatión: Glifosato. Los grupos se separaron aproximadamente 5 metros de distancia para su manejo. Se administraron concentraciones subletales en el alimento de las abejas, la cual es una solución de sacarosa al 50%. El malatión (Marca: Malatión 1000 "Uso agrícola") se administró a una concentración de 9 $\mu\text{g}/\text{L}$, disuelto en sacarosa, la concentración usada es menor a la dosis letal 50, publicado por Hardstone M, Scott J, en su investigación (40). El glifosato (Marca: Rival.) se disolvió también en la solución de sacarosa a una concentración al 1 $\mu\text{g}/\text{L}$, la cual es una dosis menor a la concentración usada por Motta y col., 2020 (62).

La duración del experimento fue de 29 días y se realizaron muestreos a los días 0, 5, 10, 20 y 29 días. Al finalizar los 29 días se tomó la miel que se produjo, figura 12 a diferencia de otros estudios, en donde el muestreo se realizó semanalmente (62, 68).



FIGURA 12. DISEÑO EXPERIMENTAL DE EXPOSICIÓN DE *A. MELLIFERA* AL MALATION Y AL GLIFOSATO, (43, 46, 69)

Se recolectaron aproximadamente 50 abejas de cada uno de los grupos experimentales, para ello se contó con la asesoría de un apicultor con experiencia, quien instruyó en el cuidado y manejo del modelo experimental. Posteriormente, los especímenes se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se transportaron al laboratorio y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la disección de los intestinos; se descongelaron 3 especímenes por triplicado, se realizó un corte en la parte inferior del tórax y la parte superior del abdomen, posteriormente se abrió el abdomen y se cortó en dirección del aguijón al tórax de la abeja, para la extracción y recolección del intestino. Se emplearon los intestinos debido a que es el compartimento en donde se lleva a cabo la absorción de los alimentos y de los xenobióticos, siendo además el sitio donde se generan las primeras reacciones de detoxificación, por lo que es un lugar adecuado para la determinación de la actividad de la catalasa y de los péptidos antimicrobianos.

5.4 Determinación de proteínas por el Método de Bradford.

Las proteínas se cuantificaron con el reactivo de Bradford (52, 53, 70), el cual se preparó de la siguiente manera: se pesaron 10 mg de azul Coomassie G250, se añadieron 5 mL de etanol, 10 mL de ácido fosfórico y se aforó a 100 mL con agua tridestilada. Se preparó una curva de calibración como se indica en la tabla 4.

TABLA 4. PREPARACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE MEDICIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.

Reactivo	Concentración de proteína (mg/mL)						
	0	1	2	3	4	5	6
Estándar de albumina, 10 mg/mL (μL)	0	1	2	3	4	5	6
Agua (μL)	10	9	8	7	6	5	4
Reactivo de Bradford (μL)	200	200	200	200	200	200	200
Concentración mg/mL	0	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.30

La curva mostró un comportamiento lineal hasta la concentración de 0.25 mg/mL, por lo que el punto 6 se eliminó. La linealidad de la curva valorada en tres días diferentes fue de 0.9856, 0.9831 y 0.9869.

Los límites de detección y cuantificación del método fueron determinados con las ecuaciones 2 y 3, fueron de 0.8236 mg/mL y de 2.7452 mg/mL, respectivamente.

$$LD = B + 3SD \quad \dots \text{Ec. 1}$$

$$LC = B + 10SD \quad \dots \text{Ec 2}$$

Donde LD es límite de detección, LC es límite de cuantificación, B es el promedio de 10 blancos y SD es la desviación estándar.

La exactitud valorada con el porcentaje de recuperación, a partir de un control de concentración 2 mg/mL, con la ecuación 4, fue de 93.51%.

$$\%R = \frac{x \text{ obtenido}}{x \text{ esperado}} \times 100 \quad \dots \text{Ec 3}$$

El cálculo de repetibilidad y reproducibilidad permite conocer la precisión, considerándose aceptable una desviación estándar relativa (DER) menor al 3% en repetibilidad y cercana al 5% para reproducibilidad (71). La repetibilidad se calculó mediante 10 mediciones de un control de albúmina, con el mismo analista, en el

mismo día, el cual fue del 1.02%. La reproducibilidad se evaluó haciendo mediciones de un control por 3 días, mismo operador, por triplicado, obteniendo una reproducibilidad del 2.02%.

5.5 Determinación de la actividad de la catalasa en el intestino de la *Apis mellifera*.

La cuantificación de catalasa se realizó con el método de Aebi (1977), el cual consiste en medir la desaparición del H₂O₂ en presencia de la enzima a 240 nm (72). Se preparó un buffer de fosfatos a pH 7.4 (PBS) en el cual se trituró el tejido. Se hicieron diferentes diluciones de la proteína en el PBS y se tomaron 500 µL del extracto diluido y se añadieron 250 µL del H₂O₂, al 1%. Se tomó la absorbancia inicial (A1) y se tomó la absorbancia después de 30 segundos (A2).

Se determinó la tasa constante de reacción de primer orden (k) de acuerdo con las recomendaciones bibliográficas, con la siguiente ecuación, donde t es el tiempo:

$$k = 2.3/t(\text{Log} \left(\frac{A1}{A2} \right)) \dots \text{Ec 4}$$

5.6 Expresión de péptidos antimicrobianos por RT-PCR.

El intestino extraído se pesó y se trituró con 600 µl buffer de lisis por cada 30 mg de tejido, determinado, se usó el RNeasy Mini Kit, (Qiagen, Hilden, Germany), el cual utiliza columnas de afinidad al RNA. Brevemente, el tejido, después de ser triturado y homogenizado se centrifugó a 17,000 rpm por 2 minutos, se tomaron 600 µL del sobrenadante y se les añadió 600 µL de etanol para insolubilizar el RNA, la mezcla se colocó en una columna de unión al RNA, se centrifugó por 15 segundos a 8,000 gy se lavó con 500 µL de buffer RPE, incluido en el kit; posteriormente, se centrifugó 15 segundos a 8,000 g, se realizaron otros dos lavados con 500 µL de buffer RW1, también incluido en el kit, centrifugando en el primer lavado por 15 segundos y en el segundo por 2 minutos, ambos a 8,000 g; posteriormente, el RNA se

eluyó en una columna con 50 μL de agua libre de RNAsas. La concentración de RNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop One/One (Thermo Fisher, CA, USA), se tomó la lectura a 280 para determinar la relación 260/280, cuyo valor debe de ser mayor a 2.0, lo que indica que no hay proteínas en la muestra.

Para la determinación de los transcritos de las defensinas se requiere convertir el RNA a DNA codificante, para lo cual se usó la reacción de transcripción inversa, SuperScript II (Invitrogen, CA, USA) usando oligo dT (Invitrogen, CA, USA) como cebadores. Se preparó una mezcla de reacción que contiene 1 μL de oligo dT, 1 μg de RNA total, 1 μL de dNTPs 10 mM y se ajustó a 10 μL con agua libre de RNAsa. Se calentó a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos, se agregaron 4 μL del buffer 5X para la reacción y 2 μL de ditioneitol, incluidos en la enzima; se calentó la mezcla a 42 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos y se agregó 1 μL de la enzima. Posterior a eso se calentó por 10 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$, luego se subió la temperatura a 42 $^{\circ}\text{C}$ por 50 minutos y se terminó la reacción calentando por 10 minutos a 70 $^{\circ}\text{C}$. Se cuantificó el cDNA por espectrofotometría.

La cuantificación de los transcritos Defensina 1 y Defensina 2 se realizó con SYBR Green (63), agregando 400 nanogramos de cDNA a una mezcla que contiene 4 μL de la enzima (Mezcla maestra (2X) para qPCR Maxima SYBR Green/ROX, ThermoFisher Scientific, Inc.), 2 μL de los cebadores μM (Tabla 5). Las secuencias que se utilizaron como cebadores para la amplificación de los genes evaluados se muestran en la tabla 5. Para la amplificación del cDNA, se activó la enzima calentando la mezcla a una temperatura de 95 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, posteriormente se realizaron 40 ciclos, que consistieron en desnaturalización, 94 $^{\circ}\text{C}$ por 15 segundos; alineación, un minuto a 57.5 $^{\circ}\text{C}$ y amplificación, 30 segundos a 72 $^{\circ}\text{C}$, al finalizar los 40 ciclos se subió la temperatura por un minuto a 95 $^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo la reacción a 4 $^{\circ}\text{C}$. Para la cuantificación relativa se utilizó como gen constitutivo a la proteína ribosomal 18S y se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (65, 66). El cual utiliza el C_t , que significa el ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el límite de detección del equipo.

TABLA 5. SECUENCIAS DE LOS CEBADORES USADOS PARA LAS REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN.

Gen	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Tamaño
Def1	5'-tgcgctgctaactgtctcag-3'	5'- acaaactcctttctcgcaatg-3'	60 pb
Def2	5'-ggtaacgtgacgacgtttatc-3'	5'-tagcgcaggctgaatgatta-3'	65 pb
18S	5'-aaatgtcaaaacgtccagaaca-3'	5'-tcgagcttcggattcattgt-3'	65 pb

5.7 Determinación de Malatión y Glifosato en la miel.

La miel de abeja se obtuvo directamente del panal al finalizar el experimento para verificar persistencia del plaguicida. Es importante mencionar que, la recolecta se realizó con ayuda de un apicultor. La miel se exprimió o se colocó un panal en un recipiente, enseguida se colocaron en una nevera con hielo, para su transporte al laboratorio, se congelaron a -20 °C hasta la extracción del malatión y glifosato (5).

5.7.1 Extracción del Malatión y del Glifosato de la miel

Se pesó 1 gramo de miel en tubo, se agregaron 10 mL de ácido acético al 0.5% en agua ultrapura. Después se agitó vigorosamente durante 3 minutos en vortex, enseguida se colocó en un baño ultrasónico por 30 minutos a 50°C y se centrifugó por 4 minutos a 4000 rpm. El sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su análisis (66).

5.7.2 Metodología de UPLC-MS

Los estudios cromatográficos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica perteneciente al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto

Politécnico Nacional de Reynosa, Tamaulipas.

Primeramente, se tomó 1 ml de la muestra procesada como se describió anteriormente, se filtró a través de filtro de jeringa acrodisc de nylon, 13 mm, 0.2 μ m y se transfirió a un vial de vidrio. El análisis se llevó a cabo utilizando un equipo de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC-MS/MS) acoplado a un detector de masas Watersb QDA® (Milford, MA, EEUU). Se utilizó una columna Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μ m, 2.1 x 100 nm. El equipo se usó en modo de iones positivos acondicionando la columna a 40 °C y el automuestreador a 15 °C. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0.1% en agua ultrapura (fase A) y acetonitrilo (fase B). Se usó una elución isocrática de 30% de la fase A y 70% de la fase B. El flujo fue de 0.3 mL/min y el volumen de inyección de 10 μ l. Es importante mencionar que para la estandarización del método se usó un control de Glifosato (Chem Service, EUA) y de Malatión (ChemService, EUA).

5.8 Análisis estadístico.

Se usaron medidas de tendencia central y analizados con la prueba de bondad de ajuste Shapiro Wilk para conocer su normalidad. Posteriormente, se realizó análisis de varianza (ANOVA) para la comparación entre grupos seguido de un post-hoc Bonferroni. Posteriormente, se realizó una correlación de Spearman para establecer una asociación entre la actividad de catalasa y la expresión de péptidos antimicrobianos en la *Apis mellifera* con la exposición a malatión y glifosato, respectivamente. El análisis se realizó con los paquetes estadísticos GraphPad Prism versión 8.0, se consideraron diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de los plaguicidas sobre el peso de los intestinos de abejas.

Los intestinos extraídos de cada uno de los grupos experimentales mostraron variación tanto en peso como en aspecto. En ese sentido, los intestinos de las abejas expuestas a malatión mostraron bajo peso al finalizar el experimento en comparación con el grupo control ($p = 0.01$) como se observa en la figura 13. Interesantemente, la pérdida de la masa intestinal comenzó a partir del día 15 de la exposición a malatión.

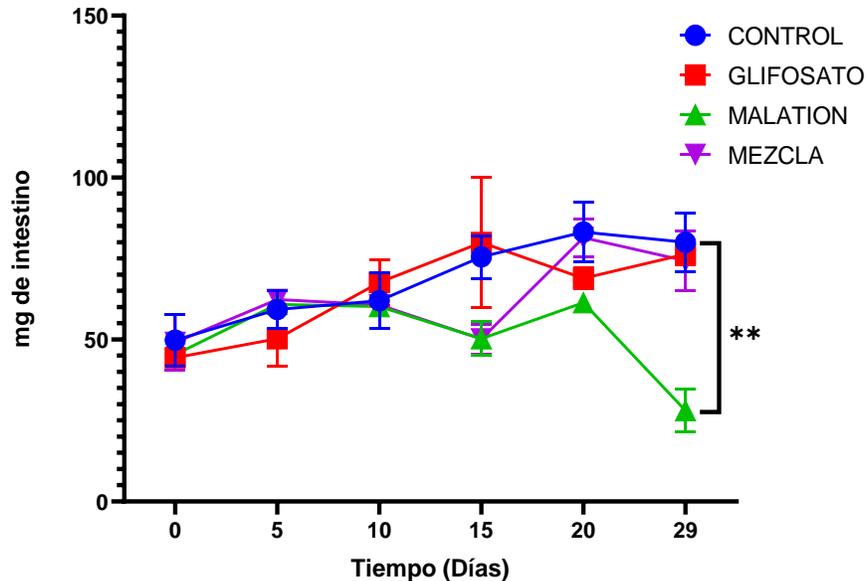


FIGURA 13. EFECTO DEL MALATIÓN Y EL GLIFOSATO EN EL PESO DE INTESTINOS DE *A. MELLIFERA*. SE HICIERON TRES ENSAYOS INDEPENDIENTES POR TRIPLICADO A LOS 5, 10, 15, 20 Y 29 DÍAS. SE REALIZÓ UN ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE DOS FACTORES. ** $p < 0.01$.

6.2 Evaluación de la actividad de la catalasa en el intestino de las abejas.

La actividad de la catalasa se reportó normalizándola con la cantidad de proteínas totales presentes en el intestino. Las proteínas totales se cuantificaron por el método de Bradford (73), el cual se basa en la reacción del Azul de Coomassie G250 con la proteína (principalmente residuos de arginina), presentando un pico de absorción máxima a 595 nm.

Para la cuantificación de las proteínas por el método Bradford, se buscó la dilución del extracto intestinal óptimo, usando diluciones de 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200 en PBS y el extracto sin diluir. Se observó que la dilución 1:10 fue la más adecuada para la cuantificación de las proteínas.

Para la determinación de la actividad de la catalasa, se determinó la dilución óptima del extracto, se trabajaron diluciones de 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:500. Los resultados se muestran en la figura 14, en donde se observa que la dilución óptima de trabajo fue de 1:200, los ensayos se realizaron por triplicado.

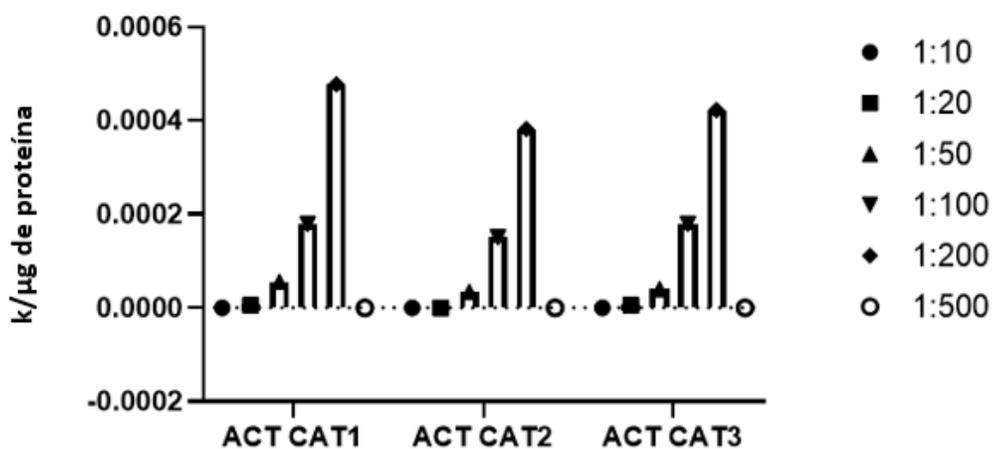


FIGURA 14. DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DEL EXTRACTO INTESTINAL PARA LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CATALASA. K INDICA CONSTANTE DE VELOCIDAD. SE MUESTRAN LOS RESULTADOS DE TRES ENSAYOS, CADA UNO REALIZADO POR TRIPLICADO.

Posteriormente, se determinó la actividad de catalasa en el intestino de las abejas tratadas con el malatión, el glifosato, la mezcla de ambos y en el control. En el grupo tratado con malatión hubo un incremento transitorio en la actividad de la catalasa a los 5 días, posteriormente disminuyó significativamente hasta los 20 días. Con respecto al tratamiento con la mezcla, a los 10 días se observó un ligero decremento, pero después se reestablece

a los días 15, 20 y 29, pero no se tuvieron diferencias significativas. La actividad de la catalasa en las abejas tratadas con glifosato y el control tuvieron un comportamiento similar (figura 15).

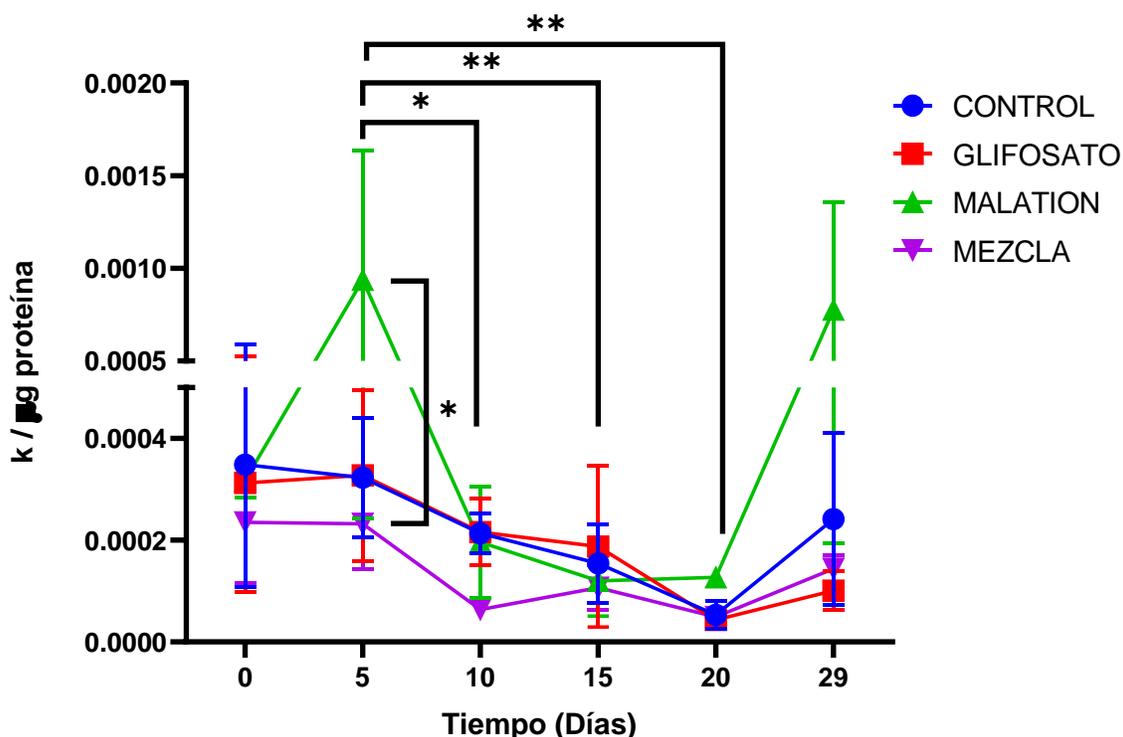


FIGURA 15. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A GLIFOSATO Y MALATION EN LA ACTIVIDAD DE LA CATALASA. SE MUESTRAN RESULTADOS DE TRES ENSAYOS INDEPENDIENTES. K INDICA CONSTANTE DE VELOCIDAD. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE DOS FACTORES. SE CONSIDERÓ SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

6.3 Efecto de los plaguicidas en la expresión de los péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son las moléculas de carácter inmune más importantes en los invertebrados, al respecto, su cuantificación resulta importante para dimensionar si su expresión puede ser alterada por efecto de los plaguicidas antes mencionados; como se observa en la figura 16, la defensina 1 (Def1) mostró un incremento a los 5 días (D5) en el grupo tratado con Malation, aunque no de manera significativa. Interesantemente, se muestra un aumento significativo en la expresión de la Def1 en el grupo de mezcla de

manera temprana, es decir, también al 5to día de tratamiento respecto al grupo control, posteriormente, los niveles de expresión de la Def1 se mantienen de manera similar en los días 10 (D10), 15 (D15) y 20 (D20), respectivamente.

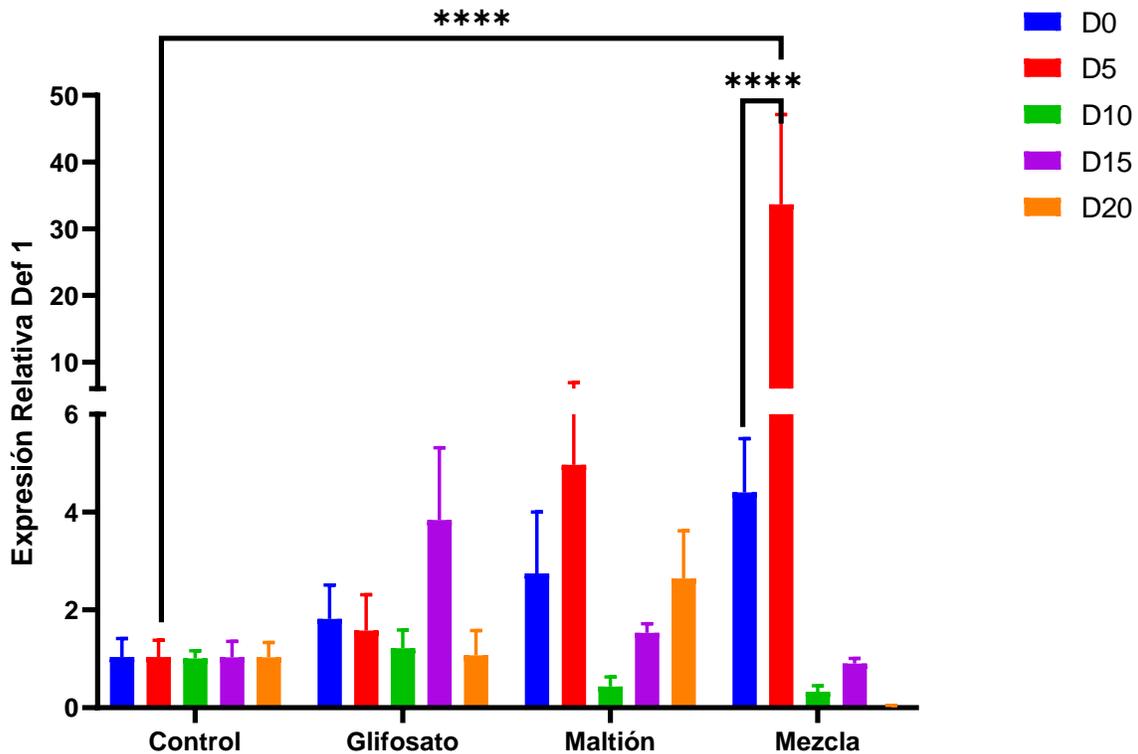


FIGURA 16. EXPRESIÓN DE DEF1 DURANTE LA EXPOSICIÓN A MALATIÓN Y GLIFOSATO. SE HICIERON TRES ENSAYOS INDEPENDIENTES. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE DOS FACTORES. SE CONSIDERÓ SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA **** $p < 0.0001$.

Por otro lado, al analizar la expresión de la defensina 2 (Def2) se observó, un comportamiento inverso como el mostrado para Def1. En ese sentido, los niveles de Def2 se incrementaron de manera tardía aproximadamente al día 20 de tratamiento (D20) en el grupo expuesto a glifosato, maltión y en mezcla respecto al grupo control. Interesantemente, el mayor aumento en la expresión de Def2 se observó en el grupo expuesto a glifosato, pero al momento de estar en mezcla, no se observó la misma magnitud. El grupo tratado con maltión también presentó un incremento al día 20 pero no es significativo., figura 17.

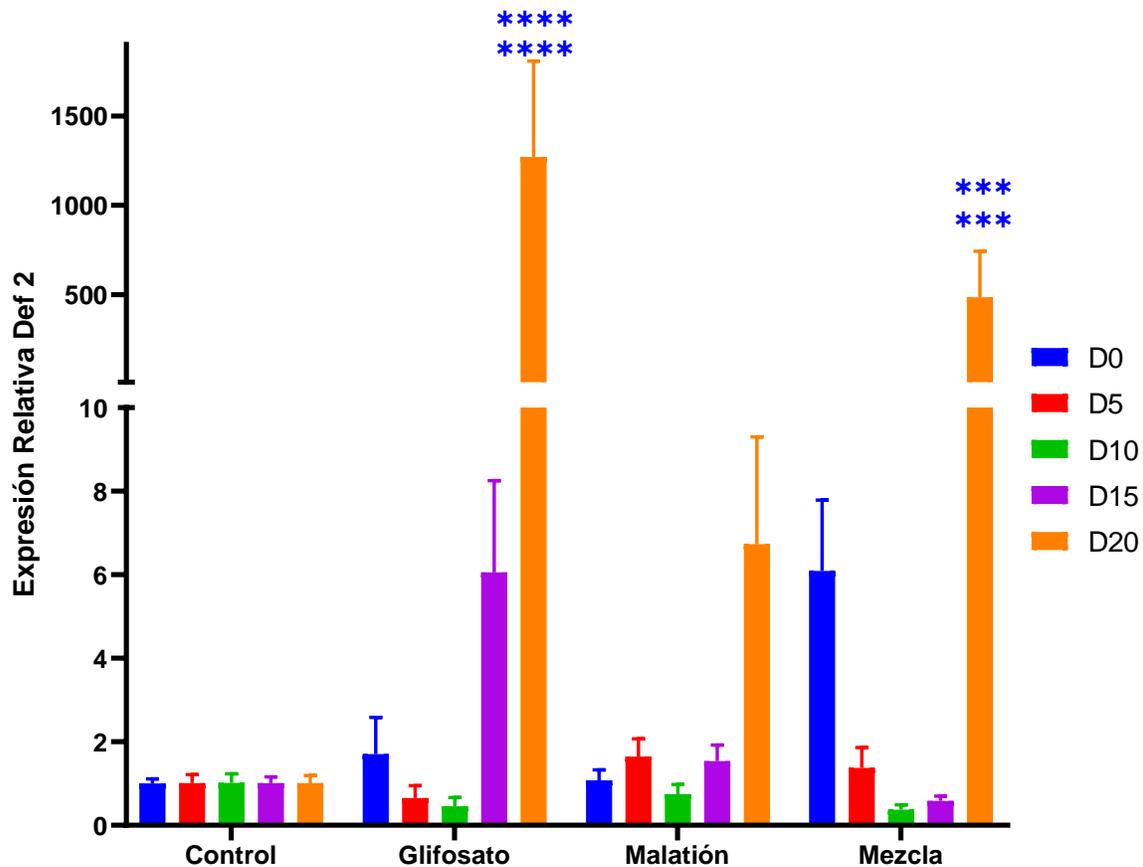


FIGURA 17. EXPRESIÓN DE DEF2 DURANTE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS. SE HICIERON TRES ENSAYOS INDEPENDIENTES POR TRIPLICADO. ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE DOS FACTORES. SE CONSIDERÓ SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA CUANDO *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

6.4 Correlación de la actividad de catalasa y la expresión de péptidos antimicrobianos.

En la tabla 6, se muestra la correlación entre la actividad de catalasa y la expresión de la Def1 y Def2 en cada exposición, respectivamente. Se encontró una asociación altamente positiva pero no de manera significativa en la expresión de Def 1 y catalasa en el grupo tratado con la mezcla de los plaguicidas ($r=0.9$; $p=0.0833$). Sin embargo, esta correlación no pudo ser extrapolada para el caso de Def2, no hubo ninguna asociación significativa en los grupos expuestos respecto a la actividad de la catalasa, sugiriendo que el incremento de la catalasa no afecta la expresión de los péptidos antimicrobianos estudiados.

TABLA 6. CORRELACIÓN ENTRE ACTIVIDAD DE CATALASA CONTRA EXPRESIÓN RELATIVA DE DEFENSINA 1 Y DEFENSINA 2.

	DEF 1 (FC)			
Grupo	Control	Glifosato	Malatión	Mezcla
R	0.6	0.3	0.7	0.9
p	0.35	0.6833	0.2333	0.0833
	DEF 2 (FC)			
Grupo	Control	Glifosato	Malatión	Mezcla
R	-0.2	-0.7	-0.1	0
p	0.7833	0.2333	0.95	>0.999

DEF 1: Defensina 1. DEF 2: Defensina 2. R: Coeficiente de correlación de Spearman. p: Nivel de significancia.

6.5 Observaciones del estudio en campo.

La ejecución del diseño experimental antes mencionado se realizó en una localidad del municipio de Ojocaliente, Zacatecas (Latitud: **22.5706**, Longitud: **-102.255** 22° 34' 14" Norte, 102° 15' 18" Oeste) se contó con el apoyo y la asesoría de un apicultor con experiencia que consistió en otorgar entrenamiento para el manejo y cuidado de las colmenas. En ese sentido, de manera inicial, se aislaron las colmenas y se dejaron adaptar durante 2 semanas antes de comenzar con la exposición a los plaguicidas (figura 18).



FIGURA 18. EXPOSICIÓN DE PLAGUICIDAS-COLMENAS. EN LA IMAGEN SE MUESTRA LA COLMENA IDENTIFICADA POR CADA EXPOSICIÓN.

Los resultados muestran que al D5 del experimento, únicamente 2 de las 4 colmenas aisladas consumieron el alimento en su totalidad. Las colmenas control y la expuesta a glifosato consumieron en su totalidad el alimento que se les colocó e interesantemente, las expuestas a malatión y a la mezcla, consumieron el alimento de manera parcial, lo que se corroboró al observar el contenedor que lo contenía.

Adicionalmente, se observó a partir del día 15 (D15) cambios en el comportamiento de las abejas de la colmena expuesta a malatión, ya que el sonido que emitieron era diferente. Al respecto y de acuerdo con lo informado por el apicultor, este sonido era indicativo de estrés, además se observó que estas abejas mostraron un caminar inestable, las alas extendidas, así como la emisión de un sonido diferente al que emitía la colmena control; al llegar al D20 de la exposición, se observó una gran mortalidad de abejas, observándose en las abejas muertas afuera de la colmena, así como una baja población en la colmena, con una gran cantidad de zánganos.) Del mismo modo, es importante destacar que durante el transcurso del experimento, se comenzó a notar una baja en la población obrera pero un aumento de zánganos, al finalizar el experimento la colmena expuesta a malatión colapsó, entendiéndose de esta manera que fue un daño devastador en esta colmena.

6.6 Determinación de Malatión y Glifosato en miel.

Las abejas expuestas a malatión murieron por lo que no se recolectó miel de esta colmena. En el resto de las colmenas se extrajo en promedio 30 g de miel de cada una. Para la determinación de los plaguicidas en miel se utilizó un método estandarizado del Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica del Centro de Biotecnología Genómica del IPN. Para ello, se verificó que los plaguicidas se detecten en las condiciones estandarizadas en el laboratorio, para lo cual se utilizaron los estándares correspondientes. En el caso del malatión se observó un pico a un tiempo de retención de 1.64 min, que de acuerdo al espectro de masas correspondió al malatión (m/z 330.87) (figura 19). El Glifosato se observó a un tiempo de retención de 2.3 min, y su espectro correspondió al glifosato (171.05 m/z) (figura 20).

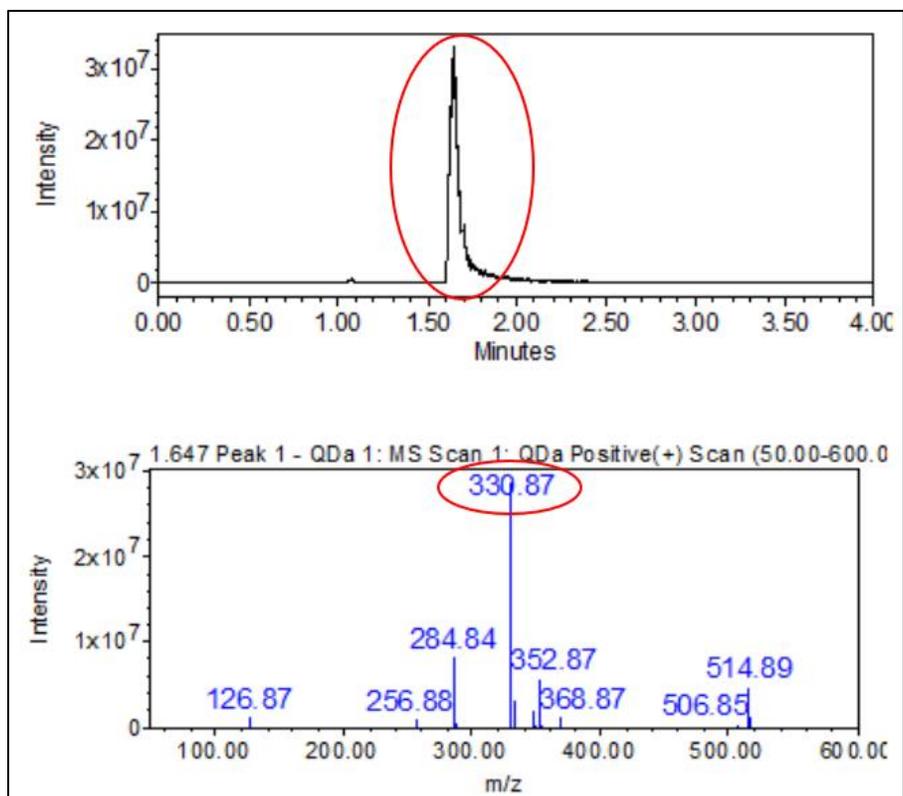


FIGURA 19. DETECCIÓN DE ESTÁNDAR DE MALATIÓN ANALIZADO POR UPLC/MS. SE MUESTRA EL CROMATOGRAMA Y EL ESPECTRO DE MASAS. VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10 μ L, CONCENTRACIÓN 3×10^{-3} μ g/ μ L. TIEMPO DE RETENCIÓN 1.647 MIN Y PM 330.87G/MOL.

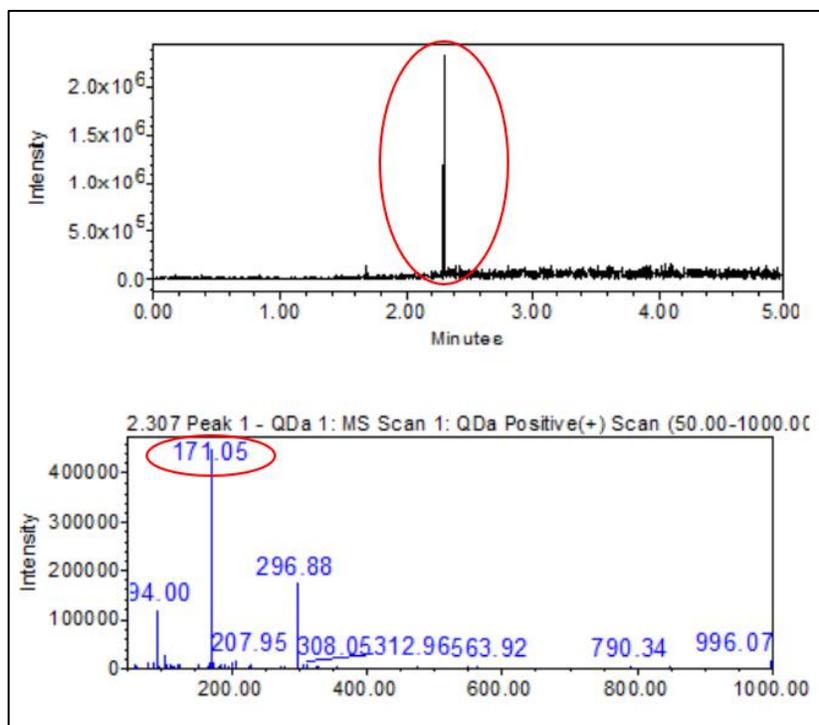


FIGURA 20. DETECCIÓN ESTÁNDAR DE GLIFOSATO ANALIZADO POR UPLC/MS. SE MUESTRA EL CROMATOGRAMA Y EL ESPECTRO DE MASAS. VOLUMEN DE INYECCIÓN: 10 μ L, CONCENTRACIÓN: 3×10^{-4} μ G/ μ L TIEMPO DE RETENCIÓN: 2.307 MIN Y PM: 171.05 G/MOL.

Ya determinadas las condiciones de elución de los plaguicidas por UPLC-MS se verificó la capacidad de extracción del plaguicida por adición de concentraciones conocidas de estándares de malatión y glifosato, respectivamente, a muestras conocidas de miel libre de estos compuestos. Obteniendo en ambos casos los picos en el cromatograma que coinciden con el tiempo de retención determinado previamente y esto se corrobora con el espectro de masas y de esta manera poder detectar la presencia de malatión y glifosato en las muestras de miel (figura 21 y 22, respectivamente).

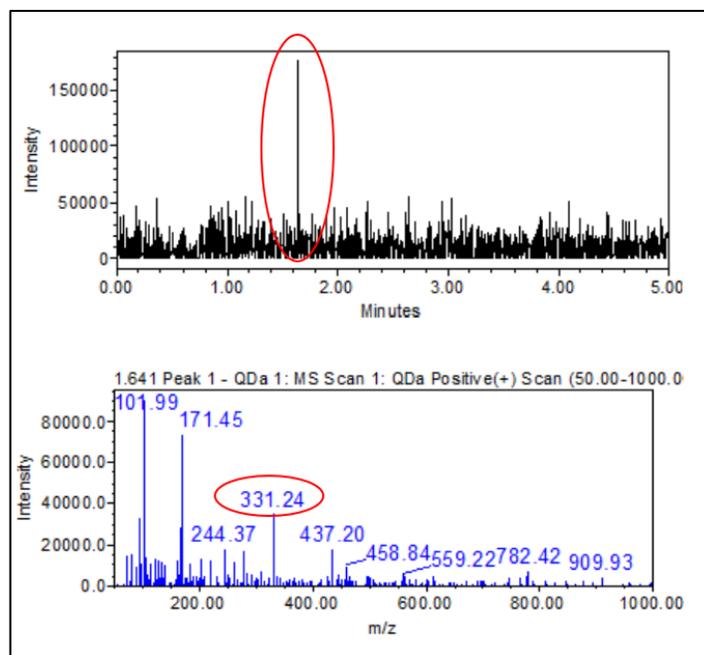


FIGURA 21. CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS DEL MALATIÓN EN MIEL TIEMPO DE RETENCIÓN 1.641 MIN Y PM 331.24 G/MOL. CONCENTRACIÓN DE MALATIÓN EN LA MUESTRA $1 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

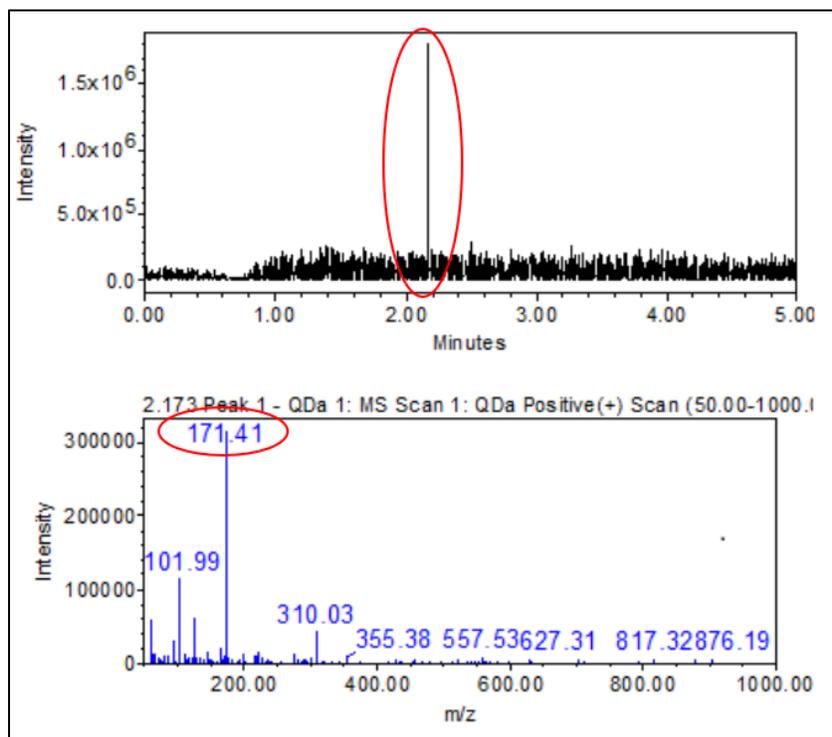


FIGURA 22. CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS DEL GLIFOSATO EN MIEL ENRIQUECIDA CON GLIFOSATO. TIEMPO DE RETENCIÓN 2.173 MIN Y PM 171.41 G/MOL. CONCENTRACIÓN DE GLIFOSATO EN LA MUESTRA $1 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Posteriormente, ya que se comprobó que se puedan determinar los plaguicidas malatión y glifosato en las muestras de miel que se enriquecieron con éstos, se procedió a realizar el análisis de estos en las muestras de miel provenientes de las colmenas experimentales de cada tratamiento. Sorprendentemente, solo se encontró malatión en la colmena control, a un tiempo de retención de 1.641 min, en el espectro de masas se observó un pico molecular de 331.24 g/mol (Figura 24A), que al compararse con el de la miel enriquecida con malatión tuvo un ligero desplazamiento en el tiempo de retención, 1.787 min, sin embargo, el espectro de masas indicó la presencia de malatión por la presencia del ión molecular en un valor m/z de 331.25 g/mol. En la miel proveniente de la colmena tratada con glifosato, así como la correspondiente a la colmena del tratamiento mezcla glifosato/malatión no se detectaron estos plaguicidas (figura 23). En el cromatograma que corresponde a la miel procedente de la colmena tratada con glifosato se observó un pico a los 3.3 min, el cual no corresponde al malatión (Figura 23B). En la muestra de miel correspondiente a la colmena tratada con malatión se observó un pico a los 1.3 min correspondiente a un fragmento con relación m/z no atribuible a malatión.

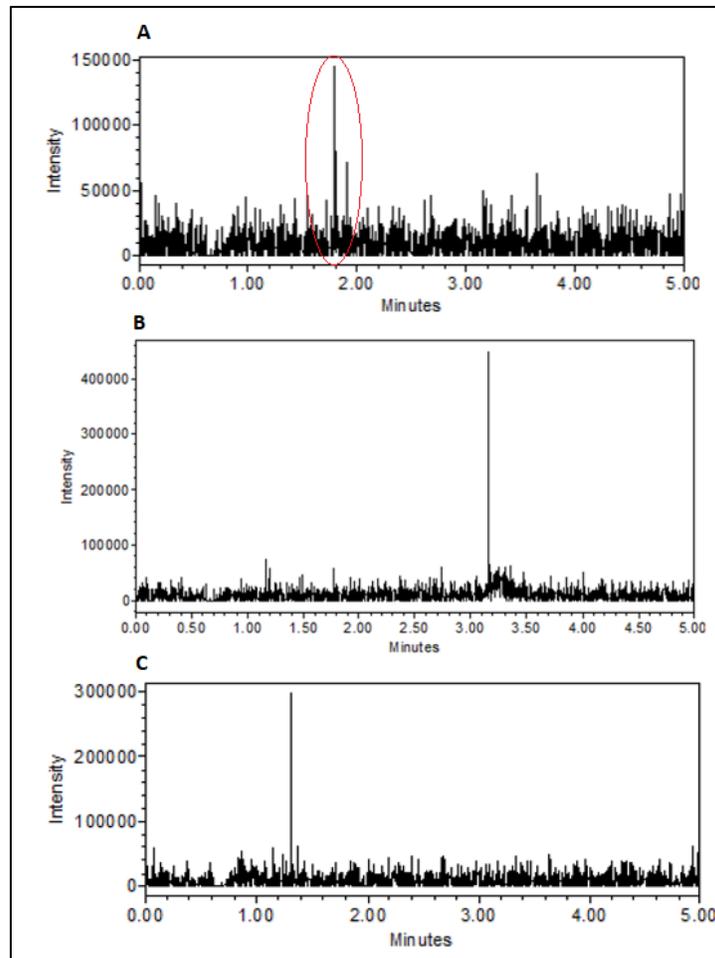


FIGURA 23. IDENTIFICACIÓN DE MALATIÓN EN MUESTRAS DE MIEL DE LAS COLMENAS EXPERIMENTALES. A: COLMENA CONTROL B: COLMENA TRATADA CON GLIFOSATO. C: COLMENA TRATADA CON MALATIÓN Y GLIFOSATO.

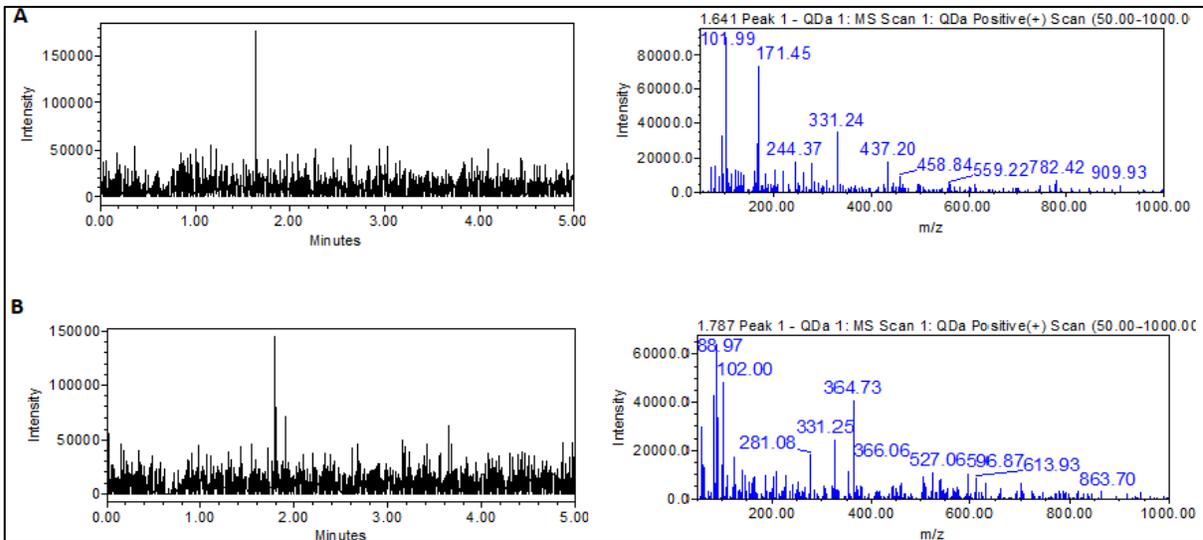


FIGURA 24. DETECCIÓN DE MALATIÓN EN MIEL DE COLMENA CONTROL Y EN MIEL ENRIQUECIDA CON MALATIÓN. A CROMATOGRAMA Y EL ESPECTRO DE MASAS CORRESPONDIENTE A LA MIEL ENRIQUECIDA. B CROMATOGRAMA Y ESPECTRO DE MASAS DE COLMENA CONTROL.

Al comparar los espectros de masas de los picos encontrados en los cromatogramas de la miel de la colmena control y de la miel enriquecida con el estándar de malatión, se observó un pico molecular de 331.25 g/mol, lo que comprueba que es el mismo compuesto, además, el patrón de fragmentación es similar en ambos espectros (figura 24).

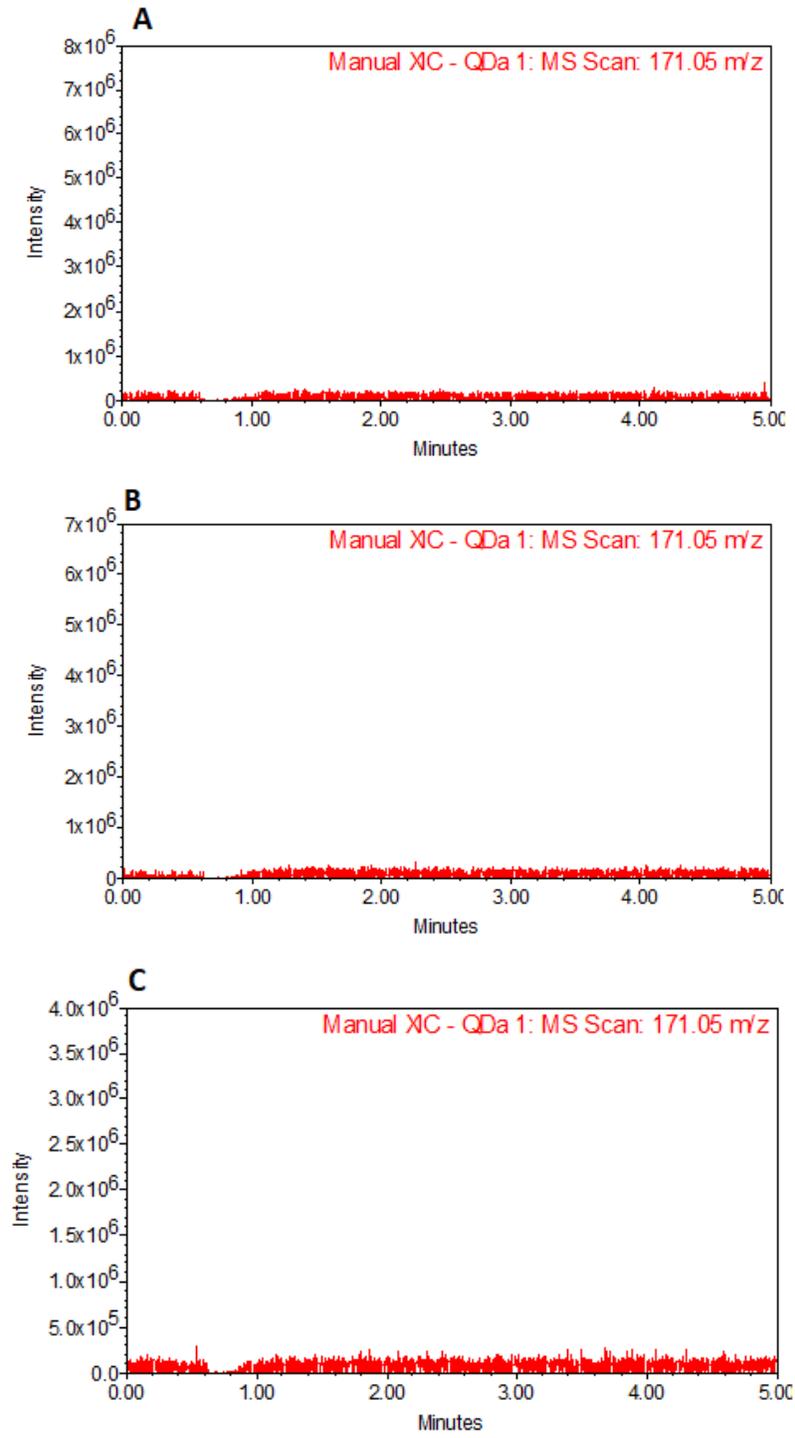


FIGURA 25. IDENTIFICACIÓN DE GLIFOSATO EN MUESTRAS DE MIEL DE LAS COLMENAS EXPERIMENTALES. A: CROMATOGRAMA DE MIEL DE LA COLMENA CONTROL B: CROMATOGRAMA DE COLMENA DE MIEL TRATADA CON GLIFOSATO. C: CROMATOGRAMA DE COLMENA TRATADA CON MALATI3N Y GLIFOSATO.

Finalmente, se procedió a evaluar la presencia de glifosato en las muestras de miel de las colmenas control, tratada con glifosato y con la mezcla de malatión/glifosato. En ninguna se pudo detectar este herbicida (Figura 25).

7. DISCUSIÓN.

Las abejas melíferas son uno de los polinizadores más importantes para agricultura. No obstante, en los últimos años, el número de colmenas que mueren o colapsan se ha incrementado de manera alarmante. Existen distintos factores que pueden generar ese colapso tales como las enfermedades, el cambio climático, la deforestación, la movilización ilegal de colmenas y la contaminación (74).

La contaminación por plaguicidas ha despertado importante interés en evaluar los efectos de estos en las abejas melíferas. El malatión es un tipo de plaguicidas que se usan ampliamente en la agricultura y prevención de plagas, estos alteran la función nerviosa del insecto al inhibir la acetilcolinesterasa, enzima que elimina los neurotransmisores de acetilcolina de la sinapsis (52, 62).

En el experimento se usó una concentración de malatión de 9 $\mu\text{g/L}$, lo que equivale a 0.045 $\mu\text{g/g}$ con una población promedio de 20,000 abejas, dosis que fue inferior a la LD_{50} reportada, que es de 4.19 $\mu\text{g/g}$ (46), sin embargo, esta dosis generó mortandad absoluta al día 29 después de iniciar la exposición crónica. En el caso del glifosato, la dosis que se empleó también fue menor a las concentraciones encontradas en un estudio realizado por Ruiz T, *et al.* 2014 (75), donde encontraron concentraciones de 0.05 $\mu\text{g/L}$ en cuerpos de agua cercanos a cultivos de soya en Tapachula, Chiapas, México.

Por otro lado, se observó una disminución significativa en el peso de los intestinos de las abejas expuestas a malatión, lo cual podría estar relacionado con la disminución en la ingesta de alimento, que se ha relacionado también con el estado nutricional del insecto (74). En nuestro estudio, las abejas tratadas con malatión, el peso disminuyó significativamente a partir del día 15, lo que sugiere un posible compromiso en la vía digestiva asociado con cambios en la microflora natural, así como en la respuesta inmune (74). En un estudio donde evaluaron que un estado nutricional de las abejas se puede medir con base a su peso, se observó que las abejas mejor nutridas tenían un mayor peso, por lo que se encontraban fuertes para combatir cualquier amenaza, lo que asemeja los

resultados obtenidos en este trabajo; ya que conforme se alimentaron a través de los días su peso fue en aumento, y la baja nutrición de la colmena tratada con malatión generó disminución de peso del intestino de abejas (76).

La detoxificación, es realizada por enzimas del citocromo P450, así como por enzimas de fase II, lo cual genera metabolitos hidrosolubles. Las enzimas del CYP450 están ampliamente distribuidas en los diferentes organismos y los insectos no son la excepción, tienen un papel importante en la detoxificación de los xenobióticos, como los plaguicidas y son inducidas o inhibidas por la interacción de xenobióticos y microorganismos a los cuales puede estar expuesta la abeja (45, 49). Sin embargo, en las reacciones de detoxificación se generan varios radicales libres, como el peróxido de hidrogeno, el cual es degradado por la catalasa, a través de la dismutación del peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno (74). Se ha reportado que la actividad de la catalasa incrementa en abejas expuestas a glifosato (77), sin embargo, en nuestros resultados, la actividad de la catalasa no se alteró, con respecto al control, en las colmenas tratadas con glifosato y con la mezcla de plaguicidas, caso contrario sucedió en la colmena tratada con malatión, en donde la actividad de la catalasa se incrementó considerablemente a los 5 días, pero disminuye considerablemente después. En un estudio realizado por Tesovnik, 2020, se muestra que los patrones de expresión génica de la catalasa cambian con respecto al tiempo, con una disminución significativa en la expresión de genes relacionados con la detoxificación y la respuesta inmune (78) en abejas expuestas a tiametoxan. Se ha reportado que los xenobióticos, como los plaguicidas organofosforados generan varios mecanismos moleculares de resistencia, la cual puede ser metabólica, incrementando la expresión de genes relacionados con el metabolismo, como los del CYP450, o bien los de Fase II, como lo es el glutatión S transferasa, o bien por una tolerancia aloquímica (79).

Los plaguicidas y ROS pueden afectar receptores PRR, lo que lleva a alteraciones en vías de señalización importantes para la generación de genes del sistema inmune, tales como los péptidos antimicrobianos como defensina 1 y 2 así como alteraciones de enzimas detoxificantes (64, 78). En nuestro estudio se observó una sobreexpresión de la Def1 en los

grupos de abejas tratadas con malatión y con la mezcla, siendo en este grupo donde se observó un efecto más notable a los 5, días, con un decremento posterior notable en los siguientes días. La Def2 se incrementó notablemente al día 20 en los grupos tratados con glifosato y en el grupo tratado con la mezcla; en ambos PAM valorados por la expresión génica, esto sugiere un efecto sinérgico entre los dos plaguicidas. También el comportamiento es similar a lo encontrado por Yu L. *et al.* 2021 que encontraron aumento de la expresión de defensina 1 tras exponerse con a las abejas a un plaguicida piretroide, aunque se sabe no es de la misma familia, se puede observar que la expresión de péptidos antimicrobianos puede incrementarse ante la exposición a los plaguicidas (80). En un estudio realizado por Guo Y, *et al.* 2021, mostraron una alteración en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune y con la detoxificación, así mismo con un incremento en la mortalidad de las abejas expuestas al plaguicida flupiradifurona (81).

El incremento en la expresión de los genes del sistema inmune durante la exposición a plaguicidas, como la flumetrina, correlacionan con un incremento en la diversidad y abundancia de la flora microbiana intestinal de la abeja (80), lo cual puede explicar los resultados que se observaron en nuestro estudio.

En los diversos estudios que se han realizado en relación con la exposición intencional a plaguicidas no se ha valorado la presencia de este en la miel, como lo realizamos nosotros (82). En el caso de las colmenas contaminadas con glifosato y con la mezcla de glifosato y malatión no se detectó en la miel los plaguicidas evaluados, lo que podría explicarse por la eficiente detoxificación de las abejas, sin embargo, se requieren más estudios, como lo son la evaluación de los genes que codifican para las enzimas detoxificantes, como CYP450 o GST, así como un estudio que permita identificar los metabolitos de estos plaguicidas en la miel. En el caso de la colmena contaminada con malatión, no se recuperó miel, lo que es un reflejo de la toxicidad que ejerció este plaguicida en la colmena. Sin embargo, en el caso de la colmena control, se encontró malatión, esto puede deberse a un probable pillaje de las abejas control hacia la colmena de malatión, en la cual hubo colapso. Sin embargo, al no estar expuestas de forma crónica a ningún plaguicida, no hubo inducción de enzimas

detoxificantes, por lo que el plaguicida no fue metabolizado en su totalidad y fue depositado en la miel. La medición nuevamente de los genes que codifican para la detoxificación será de gran interés para elucidar el mecanismo propuesto

Finalmente, diversos estudios han reportado incidentes de envenenamiento de abejas, esta exposición incidental puede provocar impactos negativos en el aprendizaje, memoria y apetito de las abejas (74), se ha reportado que un mecanismo desarrollado por las abejas para resistir la exposición de plaguicidas, es por cambios en el comportamiento, en su morfología o en su fisiología. La resistencia por comportamiento consiste en un mecanismo de protección, donde los insectos dejan de realizar actividades aprendidas en su comunidad, pues el tóxico les generó algún efecto negativo, así pueden dejar de comer y cambian su estilo de buscar alimento, entre otros (83). Nuestros resultados muestran que las abejas expuestas a malatión alteraron su comportamiento y consumieron menos alimento, lo que sugiere que las abejas expuestas fueron capaces de identificar el plaguicida que causó efectos negativos, malatión, disminuyendo la ingesta del alimento que se les administró. Así mismo, los movimientos atípicos en las abejas expuestas al plaguicida malatión, pueden ser causado por la inhibición colinérgica, aumentando la contractibilidad muscular (83). También se observó que las abejas expuestas a malatión mantuvieron las alas abiertas y un ruido atípico, en comparación con la colmena control, que nos podría indicar que las abejas probablemente sufrieron una sobre estimulación nerviosa, al tener inhibida la acetilcolinesterasa que resulta evidente por la manifestación de sobre-aleteo irregulares y como consecuencia un agotamiento que se refleja en la alta mortalidad de la población de estudio.

8. CONCLUSIONES.

1. La actividad de la catalasa puede considerarse como un marcador temprano a la exposición al malatión.
2. La defensina 2 se incrementa en respuesta a la exposición de glifosato y en mezcla, respectivamente, al día 20 de exposición. Sin embargo, no hubo correlación con la actividad de la catalasa.
3. El malatión mostró una alta letalidad evidenciado por el colapso total de la colmena expuesta a este plaguicida.

9. PERSPECTIVAS

1. Este estudio sienta las bases para la generación de investigaciones posteriores a través de la dilucidación de los factores que contribuyeron al colapso de la colmena tratada con malatión, lo que puede estar relacionado con la susceptibilidad genética entre las diferentes especies de *Apis mellifera*.
2. Valorar la actividad detoxificante de la *Apis mellifera*.
3. Realizar estudio de valoración de metabolitos de los plaguicidas.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ostiguy N, Drummond FA, Aronstein K, Eitzer B, Ellis JD, Spivak M, et al. Honey Bee Exposure to Pesticides: A Four-Year Nationwide Study. *Insects*. 2019;10(1).
2. Crenna E, Jolliet O, Collina E, Sala S, Fantke P. Characterizing honey bee exposure and effects from pesticides for chemical prioritization and life cycle assessment. *Environ Int*. 2020;138:105642.
3. Siviter H, Koricheva J, Brown MJF, Leadbeater E. Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. *J Appl Ecol*. 2018;55(6):2812-21.
4. Sanchez-Bayo F, Goulson D, Pennacchio F, Nazzi F, Goka K, Desneux N. Are bee diseases linked to pesticides? - A brief review. *Environ Int*. 2016;89-90:7-11.
5. Ruiz-Toledo J, Vandame R, Castro-Chan RA, Penilla-Navarro RP, Gomez J, Sanchez D. Organochlorine Pesticides in Honey and Pollen Samples from Managed Colonies of the Honey Bee *Apis mellifera* Linnaeus and the Stingless Bee *Scaptotrigona mexicana* Guerin from Southern, Mexico. *Insects*. 2018;9(2).
6. Zhu W, Schmehl DR, Mullin CA, Frazier JL. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS One*. 2014;9(1):e77547.
7. Chmiel JA, Daisley BA, Pitek AP, GJ T, 8:22. RG. Understanding the Effects of Sublethal Pesticide Exposure on Honey Bees: A Role for Probiotics as Mediators of Environmental Stress. *Front Ecol Evol*. 2020;8(22):1-19.
8. Pernal SF. The Social Life of Honey Bees. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2021;37(3):387-400.
9. Guzmán–Novoa E, Correa Benítez A, Espinosa Montaña LG, G. GN. Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México. *Veterinaria México*. 2011;42(2).
10. Jernigan CM. Bee anatomy: Arizona State University School of Life Sciences Ask A Biologist; 2017 [Available from: <https://askabiologist.asu.edu/honey-bee-anatomy>].
11. Martínez Pérez de Ayala LR, Martínez Puc JF, Cetzal-Ik WR. *Apicultura: Manejo, nutrición, sanidad y flora apícola*. 1 ed2017.
12. Camacho-Perez A. *Apuntes de Apicultura*. 1 ed2010.
13. Berenbaum MR, Calla B. Honey as a Functional Food for *Apis mellifera*. *Annu Rev Entomol*. 2021;66:185-208.
14. Lewkowski O, Muresan CI, Dobritzsch D, Fuszard M, Erlen S. The Effect of Diet on the Composition and Stability of Proteins Secreted by Honey Bees in Honey. *Insects*. 2019;10(9).
15. Chua LS, Lee JY, Chan GF. Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405(10):3063-74.
16. Moguel Ordóñez YB, Echazarreta Gonzalez C, Mora Escobedo R. Calidad fisicoquímica de la miel de abeja *Apis mellifera* producida en el estado de Yucatán durante diferentes etapas del proceso de producción y tipos de floración. *Técnica Pecuaria en México*. 2005;43(3):12.

17. Wright GA, Nicolson SW, Shafir S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. *Annu Rev Entomol.* 2018;63:327-44.
18. Ulloa JA, Mondragón Cortez PM, Rodríguez Rodríguez R, Reséndiz Vázquez JA, Rosas Ulloa P. La miel de abeja y su importancia. *Revista Fuente.* 2010;2(5):8.
19. Gangemi S, Gofita E, Costa C, Teodoro M, Briguglio G, Nikitovic D, et al. Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (Review). *Int J Mol Med.* 2016;38(4):1012-20.
20. Richardson JR, Fitsanakis V, Westerink RHS, Kanthasamy AG. Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol.* 2019;138(3):343-62.
21. Doménech J. Plaguicidas. Sus efectos en la salud humana. *OFFARM.* 2004;23(7):108-14.
22. Ramírez JA, Lacasaña M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición / Pesticides: classification, uses, toxicological aspects and exposure assesment. *Archivos de prevención de riesgos laborales.* 2001;4(2):67-75.
23. Fernández A., Daniel G., Mancipe G., C. L, C. FAD. Intoxicación por Organofosforados *Revista Med.* 2010;18(1):84-92.
24. Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, et al. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* 2015;16(5):490-1.
25. ICSC 0172 - MALATIÓN [Internet]. International Labour Organization. 2019. Available from: https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_lang=es&p_card_id=0172&p_version=2
26. ATSDR. Toxicological profile for malathion. In: Registry AftSaD, editor. 2013.
27. FAO W. Manual sobre la elaboración y uso de las especificaciones de plaguicidas de la FAO y la OMS. 1 ed2017.
28. NORMA Oficial Mexicana NOM-232-SSA1-2009. Plaguicidas: Que Establece Los Requisitos Del Envase, Embalaje y Etiquetado de Productos Grado Técnico y Para Uso Agrícola, Forestal, Pecuario, Jardinería, Urbano, Industrial y Doméstico, (2009).
29. NORMA Oficial Mexicana NOM-256-SSA1-2012. Condiciones Sanitarias Que Deben Cumplir Los Establecimientos Y Personal Dedicados A Los Servicios Urbanos De Control De Plagas Mediante Plaguicidas, (2012).
30. NORMA Oficial Mexicana NOM-045-SSA1-1993. Plaguicidas. Productos Para Uso Agrícola, Forestal, Pecuario, De Jardinería, Urbano E Industrial. Etiquetado, (1993).
31. NORMA Oficial Mexicana NOM-046-SSA1-1993. Plaguicidas. Productos Para Uso Doméstico-Etiquetado, (1993).
32. NORMA Oficial Mexicana NOM-004-SAG/GAN-2018, Producción De Miel Y Especificaciones, (2018).
33. Kim KH, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ.* 2017;575:525-35.
34. Comfort N, Re DB. Sex-Specific Neurotoxic Effects of Organophosphate Pesticides Across the Life Course. *Curr Environ Health Rep.* 2017;4(4):392-404.

35. INCHEM. Glyphosate: International Program in Chemical Safety; 1993 [Available from: <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc159.htm#SectionNumber:2.5>.
36. Bettazzi F, Romero Natale A, Torres E, Palchetti I. Glyphosate Determination by Coupling an Immuno-Magnetic Assay with Electrochemical Sensors. *Sensors (Basel)*. 2018;18(9).
37. Soydan E, Olcay AC, Bilir G, Tas O, Senturk M, Ekin D, et al. Investigation of pesticides on honey bee carbonic anhydrase inhibition. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020;35(1):1923-7.
38. Salazar-López NJ, Aldana Madrid ML. Herbicida Glifosato: Usos, toxicidad y regulación. *Revista Biotecnia*. 2011;13(2):23-8.
39. Van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, et al. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci Total Environ*. 2018;616-617:255-68.
40. Vazquez DE, Iliina N, Pagano EA, Zavala JA, Farina WM. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PLoS One*. 2018;13(10):e0205074.
41. Barascou L, Brunet JL, Belzunces L, Decourtye A, Henry M, Fourrier J, et al. Pesticide risk assessment in honeybees: Toward the use of behavioral and reproductive performances as assessment endpoints. *Chemosphere*. 2021;276:130134.
42. Hristov P, Shumkova R, Palova N, Neov B. Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Vet Sci*. 2020;7(4).
43. Danihlik J, Skrabisova M, Lenobel R, Sebela M, Omar E, Petrivalsky M, et al. Does the Pollen Diet Influence the Production and Expression of Antimicrobial Peptides in Individual Honey Bees? *Insects*. 2018;9(3).
44. Danihlik J, Aronstein K, Petřivalský M. Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*. 2015;54(2):123-36.
45. Gong Y, Diao Q. Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology*. 2017;26(1):1-12.
46. Hardstone MC, Scott JG. Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects? *Pest Management Science*. 2010;66(11):1171-80.
47. Johnson RM. Honey bee toxicology. *Annu Rev Entomol*. 2015;60:415-34.
48. Collison E, Hird H, Cresswell J, Tyler C. Interactive effects of pesticide exposure and pathogen infection on bee health - a critical analysis. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2016;91(4):1006-19.
49. Berenbaum MR, Johnson RM. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Curr Opin Insect Sci*. 2015;10:51-8.
50. Montella IR, Schama R, Valle D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(4):437-49.
51. Simone-Finstrom M, Li-Byarlay H, Huang MH, Strand MK, Rueppell O, Tarpy DR. Migratory management and environmental conditions affect lifespan and oxidative stress in honey bees. *Sci Rep*. 2016;6:32023.

52. Margotta JW, Roberts SP, Elekonich MM. Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Exp Biol.* 2018;221(Pt 14).
53. Carvalho SM, Belzunces LP, Carvalho GA, Brunet JL, Badiou-Beneteau A. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ Toxicol Chem.* 2013;32(9):2117-24.
54. Li Z, Hou M, Qiu Y, Zhao B, Nie H, Su S. Changes in Antioxidant Enzymes Activity and Metabolomic Profiles in the Guts of Honey Bee (*Apis mellifera*) Larvae Infected with *Ascospaera apis*. *Insects.* 2020;11(7).
55. Gregorc A, Alburaki M, Rinderer N, Sampson B, Knight PR, Karim S, et al. Effects of coumaphos and imidacloprid on honey bee (Hymenoptera: Apidae) lifespan and antioxidant gene regulations in laboratory experiments. *Sci Rep.* 2018;8(1):15003.
56. Roberts KE, Hughes WO. Immunosenescence and resistance to parasite infection in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol.* 2014;121:1-6.
57. Wilson-Rich N, Dres ST, Starks PT. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol.* 2008;54(10-11):1392-9.
58. Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, et al. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol.* 2006;15(5):645-56.
59. Vannette RL, Mohamed A, Johnson BR. Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Sci Rep.* 2015;5:16224.
60. Chmiel JA, Daisley BA, Burton JP, Reid G. Deleterious Effects of Neonicotinoid Pesticides on *Drosophila melanogaster* Immune Pathways. *mBio.* 2019;10(5).
61. O'Neal ST, Reeves AM, Fell RD, Brewster CC, Anderson TD. Chlorothalonil Exposure Alters Virus Susceptibility and Markers of Immunity, Nutrition, and Development in Honey Bees. *J Insect Sci.* 2019;19(3).
62. Motta EVS, Mak M, De Jong TK, Powell JE, O'Donnell A, Suhr KJ, et al. Oral or Topical Exposure to Glyphosate in Herbicide Formulation Impacts the Gut Microbiota and Survival Rates of Honey Bees. *Appl Environ Microbiol.* 2020;86(18).
63. Christen V, Fent K. Exposure of honey bees (*Apis mellifera*) to different classes of insecticides exhibit distinct molecular effect patterns at concentrations that mimic environmental contamination. *Environ Pollut.* 2017;226:48-59.
64. Li P, Chang M. Roles of PRR-Mediated Signaling Pathways in the Regulation of Oxidative Stress and Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14).
65. Ramond E, Jamet A, Ding X, Euphrasie D, Bouvier C, Lallemand L, et al. Reactive Oxygen Species-Dependent Innate Immune Mechanisms Control Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Virulence in the *Drosophila* Larval Model. *mBio.* 2021;12(3):e0027621.
66. Yang HT, Yang MC, Sun JJ, Guo F, Lan JF, Wang XW, et al. Catalase eliminates reactive oxygen species and influences the intestinal microbiota of shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 2015;47(1):63-73.
67. Badiou-Beneteau A, Carvalho SM, Brunet JL, Carvalho GA, Bulete A, Giroud B, et al. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*:

- application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012;82:22-31.
68. Klaassen CD. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 7a. ed. McGraw-Hill, editor 2008.
69. Kivrak İ, Kivrak Ş, Harmandar M. Development of a rapid method for the determination of antibiotic residues in honey using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Science and Technology.* 2016;36(1):90-6.
70. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1994;32:9-15.
71. Guidelines for Standard Method Performance Requirements AOAC Official Methods of Analysis, (2016).
72. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
73. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
74. Harwood GP, Dolezal AG. Pesticide-Virus Interactions in Honey Bees: Challenges and Opportunities for Understanding Drivers of Bee Declines. *Viruses.* 2020;12(5).
75. Ruiz-Toledo J, Sánchez-Guillén D. Efecto de la concentración de glifosato presente en cuerpos de agua cercanos a campos de soya transgénica sobre la abeja *Apis mellifera* y la abeja sin aguijón *Tetragonisca angustula*. *Acta Zoológica Mexicana.* 2014;30(2):408-13.
76. Alburaki M, Steckel SJ, Williams MT, Skinner JA, Tarpay DR, Meikle WG, et al. Agricultural Landscape and Pesticide Effects on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Biological Traits. *J Econ Entomol.* 2017;110(3):835-47.
77. Corbacho Soto M. Estudio del efecto del glifosato sobre el estrés oxidativo en las abejas: UIB - Universitat de les Illes Balears; 2020.
78. Tesovnik T, Zorc M, Ristanic M, Glavinic U, Stevanovic J, Narat M, et al. Exposure of honey bee larvae to thiamethoxam and its interaction with *Nosema ceranae* infection in adult honey bees. *Environ Pollut.* 2020;256:113443.
79. Li X, Schuler MA, Berenbaum MR. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol.* 2007;52:231-53.
80. Yu L, Yang H, Cheng F, Wu Z, Huang Q, He X, et al. Honey bee *Apis mellifera* larvae gut microbial and immune, detoxication responses towards flumethrin stress. *Environ Pollut.* 2021;290:118107.
81. Guo Y, Diao QY, Dai PL, Wang Q, Hou CS, Liu YJ, et al. The Effects of Exposure to Flupyradifurone on Survival, Development, and Foraging Activity of Honey Bees (*Apis mellifera* L.) under Field Conditions. *Insects.* 2021;12(4).
82. El-Nahhal Y. Pesticide residues in honey and their potential reproductive toxicity. *Sci Total Environ.* 2020;741:139953.
83. Badii MH, Garza-Almanza V. Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos. *Cultura Científica Y Tecnológica.* 2015;4(18):9-25.

11. ANEXOS

11.1 Constancia de curso básico de inmunidad innata.


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

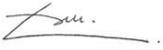
Otorgan la presente
CONSTANCIA
a
JOSE MANUEL ESPINOZA DOMINGUEZ

Por haber completado con éxito el
3er. Curso en Línea de Inmunología Básica

Realizado del 01 al 31 de agosto de 2021
Valor curricular: 96 horas teóricas

Ciudad de Aguascalientes a 31 de agosto de 2021.


Dr. José Antonio Enciso Moreno
PRESIDENTE SMI
2021-2023


Dra. Eva María Salinas Miralles
Universidad Autónoma de Aguascalientes
ORGANIZADORA DEL CURSO


Dr. Julio Enrique Castañeda Delgado
SECRETARIO-TESORERO SMI
2021-2023


Dr. Rommel Chacón Salinas
Instituto Politécnico Nacional
ORGANIZADOR DEL CURSO





11.2 Constancia de “III Curso Internacional de Inmunidad Innata en Salud y Enfermedades Infecciosas”.

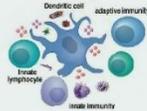
 

La Universidad Autónoma de Aguascalientes
Otorga la presente:

CONSTANCIA

A: JOSÉ MANUEL ESPINOZA DOMÍNGUEZ

Por haber acreditado el:



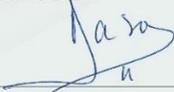
**III CURSO INTERNACIONAL
Inmunidad Innata en Salud
y Enfermedades Infecciosas**

Realizado de manera virtual del 20 de septiembre al 1º de octubre de 2021.

Obteniendo una calificación de: 8-OCHO-
Horas: 45 -cuarenta y cinco-
Créditos: 3 -tres-

Aguascalientes, Ags., México, 1º de Octubre de 2021.


Dr. en C. Francisco Javier Avelar González
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES


Dr. Daniel Scott-Algara
COORDINADOR DE RELACIONES DEL
INSTITUTO PASTEUR CON AMÉRICA LATINA

“SE LUMEN PROFERRE”

11.3 Constancia de participación en la XXI Reunión Internacional de Ciencias Médicas.



ANIVERSARIO 50 1971 2021
Departamento de Ciencias Médicas

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Departamento de Ciencias Médicas, División Ciencias de la Salud
Universidad de Guanajuato, Campus León

XXI Reunión Internacional de Ciencias Médicas

EVENTO VIRTUAL 8-10 septiembre 2021

Otorga la Presente

Constancia

KARLA IVON HERRERA GARCÍA

POR SU PARTICIPACIÓN CON EL TRABAJO LIBRE:
VALORACIÓN DE LA RESPUESTA AL METROTEXATO EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

EN COAUTORÍA CON:
ATHENEA NIEVES ARELLANO, FÁTIMA RAUDALES GARCÍA, JOSÉ MANUEL ESPINOZA DOMÍNGUEZ, ALEJANDRA GONZÁLEZ CARLOS, GUADALUPE JIMENA MARTÍNEZ REYES, CYNTHIA BERENICE RANGEL SAUCEDO, JULIO RAMÍREZ BARRANCO, GRETTEL MENDOZA ALMANZA, EDGAR LEÓN ESPARZA IBARRA, IRMA E. GONZÁLEZ CURIEL, SUSANA GODINA GONZÁLEZ

Dr. Victoriano Pérez Vázquez
Coordinador del Doctorado en Ciencias Médicas

Dr. Tonatiuh García Campos
Director de División de Ciencias de la Salud

Dra. Claudia Luévano Contreras
Directora del Departamento de Ciencias Médicas

Dra. Lorena del Rocio Ibarra Reynoso
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Médicas

11.4 Constancia de participación en XII CONGRESO NACIONAL DE TOXICOLOGÍA.

