



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE UN  
EXTRACTO DE *Agave lechuguilla* TORR. CON PROPIEDADES  
BIOHERBICIDAS EN *Artemia franciscana* (KELLOGG. 1906)  
COMO MODELO ECOTOXICOLÓGICO.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

**Carlos Alberto Galaviz Acosta**

La Paz, Baja California Sur, Julio de 2026.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las **14:25** horas del día **19** del mes de **junio** del año **2026**, se procedió por las personas abajo firmantes, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE UN EXTRACTO DE *Agave lechuguilla* TORR. CON PROPIEDADES BIOHERBICIDAS EN *Artemia franciscana* (KELLOGG, 1906) COMO MODELO ECOTOXICOLÓGICO"**




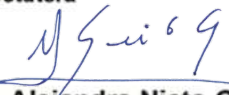
Presentada por el/la alumno/a:

**Carlos Alberto Galaviz Acosta**

Aspirante al Grado de MAESTRO/A EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones las personas integrantes de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Grado y nombre	Estatus	Firma
Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado	Codirectora	
Dr. Adrián Esteban Velázquez Lizárraga	Codirector	 Adrián Velázquez Lizárraga
Dra. Laurence Stephanie Mercier	Cotutora	 Mercier L.
	 Dra. Alejandra Nieto Garibay, Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos	



La Paz, Baja California Sur, a 23 de junio de 2026.

Los miembros del comité de tesis del estudiante CARLOS ALBERTO GALAVIZ ACOSTA del Programa de Maestría en Ciencias en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales con Orientación e Biotecnología, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo. Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

✓ iThenticate    Página 2 de 116 - Descripción general de integridad    Identificador de la entrega: troid:3117:602199404

### 19% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

**Filtrado desde el informe**

- Bibliografía
- Texto citado

---

**Fuentes principales**

- 18% Fuentes de Internet
- 10% Publicaciones
- 0% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

---

**Marcas de integridad**

N.º de alerta de integridad para revisión

- Caracteres reemplazados  
125 caracteres sospechosos en N.º de páginas  
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo. Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

**Herramienta antiplagio:**

iThenticate

**Filtros utilizados:**

Bibliografía

Texto citado

**Porcentajes de similitud:**

19%

Se muestra captura de pantalla

**Co/directores**


  
Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado

  
Dr. Adrián Esteban Velázquez Lizáraga

**Estudiante**

  
Carlos Alberto Galaviz Acosta

**Personal técnico de asesoría en el análisis**

  
Susana Luna García

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Directora de Tesis

Dr. Adrián Esteban Velázquez Lizárraga  
Universidad Autónoma de Coahuila  
Co-Director de Tesis

Dra. Laurence Stéphanie Mercier  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Tutora de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado  
Dr. Adrián Esteban Velázquez Lizárraga  
Dra. Laurence Stéphanie Mercier

### **Jurado de Examen**

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado  
Dr. Adrián Esteban Velázquez Lizárraga  
Dra. Laurence Stéphanie Mercier

### **Suplente**

Dr. Felipe de Jesús Asencio Valle

## Resumen

El extracto de *Agave lechuguilla* ha mostrado potencial bioherbicida contra malezas resistentes, como *Chenopodium album*; sin embargo, su seguridad ambiental aún no se ha evaluado. En este estudio se determinó la toxicidad aguda de un extracto obtenido del bagazo (*guishe*) de *A. lechuguilla* en *Artemia franciscana*, utilizada como modelo ecotoxicológico. Para ello, se integraron respuestas letales, bioquímicas, enzimáticas, moleculares y morfométricas.

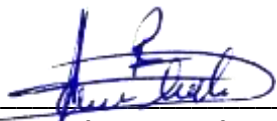
Los nauplios instar I de *A. franciscana* se expusieron durante 24 h a seis concentraciones del extracto (250-1,500 µg/mL) y a un control negativo. La mortalidad se analizó mediante Probit para estimar CL<sub>10</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>, cuyos valores fueron 97, 214 y 799 µg/mL, respectivamente. Posteriormente, organismos expuestos a estas concentraciones en un bioensayo piloto mostraron un aumento de carbohidratos (2.7 veces) y de lípidos totales (1.9 veces) en CL<sub>50</sub>, sin cambios significativos en proteínas. La actividad antioxidante presentó un patrón diferencial: la catalasa fue mayor en CL<sub>25</sub> (9.19 U/mg proteína), mientras que superóxido dismutasa y glutatión reductasa aumentaron en CL<sub>50</sub> (13.92 y 1.02 U/mg proteína). Además, se observó una reducción del diámetro corporal en CL<sub>10</sub>, un engrosamiento de la cutícula y una disminución del lumen digestivo en CL<sub>50</sub>. A nivel génico, se aumentó la expresión de *AfGST* en CL<sub>25</sub> y se disminuyó la de *AfjBUG* en CL<sub>50</sub>, lo que sugiere afectación en procesos asociados con la reparación del ADN.

En conjunto, el extracto de *A. lechuguilla* induce toxicidad aguda dependiente de la concentración en *A. franciscana*, altera el metabolismo energético, activa diferencialmente el sistema antioxidante, modula genes de estrés y provoca daño tisular. Aunque no es inocuo para organismos no objetivo, estos resultados no descartan su potencial bioherbicida y aportan concentraciones de referencia para futuros estudios regulatorios y estrategias de mitigación.

**Palabras clave:** Toxicidad aguda, *Agave lechuguilla*, *Artemia franciscana*, estrés oxidativo, bioherbicida.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-2096-9104>

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado



Dr. Adrián Esteban Velázquez Lizáraga

## Summary

The extract of *Agave lechuguilla* exhibits promising bioherbicidal properties against resistant weeds such as *Chenopodium album*, but its environmental safety has not been evaluated. In this study, the acute toxicity of an extract from the bagasse (guishe) of *A. lechuguilla* was determined using *Artemia franciscana* as an ecotoxicological model, integrating lethal, biochemical, enzymatic, molecular, and morphometric responses.

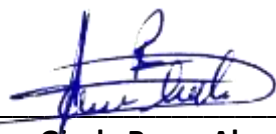
First-instar nauplii of *A. franciscana* were exposed for 24 hours to six concentrations of the extract (250-1,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and a negative control. Mortality was analyzed using Probit to estimate  $\text{CL}_{10}$ ,  $\text{CL}_{25}$ , and  $\text{CL}_{50}$ , which were 97, 214, and 799  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Subsequently, organisms exposed to these concentrations in a pilot bioassay showed increases in carbohydrates (2.7-fold) and total lipids (1.9-fold) at the  $\text{CL}_{50}$ , with no significant changes in proteins. The antioxidant activity exhibited a differential pattern: catalase activity was higher at  $\text{CL}_{25}$  (9.19 U/mg protein), whereas superoxide dismutase and glutathione reductase activities increased at  $\text{CL}_{50}$  (13.92 and 1.02 U/mg protein). Additionally, a reduction in body diameter was observed at  $\text{CL}_{10}$ , along with cuticle thickening and a decrease in the digestive lumen at  $\text{CL}_{50}$ . At the genetic level, *AfGST* expression increased at  $\text{CL}_{25}$ , while *AfjBUG* decreased at  $\text{CL}_{50}$ , suggesting effects on DNA repair processes.

Overall, the *A. lechuguilla* extract induces concentration-dependent acute toxicity in *A. franciscana*, alters energy metabolism, differentially activates the antioxidant system, modulates stress-related genes, and causes tissue damage. Although it is not harmless to non-target organisms, these results do not rule out its potential as a bioherbicide and provide reference concentrations for future regulatory studies and mitigation strategies.

**Keywords:** Acute toxicity, *Agave lechuguilla*, *Artemia franciscana*, oxidative stress, bioherbicide

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-2096-9104>

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado



Dr. Adrián Esteban Velázquez Lizáraga

## Dedicatoria

- A mi mejor amigo y padre Armando Enrique Galaviz Galicia, porque, a pesar de que pruebo su paciencia todos los días, desde el principio ha estado apoyándome y brindándome cariño.
- A mi mejor amiga y madre Julia Guadalupe Acosta Almada, tu amor, comprensión y entendimiento me han hecho crecer como persona, lo quiera o no.
- A mi abuela María Guadalupe Almada García, que me alimentó y me dio techo cuando más hambre y frío tuve, y me ha visto en mis peores y mejores momentos.
- A mi abuelo Gaspar Acosta Pérez, por enseñarme sobre la nobleza y la importancia de la familia. Su ausencia me inspira a seguir adelante todos los días.
- A mis compañeros emplumados y los de cuatro patas, que me han hecho compañía a lo largo de todo el proceso.
- A mi comité de tesis, por no rendirse con un estudiante tan complicado y distraído, estaré por siempre agradecido

## **Agradecimientos**

A la **Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)** por la beca de posgrado asignada con el número 4030593, cuyo apoyo financiero fue fundamental para mi dedicación exclusiva a este proyecto de investigación durante mi formación como maestro en ciencias.

Al **Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)** por brindarme acceso a sus instalaciones y equipos de trabajo, recursos fundamentales para la ejecución de esta investigación.

A mis codirectores de tesis, la **Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado** y el **Dr. Adrián Esteban Velázquez Lizárraga**, así como a mi tutora, la **Dra. Laurence Stéphanie Mercier**, por su invaluable guía, acompañamiento constante y apoyo brindado a lo largo de esta investigación. Su experiencia y dedicación fueron fundamentales para la culminación de este trabajo.

Al **Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle** por permitirnos trabajar en su laboratorio de Patogénesis Microbiana y hacer uso de sus equipos e instrumentos, los cuales fueron esenciales para el desarrollo de diversos análisis de esta investigación.

Al Técnico **Jesús Antonio Villavicencio Aguilar** y a **Pedro García Luna** por el préstamo de tinas y espacio, así como por su apoyo técnico en el invernadero agroacuícola durante el bioensayo con *Artemia franciscana*.

Al **Dr. Leopoldo Javier Rios González** y a su grupo de investigación, en especial al **M. en C. Gustavo Neyra Escobedo** del Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, por su valiosa colaboración técnica, asesoría y apoyo en diversas etapas de este trabajo.

A la **Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro** por facilitarnos el uso del termociclador tiempo real, así como al **Dr. Julio Antonio Hernández González**, técnico del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por su apoyo técnico fundamental durante la fase experimental de este proyecto.

A la **Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo** y a la **Técnico Eulalia Meza Chávez** del Laboratorio de Histología e Histoquímica, por su valiosa guía y apoyo durante el procesamiento de las muestras para los análisis histológicos de esta tesis.

A los técnicos del edificio A: **M. en C. Delia Irene Rojas Posadas** del Laboratorio de Genética Molecular, al **Dr. Jesús Martín Ramírez Orozco** del Laboratorio de Inmunogenómica Marina, y al **M. en C. René Rodolfo Rebollar Prudente** del Laboratorio de Biotecnología Marina, por su disposición y apoyo técnico brindado durante el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Paola Magallón Servín** por proporcionarnos agua dulce para los bioensayos, así como a **Eric Javier Abraham Jaramillo, Yanet Márquez Talamantes** y al **M. en C. Salvador Gerardo Reyes León** por su valioso apoyo durante el muestreo y la toma de muestras.

A la técnico **Ing. Francisca Griselda Peña Armenta** del Laboratorio de Absorción Atómica, por su apoyo en el análisis de componentes iónicos y por la preparación del agua desionizada utilizada en diversos procedimientos de esta investigación.

Al **M. en C. Roberto Hernández Herrera** y a la **Técnico Griselda Francisca Gallegos Simental** del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica, por su apoyo en el procesamiento de las muestras para los análisis bioquímicos de este trabajo.

A la **Dra. Martha Heidi Bedolla Torres** del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por todo su apoyo técnico y disposición durante el desarrollo de esta investigación.

Al personal del Taller de Maquinados, **Jorge Cobos Anaya** y **Alfonso Álvarez Casillas**, por su apoyo en la construcción del sistema de eclosión de *Artemia* utilizado en los bioensayos.

Al técnico **Julián Alfonso Garzón Favela** y **Biol. Gabriel González Gómez** del Laboratorio de Microalgas, por proporcionar microalga fresca como alimento para los organismos durante los bioensayos.

A los técnicos que nos proporcionaron agua de mar: **Tec. Gabriel Robles Villegas** del Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola, **Tec. Francisco Javier Encarnación Ramírez** del Laboratorio de Nutrición Experimental, a la **M. en C. Roxana Bertha Inohuye Rivera** del Laboratorio de

Diagnóstico Parasitológico, y al **Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola**, por su invaluable apoyo en la obtención de insumos clave para los bioensayos.

Al personal de la Dirección de Estudios de Posgrado: a la **Dra. Alejandra Nieto Garibay** (Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos), a la **Mtra. Oselvia Ibarra Morales** (Jefa del Departamento de Control Escolar), a **Tania Verónica Núñez Valdez** (Asistente del Departamento de Control Escolar), a **Adriana Teresa Franzoni García** (Secretaria de la Dirección de Posgrado), al **Ing. Horacio Sandoval Gómez** (Laboratorio de Cómputo) y a **Susana Luna García** (Biblioteca), por su eficiente gestión y disposición para apoyarnos durante mi estancia en el CIBNOR.

## Contenido

Resumen .....	i
Summary .....	ii
Dedicatoria .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Contenido.....	vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xi
Abreviaturas .....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1 La problemática de los herbicidas sintéticos: el caso del glifosato .....	3
2.1.1 El glifosato: origen, modo de acción y uso global .....	3
2.1.2 Impactos del glifosato en la salud y el ambiente .....	4
2.2 Búsqueda de alternativas sostenibles: Los bioherbicidas .....	5
2.2.1 Definición y tipos de bioherbicidas. ....	5
2.2.2 Ventajas y desafíos en el desarrollo de bioherbicidas .....	6
2.3 El bagazo de <i>Agave lechuguilla</i> como fuente de compuestos bioactivos .....	7
2.3.1 Generalidades del <i>Agave lechuguilla</i> .....	7
2.3.2 Metabolitos secundarios con potencial herbicida en <i>Agave</i> spp. ....	8
2.3.3 El extracto de <i>Agave lechuguilla</i> como bioherbicida .....	8
2.4 <i>Artemia</i> spp. como organismo modelo en ecotoxicología.....	9
2.4.1 Características biológicas que la hacen un modelo ideal.....	9
2.4.2 Aplicaciones del modelo <i>Artemia</i> en ensayos de toxicidad .....	9
2.4.3 Antecedentes de estudios toxicológicos con <i>Artemia franciscana</i> .....	10
2.4.4 Ventajas y limitaciones del modelo.....	11
2.5 Biomarcadores de toxicidad y estrés en organismos acuáticos .....	12
2.5.1 Biomarcadores de estrés oxidativo .....	13
2.5.2 Biomarcadores de metabolismo energético .....	13
2.5.3 Biomarcadores de expresión génica .....	14
2.5.4 Biomarcadores histopatológicos .....	14
2.5.5 Aplicación de biomarcadores en la evaluación de bioherbicidas .....	15
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>18</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
5.1 Objetivo general .....	19
5.2 Objetivos específicos .....	19
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
6.1 Material biológico e identificación molecular .....	20
6.2 Determinación de la concentración letal 50 (CL50) .....	21
6.3 Diseño experimental para el bioensayo a escala piloto .....	23
6.3.1 Eclosión y preparación de organismos.....	24
6.3.2 Muestreo y procesamiento de organismos.....	25
6.3.3 Obtención y almacenamiento de muestras .....	26
6.4 Determinación de carbohidratos, lípidos y proteínas totales .....	26

6.4.1 Carbohidratos totales.....	26
6.4.2 Lípidos totales .....	27
6.4.3 Proteínas totales.....	27
6.5 Determinación de enzimas antioxidantes .....	27
6.5.1 Cuantificación de proteínas totales.....	28
6.5.2 Actividad de catalasa (CAT) .....	28
6.5.3 Actividad de superóxido dismutasa (SOD) .....	28
6.5.4 Actividad de glutatión reductasa (GR).....	29
6.6 Expresión relativa de genes.....	29
6.6.1 Extracción de ARN total.....	29
6.6.2 Cuantificación y verificación de la integridad del ARN total .....	31
6.6.3 Síntesis de ADN complementario.....	31
6.6.4 Diseño de oligonucleótidos para RT-qPCR .....	31
6.6.5 Preparación de mezcla maestra y cálculo de curvas estándar .....	32
6.6.6 Estabilidad de genes de referencia y cálculo de expresión relativa .....	33
6.6.7 Cálculo de expresión relativa y análisis estadístico .....	34
6.7 Análisis histológico y morfometría .....	35
6.7.1 Fijación de tejidos.....	35
6.7.2 Procesamiento histológico e inclusión en parafina.....	35
6.7.3 Captura de imágenes y análisis morfométrico.....	36
6.8 Análisis estadísticos .....	36
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
7.1 Identificación molecular .....	38
7.2 Determinación de la concentración letal 50 (CL <sub>50</sub> ), CL <sub>25</sub> y CL <sub>10</sub> del extracto de <i>Agave lechuguilla</i> en nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	39
7.2.1 Cálculo de medias ponderadas .....	40
7.3 Perfil bioquímico fisiológico: carbohidratos, proteínas y lípidos totales .....	41
7.4 Actividad de enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GR).....	45
7.5 Expresión relativa de genes.....	46
7.5.1 Calidad del ARN total .....	46
7.5.2 Cálculo de la eficiencia de los oligonucleótidos.....	48
7.5.3 Estabilidad de genes de referencia.....	50
7.5.4 Expresión relativa de genes.....	51
7.6 Morfometría por histología de <i>Artemia franciscana</i> expuesta a concentraciones letales del extracto.....	53
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
8.1 Valor de CL <sub>50</sub> en contexto ecotoxicológico.....	57
8.2 Mecanismos de toxicidad aguda .....	58
8.2.1 Alteraciones del metabolismo energético y respuesta antioxidante .....	58
8.2.2 Respuesta molecular (GST, HSP70 y jBUG).....	61
8.2.3 Alteraciones histológicas e integración de los biomarcadores .....	65
8.3 Implicaciones de los resultados en el desarrollo de bioherbicida .....	67
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>72</b>
<b>10. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>74</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>82</b>
Anexo A.- Diagrama de los parámetros morfométricos .....	82

## Lista de figuras

- Figura 1.** Diseño experimental para evaluar la  $CL_{50}$  del extracto de *Agave lechuguilla* en nauplios de *Artemia franciscana*. Los grupos de control únicamente contenían 6 mL de agua salobre a 15 UPS, los números corresponden a la concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que se agregó en cada pozo de extracto en un volumen de 6 mL. Todos los pozos contenían 10 nauplios de *Artemia franciscana*. .....22
- Figura 2.** Distribución de las unidades experimentales en el bioensayo. Se emplearon tres tinas independientes (**Tina A**, **Tina B** y **Tina C**). En cada tina se colocaron cuatro cubetas de 20 L correspondientes a los tratamientos: control (C), concentración letal 10 ( $CL_{10}$ ), concentración letal 25 ( $CL_{25}$ ) y concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ). Cada tratamiento se estableció en triplicado ( $n = 3$ ), con una réplica por tina. ....24
- Figura 3.** Gráfico de cajas y bigotes que muestra la distribución de las concentraciones letales  $CL_{50}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{10}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) del extracto de *Agave lechuguilla* sobre nauplios de *Artemia franciscana*, calculadas a partir de cinco experimentos independientes. Para cada parámetro ( $n = 5$ ), la caja representa el rango intercuartil (**Q1–Q3**), la línea interna indica la mediana, y los bigotes se extienden hasta los valores mínimo y máximo. ....41
- Figura 4.** Contenido de **(A)** carbohidratos totales, **(B)** proteínas totales y **(C)** lípidos totales ( $\text{mg}/\text{g}$  peso seco) en *Artemia franciscana* expuesta a las concentraciones  $CL_{10}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{50}$  del extracto de *Agave lechuguilla*. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar ( $n = 3$ ). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba *post hoc* correspondiente (Holm-Šídák para carbohidratos, Tukey para lípidos;  $p < 0.05$ ).....42
- Figura 5.** Análisis multivariado del perfil bioquímico. **(A)** Mapa de calor del perfil bioquímico de *Artemia franciscana* expuesta por 24 h a diferentes concentraciones letales del extracto de *Agave lechuguilla*. Los valores estandarizados (escala Z) se representan en una gradiente de color desde azul (valores bajos) hasta rojo (valores altos). **(B)** Biplot del Análisis de Componentes Principales (PCA) mostrando la distribución de los tratamientos (puntos) y la contribución de las variables (flechas). ....44
- Figura 6.** Actividad de enzimas antioxidantes en *Artemia franciscana* expuesta a diferentes concentraciones del extracto de *Agave lechuguilla*. **(A)** Catalasa (CAT) donde 1 U se define como 1  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido por min, **(B)** Superóxido dismutasa (SOD) donde 1 U se define como 50% de inhibición de la reducción del NBT por min, **(C)** Glutatión reductasa (GR), donde 1 U se define como 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{TNB}^-$  formado por min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar ( $n = 3$ ). **(D)** Mapa de calor de los valores estandarizados de las tres enzimas antioxidantes. ....46
- Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ARN total extraído de *Artemia franciscana*. MW: marcador de peso molecular de 1 kb plus DNA ladder (pb). Los números sobre cada carril corresponden al código de gel indicado en la Tabla 4. ....48
- Figura 8.** Expresión relativa de genes en nauplios de *Artemia franciscana* expuesta a diversas concentraciones letales del extracto de *Agave lechuguilla*. **(A)** Glutatión S-transferasa (*AfGST*). Los datos se presentan como mediana y percentiles 25-75 ( $n = 3$ ). **(B)** Proteína de choque térmico 70 kDa (*AfHSP70*). **(C)** Proteína Jitterbug (*AfJBUG*). Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). La línea horizontal punteada representa el nivel basal del control (valor = 1).....52
- Figura 9.** Micrografías de cortes transversales de nauplios de *Artemia franciscana* expuestos a concentraciones letales del extracto de *Agave lechuguilla* por 24 h. **(A-C)** Control, **(D-F)**  $CL_{10}$ , **(G-I)**  $CL_{25}$ , **(J-L)**  $CL_{50}$ . La barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ .....54

**Figura 10.** Morfometría de nauplios de *Artemia franciscana* expuestos al extracto de *Agave lechuguilla*. **(A)** Diámetro corporal total (R1), **(B)** Espesor de la cutícula (R2), **(C)** Tamaño del lumen digestivo (R3). Los datos se presentan como gráficos de cajas y bigotes ( $n = 7-13$ ). La caja representa el rango intercuartil (**Q1-Q3**), la línea interna indica la mediana, los bigotes se extienden hasta los valores mínimo y máximo. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey,  $p < 0.05$ ).....55

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Resultados del alineamiento BLASTn para el gen <i>18S rRNA</i> y <i>COI</i> de <i>Artemia</i> spp. ....	39
<b>Tabla 2.</b> Valores de concentración letal (CL <sub>10</sub> , CL <sub>25</sub> y CL <sub>50</sub> ) del extracto de <i>Agave lechuguilla</i> determinados en cinco bioensayos independientes. Se muestran los valores de CL <sub>50</sub> , CL <sub>25</sub> y CL <sub>10</sub> (µg/mL), junto con intervalos de confianza al 95 % (IC 95 %) de la CL <sub>50</sub> .....	39
<b>Tabla 3.</b> Valores ponderados de concentración letal (CL <sub>50</sub> , CL <sub>25</sub> y CL <sub>10</sub> ) del extracto de <i>Agave lechuguilla</i> calculados a partir de cinco bioensayos independientes. IC 95% significa intervalo de confianza al 95%. ....	40
<b>Tabla 4.</b> Concentración y pureza del ARN total extraído de <i>Artemia franciscana</i> . ....	47
<b>Tabla 5.</b> Características de los oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR. Los valores de la temperatura del pico disociación muestran la media ± desviación estándar ( <i>n</i> = 15). S: refiere a la secuencia sentido y A: a la secuencia antisentido. ....	49
<b>Tabla 6.</b> Clasificación de la estabilidad de los genes de referencia según cada algoritmo. ....	51

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AFA</b>	Ácido acético-formol-alcohol (solución de Davidson)
<b>AMPA</b>	Ácido aminometilfosfónico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza ( <i>Analysis of variance</i> )
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNi</b>	ARN de interferencia
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina ( <i>Bovine serum albumin</i> )
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CES</b>	Mezcla de potenciadores de amplificación (betaína, DTT, DMSO, BSA)
<b>CL<sub>x</sub></b>	Concentración letal para el x% de la población
<b>COI</b>	Citocromo c oxidasa subunidad I
<b>Cq</b>	Ciclo de cuantificación
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNasa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótido trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EPSPS</b>	5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FD</b>	Factor de dilución
<b>g</b>	Gramo(s)
<b><i>g</i></b>	Aceleración de la gravedad (fuerza centrífuga)
<b>GC</b>	Guanina-citosina
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>GST</b>	Glutación S-transferasa
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HCIB</b>	Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
<b>HPLC-MS/MS</b>	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem
<b>HSP70</b>	Proteína de choque térmico de 70 kDa
<b>IARC</b>	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
<b>IC 95%</b>	Intervalo de confianza del 95%
<b>INIFAP</b>	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
<b>ITS</b>	Espaciador interno transcripto ( <i>Internal transcribed spacer</i> )
<b>KEGG</b>	Enciclopedia de genes y genomas de Kioto ( <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> )
<b>L</b>	Litro(s)
<b>LED</b>	Diodo emisor de luz ( <i>Light-emitting diode</i> )
<b>M</b>	Molar
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>mg</b>	Miligramo(s)
<b>min</b>	Minuto(s)
<b>mL</b>	Mililitro(s)
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MS</b>	Murashige y Skoog (medio de cultivo)
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazolio
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
<b>NER</b>	Reparación por escisión de nucleótidos ( <i>Nucleotide excision repair</i> )
<b>ng</b>	Nanogramo(s)
<b>nm</b>	Nanómetro(s)
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>NTC</b>	Control sin templado ( <i>No template control</i> )
<b>OCDE</b>	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
<b>ONU</b>	Organización de las Naciones Unidas
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>PLTX</b>	Palitoxina

<b>POEA</b>	Polioxietilamina
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa o PCR en tiempo real
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficiente de determinación
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno ( <i>Reactive oxygen species</i> )
<b>rRNA</b>	ARN ribosomal
<b>RT-qPCR</b>	Transcriptasa inversa seguida de PCR cuantitativa
<b>s</b>	Segundo(s)
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>Tm</b>	Temperatura de disociación ( <i>Melting temperature</i> )
<b>TNB<sup>-</sup></b>	Ácido 2-nitro-5-tiobenzoico
<b>U</b>	Unidad (enzimática)
<b>UPS</b>	Unidades prácticas de salinidad ( <i>Practical salinity units</i> )
<b>USEPA</b>	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Voltio(s)
<b>µg</b>	Microgramo(s)
<b>µL</b>	Microlitro(s)
<b>µm</b>	Micrómetro(s)
<b>µM</b>	Micromolar
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>× g</b>	Fuerza centrífuga relativa (veces la gravedad)
<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>8-OHdG</b>	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

## 1. INTRODUCCIÓN

El sector agrícola es un componente importante de la economía y de la seguridad alimentaria mundial. Se estima que, para satisfacer las necesidades de una población global proyectada de 9,700 millones de personas para el año 2050, será necesario incrementar significativamente la productividad agrícola (Baldos & Hertel, 2014; Lutz & KC, 2010). Este desafío ha impulsado el desarrollo y la adopción de diversas estrategias destinadas a mejorar la eficiencia de los sistemas de producción, entre ellas el control de especies vegetales no deseadas o arvenses, cuya presencia reduce el rendimiento y la calidad de los cultivos.

A pesar de su efectividad, en los últimos años se ha acumulado evidencia que relaciona al glifosato, un herbicida de amplio espectro, con diversos efectos adversos sobre la salud y el medio ambiente. Diversos estudios han documentado su capacidad para inducir estrés oxidativo, alterar procesos endocrinos y afectar organismos no objetivo (Chang et al., 2023; IARC, 2017; Muñoz et al., 2021). Asimismo, su amplia utilización ha favorecido su dispersión en distintos compartimentos ambientales, incluyendo suelos y cuerpos de agua, donde puede impactar a especies acuáticas y terrestres (Battaglin et al., 2014; Darmani & Al-Saleh, 2023; Mesnage et al., 2015). Estas preocupaciones han motivado restricciones regulatorias en distintos países y han impulsado la búsqueda de alternativas más sostenibles para el control de malezas (Pérez-Vázquez et al., 2024). Entre las posibles alternativas destacan los bioherbicidas, productos derivados de organismos vivos o de sus metabolitos que poseen actividad fitotóxica (Bailey, 2014). En este contexto, el extracto obtenido del bagazo de *Agave lechuguilla* ha mostrado resultados prometedores como agente bioherbicida, particularmente por su capacidad para inhibir la germinación y el crecimiento de especies vegetales de importancia agrícola (Sánchez Robles et al., 2023). Además de representar una alternativa potencial a los herbicidas convencionales, su aprovechamiento permitiría valorizar un subproducto generado en grandes cantidades durante la extracción de fibra del *A. lechuguilla* (Carmona et al., 2017; Reyes-Agüero et al., 2000).

No obstante, la eficacia herbicida de un producto constituye únicamente uno de los criterios necesarios para su eventual aplicación. La evaluación de sus posibles efectos sobre organismos no objetivo es un requisito indispensable para determinar su viabilidad ambiental. Aspectos como la toxicidad, la bioacumulación, la persistencia y los mecanismos de respuesta biológica deben

considerarse antes de proponer cualquier compuesto como alternativa sostenible para el manejo de arvenses.

Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la toxicidad aguda de un extracto de *Agave lechuguilla* con propiedades bioherbidas mediante el uso de *Artemia franciscana* como organismo modelo ecotoxicológico. La *Artemia* es ampliamente utilizada en estudios de toxicidad debido a su sensibilidad, facilidad de cultivo y relevancia como organismo indicador en ecosistemas acuáticos (Morgan et al., 2019; Souza et al., 2024). Para ello, se determinaron concentraciones letales y se analizaron respuestas bioquímicas, enzimáticas, moleculares e histológicas que permitieran caracterizar de manera integral los efectos del extracto en un organismo acuático no objetivo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 La problemática de los herbicidas sintéticos: el caso del glifosato

El glifosato (*N*-(fosfometil)glicina) es el herbicida más efectivo que existe y a su vez, el más polémico en la historia de la agricultura. Desde su comercialización en 1974, su uso ha aumentado exponencialmente, hasta convertirse en el herbicida más utilizado en el mundo, modernizando las prácticas de manejo de malezas (Duke, 2018; Duke & Powles, 2008). Su éxito sin precedentes se basa en una combinación de características: un modo de acción único y efectivo que inhibe la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) en las plantas, permitiendo un control eficaz de arvenses, y además un perfil toxicológico agudo inicialmente favorable para los animales no objetivo (como mamíferos y aves), ya que carecen de la enzima EPSPS, el objetivo molecular del herbicida (Duke, 2018; Duke & Powles, 2008; Maeda & Dudareva, 2012). El desarrollo de cultivos genéticamente modificados resistentes al glifosato (*Roundup Ready*®) a mediados de los años 90 marcó un punto de inflexión, catapultando su uso a niveles sin precedentes y consolidando un paquete tecnológico que prometía una solución simple y económica para el control de las arvenses a escala mundial (Green & Siehl, 2021). La dependencia global casi exclusivamente de una sola molécula, no fue una solución definitiva, generando una serie de problemas ambientales complejos, como la evolución de malezas resistentes al herbicida, los posibles efectos carcinogénicos y la contaminación generalizada de ecosistemas acuáticos y terrestres, lo que llevó a múltiples países, incluido México, a restringir o prohibir su uso y/o comercialización (AFP, 2023; Arellano Aguilar et al., 2025; Klátyik et al., 2025; T. Zhang et al., 2026).

#### 2.1.1 El glifosato: origen, modo de acción y uso global

La historia del glifosato se remonta a 1950, cuando el químico suizo Henri Martin, trabajando para la compañía farmacéutica Cilag, sintetizó por primera vez la molécula *N*-(fosfometil)glicina en busca de nuevos compuestos con aplicaciones terapéuticas. Al no encontrarle propiedades farmacológicas de interés, la molécula fue comercializada y, posteriormente, llegó a la empresa Monsanto (Székács & Darvas, 2011). El potencial del glifosato fue descubierto dos décadas después, en 1970, cuando el Dr. John E. Franz, químico orgánico de Monsanto (adquirido por Bayer en 2016), identificó sus propiedades herbicidas mientras investigaba compuestos

fosfonados (Dill et al., 2010). Franz y su equipo descubrieron que esta molécula, que inicialmente se había sintetizado sin un propósito agrícola, poseía una capacidad excepcional para eliminar malezas anuales y perennes (Duke & Powles, 2008). El compuesto fue patentado como herbicida y comercializado por primera vez en 1974 bajo el nombre comercial de *Roundup*<sup>®</sup>, marcando el inicio de una nueva era en el control químico de arvenses (Duke & Powles, 2008).

### **2.1.2 Impactos del glifosato en la salud y el ambiente**

La percepción inicial del glifosato como un herbicida de bajo riesgo para la salud animal y humana cambió drásticamente al acumularse evidencia de sus posibles efectos adversos, lo que desató una intensa controversia a nivel global (Mesnage et al., 2015). El punto de inflexión ocurrió en 2015, cuando la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) lo clasificó como "probable cancerígeno para los humanos" (Grupo 2A), con base en estudios que demostraban su capacidad para inducir estrés oxidativo y daño al ADN en modelos experimentales (Mesnage et al., 2015). Más allá de esta controversia, investigaciones posteriores revelaron que el glifosato y sus formulaciones comerciales pueden afectar funciones celulares fundamentales, como la fosforilación oxidativa en las mitocondrias, lo que altera el metabolismo energético y potencia el daño celular (Peixoto, 2005; Pereira et al., 2018). Adicionalmente, se ha documentado que el glifosato actúa como disruptor endocrino, afectando la síntesis de hormonas esteroides y provocando efectos teratogénicos, tumorigénicos, hepáticos y renales incluso en concentraciones por debajo de los límites regulatorios establecidos (Mesnage et al., 2015). En un estudio reciente, Panzacchi *et al.*, (2025) expusieron ratas Sprague-Dawley a glifosato y a dos herbicidas a base de glifosato (*Roundup Bioflow* y *RangerPro*) desde el día 6 de gestación hasta las 104 semanas de edad. El glifosato se administró en el agua de beber a tres dosis equivalentes a la ingesta diaria admisible (0.5 mg/kg/día) de la Unión Europea (UE), a 5 mg/kg/día y al nivel sin efecto adverso observado (50 mg/kg/día) de la UE. Los resultados mostraron un aumento en la incidencia de neoplasias malignas en múltiples órganos, incluyendo leucemias y tumores en hígado, tiroides y páncreas, así como una reducción en la supervivencia durante el primer año de vida en las ratas expuestas (Panzacchi et al., 2025).

El uso masivo de glifosato ha resultado en una contaminación generalizada de suelos y cuerpos de agua. Estudios realizados en Estados Unidos entre 2001 y 2010 detectaron glifosato y su

principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), en el 17.9% de las muestras analizadas, encontrándose con mayor frecuencia en suelos y sedimentos, canales de drenaje, precipitación pluvial, ríos y arroyos (Battaglin et al., 2014). El AMPA presenta una persistencia ambiental significativamente mayor que el glifosato, con una vida media que oscila entre 76 y 240 días, lo que contribuye a su acumulación en los ecosistemas (Pérez-Vázquez et al., 2024). Tanto el glifosato como el AMPA, junto con los coadyuvantes presentes en las formulaciones comerciales como el surfactante polioxietilamina (POEA), han demostrado toxicidad en diferentes tejidos y órganos de especies terrestres y acuáticas (Pérez-Vázquez et al., 2024). En crustáceos como la *Artemia salina*, la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de Roundup® (0.72 µg/mL de glifosato) afecta el desarrollo temprano, disminuyendo la longitud corporal y reduciendo el ancho de la cola, el abdomen y la cabeza, mientras que concentraciones superiores a 72 µg/mL inhiben completamente la eclosión de los quistes (Darmani & Al-Saleh, 2023). La evidencia de daño ambiental y a la salud ha llevado a numerosos países, incluyendo México, a restringir o prohibir su uso, subrayando la urgencia de desarrollar alternativas sostenibles para el control de malezas (DOF, 2023).

## **2.2 Búsqueda de alternativas sostenibles: Los bioherbicidas**

### **2.2.1 Definición y tipos de bioherbicidas.**

Un bioherbicida se define como un producto derivado de organismos vivos (animales, plantas y microorganismos) o de sus metabolitos naturales, capaz de suprimir el crecimiento de malezas de manera selectiva (Bailey, 2014). Los bioherbicidas se clasifican generalmente en tres grandes categorías según su origen y composición. La primera categoría comprende los bioherbicidas microbianos, los cuales contienen microorganismos vivos (hongos, bacterias o virus) que actúan como agentes de control, ya sea infectando directamente a la maleza o produciendo toxinas que inhiben su desarrollo (Mathur & Gehlot, 2018; Zhang et al., 2025). La segunda categoría son los bioherbicidas botánicos o de extractos vegetales, los cuales contienen compuestos naturales como aceites esenciales, aleloquímicos o metabolitos secundarios extraídos de plantas con actividad fitotóxica (Ghosh, 2023). La tercera categoría corresponde a los bioherbicidas bioquímicos, que incluyen compuestos purificados o sintetizados a partir de fuentes naturales que interfieren con procesos bioquímicos específicos de las malezas, como la síntesis de pigmentos, la fotosíntesis o la división celular (Ghosh, 2023; Zhang et al., 2025).

### 2.2.2 Ventajas y desafíos en el desarrollo de bioherbicidas

Los bioherbicidas presentan múltiples ventajas frente a los herbicidas sintéticos convencionales. En primer lugar, son altamente selectivos y específicos frente a las malezas objetivo, causando un impacto mínimo de la acción bioherbicida sobre los cultivos, toxicidad en organismos no objetivo y difusión en el medio ambiente (Hasan et al., 2021; Storozhenko & Yukhymuk, 2025). Los bioherbicidas poseen una vida media ambiental corta, lo que reduce drásticamente la contaminación de suelos, aguas subterráneas y superficiales, así como la acumulación de residuos tóxicos y su dispersión (Zhang et al., 2025). Esta selectividad se debe a que los compuestos de origen natural suelen interactuar de manera preferencial con dianas moleculares presentes en las malezas, pero no con organismos benéficos como polinizadores, depredadores o microorganismos edáficos (Costa et al., 2025). En segundo lugar, los bioherbicidas presentan menor persistencia en el ambiente, ya que, al ser compuestos de origen natural, se degradan más rápidamente mediante procesos microbianos y fotoquímicos, lo que reduce el riesgo de contaminación de suelos y aguas subterráneas (Islam et al., 2024; Kremer, 2023). En tercer lugar, presentan múltiples modos de acción, lo que dificulta la aparición de resistencia en las poblaciones de malezas, a diferencia de los herbicidas sintéticos que suelen tener un único modo de acción (Hasan et al., 2021; Storozhenko & Yukhymuk, 2025). Adicionalmente, contribuyen a la conservación de la salud del suelo, la calidad del agua y la biodiversidad, alineándose con los principios de la agricultura sostenible y el enfoque de "Una Salud" (*One-Health*) (Islam et al., 2024; Storozhenko & Yukhymuk, 2025).

Sin embargo, el desarrollo y la comercialización de bioherbicidas enfrentan desafíos significativos que han limitado su adopción masiva. Uno de los principales obstáculos es la variabilidad en la eficacia bajo condiciones de campo, ya que los bioherbicidas son altamente sensibles a factores ambientales como temperatura, humedad, pH del suelo, radiación UV y competencia con microorganismos nativos (Cordeau et al., 2016; Storozhenko & Yukhymuk, 2025). Esta sensibilidad genera una brecha entre los resultados prometedores obtenidos en laboratorio y el desempeño frecuentemente inconsistente en el campo (Kremer, 2023; Marrone, 2019). Otro desafío crítico es la formulación y estabilidad del producto: los compuestos bioactivos naturales tienden a ser volátiles, fotosensibles o susceptibles a la degradación microbiana, lo que requiere el desarrollo de sistemas de encapsulamiento (como nanoemulsiones o biopolímeros) para protegerlos y

asegurar su vida útil (Kariyanna et al., 2024; Storozhenko & Yukhymuk, 2025). La escalabilidad y los costos de producción representan una barrera económica importante, ya que producir bioherbicidas a gran escala es frecuentemente más costoso que sintetizar herbicidas químicos, lo que dificulta competir con productos de bajo costo como el glifosato (Kremer, 2023; Marrone, 2019). Además, la acción lenta de los bioherbicidas en comparación con los herbicidas sintéticos de contacto puede ser percibida negativamente por los agricultores (Storozhenko & Yukhymuk, 2025). Finalmente, existen barreras regulatorias significativas: la falta de una definición armonizada a nivel internacional y los rigurosos requisitos de registro (que incluyen estudios de eficacia, toxicidad e impacto ambiental) incrementan los costos y el tiempo de comercialización (Kariyanna et al., 2024; Storozhenko & Yukhymuk, 2025).

## **2.3 El bagazo de *Agave lechuguilla* como fuente de compuestos bioactivos**

### **2.3.1 Generalidades del *Agave lechuguilla***

El *Agave lechuguilla* es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia *Asparagaceae* (subfamilia *Agavoideae*), nativa de las zonas áridas y semiáridas del noreste de México y del sur de Estados Unidos. En México, esta especie cubre más de 20 millones de hectáreas, lo que equivale aproximadamente al 10% del territorio nacional, y se distribuye principalmente en los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas (Silva-Montellano & Eguiarte, 2003). El *Agave* es conocido comúnmente como "lechuguilla" y sus hojas rígidas han sido utilizadas por comunidades artesanales para extraer fibras naturales de alta calidad, llamadas "ixtle", empleadas en la elaboración de cepillos, cuerdas y textiles artesanales (Reyes-Agüero et al., 2000).

El aprovechamiento del *A. lechuguilla* representa una actividad socioeconómica relevante para las comunidades rurales de la región, ya que la extracción y comercialización del *ixtle* genera ingresos para numerosas familias campesinas (Carmona et al., 2017). La fibra se obtiene mediante un proceso de tallado manual o mecánico del cogollo, que está integrado por las hojas tiernas y centrales de la planta (Chávez Cobián, 2022). Sin embargo, un aspecto crítico de esta actividad es que la fibra representa únicamente el 15% de la masa vegetal aprovechada, mientras que el 85% restante corresponde a un residuo lignocelulósico conocido localmente como "guishe" (Carmona

et al., 2017). A nivel nacional, se estima que esta actividad genera aproximadamente 150,000 toneladas anuales de *guishe* (Reyes-Agüero, Aguirre-Rivera y Peña-Valdivia, 2000).

### **2.3.2 Metabolitos secundarios con potencial herbicida en *Agave* spp.**

El *guishe* ha sido tradicionalmente desechado a cielo abierto, ya sea por acumulación (lo que genera problemas de fermentación y proliferación de plagas) o mediante incineración directa por parte de los campesinos, lo que contribuye a problemas de contaminación ambiental (Cervantes-Güicho et al., 2024; Chávez Cobián, 2022). Ante esta problemática, diversos estudios han propuesto la valorización del *guishe* como una estrategia para disminuir su impacto ambiental y generar productos de alto valor agregado a partir de sus compuestos bioactivos (Cervantes-Güicho et al., 2024).

Estudios de bioprospección han demostrado que el *guishe* contiene una amplia variedad de metabolitos secundarios, principalmente compuestos fenólicos y flavonoides, con propiedades antioxidantes, antimicrobianas y alelopáticas (Morreeuw et al., 2021; Sánchez Robles et al., 2023). Mediante análisis de transcriptómica y cromatografía de alta resolución (HPLC-MS/MS), se logró identificar y cuantificar nueve flavonoides en el extracto etanólico del *guishe*, cuyas concentraciones por gramo de residuo seco son: isorhamnetina (1251.96 µg), flavanona (291.51 µg), hesperidina (34.23 µg), delphinidina (24.23 µg), quercetina (15.57 µg), kaempferol (13.71 µg), cianidina (12.32 µg), apigenina (9.70 µg) y catequina (7.91 µg) (Morreeuw et al., 2021). Adicionalmente, se han identificado compuestos alelopáticos como pterostilbeno, ácido hidroxicafeico, ácido cafeoil tartárico y ácido 4-O-glucósido cumárico en el jugo de *guishe* obtenido mediante prensado mecánico (Morreeuw et al., 2021).

### **2.3.3 El extracto de *Agave lechuguilla* como bioherbicida**

La presencia de estos compuestos con actividad alelopática ha motivado la evaluación del extracto de *guishe* como posible bioherbicida. En un estudio de bioconversión fúngica, se demostró que el jugo de *guishe* sometido a fermentación con hongos durante 72 h incrementó su contenido de flavonoides (2.45 veces) y polifenoles hidrolizables (2.22 veces), alcanzando concentraciones de 14.9 y 1.57 g/L respectivamente (Sánchez Robles et al., 2023). Este extracto bioprocesado (BGJ, por sus siglas en inglés) fue evaluado en ensayos alelopáticos sobre semillas modelo de maíz y tomate, logrando inhibiciones de hasta el 96.67% en la germinación de maíz y del 76.6% en

tomate, en comparación con el control positivo (Sánchez Robles et al., 2023). Estos resultados confirmaron que el *guishe* de *A. lechuguilla* contiene compuestos bioherbicidas capaces de inhibir la germinación y el crecimiento de las semillas.

## **2.4 Artemia spp. como organismo modelo en ecotoxicología**

### **2.4.1 Características biológicas que la hacen un modelo ideal**

El género *Artemia* (Crustacea, Anostraca), cuyos organismos son conocidos comúnmente como artemias o “camarones de salmueras”, está adaptado a hábitats extremos con temperaturas de 9 a 35 °C y rangos de salinidad que superan los 25 g/L (Carmona et al., 2017). La *Artemia franciscana* y la *Artemia salina* son las especies más comúnmente utilizadas en estudios ecotoxicológicos y ensayos de genotoxicidad debido a su corto ciclo de vida, alta tasa de fecundidad, fácil cultivo en laboratorio y la disponibilidad comercial de sus quistes (Albarano, Serafini, et al., 2022; Souza et al., 2024). Una de las características más notables de la *Artemia* es su capacidad para producir quistes, que son embriones en estado de latencia metabólica y pueden permanecer viables durante largos periodos, con alta capacidad de resistir adversidades ambientales y eclosionar cuando las condiciones son favorables (Souza et al., 2024). Esta propiedad hace que los quistes sean ideales para bioensayos ecotoxicológicos, ya que son relativamente económicos, tienen una larga vida útil y son fáciles de eclosionar de forma estandarizada (Morgan et al., 2019). Adicionalmente, la *Artemia* presenta un ciclo de vida corto, lo que permite realizar estudios que abarcan diferentes etapas de desarrollo, es decir, desde nauplios recién eclosionados, que aún no se alimentan y dependen de sus reservas vitelinas, hasta juveniles y adultos (Morgan et al., 2019).

### **2.4.2 Aplicaciones del modelo Artemia en ensayos de toxicidad**

El género *Artemia* es ampliamente utilizado como organismo bioindicador para evaluar la calidad ambiental y la toxicidad de sustancias químicas, incluyendo pesticidas, metales pesados, nanomateriales y productos bacterianos (Albarano et al., 2022; Souza et al., 2024) (Albarano, Ruocco, et al., 2022; Souza et al., 2024). Los ensayos de toxicidad aguda con *Artemia* se basan típicamente en la determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) a 24 o 48 h de exposición, siguiendo protocolos estandarizados como los de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos) (Mashjoor et al., 2019).

En un estudio comparativo de la toxicidad de cinco herbicidas ampliamente utilizados (Paraquat, 2,4-D, Trifluralina, Glifosato y Atrazina) sobre nauplios de *A. franciscana*, se determinó que el glifosato presentó la menor letalidad ( $CL_{50}$  a 48 h = 164.31 mg/L), mientras que la Trifluralina ( $CL_{50}$  = 11.87 mg/L) y el 2,4-D ( $CL_{50}$  = 12.93 mg/L) mostraron la toxicidad más alta (Mashjoor et al., 2019). Estos resultados confirman la utilidad de *A. franciscana* como bioindicador ecotoxicológico para evaluar el impacto de herbicidas en ecosistemas acuáticos. Entre las principales ventajas del modelo *Artemia* se encuentran: su fácil manipulación en condiciones de laboratorio, la disponibilidad comercial de quistes estandarizados, su alta sensibilidad a una amplia gama de contaminantes, y la posibilidad de realizar estudios a diferentes niveles de organización biológica (desde molecular hasta poblacional) (Albarano et al., 2022; Souza et al., 2024). Adicionalmente, su capacidad para vivir en un amplio rango de salinidad la convierte en un modelo relevante para evaluar el impacto de contaminantes en ecosistemas costeros y salobres, donde los organismos de agua dulce como *Daphnia magna* no pueden sobrevivir (Morgan et al., 2019). Sin embargo, el modelo también presenta ciertas limitaciones. Algunos estudios han señalado que *Artemia* puede tener una sensibilidad relativamente baja a ciertos contaminantes en comparación con otros organismos modelo, lo que requiere el uso de biomarcadores más sensibles (como genotoxicidad o estrés oxidativo) para detectar efectos subletales (Albarano et al., 2022).

#### **2.4.3 Antecedentes de estudios toxicológicos con *Artemia franciscana***

Además de los ensayos convencionales de mortalidad, investigaciones recientes han ampliado el uso de *Artemia* para evaluar efectos subletales mediante biomarcadores más sensibles, incluyendo alteraciones bioquímicas (actividad enzimática), estrés oxidativo, daño genético (genotoxicidad) y cambios en la expresión génica (Albarano, Serafini, et al., 2022; Souza et al., 2024). En particular, la detección de daños en el ADN y la regulación de genes clave se ha propuesto como un punto final adicional y valioso para la evaluación ecotoxicológica de contaminantes ambientales (Albarano, Serafini, et al., 2022).

En el contexto de la exposición a herbicidas, un estudio metabolómico con *A. franciscana* expuesta a concentraciones subletales de Roundup® (1-100 ppm de glifosato) identificó mediante resonancia magnética nuclear (RMN de  $^1H$ ) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) que el herbicida afecta significativamente el metabolismo energético, el metabolismo de

carbohidratos, el metabolismo de un carbono mediado por folatos, así como el proceso de muda y desarrollo de la *Artemia* (Morgan et al., 2019). Estos hallazgos demuestran que *A. franciscana* es un modelo adecuado no solo para evaluar toxicidad aguda, sino también para identificar mecanismos de acción toxicológica a nivel molecular mediante herramientas como la transcriptómica y la metabolómica (Morgan et al., 2019; Souza et al., 2024). Asimismo, se ha documentado que la exposición a toxinas marinas como la palitoxina (PLTX) en *A. franciscana* induce estrés oxidativo, evidenciado por un aumento significativo de especies reactivas de oxígeno (ROS) y alteraciones en la actividad de enzimas antioxidantes clave como catalasa (CAT), peroxidasa (POD), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) (Morgan et al., 2019). Este tipo de estudios respalda el uso de biomarcadores de estrés oxidativo y la medición de la actividad de enzimas antioxidantes en *A. franciscana*, tal como se plantea en los objetivos específicos de la presente tesis.

#### **2.4.4 Ventajas y limitaciones del modelo**

Entre las principales ventajas del modelo *Artemia* se encuentran: su fácil manipulación en condiciones de laboratorio, la disponibilidad comercial de quistes, su alta sensibilidad a una amplia gama de contaminantes, y la posibilidad de realizar estudios a diferentes niveles de organización biológica (Albarano et al., 2022; Souza et al., 2024). Adicionalmente, su capacidad para vivir en un amplio rango de salinidad la convierte en un modelo relevante para evaluar el impacto de contaminantes en ecosistemas costeros y salobres, donde los organismos de agua dulce como *Daphnia magna* no pueden sobrevivir (Morgan et al., 2019). Sin embargo, el modelo también presenta ciertas limitaciones. Algunos estudios han señalado que la *Artemia* puede tener una sensibilidad relativamente baja a ciertos contaminantes en comparación con otros organismos modelo, lo que requiere el uso de biomarcadores más sensibles (como genotoxicidad o estrés oxidativo) para detectar efectos subletales (Albarano et al., 2022). Por esta razón, la presente investigación incorpora, además del ensayo de toxicidad aguda convencional (CL<sub>50</sub>), la determinación de actividades enzimáticas antioxidantes (CAT, SOD, GR) como biomarcadores de estrés oxidativo, lo que permite una evaluación más completa y sensible del impacto ecotoxicológico del extracto de *Agave lechuguilla*.

En los últimos años, *Artemia franciscana* ha sido ampliamente utilizada para evaluar la toxicidad de contaminantes emergentes como nanopartículas y formulaciones de glifosato. Un estudio internacional para validar un protocolo armonizado de toxicidad con *A. franciscana* usando nanopartículas de plata (AgNPs) mostro que, aunque el protocolo funcionó bien con el químico de referencia (dicromato de potasio), la variabilidad en los resultados con AgNPs fue muy alta, identificándose como fuentes de variabilidad las condiciones de eclosión, el tipo de incubación de la placa de prueba y el régimen de iluminación (Kos et al., 2016; Morgan et al., 2019). Adicionalmente, se estudiaron los efectos dependientes del tiempo de nanopartículas de poliestireno (PS-NH<sub>2</sub>, 50 nm) en *A. franciscana* después de exposiciones a corto plazo (48 h) y largo plazo (14 días) a concentraciones de 0.1, 1, 3 y 10 µg/mL en agua de mar natural. Además, los autores encontrando que la exposición a corto plazo causó una disminución en el crecimiento y desarrollo de los nauplios, permitiendo evaluar respuestas fisiológicas, bioquímicas y moleculares (Varó et al., 2019). Estos estudios demuestran la versatilidad del modelo de *Artemia franciscana* para evaluar no solo la toxicidad aguda, sino también efectos subletales a nivel metabólico y molecular frente a contaminantes de diversa naturaleza.

## **2.5 Biomarcadores de toxicidad y estrés en organismos acuáticos**

Los biomarcadores se definen como respuestas biológicas medibles que indican la exposición de un organismo a sustancias tóxicas y los efectos tempranos de dicha exposición, permitiendo evaluar el estado de salud de los ecosistemas antes de que se manifiesten efectos poblacionales evidentes (Van der Oost et al., 2003). En ecotoxicología acuática, los biomarcadores se clasifican generalmente en tres categorías según el nivel de organización biológica que evalúan: biomarcadores de exposición (detección de la sustancia o sus metabolitos en tejidos), biomarcadores de efecto (cambios fisiológicos, bioquímicos o histológicos) y biomarcadores de susceptibilidad (factores que modulan la respuesta individual frente al tóxico) (Valavanidis & Vlachogianni, 2009). Los biomarcadores ofrecen ventajas significativas sobre los ensayos convencionales de toxicidad aguda (como la determinación de CL<sub>50</sub>), ya que permiten detectar efectos subletales a concentraciones ambientalmente relevantes, identificar mecanismos de acción tóxica y proporcionar señales de alerta temprana de deterioro ambiental (Lankadurai et al., 2013). En particular, los biomarcadores bioquímicos 8-OHdG (daño al ADN), MDA (peroxidación lipídica), proteína carbonilos (daño a proteínas), y GSH (glutatión) son ampliamente utilizados por

su sensibilidad, rapidez y relativo bajo costo en organismos modelo como peces, moluscos y crustáceos (Valavanidis & Vlachogianni, 2009).

### **2.5.1 Biomarcadores de estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es uno de los mecanismos más comunes de toxicidad inducida por contaminantes ambientales, como metales pesados, pesticidas y nanopartículas. Este fenómeno ocurre cuando se produce un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del sistema antioxidante para neutralizarlas, lo que resulta en daño a lípidos, proteínas y ADN (Livingstone, 2001). Entre las actividades de las enzimas antioxidantes más estudiadas como biomarcadores se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión reductasa (GR), que constituyen la primera línea de defensa celular frente al daño oxidativo (Valavanidis & Vlachogianni, 2009). La SOD cataliza la dismutación del radical superóxido ( $O_2^-$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular, por lo que se considera una enzima clave en la protección celular (Livingstone, 2001). Por su parte, la CAT descompone el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno, trabajando de manera sinérgica con la SOD para prevenir la formación del radical hidroxilo (OH), altamente reactivo y dañino para las células (Valavanidis & Vlachogianni, 2009). La GR completa el sistema antioxidante al regenerar glutatión reducido (GSH) a partir de glutatión oxidado (GSSG) mediante NADPH como cofactor, manteniendo así el equilibrio redox celular (Van der Oost et al., 2003). La exposición a herbicidas como el glifosato ha demostrado inducir estrés oxidativo en diversos organismos acuáticos. En el crustáceo *Artemia franciscana*, la exposición a concentraciones subletales de *Roundup*<sup>®</sup> afectó múltiples rutas metabólicas, incluidas las de metabolismo energético y de carbohidratos, lo que sugiere una posible alteración del estado redox celular (Morgan et al., 2019). En peces como *Danio rerio*, la exposición a glifosato moduló los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial e indujo hiperpolarización mitocondrial, lo que se asocia con una mayor producción de ROS y estrés oxidativo (Pereira et al., 2018)

### **2.5.2 Biomarcadores de metabolismo energético**

El metabolismo energético es un proceso fundamental para la supervivencia y el desarrollo de los organismos, y su alteración constituye un biomarcador temprano de estrés toxicológico. La exposición a contaminantes puede afectar rutas clave como la glucólisis, el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, resultando en cambios en los niveles de metabolitos como glucosa,

aminoácidos y nucleótidos (Lankadurai et al., 2013). En *Artemia franciscana*, el análisis metabolómico mediante RMN de  $^1\text{H}$  y GC-MS reveló que la exposición a Roundup® afecta significativamente el metabolismo de carbohidratos y energía, evidenciado por cambios en los niveles de glucosa, aspartato y betaína (Morgan et al., 2019). Además, el análisis de rutas metabólicas con la base de datos KEGG sugirió un deterioro del metabolismo de un carbono mediado por folatos, así como del proceso de muda y desarrollo de la artemia (Morgan et al., 2019).

### **2.5.3 Biomarcadores de expresión génica**

Los avances en técnicas moleculares han permitido el desarrollo de biomarcadores basados en la expresión génica, que ofrecen una sensibilidad sin precedentes para detectar efectos subletales de contaminantes. Cambios en la transcripción de genes específicos pueden ocurrir a concentraciones muy bajas, mucho antes de que se manifiesten efectos a nivel bioquímico o fisiológico (Van der Oost et al., 2003). En el contexto de la toxicidad por herbicidas, se han identificado genes cuya expresión se altera en respuesta a la exposición a glifosato. Por ejemplo, en *Artemia franciscana* se ha propuesto el uso de la transcriptómica como herramienta complementaria para identificar cambios en la expresión génica asociados al estrés subletal (Morgan et al., 2019). Aunque los estudios de expresión génica en *Artemia* son aún limitados en comparación con otros organismos modelo como *Daphnia magna*, su creciente uso en ecotoxicología molecular está permitiendo identificar biomarcadores de exposición y efecto con alta especificidad y sensibilidad (Lankadurai et al., 2013).

### **2.5.4 Biomarcadores histopatológicos**

Los biomarcadores histopatológicos evalúan cambios estructurales en tejidos y órganos como respuesta a la exposición a tóxicos. Estos biomarcadores son particularmente útiles porque integran los efectos de múltiples vías de toxicidad y proporcionan evidencia directa de daño tisular (Valavanidis & Vlachogianni, 2009). En organismos acuáticos, los tejidos más comúnmente examinados incluyen branquias, hígado (o hepatopáncreas en crustáceos) y riñón, ya que son los principales órganos diana de los contaminantes. En crustáceos como *Artemia*, la exposición a contaminantes puede inducir alteraciones histológicas en el tracto digestivo, incluyendo vacuolización de células epiteliales, pérdida de microvellosidades y necrosis (Peres Alves de Souza

et al., 2024). Aunque los estudios histopatológicos en *Artemia* son menos comunes que en peces y moluscos, representan una herramienta valiosa para evaluar el impacto de contaminantes a nivel tisular, complementando los biomarcadores bioquímicos y moleculares (Albarano, Serafini, et al., 2022).

### **2.5.5 Aplicación de biomarcadores en la evaluación de bioherbicidas**

La evaluación de la seguridad ambiental de nuevos bioherbicidas, como el extracto de *Agave lechuguilla*, requiere un enfoque integral que abarque diferentes niveles de biomarcadores. Los ensayos convencionales de toxicidad aguda ( $CL_{50}$ ) proporcionan una primera aproximación de la peligrosidad del compuesto, pero son insuficientes para detectar efectos subletales que podrían manifestarse a concentraciones ambientalmente relevantes (Van der Oost et al., 2003). La incorporación de biomarcadores de estrés oxidativo (SOD, CAT, GR), del metabolismo energético y de la expresión génica permite una evaluación más sensible y completa del potencial ecotoxicológico de los bioherbicidas. Este enfoque multibiomarcador es particularmente relevante al evaluar compuestos de origen natural, que pueden presentar mecanismos de acción complejos y efectos subletales que no se reflejan en la mortalidad aguda (Lankadurai et al., 2013).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El extracto de *Agave lechuguilla* ha demostrado propiedades bioherbidas prometedoras en estudios previos, incluyendo su capacidad para inhibir la germinación de *Chenopodium album* y alterar rutas metabólicas y transcriptómicas en esta maleza modelo (Velázquez-Lizárraga et al., 2025, 2026). Sin embargo, un aspecto crítico para el desarrollo de cualquier bioherbicida es la evaluación de su seguridad ambiental, en particular respecto de los organismos no objetivo. Hasta el momento, no existen estudios que hayan abordado esta dimensión ecotoxicológica del extracto de *A. lechuguilla*, lo que representa un vacío de conocimiento que limita su posible escalamiento y registro como producto comercial.

El presente trabajo aborda específicamente esta carencia mediante la determinación de la toxicidad aguda ( $CL_{50}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{10}$ ) del extracto en *Artemia franciscana*, un organismo modelo ampliamente aceptado en ecotoxicología por su sensibilidad y relevancia ecológica. Adicionalmente, se incorpora la medición de actividades enzimáticas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa) como biomarcadores de estrés oxidativo, lo que permite detectar efectos subletales que no serían evidentes únicamente mediante el ensayo de mortalidad. Esta estrategia metodológica de toxicidad dual aguda, más biomarcadores bioquímicos, proporciona una evaluación más sensible y completa que la simple determinación de  $CL_{50}$ .

El aporte al conocimiento científico de esta investigación es triple. En primer lugar, genera los primeros datos empíricos sobre la seguridad ambiental del extracto de *A. lechuguilla*, estableciendo concentraciones de referencia ( $CL_{50}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{10}$ ) que podrán utilizarse en futuros estudios regulatorios y de riesgo ambiental. En segundo lugar, contribuye a la caracterización del modo de acción tóxico del extracto al esclarecer si su efecto implica estrés oxidativo en organismos no objetivo, lo cual constituye información relevante para el diseño de formulaciones más selectivas. En tercer lugar, sienta las bases metodológicas para la evaluación ecotoxicológica de otros extractos vegetales con potencial bioherbicida.

Desde una perspectiva social y económica, la validación de la seguridad de este extracto es un paso necesario para su eventual transferencia a comunidades rurales productoras de *ixtle* en el noreste de México, que actualmente desechan el bagazo (*guishe*) como residuo. La revalorización

de este subproducto como materia prima para un bioherbicida seguro generaría una fuente adicional de ingreso para estas comunidades y reduciría el impacto ambiental asociado a su disposición inadecuada. Asimismo, contar con alternativas nacionales al glifosato, cuyo uso ha sido restringido en México debido a riesgos sanitarios y ambientales, contribuye a la soberanía agrícola del país.

En síntesis, esta investigación responde a la pregunta específica de si el extracto de *A. lechuguilla* con propiedades bioherbicidas es seguro para organismos acuáticos no objetivo, mediante un abordaje metodológico que combina ensayos de toxicidad aguda estandarizados y biomarcadores de estrés oxidativo. Los resultados permitirán determinar el cociente de riesgo (concentración efectiva en maleza vs. concentración tóxica en *Artemia*) y ofrecerán una primera aproximación al perfil ecotoxicológico de este candidato a bioherbicida.

#### **4. HIPÓTESIS**

El extracto de *Agave lechuguilla*, con propiedades bioherbidas, induce una respuesta tóxica dependiente de la concentración en *Artemia franciscana*, manifestada por alteraciones fisiológicas, bioquímicas, moleculares e histológicas asociadas a mecanismos de estrés celular.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Determinar la toxicidad aguda de un extracto de *Agave lechuguilla* con propiedades bioherbidas mediante nauplios de *Artemia franciscana* como modelo ecotoxicológico.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Determinar las concentraciones letales (CL<sub>50</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>10</sub>) de un extracto de *Agave lechuguilla* en *Artemia franciscana*.
2. Evaluar algunas variables (carbohidratos, lípidos y proteínas totales) del perfil bioquímico fisiológico de *Artemia franciscana* expuesta a las concentraciones letales CL<sub>50</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>10</sub> del extracto.
3. Evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión reductasa (GR) en *Artemia franciscana* expuesta a las concentraciones letales CL<sub>50</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>10</sub> del extracto.
4. Analizar la expresión de genes relacionados con la respuesta a xenobióticos en *Artemia franciscana* expuesta a las concentraciones letales CL<sub>50</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>10</sub> del extracto mediante RT-qPCR.
5. Evaluar los cambios morfométricos inducidos por el extracto de *Agave lechuguilla* en *Artemia franciscana* mediante el análisis de cortes transversales para determinar el diámetro corporal total, el espesor de la cutícula y el tamaño del lumen digestivo.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Material biológico e identificación molecular

El bagazo residual (*guishe*) de *Agave lechuguilla* fue recolectado en el municipio de Ramos Arizpe, Coahuila. El material fue depositado en recipientes de polipropileno de 200 L y transportado al Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, en Saltillo. Para obtener el extracto, el bagazo fue sometido a prensado en una prensa hidráulica a una presión de 1.05 kN. El jugo resultante se homogenizó y aireó en una batidora doméstica (Proctor Silex, modelo 62515RY) a velocidad máxima, hasta que todo el jugo se convirtió en una espuma densa. Dicha espuma fue deshidratada en un secador de charolas KL-10 (Koleff, Santiago de Querétaro, México) a 50 °C durante 24 horas. El polvo seco obtenido se almacenó en frascos herméticos a temperatura ambiente hasta su uso posterior en los bioensayos.

Los quistes de *Artemia* spp. (Premium 90%, Biogrow) fueron adquiridos comercialmente (ProAqua, Mazatlán, Sinaloa, México). Para la eclosión, se empleó un sistema construido a partir de una botella de refresco de plástico de grado alimenticio. La botella fue lavada y cortada a 2/3 de su altura desde la boquilla; la base se utilizó como soporte, invirtiendo la parte superior, que sirvió como cámara de eclosión. La tapa de la botella fue perforada para introducir una manguera de aireación conectada a un aireador, lo que permite inyectar aire desde el fondo del recipiente. El agua de mar esterilizado se ajustó a 15 UPS, la iluminación se proporcionó con una lámpara LED comercial de 800 lúmenes (luz blanca) y la temperatura se mantuvo entre 24 y 26 °C durante 24 h. Transcurrido este periodo, los quistes no eclosionados fueron removidos y los nauplios obtenidos se mantuvieron en agua salobre limpia (15 UPS) dentro del mismo sistema de cultivo. Los organismos fueron alimentados con microalgas y levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* hasta alcanzar el tamaño adulto. A partir de esta cohorte, se seleccionaron tres individuos para la extracción de ADN genómico. La extracción de ADN genómico se realizó de acuerdo con el método de resina Chelex-100 (Manaffar et al., 2010). La concentración y la pureza del ADN se cuantificaron mediante espectrofotometría (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

Para la amplificación de marcadores genéticos, se realizó una PCR con cebadores universales dirigidos a las regiones del gen del *ARNr 18S* y del gen mitocondrial de la *citocromo oxidasa I (COI)*. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, que contenía: 1X de buffer Colorless *GoTaq*<sup>®</sup> Flexi, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 1.25  $\mu$ M de cada oligonucleótido y 1.25 U de la ADN polimerasa *GoTaq*<sup>®</sup> Flexi (Promega, Madison, Wisconsin, EE. UU.). El programa de termociclado consistió en: desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 58 °C por 20 s y extensión a 72 °C por 45 s; seguido de una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X, purificados con el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) y enviados para secuenciación por el método de Sanger a la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

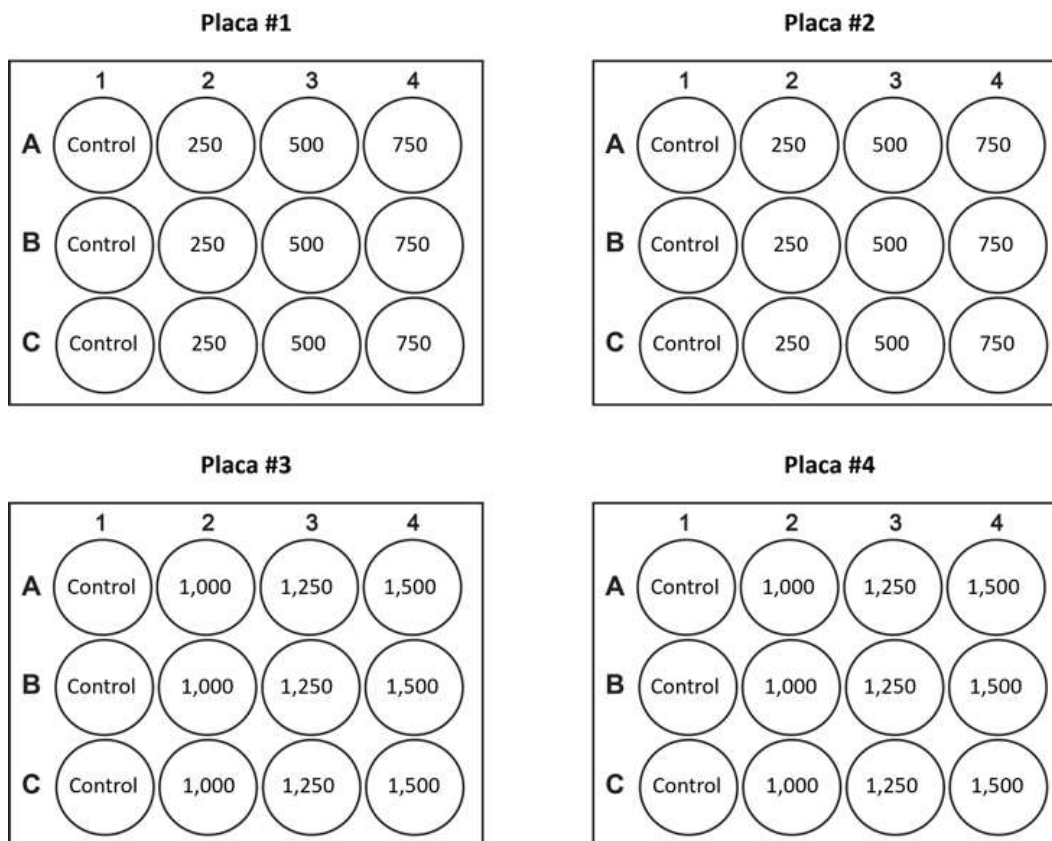
Las secuencias obtenidas se analizaron mediante alineamientos locales con la herramienta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) contra las bases de datos de referencia del NCBI. La asignación del género y la especie se estableció con base en los porcentajes más altos de identidad y de cobertura, lo que confirma que el organismo utilizado en los bioensayos corresponde a *Artemia franciscana*.

## **6.2 Determinación de la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>)**

Para la determinación de la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), se utilizaron nauplios de *Artemia franciscana* en el estadio instar I (24 h posteriores a la eclosión). La eclosión de los quistes se realizó bajo las condiciones descritas en la sección anterior (temperatura de 24–26 °C, iluminación LED de 800 lúmenes, aireación continua durante 24 h). Transcurrido este periodo, los nauplios fueron cosechados aprovechando su fototactismo positivo mediante una linterna LED.

Paralelamente, se preparó un extracto de agave (*Agave lechuguilla*) previamente deshidratado. Para ello, se colocó el material vegetal en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con agua de mar a 15 UPS, obteniéndose una concentración de 10,000  $\mu$ g/mL. La mezcla se mantuvo en agitación horizontal, en la oscuridad, hasta el día de la eclosión. Debido a la formación de flóculos, el extracto fue filtrado mediante un embudo y papel filtro No. 3; el filtrado resultante (libre de flóculos) se empleó como solución madre para las pruebas de toxicidad.

Para el bioensayo, los nauplios cosechados se colocaron en placas de 12 pocillos para el cultivo celular. En cada pocillo se depositaron 10 nauplios utilizando una pipeta de transferencia bajo observación con un estereoscopio (ZOOM 2000, Leica) (Fig. 1).



**Figura 1.** Diseño experimental para evaluar la  $CL_{50}$  del extracto de *Agave lechuguilla* en nauplios de *Artemia franciscana*. Los grupos de control únicamente contenían 6 mL de agua salobre a 15 UPS, los números corresponden a la concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) que se agregó en cada pocillo de extracto en un volumen de 6 mL. Todos los pocillos contenían 10 nauplios de *Artemia franciscana*.

De este modo, cada concentración evaluada (250, 500, 700, 1,000, 1,250 y 1,500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) contó con 6 réplicas ( $n = 6$ ), mientras que el control contó con 12 réplicas ( $n = 12$ ). Una vez establecido el experimento, se registró la hora de inicio y las placas se mantuvieron en agitación horizontal durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se evaluó la mortalidad en cada pocillo mediante observación con estereoscopio.

El bioensayo se realizó en quintuplicado (cinco experimentos independientes) para estimar la  $CL_{50}$ . Para el análisis de los datos, se sumaron los nauplios muertos por concentración en cada experimento, obteniendo un total de 120 nauplios en el control y 60 en cada concentración (250,

500, 700, 1,000, 1,250 y 1,500  $\mu\text{g/mL}$ ). Se calculó el porcentaje de mortalidad para cada concentración y se corrigió con respecto al control mediante la fórmula:

$$\% \text{Mortalidad corregida} = \frac{\% \text{Mortalidad observada} - \% \text{Mortalidad control}}{1 - \% \text{Mortalidad control}} \quad (1)$$

Posteriormente, los valores de mortalidad corregida se transformaron a unidades Probit utilizando la función inversa de la distribución normal estándar acumulada, aplicando la siguiente relación:

$$\text{Probit} = \phi^{-1}(p) + 5 \quad (2)$$

Donde  $p$  es la proporción de mortalidad corregida expresada como porcentaje dividido entre 100, y  $\phi^{-1}$  representa el inverso de la función de distribución acumulada de la distribución normal estándar. Las concentraciones evaluadas se transformaron al logaritmo base 10 ( $\log_{10}$ ). Con los pares de datos ( $\log_{10}$  de la concentración, Probit), se realizó un análisis de regresión lineal para obtener la ecuación de la recta dosis-respuesta (Finney, 1971; Hamidi et al., 2014).

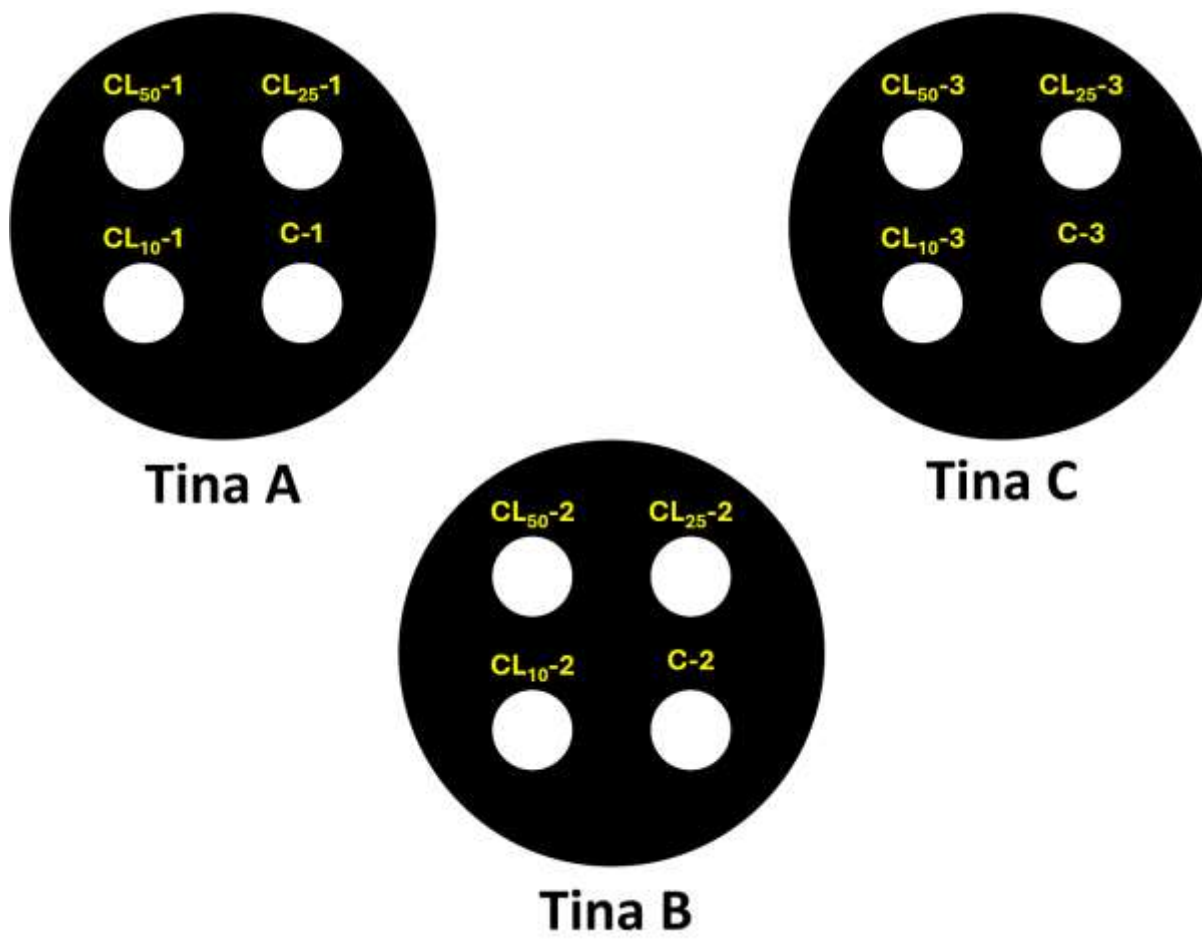
A partir de la ecuación de la recta, se despejó el  $\log_{10}$  de  $CL_{50}$ . Se calculó la media de los  $\log_{10}$  de las concentraciones, la suma de cuadrados de  $X$  ( $SS_x$ ) y el error estándar a partir de los datos de la regresión lineal. Con estos valores, se determinó la  $CL_{50}$  y sus intervalos de confianza al 95% (superior e inferior), empleando el valor crítico de la distribución  $t$  de Student con tres grados de libertad. El mismo procedimiento se aplicó para estimar la  $CL_{25}$  y la  $CL_{10}$  en cada uno de los cinco experimentos.

Finalmente, para obtener un valor general por experimento, se calculó la media ponderada utilizando el error estándar, la varianza y el peso correspondiente. Este procedimiento se aplicó a la  $CL_{50}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{10}$ .

### 6.3 Diseño experimental para el bioensayo a escala piloto

El diseño experimental se estableció en un sistema que constó de tres tinajas de 2,000 L cada una, con 500 L de agua potable (Fig. 2). En cada tina se colocaron cuatro cubetas de 20 L, que constituyeron las unidades experimentales. En cada tina, las cuatro cubetas correspondieron a los siguientes tratamientos: control,  $CL_{50}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{10}$ . Cada tina fue equipada con dos calentadores sumergibles, con control de temperatura ajustado a 25 °C, y cubiertos con tela de mosquitero para

evitar la entrada de contaminantes externos. Cada tina tenía una luz tipo neón que permaneció encendida durante las 24 horas que duró el bioensayo.



**Figura 2.** Distribución de las unidades experimentales en el bioensayo. Se emplearon tres tinas independientes (**Tina A**, **Tina B** y **Tina C**). En cada tina se colocaron cuatro cubetas de 20 L correspondientes a los tratamientos: control (C), concentración letal 10 (CL<sub>10</sub>), concentración letal 25 (CL<sub>25</sub>) y concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>). Cada tratamiento se estableció en triplicado ( $n = 3$ ), con una réplica por tina.

### 6.3.1 Eclosión y preparación de organismos

Un día antes del inicio del experimento, se eclosionaron 4 g de quistes de *Artemia franciscana*. Utilizando un sistema de eclosión basado en un botellón de 20 L para agua purificada, bajo las condiciones descritas en la sección 6.2. Paralelamente, en el laboratorio se prepararon nueve botellas de vidrio con las concentraciones de extracto de *Agave lechuguilla* correspondientes a CL<sub>50</sub> (650 µg/mL), CL<sub>25</sub> (214 µg/mL) y CL<sub>10</sub> (97 µg/mL), utilizando agua de mar a 15 UPS. Para la

concentración CL<sub>50</sub> se prepararon 2 L de solución, mientras que para CL<sub>25</sub> y CL<sub>10</sub> se prepararon 1 L de cada una.

Al día siguiente, los nauplios eclosionados fueron cosechados, evitando la inclusión de quistes, y trasladados al invernadero agroacuícola de CIBNOR donde se montó el diseño experimental. Los nauplios se resuspendieron en 15 L de agua a 15 UPS, y se añadió 1 L de esta suspensión homogénea (conteniendo los nauplios) en cada una de las cubetas. Previamente, las cubetas habían sido atemperadas en un sistema de baño maría y se encontraban con aireación continua y rellena con 13 L de agua a 15 UPS. El mismo día, los extractos preparados se filtraron con papel filtro para eliminar los flóculos formados y el filtrado resultante se añadió a cada cubeta correspondiente, alcanzando un volumen final de 15 L por unidad experimental. Al inicio del experimento, se registraron los parámetros de pH, temperatura y salinidad en cada cubeta y el sistema se mantuvo en condiciones controladas durante 24 h.

### **6.3.2 Muestreo y procesamiento de organismos**

Para el muestreo, se aleatorizó el orden de recolección de las unidades experimentales, tanto de los controles como de los tratamientos. Antes de cada muestreo, se midieron los parámetros de pH, salinidad, temperatura y saturación de oxígeno utilizando una sonda multiparamétrica Odeon PONSEL (AquaLabo, Champigny-sur-Marne, Francia).

En las cubetas que contenían extracto de *Agave lechuguilla*, se observó la formación de un flóculo en forma de nata en la superficie, el cual fue retirado cuidadosamente con una cuchara cubierta con un cedazo de cocina. Posteriormente, el contenido total de cada cubeta se cosechó mediante un tamiz de 100 µm para retener los nauplios. Los nauplios muertos adheridos a las paredes de las cubetas fueron removidos con papel secante.

Una vez cosechados, los nauplios fueron enjuagados en un baño con solución de Tween-20 al 0.4% en agua de mar a 15 UPS para eliminar residuos de flóculo, seguido de un segundo enjuague con agua de mar a 15 UPS para retirar el exceso de detergente. Los organismos se secaron con papel absorbente para eliminar la humedad remanente y, posteriormente, se procedió a la toma de muestras por pesaje. Cabe mencionar que el lavado con Tween-20 se realizó también para los nauplios de las unidades experimentales de control.

### 6.3.3 Obtención y almacenamiento de muestras

Se colectaron muestras para los siguientes análisis:

- **Bioquímica fisiológica (proteínas, lípidos y carbohidratos totales):** las muestras se colocaron en tubos para microcentrífuga y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- **Extracción de ARN total:** se tomaron entre 30 y 50 mg de nauplios, a los cuales se añadió 1 mL de solución estabilizadora de ARN (70 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 25 mM de citrato de sodio y 10 mM de EDTA, pH 5.2).
- **Enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa):** se tomaron entre 30 y 50 mg de muestra en 1 mL de buffer de homogenización (tampón de fosfato de potasio 0.2 M, pH 7.0, 10 % de glicerol, 1 % de polivinilpirrolidona [PVP] y 2 mM de EDTA).
- **Histología:** se tomaron entre 30 y 50 mg de muestra, que se fijó en solución de Davidson.

### 6.4 Determinación de carbohidratos, lípidos y proteínas totales

Para la determinación de carbohidratos, lípidos y proteínas totales, se utilizaron muestras de cada tratamiento con un peso húmedo de 80 a 100 mg. Estas fueron congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente liofilizadas en un equipo VirTis modelo 2KBTES-55y (SP Scientific, Pensilvania, EE. UU.). Una vez liofilizadas, se registró el peso seco de cada muestra y se procedió a su pulverización en un homogeneizador de perlas FastPrep-40 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE. UU.) durante 40 s a 6 m/s. El polvo resultante se mezcló con 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) al 20 % y se centrifugó a  $5000 \times g$  durante 10 min a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 6.4.1 Carbohidratos totales

Para la cuantificación de carbohidratos totales, se tomaron 25  $\mu\text{L}$  del sobrenadante recuperado y se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de antrona al 0.01 % disuelta en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 96 %. La mezcla se calentó a  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min y posteriormente se enfrió en un baño de hielo. Se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  de la muestra a una placa de microtitulación y se midió la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro para microplacas (MultiSkan FC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Se empleó una curva de calibración con glucosa a las siguientes concentraciones conocidas: 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.125 mg/dL. A partir de esta curva, se calculó la concentración de carbohidratos totales, expresada en mg por gramo de peso seco (Roe et al., 1961).

### 6.4.2 Lípidos totales

Para la determinación de lípidos totales, se tomó una alícuota de 25  $\mu\text{L}$  del mismo sobrenadante (preparado en TCA al 20 %) y se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Los tubos se agitaron y calentaron a 90 °C durante 10 min, para luego enfriarse en un baño de hielo. Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de esta mezcla y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo sulfo-fosfo-vainillina. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 40 min y se midió la absorbancia a 540 nm. Se construyó una curva de calibración utilizando un estándar de triglicéridos (200, 100, 50, 25 y 12.5 mg/dL). La concentración de lípidos totales se reportó en mg por gramo de peso seco (Barnes & Blackstock, 1973).

### 6.4.3 Proteínas totales

La cuantificación de proteínas totales se realizó tomando 25  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, a los que se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de NaOH 0.1 N. La mezcla se dejó digerir durante 2 h. Posteriormente, se tomaron 25  $\mu\text{L}$  del digesto, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo BCA (ácido bicinconínico) y se incubó a 60 °C durante 15 min. La absorbancia se midió a 562 nm. Se empleó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA) a las siguientes concentraciones conocidas: 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 mg/mL. La concentración de proteínas totales se calculó y expresó en mg por gramo de peso seco (P. K. Smith et al., 1985).

### 6.5 Determinación de enzimas antioxidantes

Para determinar la actividad de enzimas antioxidantes, se utilizaron muestras de *Artemia franciscana* con un peso de entre 30 y 40 mg, las cuales fueron suspendidas en 1 mL de buffer de homogenización (tampón de fosfato de potasio 0.2 M, pH 7.0, 1 % de polivinilpirrolidona [PVP], 10 % de glicerol y 2 mM de EDTA) (Velázquez-Lizárraga et al., 2026). Las muestras se colocaron en tubos con rosca de 2 mL que contenían una perla de 6 mm y 30 mg de perlas de 425–600  $\mu\text{m}$ . Los tubos fueron mantenidos en hielo durante su transporte al laboratorio y, posteriormente, procesados en un homogeneizador FastPrep FP120 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) a 4 m/s durante 10 s por ciclo, completando tres ciclos. Entre ciclos, los tubos se enfriaron con hielo durante 3 min. Una vez finalizada la homogeneización, los tubos se centrifugaron a 12,000  $\times g$  durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante recuperado se diluyó 1:4 en tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0.

### **6.5.1 Cuantificación de proteínas totales**

La concentración de proteínas totales en los extractos se determinó mediante el método de Bradford. En una microplaca de 96 pozos, se preparó una curva estándar por triplicado utilizando albúmina sérica bovina (BSA) a las concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu\text{g}$ . Se cargaron 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra diluida 1:4, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (0.01% azul de Coomassie G-250 (p/v), 4.7% (v/v) etanol y 8.5 % (v/v) ácido fosfórico) y se aforó a un volumen final de 220  $\mu\text{L}$  con agua desionizada. La absorbancia se midió y se calculó la concentración de proteínas totales en mg/mL para cada extracto (Bradford, 1976).

### **6.5.2 Actividad de catalasa (CAT)**

La actividad de catalasa se determinó mediante la medición del consumo de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). En una celda de cuarzo se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra diluida y se añadieron 990  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 10 mM en tampón de fosfato de potasio a 50 mM, con pH 7.0. Inmediatamente, se midió la disminución de la absorbancia a 240 nm durante 1 min, registrando lecturas cada 5 s. Como blanco, se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM sin muestra. Para el cálculo de la actividad, se seleccionó la porción lineal de la curva de consumo (con al menos tres puntos) y se determinó la pendiente ( $\Delta A/\text{min}$ ). La actividad enzimática se expresó en U/mg de proteína, donde una unidad (U) se define como el consumo de 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto por mg de proteína (Aebi, 1984).

### **6.5.3 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad de la superóxido dismutasa se determinó mediante el método de inhibición de la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT). Todos los reactivos se equilibraron a temperatura ambiente antes de su uso. Se preparó una mezcla de reacción con los siguientes componentes y concentraciones finales: EDTA 2 mM, L-metionina 9.9 mM, NBT 55  $\mu\text{M}$ , Triton X-10 0.025%, tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7.8. Los componentes se mezclaron en el orden indicado y se homogeneizaron suavemente evitando la formación de burbujas. Posteriormente, se añadieron 40  $\mu\text{L}$  de la muestra diluida 1:2 (previamente equilibrada a temperatura ambiente) y se inició la reacción agregando 20  $\mu\text{L}$  de riboflavina a 1 mM, mezclando suavemente. Los tubos se transfirieron a tubos de vidrio y se colocaron bajo una luz blanca (15 W) directa a 12 cm de distancia, con oscilación constante durante 10 min. Como control en oscuridad, se preparó un tubo idéntico que se mantuvo en completa oscuridad (blanco de reacción). Adicionalmente, se

preparó un blanco que contenía todos los componentes excepto NBT y riboflavina. La absorbancia se midió a 560 nm en celdas de polipropileno, tanto en oscuridad como en luz, y se determinó la actividad de SOD. La actividad de SOD se expresó en unidades por mg de proteína, donde una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50% la reducción de NBT bajo las condiciones del ensayo (Beyer & Fridovich, 1987).

#### **6.5.4 Actividad de glutatión reductasa (GR)**

La actividad de la glutatión reductasa se determinó según el protocolo descrito por Smith, Vierheller y Thorne (1988). La reacción se llevó a cabo en una cubeta con un volumen final de 1000  $\mu$ L, preparando los siguientes componentes en el siguiente orden: tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7.8, con 2 mM de EDTA; DNBT 0.75 mM; NADPH 0.1 mM; extracto enzimático; y, para iniciar la reacción, 1 mM de GSSG. La absorbancia se midió a 412 nm cada 15 s durante 3 min. En esta reacción, la absorbancia aumenta debido a la conversión de DTNB en  $TNB^-$  (un compuesto de color amarillo intenso). Como blanco se utilizó una mezcla idéntica que contenía todos los componentes excepto el extracto. La actividad de GR fue expresada en U/mg proteína donde 1 U de enzima está expresada en 1  $\mu$ mol de  $TNB^-$  por min formado durante la reacción (I. K. Smith et al., 1988).

### **6.6 Expresión relativa de genes**

#### **6.6.1 Extracción de ARN total**

La extracción de ARN total se realizó a partir de muestras de *Artemia franciscana* previamente almacenadas en solución estabilizadora de ARN (70 % de  $(NH_4)_2SO_4$ , 25 mM de citrato de sodio y 10 mM de EDTA, pH 5.2). El procedimiento se llevó a cabo utilizando el reactivo RIBOZOL (VWR, Radnor, Pensilvania, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante, con las siguientes adaptaciones. En primer lugar, se retiró por completo la solución estabilizadora de ARN de las muestras mediante centrifugación a  $12,000 \times g$  durante 15 min a 4 °C. Alternativamente, se utilizó una micropipeta para retirar toda la solución estabilizadora de ARN. Posteriormente se les agregó 1 mL de RIBOZOL, y las muestras se procesaron en un homogeneizador FastPrep a 4 m/s durante 40 s y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo, se mezcló vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Las muestras se centrifugaron a  $12,000 \times g$  durante 15 min a 4 °C. La fase acuosa superior se recuperó

cuidadosamente con una micropipeta de 200  $\mu\text{L}$ , evitando tocar la interfase. Se registró el volumen aproximado de la fase acuosa recuperada y se transfirió a un nuevo tubo de 1.6 mL. Se añadió etanol al 70 % (preparado con agua DEPC), equivalente al volumen de la fase acuosa recuperada, y se mezcló suavemente. La mezcla se transfirió a una columna de sílice colocada sobre un tubo de colección de 2 mL y se centrifugó a  $8,000 \times g$  durante 15 s a temperatura ambiente. En caso de que el volumen excediera 700  $\mu\text{L}$ , se realizaron múltiples centrifugaciones, descartando el flujo tras cada una. Para el primer lavado, se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de tampón RW1 (etanol al 20%, 900 mM de tiocianato de guanidina, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5), se centrifugó a  $8,000 \times g$  durante 15 s a temperatura ambiente y se descartó el flujo de la columna. Este paso se repitió con un segundo lavado de 700  $\mu\text{L}$  de tampón RW1 bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se realizó un centrifugado adicional a máxima velocidad durante 1 min a temperatura ambiente para asegurar que la columna estuviera completamente seca.

Se preparó una mezcla para el tratamiento con ADNasa I (grado de amplificación: Thermo Fisher Scientific), considerando el número total de muestras. La mezcla se preparó con un volumen adicional de 0.5 a 1 reacción para asegurar un volumen suficiente. Los componentes se detallan a continuación: 1X de tampón ADNsa I (200 mM Tris-HCl, pH 8.3, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 1 U de ADNsa I, aforado a 50  $\mu\text{L}$  por muestra. La mezcla se homogenizó mediante pipeteo suave. Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla en el centro de cada columna, teniendo cuidado de no tocar la membrana con la punta; en caso de contacto, se cambió la punta. Las columnas se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente sin centrifugar. Para el segundo lavado, se añadieron 700  $\mu\text{L}$  de tampón RPE (etanol al 80%, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) y se centrifugó a  $8,000 \times g$  durante 15 s a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante. Este paso se repitió con un segundo lavado de 700  $\mu\text{L}$  de tampón RPE bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de tampón RPE y se centrifugó nuevamente a  $8,000 \times g$  durante 15 s a temperatura ambiente, deteniendo por completo el flujo del tubo de colección con papel absorbente. Finalmente, se centrifugó a máxima velocidad durante 3 min y se descartó el tubo de colección. Las columnas se dejaron abiertas a temperatura ambiente durante 3 min para completar el secado. Las columnas se transfirieron a tubos limpios de 1.6 mL. Se aplicaron 50  $\mu\text{L}$  de agua DEPC precalentada a 60 °C en el centro de cada columna y se centrifugó a  $8,000 \times g$  durante 1 min a temperatura ambiente.

El ARN eluido se colocó inmediatamente en hielo para su conservación y posterior cuantificación y análisis.

### **6.6.2 Cuantificación y verificación de la integridad del ARN total**

La concentración y la pureza del ARN total extraído se evaluaron mediante espectrofotometría de gota (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). Para cada muestra se registraron la concentración, expresada en ng/ $\mu$ L, y las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, que permitieron estimar la pureza del ARN en términos de contaminación por proteínas y compuestos orgánicos, respectivamente.

Posteriormente, se tomó una alícuota de cada muestra, correspondiente a 0.5–1  $\mu$ g de ARN, para su visualización en un gel de agarosa al 1 % con hipoclorito de sodio, preparado en tampón TAE 1 $\times$ . La electroforesis se realizó bajo las siguientes condiciones: 10 min a 30 V, seguidas de 20 min a 50 V y, finalmente, 30 min a 80 V. El gel fue teñido con Gel Red 1 $\times$  (Biotium, Fremont, California, EE. UU.) y visualizado en un fotodocumentador con luz ultravioleta para verificar la integridad del ARN (Aranda et al., 2012).

### **6.6.3 Síntesis de ADN complementario**

A partir del ARN total extraído y cuantificado (sección 6.6.2), se utilizó 1  $\mu$ g de ARN como molde para la síntesis de ADN complementario (cDNA). La reacción se realizó utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Cat. No. 4374966, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante. Adicionalmente, se añadió 1 U de RNasin® *Ribonuclease Inhibitor* (Promega) para prevenir la degradación del ARN por ribonucleasas. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ L. El cDNA sintetizado fue almacenado a -60 °C hasta su uso en las reacciones de PCR en tiempo real (secciones 6.6.5 y 6.6.6).

### **6.6.4 Diseño de oligonucleótidos para RT-qPCR**

Para el diseño de los oligonucleótidos (cebadores) correspondientes a cada uno de los transcritos seleccionados para evaluación (5 genes de referencia, y genes blancos), se realizó inicialmente una búsqueda de las regiones de intrones y exones mediante la herramienta BlastN. Una vez identificados dos exones, estas regiones fueron utilizadas como secuencias diana para el diseño

de oligonucleótidos destinados a RT-qPCR. El diseño se llevó a cabo empleando la herramienta en línea Primer3Plus, considerando los siguientes parámetros (Untergasser et al., 2007):

- **Longitud del oligonucleótido:** 18–24 nucleótidos (nt)
- **Temperatura de alineamiento (T<sub>m</sub>):** 58–62 °C
- **Porcentaje de guanina-citosina (GC):** 35–65 %
- **GC clamp:** 2
- **Longitud del producto de PCR:** 85–200 pares de bases (pb)

Adicionalmente, se verificó que los oligonucleótidos no formaran estructuras secundarias ni dímeros entre sí, asegurando su especificidad y eficiencia en las reacciones de amplificación (Wang & Seed, 2007).

#### 6.6.5 Preparación de mezcla maestra y cálculo de curvas estándar

Para la amplificación y cuantificación de los transcritos seleccionados, se realizaron reacciones de PCR en tiempo real (qPCR) utilizando un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemania) en formato de disco rotatorio de 72 pozos. Se emplearon tiras de tubos de 0.1 mL de cuatro pocillos.

Se preparó una mezcla maestra 2X que contenía los siguientes componentes: 2X de buffer Colorless *GoTaq*<sup>®</sup> Flexi (Promega, Madison, WI, EE. UU.), 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), EvaGreen<sup>®</sup> 2X (Biotium, Fremont, CA, EE. UU.) y CES 1.25X (2.7 M de betaína, 6.7 mM de DTT, 6.7% de DMSO, 55 µg/mL de BSA). La mezcla maestra se preparó en condiciones de esterilidad utilizando puntas con filtro; se alicuotó en volúmenes de 1 mL y se almacenó a -20 °C protegida de la luz.

Para la construcción de las curvas estándar de cada par de oligonucleótidos, se extrajo ADN genómico de *Artemia franciscana* con el kit Genomic Wizard<sup>®</sup> (Promega, Madison, WI, EE. UU.). El ADN fue cuantificado mediante espectrofotometría (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) y se realizaron diluciones seriadas 1:5, 1:50, 1:500, 1:5,000 y 1:50,000.

Cada reacción de qPCR se preparó en un volumen final de 15 µL, que contenía: 1X de la mezcla maestra (concentración final de 1X), 0.25 µM de cada oligonucleótido (sentido y antisentido), 1.25

U de *GoTaq*<sup>®</sup> Flexi ADN polimerasa (Promega), 5  $\mu$ L de templado (ADN diluido para las curvas estándar o ADNc para las muestras) y agua de grado PCR para completar el volumen. Como control negativo de la reacción (NTC, del inglés *No Template Control*), se sustituyó el templado por agua de grado PCR. Cada punto de la curva estándar y cada muestra se analizaron en triplicado.

El programa de termociclado consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 40 ciclos: desnaturalización a 95 °C durante 15 s, alineamiento a 60 °C durante 20 s y extensión a 72 °C durante 20 s. La lectura de la fluorescencia se realizó al final de cada ciclo de extensión, utilizando el canal verde (longitud de onda de excitación: 470 nm; longitud de onda de detección: 510 nm) con un *gain* (volumen del detector de fluorescencia en la qPCR) de 5. Al finalizar los ciclos, se generó una curva de disociación (*melting curve*) incrementando la temperatura de 55 a 99 °C con lecturas cada 1 °C.

El valor umbral del ciclo de cuantificación ( $C_q$ ) fue calculado automáticamente mediante el software Rotor-Gene Q Pure Detection v1.7 (Qiagen). Las concentraciones de ADN para las curvas estándar se expresaron en ng/ $\mu$ L y la eficiencia de amplificación fue calculada por el mismo software a partir de la pendiente de la recta de regresión lineal entre el logaritmo de la dilución y el  $C_q$ .

#### **6.6.6 Estabilidad de genes de referencia y cálculo de expresión relativa**

El ADN complementario (ADNc) obtenido en la sección 6.6.3 fue diluido 1:10 en agua grado PCR previamente expuesta a luz UV durante 15 min. Las reacciones de RT-qPCR se prepararon siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección 6.6.5, con una modificación en la curva de disociación (*melting curve*): se estableció un rango de temperatura correspondiente al valor promedio del pico de disociación ( $T_m$ )  $\pm$  5 °C, con adquisición de fluorescencia cada 0.5 °C. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que en la sección 6.6.5.

En cada reacción se agregaron 5  $\mu$ L de cDNA diluido 1:10 como templado. Se evaluaron tres réplicas biológicas por tratamiento y, para cada réplica biológica, se preparó una réplica técnica. Los valores de umbral (*threshold*) para la determinación del ciclo de cuantificación ( $C_q$ ) fueron los mismos que los establecidos previamente en las curvas estándar de cada par de oligonucleótidos. Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen).

Para la evaluación de la estabilidad de los genes de referencia, se analizaron cuatro genes: alfa-tubulina (*ATUB*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), factor de elongación 1 $\alpha$  (*EFA1*) y proteína ribosomal L7 (*RPL7*). Los valores de  $C_q$  obtenidos para cada gen en todos los tratamientos fueron ingresados en el software RefFinder (Xie et al., 2023), el cual integra los algoritmos geNorm, NormFinder,  $\Delta C_t$  y el método de mejor clasificación por rango (*rank aggregation*) para determinar la estabilidad de expresión. El análisis identificó a *EFA1* y *GAPDH* como los genes de referencia más estables entre los tratamientos evaluados. Una vez seleccionados los genes de referencia, se cuantificó la expresión de los genes blanco: jitterbug (*jBUG*), glutatión-S-transferasa (*GST*) y proteína de choque térmico 70 kDa (*HSP70*).

### 6.6.7 Cálculo de expresión relativa y análisis estadístico

Los valores de ciclo de cuantificación ( $C_q$ ) obtenidos para cada gen en el termociclador Rotor-Gene Q fueron exportados a una hoja de cálculo. Las réplicas técnicas de cada muestra se promediaron y se construyó una tabla con los valores promedio de las tres réplicas biológicas para cada tratamiento (Control, CL<sub>10</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>).

A partir de los genes de referencia identificados como los más estables (*EFA1* y *GAPDH*; sección 6.6.6), se calculó la media geométrica de sus valores de  $C_q$  en cada muestra. Esta media geométrica se utilizó como factor de normalización para calcular el  $\Delta C_q$  de cada gen blanco mediante la siguiente fórmula:

$$C_q = C_{q(\text{gen blanco})} - \sqrt{C_{qEFA1} * C_{qGAPDH}} \quad (3)$$

Posteriormente, se calculó el promedio de los valores de  $C_q$  del grupo de control para cada gen blanco. Con este valor de referencia, se determinó el  $\Delta\Delta C_q$  de cada muestra experimental:

$$\Delta\Delta C_q = \Delta C_{q(\text{tratamiento})} - \Delta C_{q(\text{promedio control})} \quad (4)$$

La expresión relativa se calculó con la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_q}$ , los valores de expresión relativa fueron transformados a  $\log_2$  (fold-change) para su análisis. Para cada tratamiento, se calcularon la media y la desviación estándar de los valores de  $\log_2$  (fold-change). A partir de estos valores, se determinaron los límites del error de la siguiente manera:

- **Media geométrica de la expresión relativa:**  $2^{(\log_2(\text{fold-change}))}$  ( 5 )
- **Error superior:**  $\text{media geométrica} * (2^{(\text{desviación estándar})})$  ( 6 )
- **Error inferior** =  $\frac{\text{media geométrica}}{2^{(\text{desviación estándar})}}$  ( 7 )

Los resultados se expresaron como fold-change  $\pm$  error y se graficaron en escala logarítmica para visualizar la regulación positiva (valores > 1) o negativa (valores < 1) de la expresión génica en los tratamientos en comparación con el grupo control.

## 6.7 Análisis histológico y morfometría

### 6.7.1 Fijación de tejidos

Las muestras de nauplios de *Artemia franciscana* obtenidas del bioensayo (sección 6.3) fueron fijadas en solución de Davidson con ácido acético (AFA) durante 48 h. Para ello, los organismos se colocaron en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL previamente etiquetados con papel opalina y lápiz HB 2. Transcurrido el tiempo de fijación, las muestras fueron preservadas en etanol al 70% hasta su procesamiento histológico (Bell y Lightner, 1988).

### 6.7.2 Procesamiento histológico e inclusión en parafina

Los organismos fijados fueron deshidratados en una serie ascendente de etanol (del 70% al 100%), aclarados con xileno e infiltrados en parafina (Paraplast X-Tra, McCormick Scientific, San Diego, CA, EE. UU.) utilizando un procesador automático de tejidos LEICA ASP200S (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania). Posteriormente, las muestras fueron incluidas en parafina líquida a 60 °C y enfriadas a -5 °C en un centro de inclusión LEICA EG1150H y EG1150C (Leica Biosystems). Los bloques de parafina obtenidos fueron cortados en un micrótopo de rotación LEICA RM2155 (Leica Biosystems) obteniendo cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor. Para cada muestra, se realizó una serie de 10 cortes consecutivos que contenían entre 10 y 20 larvas. Los cortes fueron montados en portaobjetos.

Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H&E). Posteriormente, las preparaciones fueron montadas en resina sintética sobre cubreobjetos.

### 6.7.3 Captura de imágenes y análisis morfométrico

Las preparaciones histológicas fueron observadas con un microscopio óptico compuesto OLYMPUS BX41 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) utilizando los objetivos 40x, 60x y 100x. Las imágenes fueron digitalizadas en alta resolución (600 dpi) y se seleccionaron 10 imágenes al azar por laminilla, con enfoque en las estructuras de interés (cutícula, lumen digestivo y diámetro corporal total). El análisis morfométrico se realizó con el software Image-Pro-Premier v.6.0.0.260 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE. UU.), que permitió realizar mediciones manuales de los siguientes parámetros: diámetro corporal total ( $\mu\text{m}$ ), espesor de la cutícula ( $\mu\text{m}$ ) y tamaño del lumen digestivo ( $\mu\text{m}$ ) (Anexo 1).

### 6.8 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos en los diferentes bioensayos (toxicidad aguda, perfil bioquímico, actividad enzimática, expresión génica y morfometría) fueron analizados con el software SigmaPlot v11.0 (Systat Software, Erkrath, Alemania). Para cada variable, se evaluó el cumplimiento de los supuestos de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov ( $\alpha = 0.05$ ) y de homocedasticidad mediante la prueba de Levene ( $\alpha = 0.05$ ).

Cuando los datos cumplieron con ambos supuestos (normalidad y homocedasticidad), se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA paramétrico) para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Control, CL<sub>10</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>). En los casos en que los datos no cumplieron los supuestos, se realizó un ANOVA no paramétrico (ANOVA sobre rangos) basado en la prueba de Kruskal-Wallis. En todos los casos, se consideró un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

Las pruebas *post hoc* para comparaciones múltiples fueron seleccionadas según la naturaleza de los datos: la prueba de Tukey se utilizó para comparaciones paramétricas con varianzas iguales, la prueba de Holm-Šidák para comparaciones paramétricas específicas, y la prueba de Dunn para comparaciones no paramétricas posteriores al análisis de Kruskal-Wallis.

Los gráficos de barras, de cajas y bigotes, y las figuras de resultados generales fueron elaborados en SigmaPlot v11.0. Los mapas de calor, los análisis de componentes principales (PCA) y las

gráficas de morfometría histológica fueron generados con el software R v4.4.2 (R Core Team, Viena, Austria) utilizando los paquetes [ggplot2](#), [pheatmap](#), y [factoextra](#).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Identificación molecular

Para confirmar la identidad taxonómica del organismo utilizado en los bioensayos, se amplificaron y secuenciaron dos marcadores moleculares: el gen nuclear *18S rRNA* y un fragmento del gen mitocondrial del *citocromo c oxidasa, subunidad I (COI)*.

La secuencia consenso del gen *18S rRNA* (longitud de 862 pb) se comparó con la base de datos del NCBI mediante BLASTn (megablast). Los resultados mostraron un 99.65% de identidad con secuencias de *Artemia salina*, *Artemia franciscana* y *Artemia tibetiana* (Tabla 1). Este nivel de identidad confirma la pertenencia del organismo al género *Artemia*, aunque el marcador *18S*, por ser altamente conservado, no permite la diferenciación a nivel de especie.

El análisis del fragmento del gen *COI* (longitud de 662 pb) mostró una identidad del 80.07% con secuencias de *Artemia franciscana* depositadas en GenBank (Tabla 1). Los primeros diez hits del alineamiento correspondieron en su totalidad a *A. franciscana*, con valores de cobertura del 86-88% y valores de E cercanos a cero ( $2e^{-114}$ ), lo que indica una alta significancia estadística de los alineamientos.

Con base en la congruencia de ambos marcadores, el *18S rRNA* confirma la pertenencia al género *Artemia* y el *COI* asigna consistentemente a *A. franciscana* como el mejor hit en todos los casos, el organismo utilizado en los bioensayos fue identificado como *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906).

**Tabla 1.** Resultados del alineamiento BLASTn para el gen *18S rRNA* y *COI* de *Artemia* spp.

Especie	Acceso	Identidad (%)	Cobertura (%)	Valor de E	Gen
<i>Artemia salina</i>	GU594637.1	99.65	100	0.0	<i>18s rRNA</i>
<i>Artemia franciscana</i>	XR_010620510.1	99.65	100	0.0	<i>18s rRNA</i>
<i>Artemia tibetiana</i>	PQ535703.1	99.65	100	0.0	<i>18s rRNA</i>
<i>Artemia franciscana</i>	KF662961.1	80.07	87	$1 \times 10^{-114}$	<i>COI</i>
<i>Artemia franciscana</i>	ON088944.1	80.03	86	$1 \times 10^{-112}$	<i>COI</i>
<i>Artemia franciscana</i>	KF662957.1	79.90	87	$1 \times 10^{-112}$	<i>COI</i>

## 7.2 Determinación de la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), CL<sub>25</sub> y CL<sub>10</sub> del extracto de *Agave lechuguilla* en nauplios de *Artemia franciscana*

Se realizaron cinco bioensayos independientes para determinar la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), así como las concentraciones letales 25 (CL<sub>25</sub>) y 10 (CL<sub>10</sub>) del extracto de *Agave lechuguilla* en nauplios de *Artemia franciscana* del estadio instar I. Para cada experimento, se ajustó un modelo de regresión lineal entre la mortalidad corregida (transformada a unidades Probit) y el logaritmo de la concentración del extracto. Los parámetros obtenidos en cada uno de los cinco experimentos se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Valores de concentración letal (CL<sub>10</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>) del extracto de *Agave lechuguilla* determinados en cinco bioensayos independientes. Se muestran los valores de CL<sub>50</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>10</sub> (µg/mL), junto con intervalos de confianza al 95 % (IC 95 %) de la CL<sub>50</sub>

Experimento	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC 95 % (CL <sub>50</sub> )	CL <sub>25</sub> (µg/mL)	CL <sub>10</sub> (µg/mL)
1	787.0	671.9 – 922.1	534.1	352.1
2	714.7	600.8 – 850.1	505.5	350.7
3	984.7	843.2 – 1150.3	704.0	492.4
4	702.7	593.8 – 831.8	396.9	198.9
5	853.9	708.2 – 1029.7	607.4	422.9

Los valores de  $CL_{50}$  obtenidos en los cinco experimentos presentaron una variabilidad moderada, con un rango de 702.7 a 984.7  $\mu\text{g/mL}$ . El experimento realizado el 11 de febrero de 2026 mostró el valor más alto de  $CL_{50}$  (984.7  $\mu\text{g/mL}$ ), mientras que el del 14 de febrero de 2026 presentó el más bajo (702.7  $\mu\text{g/mL}$ ). Los intervalos de confianza al 95% se superponían entre sí, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los experimentos.

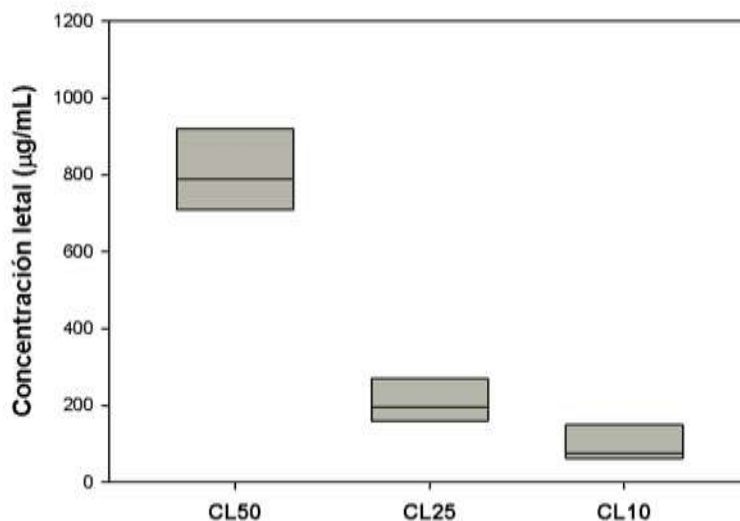
### 7.2.1 Cálculo de medias ponderadas

Para obtener una estimación global de la  $CL_{50}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{10}$  a partir de los cinco experimentos (Fig. 3), se realizó un análisis de medias ponderadas utilizando el inverso de la varianza del error estándar de cada estimación como factor de ponderación. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Valores ponderados de concentración letal ( $CL_{50}$ ,  $CL_{25}$  y  $CL_{10}$ ) del extracto de *Agave lechuguilla* calculados a partir de cinco bioensayos independientes. IC 95% significa intervalo de confianza al 95%.

Parámetro	$\log_{10}(\text{CL})$	CL ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC 95 % inferior ( $\mu\text{g/mL}$ )	IC 95 % superior ( $\mu\text{g/mL}$ )
$CL_{50}$	2.90	799	619	1,029
$CL_{25}$	2.33	214	175	263
$CL_{10}$	1.98	97	82	116

La media ponderada de la  $CL_{50}$  fue de 799  $\mu\text{g/mL}$  (IC 95 %: 619 – 1,029  $\mu\text{g/mL}$ ). De manera similar, la  $CL_{25}$  ponderada fue de 214  $\mu\text{g/mL}$  (IC 95 %: 175 – 263  $\mu\text{g/mL}$ ) y la  $CL_{10}$  ponderada fue de 97  $\mu\text{g/mL}$  (IC 95 %: 82 - 116  $\mu\text{g/mL}$ ).



**Figura 3.** Gráfico de cajas y bigotes que muestra la distribución de las concentraciones letales CL<sub>50</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>10</sub> (µg/mL) del extracto de *Agave lechuguilla* sobre nauplios de *Artemia franciscana*, calculadas a partir de cinco experimentos independientes. Para cada parámetro ( $n = 5$ ), la caja representa el rango intercuartil (Q1–Q3), la línea interna indica la mediana, y los bigotes se extienden hasta los valores mínimo y máximo.

### 7.3 Perfil bioquímico fisiológico: carbohidratos, proteínas y lípidos totales

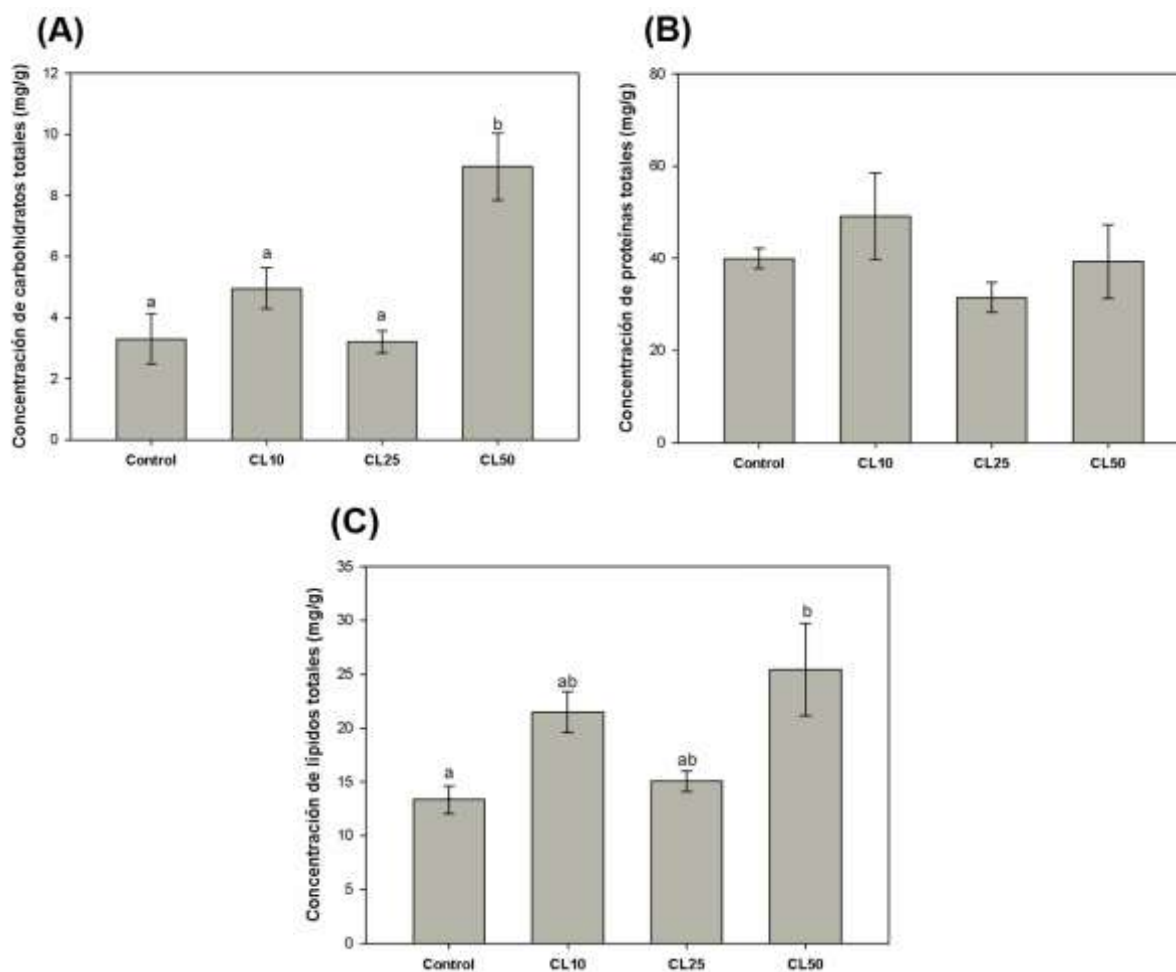
Se cuantificó el contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos totales en *Artemia franciscana* expuesta durante 24 h a las concentraciones letales CL<sub>10</sub> (97 µg/mL), CL<sub>25</sub> (214 µg/mL) y CL<sub>50</sub> (799 µg/mL) del extracto de *Agave lechuguilla*, expresado en mg por gramo de peso seco (mg/g) (Fig. 4).

Para los carbohidratos totales, el análisis de varianza (ANOVA de una vía) mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $F = 11.697$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.003$ ). La prueba *post hoc* Holm-Šidák reveló que las artemias expuestas a la CL<sub>50</sub> ( $8.94 \pm 1.90$  mg/g) presentaron un contenido de carbohidratos significativamente mayor en comparación con las del control ( $3.30 \pm 1.43$  mg/g;  $p < 0.001$ ), y con los tratamientos CL<sub>10</sub> ( $4.95 \pm 1.17$  mg/g;  $p = 0.007$ ) y CL<sub>25</sub> ( $3.20 \pm 0.62$  mg/g;  $p < 0.001$ ). No se detectaron diferencias significativas entre los organismos del control, de la CL<sub>25</sub> y de la CL<sub>10</sub> ( $p > 0.05$ ; Fig. 4a).

El contenido de proteínas totales no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (ANOVA,  $F = 1.162$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.382$ ; Fig. 4b). Los valores medios fueron: control

( $39.95 \pm 3.76$  mg/g), CL<sub>10</sub> ( $49.08 \pm 16.27$  mg/g), CL<sub>25</sub> ( $31.48 \pm 5.61$  mg/g) y CL<sub>50</sub> ( $39.31 \pm 13.75$  mg/g).

En el análisis de lípidos totales, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (ANOVA,  $F = 5.154$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.028$ ). La prueba post hoc de Tukey mostró que las artemias expuestas a la CL<sub>50</sub> ( $25.43 \pm 7.42$  mg/g) presentaron un contenido de lípidos significativamente mayor que el del control ( $13.35 \pm 2.25$  mg/g;  $q = 4.879$ ,  $p = 0.035$ ). No se encontraron diferencias significativas entre los demás tratamientos ( $p > 0.05$ ; Fig. 4c).

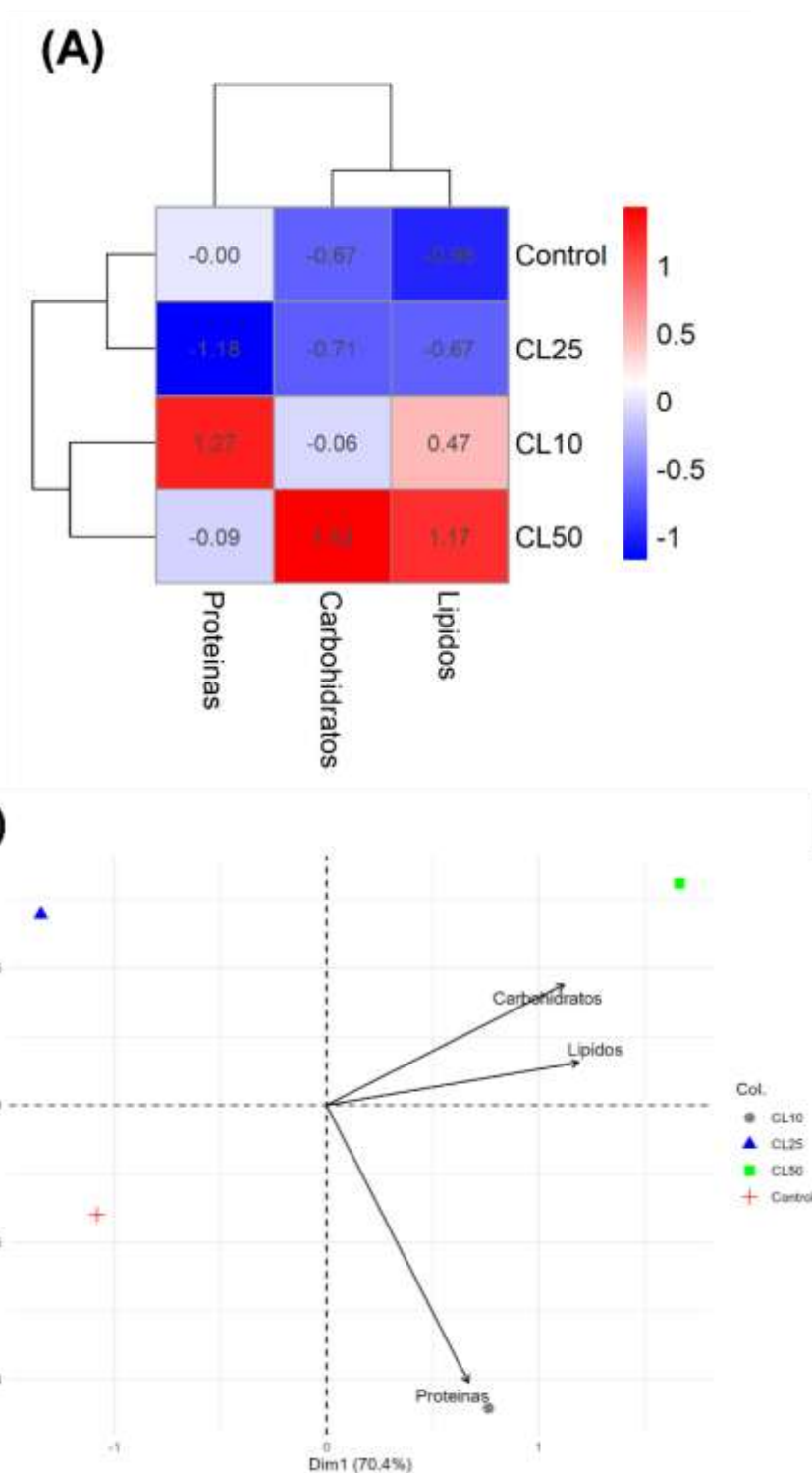


**Figura 4.** Contenido de **(A)** carbohidratos totales, **(B)** proteínas totales y **(C)** lípidos totales (mg/g peso seco) en *Artemia franciscana* expuesta a las concentraciones CL<sub>10</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub> del extracto de *Agave lechuguilla*. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar ( $n = 3$ ). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas según la prueba *post hoc* correspondiente (Holm-Šidák para carbohidratos, Tukey para lípidos;  $p < 0.05$ ).

Para explorar de manera integral las relaciones entre los tratamientos (Control, CL<sub>50</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>10</sub>) y las variables bioquímicas (carbohidratos, proteínas y lípidos totales), se elaboraron un mapa de calor (con datos estandarizados) y un Análisis de Componentes Principales (PCA). Los resultados se presentan en la Fig. 5.

El análisis de conglomerados jerárquicos agrupó los tratamientos en dos grandes clústeres. El primer clúster agrupó al Control y a CL<sub>25</sub>, mientras que el segundo agrupó a CL<sub>10</sub> y a CL<sub>50</sub>. En cuanto a las variables, los carbohidratos y los lípidos mostraron un patrón de aumento progresivo desde el Control hasta CL<sub>50</sub>, con los valores más altos en el último tratamiento (en rojo intenso). Las proteínas totales no presentaron un patrón claro de asociación con los tratamientos, con valores intermedios en todos los grupos.

Los dos primeros componentes principales explicaron el 98.5% de la varianza total (PC1 = 70.4%, PC2 = 28.1%). El biplot mostró una separación de los tratamientos a lo largo del eje PC1. El Control y CL<sub>25</sub> se ubicaron en la región negativa del PC1, mientras que CL<sub>10</sub> y CL<sub>50</sub> se ubicaron en la región positiva. CL<sub>50</sub> presentó la mayor distancia respecto al control, lo que indica un perfil bioquímico diferenciado. Las flechas correspondientes a carbohidratos y lípidos apuntaron hacia CL<sub>50</sub>, con longitudes relativamente grandes, lo que sugiere una fuerte contribución de estas variables a la separación observada. La flecha de proteínas mostró una longitud menor y una orientación menos definida, lo cual es consistente con su menor poder de discriminación entre tratamientos.



**Figura 5.** Análisis multivariado del perfil bioquímico. **(A)** Mapa de calor del perfil bioquímico de *Artemia franciscana* expuesta por 24 h a diferentes concentraciones letales del extracto de *Agave lechuguilla*. Los valores estandarizados (escala Z) se representan en una gradiente de color desde azul (valores bajos) hasta rojo (valores altos). **(B)** Biplot del Análisis de Componentes Principales (PCA) mostrando la distribución de los tratamientos (puntos) y la contribución de las variables (flechas).

#### 7.4 Actividad de enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GR)

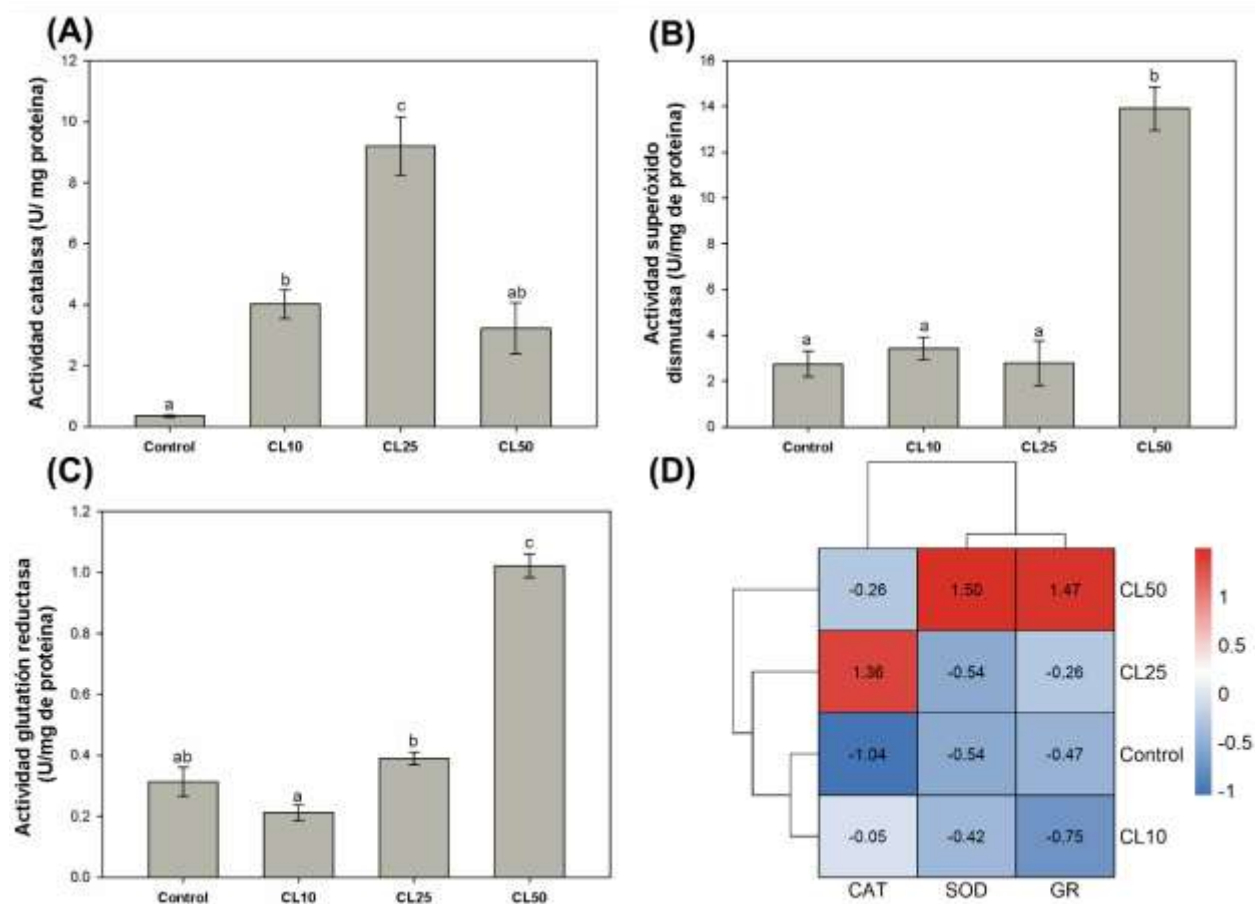
Se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión reductasa (GR) en *Artemia franciscana* expuesta a las concentraciones letales CL<sub>10</sub> (97 µg/mL), CL<sub>25</sub> (214 µg/mL) y CL<sub>50</sub> (799 µg/mL) del extracto de *Agave lechuguilla*. Los resultados se presentan en la Fig. 5, que incluye los gráficos de barras de cada enzima (paneles A-C) y un mapa de calor de las tres enzimas (panel D).

La actividad de CAT mostró diferencias marcadas entre los tratamientos (Fig. 5A). Los organismos del grupo control presentaron la actividad más baja ( $0.34 \pm 0.03$  U/mg proteína). Las artemias del tratamiento CL<sub>25</sub> mostraron la actividad más alta ( $9.19 \pm 0.93$  U/mg proteína), seguida por las de los tratamientos CL<sub>10</sub> ( $4.01 \pm 0.47$  U/mg proteína) y CL<sub>50</sub> ( $3.22 \pm 0.84$  U/mg proteína).

La actividad de la SOD presentó un patrón similar al de la CAT en cuanto a la magnitud de la respuesta (Fig. 5B). Las artemias del control mostraron una actividad de  $2.75 \pm 0.54$  U/mg proteína. Los organismos sometidos a la CL<sub>10</sub> presentaron un valor de  $3.43 \pm 0.48$  U/mg proteína, mientras que los expuestos a la CL<sub>25</sub> tuvieron una actividad de  $2.78 \pm 0.96$  U/mg proteína. Las artemias del tratamiento CL<sub>50</sub> exhibieron la actividad más alta ( $13.92 \pm 0.95$  U/mg proteína), aproximadamente cinco veces mayor que las del control.

La actividad de GR mostró un patrón diferencial (Fig. 5C). Las artemias del control presentaron una actividad de  $0.31 \pm 0.05$  U/mg proteína. Los organismos del tratamiento CL<sub>10</sub> mostraron una disminución ( $0.21 \pm 0.02$  U/mg proteína), mientras que los del grupo CL<sub>25</sub> presentaron un valor similar al del control ( $0.39 \pm 0.02$  U/mg proteína). Las artemias del tratamiento CL<sub>50</sub> presentaron la actividad más alta ( $1.02 \pm 0.05$  U/mg proteína), aproximadamente tres veces mayor que el control.

El análisis multivariado mediante mapa de calor de los valores estandarizados (Fig. 5D) mostró la formación de varios conglomerados principales de tratamientos. Un conglomerado agrupó al Control y a CL<sub>25</sub>, mientras que otro agrupó a CL<sub>10</sub> y a CL<sub>50</sub>. Se asoció con los valores más altos de SOD y GR (color rojo intenso), mientras que la CAT presentó su valor más alto en CL<sub>25</sub>. El control se caracterizó por valores bajos en las tres enzimas.



**Figura 6.** Actividad de enzimas antioxidantes en *Artemia franciscana* expuesta a diferentes concentraciones del extracto de *Agave lechuguilla*. **(A)** Catalasa (CAT) donde 1 U se define como 1  $\mu\text{mol}/\text{mL}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumido por min, **(B)** Superóxido dismutasa (SOD) donde 1 U se define como 50% de inhibición de la reducción del NBT por min, **(C)** Glutación reductasa (GR), donde 1 U se define como 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{TNB}^-$  formado por min. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar ( $n = 3$ ). **(D)** Mapa de calor de los valores estandarizados de las tres enzimas antioxidantes.

## 7.5 Expresión relativa de genes

### 7.5.1 Calidad del ARN total

La calidad del ARN total extraído de *Artemia franciscana* (12 muestras: tres réplicas biológicas por cada tratamiento: Control, CL<sub>10</sub>, CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub>) fue evaluada mediante espectrofotometría (NanoDrop-1000) y electroforesis en gel de agarosa con tampón TAE 1X.

La concentración y pureza del ARN se presentan en la Tabla 3. Las concentraciones de ARN obtenidas oscilaron entre 51.9 y 1,385  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Los valores de la relación  $A_{260}/A_{280}$  se encontraron en un rango de 2.10 a 2.17, indicando una mínima contaminación por proteínas. Los valores de la

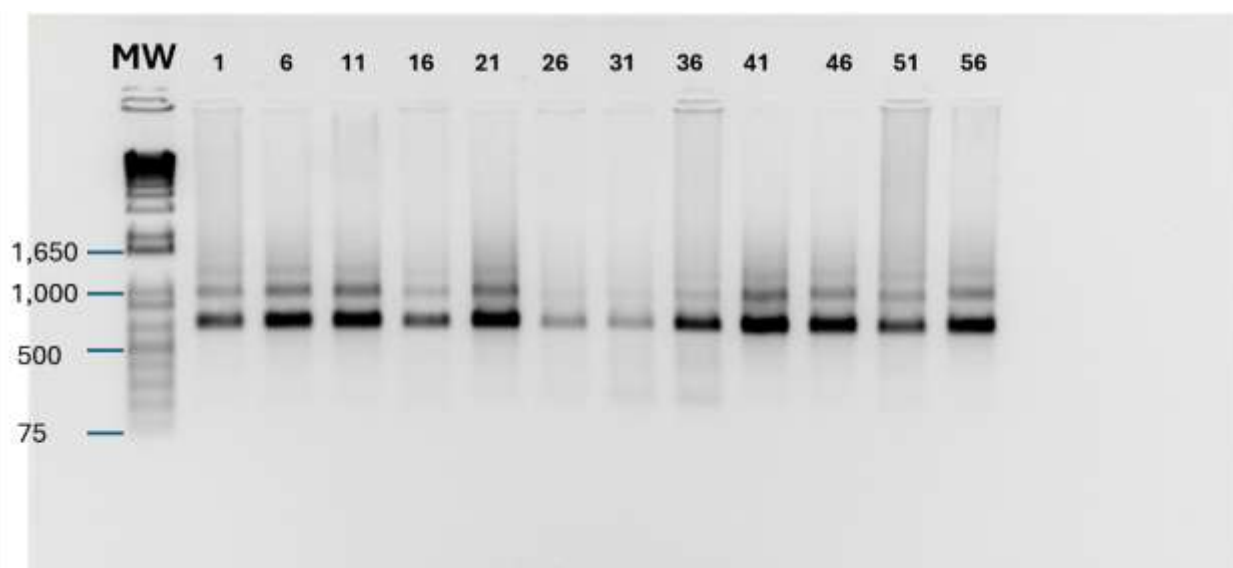
relación  $A_{260}/_{230}$  se encontraron entre 1.20 y 2.35; aunque la muestra CL<sub>10</sub>-1 presentó un valor de 1.20, el resto de las muestras mostraron valores dentro del rango aceptable para ARN total ( $\geq 1.8$ ).

**Tabla 4.** Concentración y pureza del ARN total extraído de *Artemia franciscana*.

Muestra	Tratamiento	Código gel	Concentración (ng/uL)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>
1	CL <sub>50</sub> -1	1	1,020	2.16	2.33
2	CL <sub>25</sub> -2	6	989.4	2.17	2.33
3	CL <sub>10</sub> -3	11	1,385	2.16	2.34
4	Control-1	16	123.9	2.11	1.66
5	CL <sub>50</sub> -2	21	893.7	2.17	2.29
6	CL <sub>25</sub> -3	26	51.9	2.13	2.10
7	CL <sub>10</sub> -1	31	62.5	2.10	1.20
8	Control-2	36	292.7	2.15	2.09
9	CL <sub>50</sub> -3	41	322	2.16	2.29
10	CL <sub>25</sub> -2	46	637.2	2.17	2.30
11	CL <sub>10</sub> -2	51	289.5	2.12	2.23
12	Control-3	56	1,016.1	2.17	2.35

Los códigos de gel corresponden al orden de carril en la electroforesis (Fig. 7).

La integridad del ARN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red. Se utilizó un marcador de peso molecular de ADN (100-3,000 pb) como referencia de movilidad electroforética. El gel (Fig. 7) mostró bandas bien definidas correspondientes al ARN ribosomal, sin evidencia de degradación (rastreo o *smearing*). Se observaron tres bandas principales: una banda tenue entre 1,000 y 1,650 pb, una banda definida aproximadamente a la altura de 1,000 pb y una tercera banda a la altura de aproximadamente 650 pb. La presencia de bandas discretas y la ausencia de degradación confirmaron la integridad del ARN total para su uso en la síntesis de ADNc y los análisis de expresión génica posteriores.



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ARN total extraído de *Artemia franciscana*. MW: marcador de peso molecular de 1 kb *plus DNA ladder* (pb). Los números sobre cada carril corresponden al código de gel indicado en la Tabla 4.

### 7.5.2 Cálculo de la eficiencia de los oligonucleótidos

Para cada par de oligonucleótidos diseñados (cuatro genes de referencia y tres genes blanco), se construyó una curva estándar mediante diluciones seriadas de ADN genómico de *Artemia franciscana* (1:5, 1:50, 1:500, 1:5,000 y 1:50,000). La eficiencia de amplificación (E) se calculó a partir de la pendiente de la recta de regresión lineal entre el logaritmo de la dilución y el valor de  $C_q$ , utilizando la fórmula:  $E = 10^{(-1/pendiente)}$ . El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se obtuvo de la misma regresión lineal.

La Tabla 5 resume las características de los siete pares de oligonucleótidos evaluados. Los amplicones presentaron tamaños entre 99 y 207 pb, dentro del rango recomendado para RT-qPCR (85-250 pb). Las temperaturas de disociación ( $T_m$ ) oscilaron entre 78.1 y 82.4 °C, con desviaciones estándar  $\leq 0.4$  °C, lo que indica amplificación específica de un solo producto. Las eficiencias de amplificación se encontraron en un rango de 1.86 a 2.13, dentro del intervalo aceptable (1.8-2.2). Los valores de  $R^2$  fueron  $\geq 0.98$  en todos los casos, lo que indica una excelente correlación lineal entre la dilución del templado y el  $C_q$ .

**Tabla 5.** Características de los oligonucleótidos utilizados para RT-qPCR. Los valores de la temperatura del pico disociación muestran la media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 15$ ). S: refiere a la secuencia sentido y A: a la secuencia antisentido.

Código gen	Nombre proteína codificante		Secuencia (5'–3')	Tamaño amplicon (pb)	Pico de disociación (° C)	Eficiencia	R <sup>2</sup>	Acceso NCBI
<i>AfATUB</i>	$\alpha$ -tubulina	S	CACTCTGACTGCGCTTTTATGG	128	81 $\pm$ 0.2	2.03	0.98	EU179856.1
		A	GTGATGGAGGAAACGATTTGACC					
<i>AfEF1A</i>	Factor de elongación 1- $\alpha$	S	CAGATCTCAAACGGTTACTACTCC	207	82.4 $\pm$ 0.3	1.86	0.99	XM_065717152.1
		A	AGGTGGGAAGTCGGAAAAGG					
<i>AfGAPDH</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	S	GCACCACCAACTGTCTAGC	146	79.2 $\pm$ 0.2	1.87	0.99	XM_065706136.1
		A	CCTGCCATCTCTCCATAGTTTACC					
<i>AfRPL7</i>	Proteína ribosómica L7	S	GCCCAAAGTGAAGAAAACGC	192	81.3 $\pm$ 0.3	2.11	0.99	XM_065710936.1
		A	CGCCTCTGTGGAACCTTGG					
<i>AfGST</i>	Glutación S-transferasa	S	GTAAGATAACACAGAGCAATGCG	99	79.3 $\pm$ 0.2	2.08	0.99	XM_065716579.1
		A	GTCAACACGCACCATTCTTCAC					
<i>AfHSP70</i>	Proteína de choque térmico 70 kDa	S	CCACTCGAATCCCCAAAATCC	110	78.1 $\pm$ 0.3	2.11	0.99	MH614170.1
		A	TTGAACAGCAGCACCATAGG					
<i>AfJBUG</i>	Proteína Jitterbug	S	CCAACCCACGAAATTCATACAAC	197	79 $\pm$ 0.4	2.13	0.99	XM_065720141.1
		A	ACGTGCTCAGGTGATGGG					

### 7.5.3 Estabilidad de genes de referencia

Para identificar los genes de referencia más estables en *Artemia franciscana* durante el experimento con diversas concentraciones letales de *Agave lechuguilla*, se evaluaron cuatro genes candidatos:  $\alpha$ -tubulina (*ATUB*), factor de elongación 1- $\alpha$  (*EF1A*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y proteína ribosomal L7 (*RPL7*). Los valores de  $C_q$  obtenidos para cada gen en los cuatro tratamientos (Control,  $CL_{10}$ ,  $CL_{25}$ ,  $CL_{50}$ ) se analizaron con el software RefFinder, que integra los algoritmos  $\Delta C_t$ , BestKeeper, NormFinder y geNorm.

El algoritmo  $\Delta C_t$  calcula la desviación estándar promedio de los  $C_q$  de cada gen. Los valores más bajos indican mayor estabilidad. *EF1A* y *GAPDH* presentaron los valores más bajos (0.27 y 0.27, respectivamente), seguidos de *RPL7* (0.32) y *ATUB* (0.34).

El algoritmo BestKeeper evalúa la variabilidad de los  $C_q$  mediante la desviación estándar y el coeficiente de variación. *ATUB* mostró la desviación estándar más baja (0.54), seguida de *GAPDH* (0.55), *EF1A* (0.59) y *RPL7* (0.60). El coeficiente de variación más bajo también se registró en *ATUB* (3.82%). La matriz de correlación de Pearson mostró correlaciones significativas ( $p < 0.001$ ) entre todos los pares de genes, con valores de  $r$  entre 0.840 y 0.972.

El análisis del algoritmo NormFinder estima la estabilidad a partir de la varianza combinada intra- y intergrupala. *EF1A* presentó el valor de estabilidad más bajo (0.110), seguido de *GAPDH* (0.136), *RPL7* (0.270) y *ATUB* (0.299).

Análisis geNorm. Este algoritmo calcula el valor de estabilidad  $M$ ; valores menores que 0.5 indican una alta estabilidad. *GAPDH* y *RPL7* presentaron los valores más bajos (0.199), seguidos de *EF1A* (0.259) y *ATUB* (0.299).

Con base en la integración de los cuatro algoritmos (Tabla 6), RefFinder generó una clasificación final (*Recommended comprehensive ranking*) que estableció el siguiente orden de estabilidad: *GAPDH* > *EF1A* > *RPL7* > *ATUB*. Por lo tanto, *GAPDH* y *EF1A* fueron seleccionados como los genes de referencia más estables para la normalización de los datos de expresión génica en este estudio.

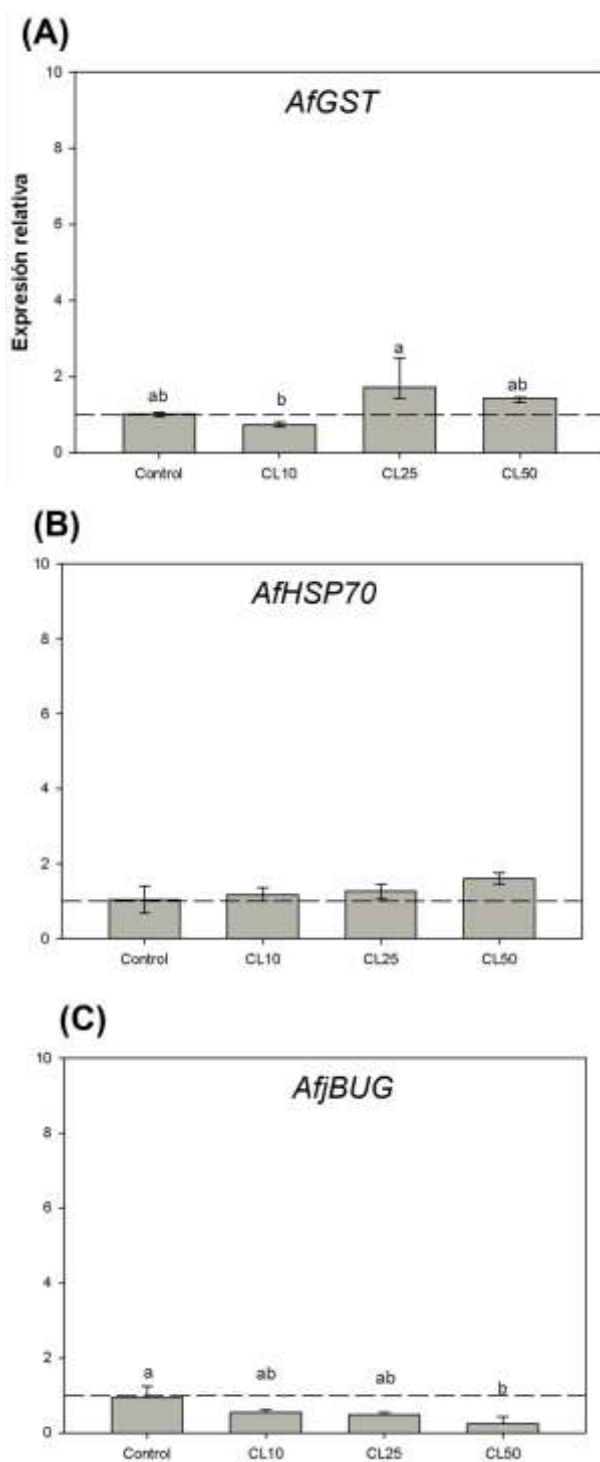
**Tabla 6.** Clasificación de la estabilidad de los genes de referencia según cada algoritmo.

Gen	$\Delta Ct$	BestKeeper	NormFinder	geNorm	Clasificación final
<i>AfEF1A</i>	1	3	1	3	2
<i>AfGAPDH</i>	2	2	2	1	1
<i>AfRPL7</i>	3	4	3	1	3
<i>AfATUB</i>	4	1	4	4	4

Los números indican el orden de estabilidad (1 = más estable, 4 = menos estable). La clasificación final corresponde al ranking recomendado por RefFinder.

#### 7.5.4 Expresión relativa de genes

Se evaluó la expresión relativa de tres genes asociados a respuesta a estrés y metabolismo de xenobióticos en *Artemia franciscana* expuesta a las concentraciones letales  $CL_{10}$  (97  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),  $CL_{25}$  (214  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y  $CL_{50}$  (799  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) del extracto de *Agave lechuguilla*: glutatión S-transferasa (*AfGST*), proteína de choque térmico 70 kDa (*AfHSP70*) y la proteína *Jitterbug* (*AfjBUG*). Los valores de expresión relativa se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , normalizando frente a los genes de referencia *AfGAPDH* y *AfEF1A* (Fig. 8).



**Figura 8.** Expresión relativa de genes en nauplios de *Artemia franciscana* expuesta a diversas concentraciones letales del extracto de *Agave lechuguilla*. **(A)** Glutación S-transferasa (*AfGST*). Los datos se presentan como mediana y percentiles 25-75 ( $n = 3$ ). **(B)** Proteína de choque térmico 70 kDa (*AfHSP70*). **(C)** Proteína Jitterbug (*AfjBUG*). Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). La línea horizontal punteada representa el nivel basal del control (valor = 1).

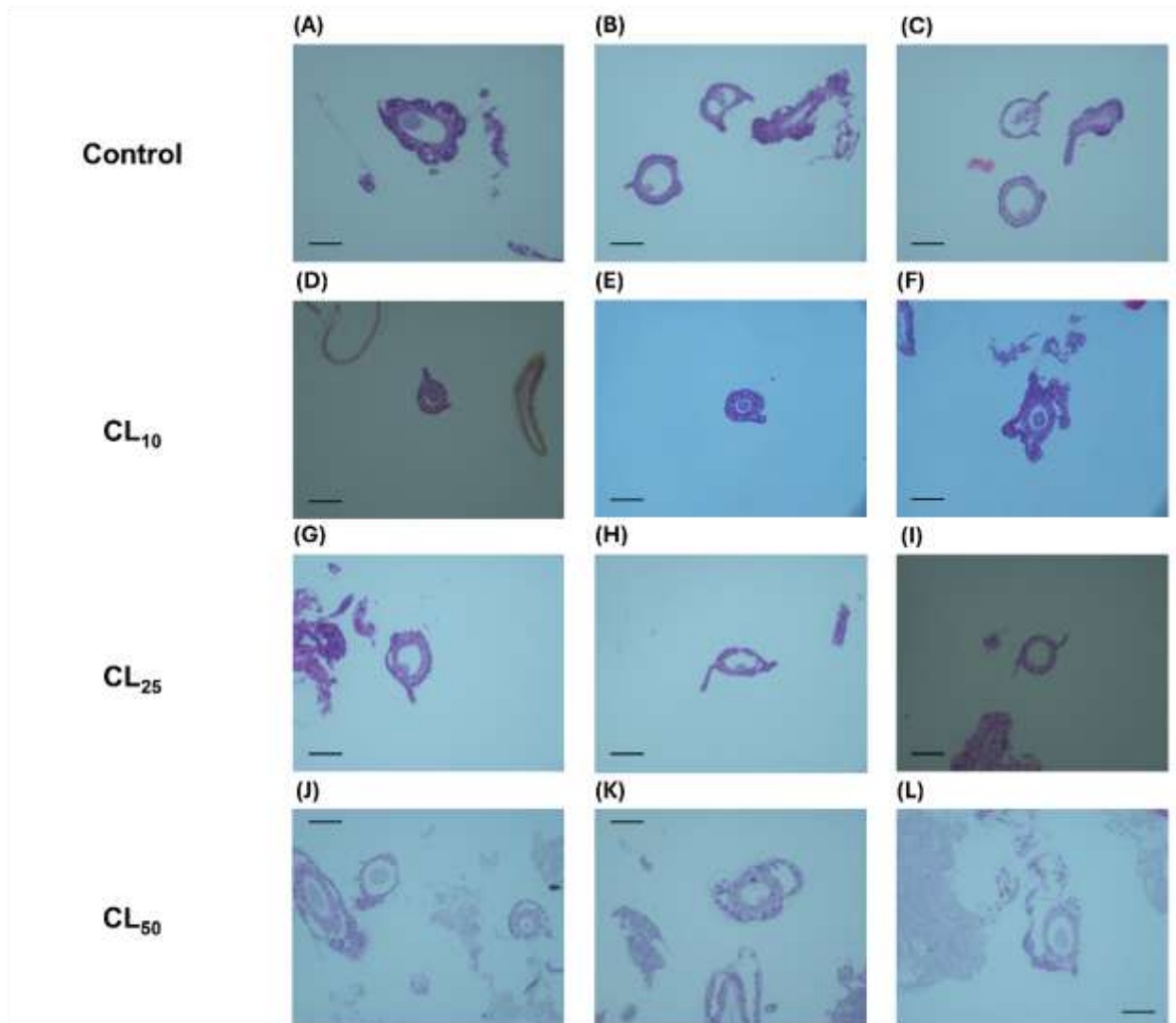
La expresión de *AfGST* no presentó una distribución normal ni homocedasticidad (Prueba de normalidad falló,  $p < 0.05$ ), por lo que se realizó un análisis de Kruskal-Wallis. Este mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $H = 9.974$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.019$ ; Fig. 8A). La prueba *post hoc* de Tukey sobre rangos identificó que CL<sub>25</sub> (mediana = 1.706) presentó una expresión significativamente mayor que la de CL<sub>10</sub> (mediana = 0.723;  $p < 0.05$ ). No se detectaron diferencias significativas entre los demás tratamientos.

En la expresión del gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (*AfHSP70*), el análisis de varianza (ANOVA de una vía) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $F = 3.162$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.086$ ; Fig. 8B). Los valores medios de expresión fueron: Control ( $1.045 \pm 0.358$ ), CL<sub>10</sub> ( $1.178 \pm 0.175$ ), CL<sub>25</sub> ( $1.256 \pm 0.197$ ) y CL<sub>50</sub> ( $1.608 \pm 0.146$ ). Aunque CL<sub>50</sub> aumentó 1.5 veces respecto al control, la diferencia no fue estadísticamente significativa. La potencia del análisis fue baja (0.360), por lo que los resultados negativos deben interpretarse con cautela.

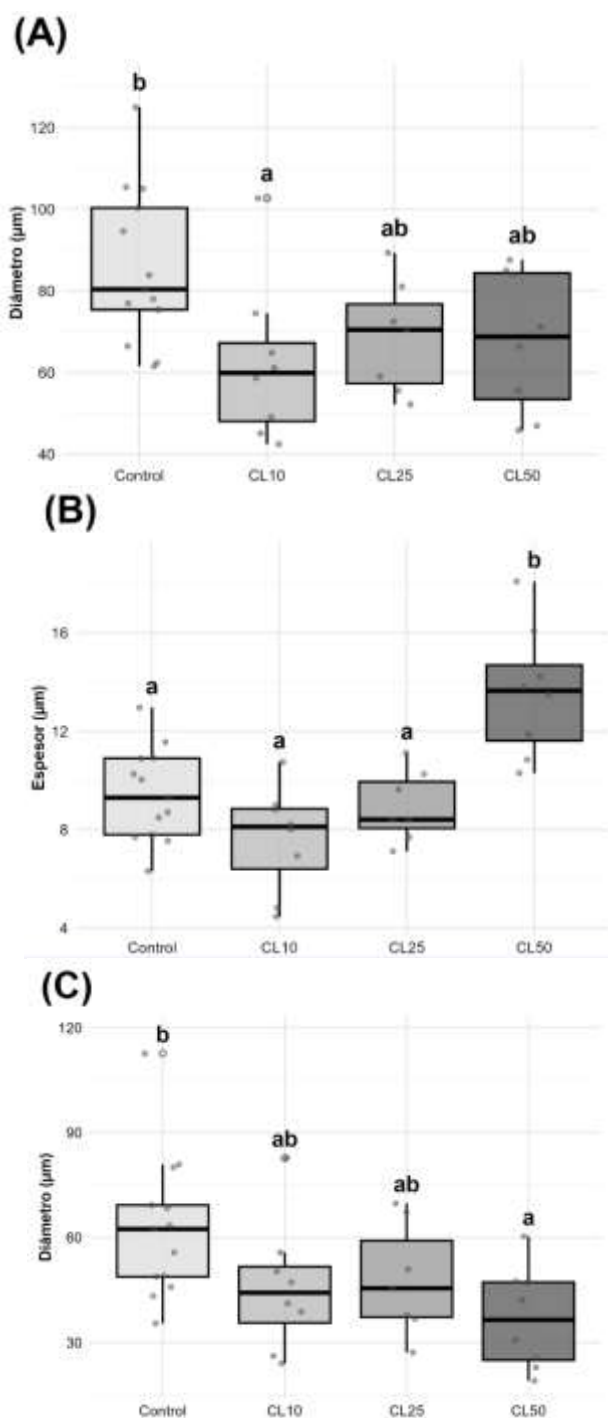
La expresión de *AfjBUG* mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (ANOVA,  $F = 7.407$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.011$ ; Fig. 8C). La prueba *post hoc* de Tukey reveló que el Control ( $0.939 \pm 0.295$ ) presentó una expresión significativamente mayor que la de CL<sub>50</sub> ( $0.234 \pm 0.203$ ;  $P = 0.007$ ). No se detectaron diferencias significativas entre el Control y CL<sub>10</sub> ( $0.547 \pm 0.078$ ) ni entre el Control y CL<sub>25</sub> ( $0.487 \pm 0.059$ ). Se observó una tendencia a la disminución de la expresión a medida que aumentaba la concentración del extracto.

### **7.6 Morfometría por histología de *Artemia franciscana* expuesta a concentraciones letales del extracto**

Se realizó un análisis histológico y morfométrico de nauplios de *Artemia franciscana* en el estadio instar I, expuestos durante 24 h a las concentraciones letales CL<sub>10</sub> (97 µg/mL), CL<sub>25</sub> (214 µg/mL) y CL<sub>50</sub> (799 µg/mL) del extracto de *Agave lechuguilla*. Se evaluaron tres parámetros en cortes transversales: diámetro corporal total (R1), espesor de la cutícula (R2) y tamaño del lumen digestivo (R3). Los resultados se presentan en la Fig. 9 (micrografías representativas) y en la Fig. 10 (gráficos de cajas y bigotes para cada parámetro).



**Figura 9.** Micrografías de cortes transversales de nauplios de *Artemia franciscana* expuestos a concentraciones letales del extracto de *Agave lechuguilla* por 24 h. **(A-C)** Control, **(D-F)** CL<sub>10</sub>, **(G-I)** CL<sub>25</sub>, **(J-L)** CL<sub>50</sub>. La barra de escala representa 50  $\mu$ m.



**Figura 10.** Morfometría de nauplios de *Artemia franciscana* expuestos al extracto de *Agave lechuguilla*. **(A)** Diámetro corporal total (R1), **(B)** Espesor de la cutícula (R2), **(C)** Tamaño del lumen digestivo (R3). Los datos se presentan como gráficos de cajas y bigotes ( $n = 7-13$ ). La caja representa el rango intercuartil (**Q1-Q3**), la línea interna indica la mediana, los bigotes se extienden hasta los valores mínimo y máximo. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey,  $p < 0.05$ ).

Para el diámetro corporal total (R1), el análisis de varianza (ANOVA de una vía) mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $F = 3.546$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.025$ ; Fig. 10A). La prueba *post hoc* de Tukey reveló que el diámetro corporal del grupo Control ( $85.82 \pm 19.07 \mu\text{m}$ ) fue significativamente mayor que el de CL<sub>10</sub> ( $62.34 \pm 19.51 \mu\text{m}$ ;  $p = 0.030$ ). No se detectaron diferencias significativas entre el Control y CL<sub>25</sub> ( $68.61 \pm 13.72 \mu\text{m}$ ) ni entre el Control y CL<sub>50</sub> ( $67.86 \pm 17.04 \mu\text{m}$ ).

En el espesor de la cutícula (R2) se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (ANOVA,  $F = 12.587$ ,  $gl = 3$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 10B). La prueba *post hoc* de Tukey mostró que CL<sub>50</sub> ( $13.59 \pm 2.62 \mu\text{m}$ ) presentó un espesor cuticular significativamente mayor que el del Control ( $9.42 \pm 1.89 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.001$ ), CL<sub>10</sub> ( $7.62 \pm 2.13 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.001$ ) y CL<sub>25</sub> ( $8.95 \pm 1.44 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.001$ ). No se encontraron diferencias significativas entre el Control y los tratamientos CL<sub>10</sub> y CL<sub>25</sub>.

El tamaño del lumen digestivo (R3), el análisis mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (ANOVA,  $F = 3.721$ ,  $gl = 3$ ,  $p = 0.021$ ; Fig. 10C). La prueba *post hoc* de Tukey reveló que el lumen del Control ( $62.76 \pm 20.48 \mu\text{m}$ ) fue significativamente mayor que el de CL<sub>50</sub> ( $36.96 \pm 14.50 \mu\text{m}$ ;  $p = 0.017$ ). No se detectaron diferencias significativas entre el Control y CL<sub>10</sub> ( $45.80 \pm 18.59 \mu\text{m}$ ) ni entre el Control y CL<sub>25</sub> ( $47.92 \pm 15.95 \mu\text{m}$ ).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Valor de $CL_{50}$ en contexto ecotoxicológico

La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) es uno de los indicadores más utilizados en ecotoxicología para estimar la toxicidad aguda de una sustancia en un organismo modelo. En el presente estudio, la exposición de nauplios de *Artemia franciscana* al extracto de *Agave lechuguilla* durante 24 h produjo una  $CL_{50}$  de 799  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo que demuestra que el extracto presenta actividad tóxica aguda sobre este organismo. Sin embargo, la magnitud de dicha toxicidad debe interpretarse en un contexto ecotoxicológico y regulatorio adecuado.

Los sistemas internacionales de clasificación de peligrosidad acuática utilizan valores de  $CL_{50}$  como uno de los criterios principales para identificar sustancias potencialmente tóxicas para los organismos acuáticos (ONU, 2001; USEPA, 2002). Bajo estos esquemas, el valor obtenido en este estudio se sitúa por encima de los umbrales generalmente asociados a sustancias de elevada toxicidad aguda, lo que sugiere una toxicidad aguda relativamente baja en las condiciones experimentales evaluadas.

Esta interpretación es consistente con el enfoque empleado en las guías de toxicidad aguda de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, que utilizan pruebas de exposición aguda para identificar peligros potenciales y establecer concentraciones de referencia para evaluaciones ecotoxicológicas posteriores (OCDE, 2025a, 2025b). No obstante, dichas clasificaciones forman parte de las herramientas de identificación de peligros y no de la evaluación integral del riesgo ambiental.

La comparación con otros herbicidas evaluados en *Artemia franciscana* proporciona un marco de referencia adicional para interpretar los resultados obtenidos. Mashjoor et al., (2019) reportaron valores de  $CL_{50}$  de 11.87 mg/L para trifluralina, 12.93 mg/L para 2,4-D y 164.31 mg/L para glifosato. Aunque las diferencias metodológicas entre estudios requieren cautela en las comparaciones directas, la  $CL_{50}$  obtenida para el extracto de *A. lechuguilla* fue superior a las reportadas para estos herbicidas sintéticos, lo que sugiere una menor toxicidad aguda relativa en este organismo modelo.

Sin embargo, este resultado no debe interpretarse como evidencia suficiente de la seguridad ambiental. La  $CL_{50}$  representa únicamente un punto final letal derivado de una exposición aguda bajo condiciones controladas de laboratorio y no proporciona información sobre efectos crónicos, alteraciones reproductivas, bioacumulación, persistencia ambiental ni la sensibilidad de otras especies potencialmente expuestas. Por lo que, los resultados obtenidos deben considerarse una primera aproximación al perfil ecotoxicológico del extracto.

## **8.2 Mecanismos de toxicidad aguda**

### **8.2.1 Alteraciones del metabolismo energético y respuesta antioxidante**

Los crustáceos del género *Artemia* son organismos halófitos extremos que han desarrollado mecanismos fisiológicos y moleculares altamente eficientes para hacer frente a condiciones ambientales adversas, incluyendo cambios en la salinidad, la temperatura, la anoxia y la exposición a contaminantes (Gajardo & Beardmore, 2012; Hibshman et al., 2020). Bajo condiciones de estrés, estos organismos activan rutas metabólicas que movilizan reservas energéticas para sostener procesos de detoxificación, reparación celular y síntesis de proteínas de estrés (Lankadurai et al., 2013). En este contexto, el incremento en los niveles de carbohidratos y lípidos observado en los nauplios expuestos a la  $CL_{50}$  podría interpretarse como una movilización de reservas energéticas hacia compartimentos celulares, o alternativamente, como un posible daño en las estructuras celulares de almacenamiento (cuerpo graso y hepatopáncreas) que impide la correcta utilización de estos sustratos (Ru Tiong et al., 2024)

El aumento significativo de los lípidos totales en la  $CL_{50}$  (25.43 mg/g) frente al control (13.35 mg/g) es particularmente relevante, ya que los lípidos constituyen la principal reserva energética en los crustáceos y son esenciales para procesos como la muda, el desarrollo y la reproducción (Ludevese-Pascual et al., 2020). Un desequilibrio en el metabolismo lipídico puede tener consecuencias profundas en la fisiología del organismo, afectando su capacidad de respuesta ante estresores adicionales. La exposición a contaminantes puede alterar rutas metabólicas clave, como la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y el ciclo de Krebs, lo que se traduce en la acumulación de metabolitos intermediarios y en cambios en los niveles de lípidos y carbohidratos (Lankadurai et al., 2013). En el caso del extracto de *A. lechuguilla*, el aumento de ambas reservas energéticas en la  $CL_{50}$  sugiere que la concentración induce un estado de estrés metabólico en el que la

demanda energética aumenta al desencadenarse una respuesta fisiológica orientada a restablecer la homeostasis. Alternativamente, puede ser un estrés agudo no es compensado por la utilización eficiente de los sustratos, posiblemente debido a daño mitocondrial o a alteraciones en las vías de señalización energética (Lankadurai et al., 2013).

Por otro lado, la ausencia de cambios significativos en los niveles de proteínas totales entre los tratamientos podría indicar que, a las 24 h de exposición, el daño celular inducido por el extracto no ha alcanzado un nivel que afecte la síntesis proteica global, o que los mecanismos de reparación y de síntesis de novo de proteínas (como las chaperonas HSP70) hayan logrado compensar la pérdida proteica. Estudios en *Artemia* han demostrado que la exposición al estrés abiótico induce la expresión de proteínas de choque térmico y otras proteínas de estrés, lo que podría contribuir a mantener la homeostasis proteica (Ru Tiong et al., 2024). Sin embargo, la alta variabilidad observada en el grupo CL<sub>10</sub> (49.08 ± 16.27 mg/g) sugiere que algunos individuos podrían estar montando una respuesta más intensa que otros, lo cual deberá explorarse en estudios futuros con un mayor número de réplicas.

En conjunto, los resultados bioquímicos fisiológicos indican que el extracto de *A. lechuguilla* induce una alteración significativa en el metabolismo energético de *Artemia franciscana* a concentraciones letales, caracterizada por la acumulación de carbohidratos y lípidos, lo cual es consistente con un estado de estrés metabólico. Estos hallazgos son congruentes con lo reportado por quienes documentan que la exposición a contaminantes ambientales y condiciones de estrés en *Artemia* genera cambios medibles en el perfil metabólico, reflejando la desregulación de rutas energéticas fundamentales (Lankadurai et al., 2013; Ru Tiong et al., 2024)

El estrés oxidativo es uno de los mecanismos más comunes de toxicidad inducida por contaminantes ambientales, incluidos los metales pesados, los pesticidas y los extractos vegetales con actividad alelopática (Livingstone, 2001). En condiciones normales, existe un equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad del sistema antioxidante para neutralizarlas. Cuando este equilibrio se rompe por la exposición a un agente tóxico, se activa una respuesta coordinada que incluye enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión reductasa (GR), que constituyen la primera línea de defensa celular frente al daño oxidativo (Fanjul-Moles & Gonsebatt, 2011). En el presente estudio, la exposición de *Artemia*

*franciscana* a diversas concentraciones letales del extracto de *Agave lechuguilla* indujo un patrón diferencial de activación de estas enzimas, lo que refleja una respuesta dependiente de la concentración y sugiere múltiples vías de generación de ROS.

Los resultados mostraron que la actividad de CAT alcanzó su máximo en los organismos expuestos a la CL<sub>25</sub> (9.19 U/mg de proteína), mientras que las actividades de SOD y GR fueron máximas en las artemias sometidas a la CL<sub>50</sub> (13.92 y 1.02 U/mg de proteína, respectivamente). Este patrón diferencial es biológicamente significativo y puede explicarse por la cinética de producción de las distintas ROS y por los umbrales de activación de cada enzima. La SOD es la primera línea de defensa, catalizando la dismutación del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y oxígeno molecular (Chaitanya et al., 2016). Un aumento de la actividad de SOD, como el observado en el tratamiento CL<sub>50</sub>, indica una producción elevada de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, probablemente generada en la cadena de transporte de electrones mitocondrial o por la activación de enzimas, como la NADPH oxidasa, en respuesta al extracto (Chaitanya et al., 2016). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por la SOD es posteriormente detoxificado por la CAT, que lo descompone en agua y oxígeno (Aebi, 1984). Sin embargo, en este estudio la CAT alcanzó su máxima actividad en el grupo CL<sub>25</sub> y no en CL<sub>50</sub>, lo que sugiere que, a concentraciones más altas del extracto (CL<sub>50</sub>), podría producirse una saturación o inhibición de la enzima, o bien que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> excede la capacidad catalítica de la CAT, lo que resulta en una acumulación de este oxidante que contribuye al daño celular observado a nivel histológico. Este fenómeno ha sido documentado en otros organismos acuáticos expuestos a concentraciones elevadas de contaminantes, en los que la actividad enzimática disminuye debido a la inactivación oxidativa (Binelli et al., 2010; Saint-Denis et al., 2001).

La GR, por su parte, mantiene el equilibrio redox celular al regenerar glutatión reducido (GSH) a partir de glutatión oxidado (GSSG) mediante NADPH como cofactor (I. K. Smith et al., 1988). El aumento significativo de GR en las artemias del grupo CL<sub>50</sub> (1.02 U/mg de proteína) indica una elevada demanda de GSH para hacer frente al estrés oxidativo. El GSH es un antioxidante no enzimático fundamental que actúa como sustrato para la glutatión peroxidasa (GPx) en la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peróxidos lipídicos. El incremento en la actividad de GR sugiere que el sistema del glutatión se recluta activamente para contrarrestar el daño oxidativo inducido por el extracto, particularmente a la concentración letal. Este patrón es consistente con lo reportado, quienes observaron que la exposición de *Artemia salina* a concentraciones subletales de

Roundup® afectó múltiples rutas metabólicas asociadas al estrés oxidativo y al metabolismo energético (Darmani & Al-Saleh, 2023).

El hecho de que la CAT alcanzara su pico en el grupo CL<sub>25</sub> y disminuyera en el grupo CL<sub>50</sub>, mientras que la SOD y la GR continuaron aumentando, sugiere que diferentes tipos de ROS predominan en distintas intensidades de estrés. A concentraciones intermedias (CL<sub>25</sub>), el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría ser la ROS principal, activando preferentemente la CAT. A mayores concentraciones (CL<sub>50</sub>), el radical superóxido y otros oxidantes podrían predominar, lo que requeriría la acción combinada de SOD y del sistema del glutatión (GR). Alternativamente, este patrón podría reflejar una jerarquía en la respuesta al estrés: la CAT se activa tempranamente como primera línea de defensa contra el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero cuando el estrés es demasiado intenso, la enzima se satura o inactiva, y la célula depende más del sistema del glutatión (GR) y de otras enzimas como la glutatión peroxidasa. Este tipo de respuesta diferencial ha sido observado en otros crustáceos expuestos a contaminantes y se considera un biomarcador sensible de toxicidad subletal (Lavarías *et al.*, 2013).

El extracto de *Agave lechuguilla* contiene una compleja mezcla de flavonoides, entre ellos isorhamnetina, quercetina, kaempferol, catequina y apigenina (Morreeuw *et al.*, 2021). Estos compuestos fenólicos son conocidos por su capacidad para generar ROS mediante su autooxidación o su interacción con la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Mierziak *et al.*, 2014). En plantas, los flavonoides ejercen su efecto alelopático precisamente mediante la inducción de estrés oxidativo en las especies objetivo (Weston & Mathesius, 2013). Los resultados del presente estudio demuestran que este mecanismo de acción no es exclusivo de las plantas, sino que también opera en organismos no objetivo como la *Artemia franciscana*, lo cual tiene importantes implicaciones para la seguridad ambiental del extracto.

### **8.2.2 Respuesta molecular (GST, HSP70 y jBUG)**

La expresión de genes asociados a la respuesta al estrés y detoxificación de xenobióticos proporciona información complementaria y altamente sensible sobre los efectos subletales de contaminantes, a menudo detectables a concentraciones más bajas o en tiempos más tempranos que los cambios bioquímicos o histológicos (Peres Alves de Souza *et al.*, 2024). En el presente estudio, se evaluó la expresión relativa de tres genes en *Artemia franciscana* expuesta a concentraciones letales del extracto de *Agave lechuguilla*: glutatión S-transferasa (AfGST),

proteína de choque térmico de 70 kDa (*AfHSP70*) y jitterbug (*AfjBUG*). Los resultados mostraron patrones de expresión diferencial que complementan y amplían las observaciones realizadas a nivel bioquímico y enzimático.

La *GST* es una enzima de fase II de detoxificación que cataliza la conjugación del glutatión reducido (GSH) con compuestos electrófilos, incluidos xenobióticos y productos de peroxidación lipídica, lo que facilita su excreción (Sheenan et al., 2001). En el presente estudio, la expresión de *AfGST* mostró un aumento significativo en los organismos del tratamiento CL<sub>25</sub> (mediana = 1.706) en comparación con el tratamiento CL<sub>10</sub> (mediana = 0.723;  $p < 0.05$ ), aunque no se detectaron diferencias significativas respecto al control. Este patrón sugiere que el extracto induce la expresión de *GST* a concentraciones intermedias (CL<sub>25</sub>), posiblemente como parte de una respuesta adaptativa para detoxificar compuestos bioactivos presentes en el extracto (flavonoides y otros aleloquímicos) (Boušová & Skálová, 2012). La ausencia de un aumento significativo en CL<sub>50</sub> podría deberse a que, a esta concentración letal, el daño celular es tan extenso que la maquinaria de transcripción queda comprometida, o bien a que la respuesta de *GST* es más sensible a concentraciones subletales que a las letales. Este tipo de respuesta bifásica (activación a dosis bajas o intermedias e inhibición a dosis altas) es común en los biomarcadores de estrés y se conoce como hormesis (Calabrese & Baldwin, 2003). El aumento de *GST* en CL<sub>25</sub> es consistente con la alta actividad de *GR* observada en CL<sub>50</sub>, ya que ambas enzimas dependen del GSH: *GR* regenera GSH a partir de GSSG, mientras que *GST* utiliza GSH como sustrato. El hecho de que *GR* aumente en CL<sub>50</sub> pero *GST* no, sugiere que a la concentración letal el sistema del glutatión podría estar operando principalmente para contrarrestar el estrés oxidativo general (vía *GR*) más que para conjugar xenobióticos específicos (vía *GST*).

Las proteínas de choque térmico de 70 kDa (*HSP70*) son chaperonas moleculares que participan en el plegamiento correcto de proteínas, en la prevención de agregados proteicos y en la reparación de proteínas dañadas por el estrés (Feder & Hofmann, 1999). En *Artemia*, se ha documentado que la exposición a diversos estresores (calor, salinidad, contaminantes, infecciones bacterianas) induce la expresión génica de *HSP70* como parte de una respuesta citoprotectora (Junprung et al., 2019). En el presente estudio, la expresión de *AfHSP70* mostró una tendencia al aumento en CL<sub>50</sub> ( $1.608 \pm 0.146$ ) en comparación con el control ( $1.045 \pm 0.358$ ), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.086$ ). La potencia del análisis fue baja

(0.360), lo que sugiere que con un tamaño de muestra mayor ( $n = 3$  por tratamiento es reducido) o con una menor variabilidad intragrupo, esta diferencia podría alcanzar significancia estadística. La variabilidad observada en el grupo de control (desviación estándar DE = 0.358) es considerablemente mayor que en los grupos tratados (DE entre 0.146 y 0.197), lo cual podría deberse a diferencias individuales en la respuesta basal de *HSP70* o a condiciones fisiológicas previas no controladas. A pesar de la falta de significancia estadística, el aumento de 1,5 veces en  $CL_{50}$  es biológicamente relevante y sugiere que, a esta concentración letal, se activa la maquinaria de reparación de proteínas dañadas, lo cual es consistente con el estrés oxidativo severo evidenciado por los altos niveles de SOD y GR en este tratamiento. Estudios previos en *Artemia franciscana* han demostrado que el silenciamiento de HSP70 mediante ARN de interferencia (ARNi) reduce la tolerancia al estrés térmico y a infecciones bacterianas, lo que subraya el papel protector de esta chaperona (Iryani et al., 2017; Ru Tiong et al., 2024). Por lo tanto, la tendencia al aumento de AfHSP70 en el tratamiento con  $CL_{50}$  podría interpretarse como un intento de la célula de contrarrestar el daño proteico inducido por el extracto.

El gen *Jitterbug* (*jBUG*) codifica una proteína involucrada en la reparación del ADN y en el mantenimiento de la estabilidad genómica, específicamente en la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER, del inglés nucleotide excision repair) y en la regulación del ciclo celular (Chung et al., 2021; Manieu et al., 2018; Sekelsky et al., 2000). La disminución significativa de la expresión de *AfjBUG* en los organismos tratados con  $CL_{50}$  ( $0.234 \pm 0.203$ ) en comparación con el control ( $0.939 \pm 0.295$ ;  $p = 0.007$ ) constituye uno de los hallazgos más relevantes de este estudio. Este resultado sugiere que, a la concentración letal del extracto, se produce una represión transcripcional de genes implicados en la reparación del ADN y en la progresión del ciclo celular, lo que podría tener consecuencias graves para la integridad genómica y la viabilidad celular. La disminución de *jBUG* podría deberse a: (1) daño directo en la maquinaria de transcripción debido a un estrés oxidativo severo; (2) activación de vías de apoptosis que suprimen la expresión de genes de reparación; o (3) un mecanismo específico de toxicidad del extracto sobre la estabilidad genómica. En *Artemia* se ha documentado que la exposición a contaminantes genotóxicos, como el benzo(k)fluoranteno, induce daño en el ADN detectable mediante el ensayo cometa y que este daño se correlaciona con cambios en la expresión de genes de reparación (Albarano, Serafini, et al., 2022). Aunque no se realizó un ensayo cometa en el presente estudio, la disminución de

jBUG en CL<sub>50</sub> es un indicador indirecto de posible genotoxicidad inducida por el extracto a concentraciones letales.

En conjunto, los resultados de expresión génica complementan y amplían las observaciones bioquímicas y enzimáticas. La inducción de *AfGST* en los organismos tratados con CL<sub>25</sub> sugiere que, a concentraciones intermedias, el extracto activa mecanismos de detoxificación de fase II, mientras que la tendencia al aumento de *AfHSP70* en CL<sub>50</sub> indica una respuesta al daño proteico. La disminución de *AfjBUG* en CL<sub>50</sub> es particularmente preocupante, ya que sugiere que, a esta concentración letal, el extracto podría comprometer la capacidad de reparación del ADN, exacerbando el daño genómico inducido por el estrés oxidativo (evidenciado por los altos niveles de SOD y GR en este tratamiento). Este patrón de expresión génica es consistente con la hipótesis de que el extracto de *A. lechuguilla* ejerce su toxicidad mediante un mecanismo multiblanco que incluye la generación de ROS, el daño a proteínas y, potencialmente, la afectación de la integridad del ADN. La similitud entre los patrones de expresión de *AfGST* y la actividad de CAT (ambos máximos en CL<sub>25</sub>), así como la coincidencia entre la disminución de *AfjBUG* y el aumento de SOD/GR en CL<sub>50</sub>, sugiere una integración funcional entre los diferentes niveles de respuesta al estrés. La activación temprana de CAT y GST en CL<sub>25</sub> podría representar una respuesta adaptativa para contener el daño, mientras que la saturación de esta respuesta en CL<sub>50</sub>, junto con la represión de *AfjBUG*, podría marcar el punto de transición hacia un daño irreversible y la muerte celular.

El análisis histológico y morfométrico de *Artemia franciscana* expuesta al extracto de *Agave lechuguilla* reveló alteraciones significativas en tres parámetros clave: diámetro corporal total, espesor de la cutícula y tamaño del lumen digestivo. Estos hallazgos proporcionan evidencia directa de daño tisular a nivel estructural, complementando los indicadores bioquímicos y moleculares de estrés oxidativo y de toxicidad.

Los nauplios expuestos a CL<sub>10</sub> mostraron una reducción significativa del diámetro corporal (62.34  $\mu\text{m}$ ) en comparación con el control (85.82  $\mu\text{m}$ ;  $p = 0.030$ ), mientras que en CL<sub>25</sub> y CL<sub>50</sub> también se observaron diámetros menores, aunque no alcanzaron significancia estadística. La reducción del tamaño corporal en respuesta a la exposición a contaminantes ha sido documentada en diversos crustáceos, incluida *Artemia*. Se ha reportado que la exposición de *Artemia salina* a concentraciones ambientalmente relevantes de Roundup® (0.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de glifosato) disminuyó la

longitud corporal y redujo el ancho de la cabeza, el abdomen y la cola (Darmani & Al-Saleh, 2023). Asimismo, se ha observado una disminución del tamaño de los nauplios de *Artemia franciscana* expuestos a nanopartículas de poliestireno. Esta reducción del tamaño corporal puede deberse a múltiples factores: (1) un retraso en el desarrollo causado por la desviación de la energía hacia procesos de detoxificación y reparación en lugar del crecimiento; (2) una contracción muscular inducida por el estrés; o (3) un efecto directo del extracto sobre la maquinaria de síntesis de proteínas estructurales (Varó et al., 2019). El hecho de que la reducción más pronunciada y significativa se observara en CL<sub>10</sub> (la concentración más baja evaluada) y no en CL<sub>25</sub> o CL<sub>50</sub> sugiere que el efecto sobre el tamaño corporal podría ser más sensible a concentraciones subletales que a las letales. A concentraciones letales (CL<sub>50</sub>), la mortalidad ocurre antes de que se manifieste plenamente la reducción del tamaño, o bien los organismos que sobreviven son intrínsecamente más resistentes y presentan menor afectación morfológica.

### **8.2.3 Alteraciones histológicas e integración de los biomarcadores**

El resultado más notable en el análisis histológico fue el engrosamiento significativo de la cutícula en los organismos expuestos a CL<sub>50</sub> (13.59  $\mu\text{m}$ ) en comparación con el control (9.42  $\mu\text{m}$ ;  $p < 0.001$ ), CL<sub>10</sub> (7.62  $\mu\text{m}$ ;  $p < 0.001$ ) y CL<sub>25</sub> (8.95  $\mu\text{m}$ ;  $p < 0.001$ ). Este resultado es particularmente interesante porque sugiere una respuesta adaptativa del organismo frente al estrés químico inducido por el extracto. La cutícula de los crustáceos es una estructura compleja, compuesta principalmente por quitina y proteínas, que cumple funciones esenciales de protección mecánica, de barrera frente a patógenos y de regulación del intercambio iónico (Roer & Dillaman, 1984). En condiciones de estrés ambiental, incluida la exposición a contaminantes, se ha documentado que algunos crustáceos pueden modificar la composición y el espesor de su cutícula como mecanismo de defensa. Por ejemplo, se ha demostrado que el silenciamiento de *HSP70* en *Artemia franciscana* afectó la estructura cuticular de los embriones, lo que evidencia la importancia de las proteínas de estrés en el mantenimiento de la integridad cuticular (Ru Tiong et al., 2024). El engrosamiento cuticular observado en CL<sub>50</sub> podría interpretarse como un intento del organismo de reforzar su barrera física frente a la penetración del extracto o de sus compuestos bioactivos. Alternativamente, podría ser un efecto indirecto del estrés oxidativo sobre el metabolismo de la quitina o sobre las células epidérmicas responsables de la secreción cuticular (Andersen, 2010). Es relevante señalar que el engrosamiento ocurrió específicamente en la concentración letal (CL<sub>50</sub>)

y no en la CL<sub>10</sub> y CL<sub>25</sub>, lo que sugiere que se trata de un efecto de estrés severo más que de una respuesta adaptativa general. Este patrón es consistente con la activación diferencial de enzimas antioxidantes observada en CL<sub>50</sub> (elevadas SOD y GR) y sugiere que el daño oxidativo a nivel celular podría estar afectando la fisiología del tegumento.

La exposición al extracto indujo una reducción significativa del lumen digestivo en CL<sub>50</sub> (36.96  $\mu\text{m}$ ) en comparación con el control (62.76  $\mu\text{m}$ ;  $p = 0.017$ ). Aunque en los tratamientos CL<sub>10</sub> y CL<sub>25</sub> también se observaron lúmenes de menor tamaño (45.80 y 47.92  $\mu\text{m}$ , respectivamente), las diferencias no fueron estadísticamente significativas. El tracto digestivo de *Artemia* es una estructura tubular revestida por un epitelio simple que participa en la absorción de nutrientes y en la digestión (Gunasekara et al., 2011). La reducción del tamaño del lumen puede deberse a: (1) hiperplasia o hipertrofia del epitelio intestinal, que ocupa más espacio y reduce la luz; (2) contracción del músculo liso circundante inducida por estrés; (3) disminución del contenido luminal por reducción de la ingesta de alimentos; o (4) daño en las microvellosidades del borde en cepillo, que altera la absorción y el tránsito intestinal. Se ha señalado que en crustáceos expuestos a contaminantes es común observar alteraciones histológicas en el tracto digestivo, que incluyen vacuolización de células epiteliales, pérdida de microvellosidades y necrosis (Peres Alves de Souza et al., 2024). En el presente estudio, la reducción del lumen en CL<sub>50</sub> sugiere que, a la concentración letal, el extracto causa un daño significativo en el sistema digestivo, lo que podría comprometer la capacidad de alimentación y de absorción de nutrientes, contribuyendo a la mortalidad observada. Este hallazgo es consistente con el aumento de los niveles de carbohidratos y lípidos en CL<sub>50</sub>, que podría interpretarse como una movilización de reservas energéticas en respuesta para tratar de volver regresar a un estado de homeostasis.

Las alteraciones morfológicas observadas a nivel histológico son el resultado integrado de los efectos bioquímicos y moleculares previamente documentados. El estrés oxidativo, evidenciado por el aumento de SOD y GR en CL<sub>50</sub>, puede causar daño en las membranas celulares debido a la peroxidación lipídica, lo que afecta la integridad de los epitelios digestivos y tegumentarios (Livingstone, 2001). El daño a proteínas estructurales, sugerido por la tendencia al aumento de *HSP70* en CL<sub>50</sub>, podría contribuir a la fragilidad de la cutícula o a la disfunción de las uniones intercelulares del epitelio intestinal (Feder & Hofmann, 1999). La disminución de la expresión de *JBUG* en CL<sub>50</sub> sugiere una posible afectación de la capacidad de reparación del ADN, lo que, a largo

plazo, podría traducirse en alteraciones de la proliferación y la diferenciación celulares, incluidas las células epiteliales del tracto digestivo y del tegumento (Manieu et al., 2018). Asimismo, la reducción del diámetro corporal y del lumen digestivo podría explicar, al menos en parte, la disminución de la viabilidad de los organismos expuestos al extracto, ya que compromete funciones vitales como la alimentación, la digestión, la absorción de nutrientes y la protección frente al medio ambiente externo.

Desde una perspectiva ecotoxicológica, las alteraciones histológicas son biomarcadores de efecto particularmente valiosos porque integran la respuesta del organismo a múltiples vías de toxicidad y proporcionan evidencia directa de daño tisular (Gajardo & Beardmore, 2012). En el contexto de la evaluación de seguridad del extracto de *A. lechuguilla*, los hallazgos histológicos confirman que el extracto no solo es tóxico en términos de mortalidad aguda, sino que también causa daño estructural significativo en órganos clave a concentraciones subletales y letales. La reducción del diámetro corporal y del lumen digestivo, así como el engrosamiento cuticular, son efectos adversos que podrían afectar la aptitud de los organismos expuestos incluso a concentraciones que no causan mortalidad inmediata. Estos resultados subrayan la importancia de incluir análisis histológicos en los estudios ecotoxicológicos de nuevos compuestos, especialmente cuando se trata de extractos complejos como el de *A. lechuguilla*, cuyo modo de acción multiblanco puede manifestarse a diferentes niveles de organización biológica.

### **8.3 Implicaciones de los resultados en el desarrollo de bioherbicida**

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el extracto de *Agave lechuguilla* posee efectos biológicos detectables sobre *Artemia franciscana*, evidenciados mediante alteraciones bioquímicas, antioxidantes, moleculares e histológicas. Aunque estos hallazgos podrían interpretarse inicialmente como una limitación para su desarrollo como bioherbicida, una evaluación integral requiere considerar simultáneamente su eficacia agronómica, su perfil toxicológico y el contexto en el que se utilizaría. En este sentido, la detección de efectos sobre organismos no objetivo no constituye una característica exclusiva de este extracto, sino que es una condición compartida por la mayoría de los herbicidas actualmente utilizados en la agricultura (Klátyik et al., 2025).

La evaluación ecotoxicológica forma parte del proceso normal de desarrollo de cualquier herbicida, independientemente de su origen sintético o biológico. Históricamente, numerosos herbicidas ampliamente utilizados han mostrado distintos grados de toxicidad en organismos acuáticos y terrestres, lo que ha motivado el establecimiento de medidas regulatorias destinadas a reducir la exposición ambiental y a minimizar los efectos adversos fuera del área de aplicación (Klátyik et al., 2025). Desde esta perspectiva, los resultados obtenidos no invalidan el potencial bioherbicida del extracto, sino que aportan información esencial para su evaluación y desarrollo responsable.

Un aspecto particularmente relevante es que el presente trabajo constituye la primera caracterización ecotoxicológica del extracto de *A. lechuguilla* en un organismo acuático modelo. Hasta ahora, los estudios realizados se habían centrado principalmente en demostrar su actividad herbicida en especies vegetales objetivo, mientras que sus posibles efectos sobre organismos no objetivo permanecían prácticamente desconocidos. Por lo tanto, los resultados de esta investigación representan un paso necesario para complementar la información disponible sobre este candidato a bioherbicida y ampliar el conocimiento necesario para su eventual implementación.

Estudios previos realizados por el grupo de investigación demostraron que el extracto posee actividad herbicida sobre *Chenopodium album*, una maleza de importancia agrícola caracterizada por la evolución de resistencia a distintos herbicidas convencionales (Velázquez-Lizárraga et al., 2025, 2026). Mediante análisis transcriptómicos se observó que el extracto altera múltiples rutas fisiológicas relacionadas con el metabolismo energético, la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, la señalización hormonal y la respuesta al estrés celular (Velázquez-Lizárraga et al., 2025). Esta característica sugiere un mecanismo de acción complejo que podría reducir la probabilidad de selección de resistencia en comparación con herbicidas que actúan predominantemente sobre una única diana molecular, como ocurre con el glifosato (Duke & Powles, 2008; Green & Siehl, 2021). Aunque la relación entre la complejidad mecanística y la evolución de la resistencia depende de múltiples factores biológicos y agronómicos, la presencia de diversos procesos fisiológicos afectados constituye un aspecto de interés para el desarrollo de nuevas herramientas de manejo de malezas (Hasan et al., 2021).

No obstante, la eficacia herbicida por sí sola no garantiza la viabilidad ambiental de un producto. Los resultados del presente estudio muestran que la exposición al extracto induce respuestas biológicas detectables en *Artemia franciscana*, que incluyen alteraciones metabólicas, activación de mecanismos antioxidantes, cambios en la expresión génica y modificaciones histológicas. Estos efectos indican que el extracto no es biológicamente inerte para los organismos acuáticos y ponen de manifiesto la necesidad de incorporar criterios ecotoxicológicos desde etapas tempranas del desarrollo tecnológico.

Aunque el presente estudio no permite realizar una evaluación formal del riesgo ambiental, es posible establecer una comparación preliminar entre la concentración efectiva de herbicida reportada para *C. album* (30 g/L) y la  $CL_{50}$  determinada en *Artemia franciscana* (799 mg/L). Esta relación corresponde aproximadamente a 37.5 veces (30 000/799), lo que indica que la concentración requerida para obtener el efecto herbicida es considerablemente superior a la que induce mortalidad aguda en el organismo acuático evaluado. Este resultado sugiere que, si se produjera una exposición directa a concentraciones cercanas a las empleadas para el control de malezas, podrían observarse efectos adversos en organismos sensibles. Sin embargo, esta relación no debe interpretarse como un cociente de riesgo ambiental, ya que no incorpora variables fundamentales como las concentraciones ambientales reales esperadas, la dilución, la degradación, la adsorción al suelo, la frecuencia de aplicación ni la exposición efectiva de los organismos no objetivo.

La comparación con herbicidas comerciales aporta un contexto adicional para interpretar estos resultados. Según los valores de  $CL_{50}$  reportados para *Artemia franciscana* por Mashjoor et al., (2019), el glifosato presenta una  $CL_{50}$  de 164.31 mg/L, mientras que 2,4-D y trifluralina muestran valores de 12.93 mg/L y 11.87 mg/L, respectivamente. Considerando las dosis comúnmente utilizadas en campo para estos herbicidas, las relaciones entre la concentración de aplicación y  $CL_{50}$  pueden alcanzar magnitudes comparables o incluso superiores a las observadas con el extracto de *A. lechuguilla*. Aunque estas comparaciones deben interpretarse con cautela debido a las diferencias entre formulaciones, condiciones experimentales y estrategias de aplicación, ilustran que la coexistencia de eficacia herbicida y toxicidad para organismos no objetivo es una característica común de numerosos productos fitosanitarios actualmente utilizados (Mashjoor et al., 2019)

Aunque el extracto presentó una menor toxicidad aguda intrínseca para *Artemia franciscana* que la de varios herbicidas sintéticos previamente evaluados en este organismo (Mashjoor et al., 2019). Los datos disponibles son insuficientes para establecer comparaciones directas de riesgo ambiental. La toxicidad aguda representa únicamente una dimensión del riesgo ecotoxicológico y debe interpretarse junto con otros factores que determinan la exposición real de los organismos no objetivo. Entre ellos se incluyen la persistencia ambiental, los procesos de degradación, la movilidad en suelo y agua, el potencial de bioacumulación, la frecuencia y la forma de aplicación, así como la sensibilidad de especies de distintos niveles tróficos. En consecuencia, los resultados obtenidos sugieren que el extracto presenta una menor toxicidad aguda relativa en este modelo biológico, pero no permiten concluir que presente un menor riesgo ambiental global en comparación con herbicidas sintéticos ampliamente utilizados. La generación de información sobre el destino ambiental del extracto y sus efectos en otros organismos será necesaria para realizar evaluaciones de riesgo más robustas y ambientalmente pertinentes.

Por otra parte, debe considerarse que la presente investigación se limitó a una exposición aguda de 24 h en una única especie acuática. En consecuencia, los resultados no permiten establecer conclusiones definitivas sobre el riesgo ambiental asociado al uso agrícola del extracto. Aspectos fundamentales como la persistencia ambiental, los productos de degradación, la movilidad en suelo y agua, el potencial de bioacumulación, los efectos crónicos y la sensibilidad de otros organismos de diferentes niveles tróficos permanecen sin evaluar. La generación de esta información será indispensable para elaborar una evaluación de riesgo ambiental robusta y científicamente sustentada.

Desde una perspectiva de desarrollo tecnológico, los hallazgos obtenidos deben interpretarse como una herramienta para orientar investigaciones futuras y no como un criterio de exclusión del extracto como candidato bioherbicida. La información generada permite identificar posibles escenarios de riesgo, establecer prioridades de investigación y diseñar estrategias de mitigación orientadas a reducir la exposición de organismos no objetivo. Asimismo, proporciona una base científica que complementa los estudios de eficacia previamente realizados y contribuye al desarrollo de alternativas para el manejo de malezas que integren criterios agronómicos, toxicológicos y ambientales.

En conjunto, los resultados indican que el extracto de *Agave lechuguilla* posee características prometedoras como candidato bioherbicida, debido a su eficacia demostrada contra malezas de importancia agrícola y a la evidencia de un mecanismo de acción que involucra múltiples procesos fisiológicos en la planta objetivo. Sin embargo, la toxicidad observada en *Artemia franciscana* demuestra que su eventual implementación deberá acompañarse de una evaluación ecotoxicológica más amplia que permita determinar las condiciones bajo las cuales su uso puede realizarse de manera ambientalmente responsable.

## 9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se evaluó la toxicidad aguda del extracto de *Agave lechuguilla* con propiedades bioherbidas, utilizando a *Artemia franciscana* como organismo modelo ecotoxicológico. La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) a las 24 h fue de 799 µg/mL, mientras que las concentraciones CL<sub>25</sub> y CL<sub>10</sub> fueron de 214 y 97 µg/mL, respectivamente. Estos resultados constituyen la primera caracterización ecotoxicológica de este extracto en un organismo acuático no objetivo y proporcionan valores de referencia para futuras evaluaciones toxicológicas y ambientales.

La exposición al extracto provocó alteraciones significativas en el perfil bioquímico de la *Artemia franciscana*. Los incrementos observados en carbohidratos y lípidos totales a la concentración CL<sub>50</sub> sugieren modificaciones del metabolismo energético asociadas a la respuesta fisiológica ante la exposición. Asimismo, la activación diferencial de catalasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa indica la participación de mecanismos antioxidantes destinados a mantener el equilibrio redox celular ante el estrés inducido por el extracto.

A nivel molecular, el extracto modificó la expresión de genes implicados en procesos de detoxificación y en el mantenimiento de la homeostasis celular. La inducción de *AfGST* sugiere la activación de mecanismos de respuesta frente a compuestos xenobióticos, mientras que la disminución de *AfjBUG* evidencia alteraciones en la regulación de genes asociados a funciones celulares fundamentales. Por su parte, aunque *AfHSP70* mostró una tendencia al aumento en la concentración más alta, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas.

El análisis histológico y morfométrico reveló modificaciones estructurales asociadas a la exposición al extracto, entre ellas la reducción del diámetro corporal, el engrosamiento de la cutícula y la disminución del lumen digestivo. Estos cambios demuestran que la exposición provoca alteraciones tisulares detectables en *Artemia franciscana*, lo cual complementa la evidencia obtenida mediante biomarcadores bioquímicos y moleculares.

En conjunto, los resultados demuestran que el extracto de *Agave lechuguilla* induce respuestas biológicas dependientes de la concentración en *Artemia franciscana*, manifestadas a nivel fisiológico, bioquímico, molecular e histológico. Aunque el extracto presentó una toxicidad aguda

intrínseca inferior a la de algunos herbicidas sintéticos previamente evaluados en este organismo modelo, los datos obtenidos no son suficientes para establecer conclusiones sobre su riesgo ambiental global. La evaluación de dicho riesgo requerirá estudios adicionales que incorporen exposiciones crónicas, otras especies no objetivo, análisis de persistencia y de degradación ambiental, así como estimaciones realistas de exposición.

Finalmente, esta investigación aporta información fundamental para el desarrollo responsable del extracto de *Agave lechuguilla* como candidato a bioherbicida, al proporcionar una base científica para futuras evaluaciones ecotoxicológicas y al contribuir a la integración de criterios de eficacia agronómica y de seguridad ambiental en su proceso de desarrollo.

## 10. LITERATURA CITADA

- Aebi, H. (1984). Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- AFP. (2023, septiembre 20). *Glyphosate: where is it banned or restricted?* <https://phys.org/news/2023-09-glyphosate-restricted.html>
- Albarano, L., Ruocco, N., Lofrano, G., Guida, M., & Libralato, G. (2022). Genotoxicity in *Artemia* spp.: An old model with new sensitive endpoints. *Aquatic Toxicology*, 252, 106320. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2022.106320>
- Albarano, L., Serafini, S., Toscanesi, M., Trifuoggi, M., Zupo, V., Costantini, M., Vignati, D. A. L., Guida, M., & Libralato, G. (2022). Genotoxicity Set Up in *Artemia franciscana* Nauplii and Adults Exposed to Phenanthrene, Naphthalene, Fluoranthene, and Benzo(k)fluoranthene. *Water (Switzerland)*, 14(10), 1594. <https://doi.org/10.3390/W14101594/S1>
- Alishahi, M., & Tulaby Dezfuly, Z. (2019). Comparative toxicities of five herbicides on nauplii of *Artemia franciscana* as an ecotoxicity bioindicator. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(4), 716–726. <https://doi.org/10.22092/IJFS.2019.118284>
- Andersen, S. O. (2010). Insect cuticular sclerotization: A review. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3), 166–178. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2009.10.007>
- Aranda, P. S., Lajoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366–369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Arellano Aguilar, O., Patiño González, C., Borges Ramírez, M. M., Peregrina Lucano, A. A., Helguera Gómez, E., Rendón Von Osten, J., Lozano Kasten, F. J., & Velazco Sandoval, N. G. (2025). *Glifosato en México impacto ambiental y exposición humana* (J. Rendón-von Osten, Ed.; 1a ed., Vol. 1). Universidad Autónoma de Campeche. <https://epomex.uacam.mx/view/download?file=894/Glifosato%20en%20Me%CC%81xico.pdf&tipo=noticias>
- Bailey, K. L. (2014). The Bioherbicide Approach to Weed Control Using Plant Pathogens. En D. P. Abrol (Ed.), *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective* (1a ed., pp. 245–266). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00014-2>
- Baldos, U. L. C., & Hertel, T. W. (2014). Global food security in 2050: The role of agricultural productivity and climate change. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*, 58(4), 554–570. <https://doi.org/10.1111/1467-8489.12048;ISSUE:ISSUE:DOI>
- Barnes, H., & Blackstock, J. (1973). Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of the sulphophosphovanilun method for “total” lipids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 12(1), 103–118. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(73\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0022-0981(73)90040-3)
- Battaglin, W. A., Meyer, M. T., Kuivila, K. M., & Dietze, J. E. (2014). Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. *Journal of the American Water Resources Association*, 50(2), 275–290. <https://doi.org/10.1111/JAWR.12159;ISSUE:ISSUE:DOI>
- Beyer, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2), 559–566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)
- Binelli, A., Parolini, M., Pedriali, A., & Provini, A. (2010). Antioxidant Activity in the Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha*) in Response to Triclosan Exposure. *Water, Air, & Soil Pollution* 2010 217:1, 217(1), 421–430. <https://doi.org/10.1007/S11270-010-0597-4>

- Boušová, I., & Skálová, L. (2012). Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metabolism Reviews*, 44(4), 267–286. <https://doi.org/10.3109/03602532.2012.713969>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2003). Hormesis: The Dose-Response Revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(Volume 43, 2003), 175–197. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.43.100901.140223/CITE/REFWORKS>
- Carmona, J. E., Morales-Martínez, T. K., Mussatto, S. I., Castillo-Quiroz, D., Ríos-González, L. J., Carmona, J. E., Morales-Martínez, T. K., Mussatto, S. I., Castillo-Quiroz, D., & Ríos-González, L. J. (2017). Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la lechuguilla (Agave lechuguilla Torr.). *Revista mexicana de ciencias forestales*, 8(42), 100–122. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11322017000400100&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322017000400100&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Cervantes-Güicho, V. de J., Reyes, A. G., Nuncio, A., Sepúlveda-Torre, L., Landa-Cansigno, C., Rodríguez-De la Garza, J. A., Medina-Morales, M. A., Ríos-González, L. J., & Morales-Martínez, T. K. (2024). Box-Behnken Design for DPPH Free Radical Scavenging Activity Optimization from Microwave-Assisted Extraction of Polyphenolic Compounds from Agave lechuguilla Torr. Residues. *Processes*, 12(9), 2005. <https://doi.org/10.3390/PR12092005/S1>
- Chaitanya, R. K., Shashank, K., & Sridevi, P. (2016). Oxidative Stress in Invertebrate Systems. En R. Ahmad (Ed.), *Free Radicals and Diseases* (1a ed., Vol. 1, pp. 19–35). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/64573>
- Chang, V. C., Andreotti, G., Ospina, M., Parks, C. G., Liu, D., Shearer, J. J., Rothman, N., Silverman, D. T., Sandler, D. P., Calafat, A. M., Beane Freeman, L. E., & Hofmann, J. N. (2023). Glyphosate exposure and urinary oxidative stress biomarkers in the Agricultural Health Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 115(4), 394–404. <https://doi.org/10.1093/JNCI/DJAC242>
- Chávez Cobián, J. A. (2022). *Análisis de Factibilidad de un Bioproceso para la Obtención de Antocianinas a partir del Bagazo de Agave lechuguilla* [Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.]. <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/2649>
- Chung, S. Y., Le, T. P., Vishwakarma, V., Cheng, Y. L., & Andrew, D. J. (2021). Isoform-specific roles of the Drosophila filamin-type protein Jitterbug (Jbug) during development. *Genetics*, 219(2). <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAB100>
- Cordeau, S., Triolet, M., Wayman, S., Steinberg, C., & Guillemain, J. P. (2016). Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management. En *Crop Protection* (Vol. 87, pp. 44–49). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.016>
- Costa, L. T. M., Smagghe, G., Viteri Jumbo, L. O., Santos, G. R., Aguiar, R. W. S., & Oliveira, E. E. (2025). Selective actions of plant-based biorational insecticides: Molecular mechanisms and reduced risks to non-target organisms. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 44, 100601. <https://doi.org/10.1016/J.COESH.2025.100601>
- Darmani, H., & Al-Saleh, D. R. H. (2023). Lower Concentrations of the Glyphosate-Based Herbicide Roundup® Cause Developmental Defects in *Artemia salina*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(7), 1586–1594. <https://doi.org/10.1002/ETC.5639>
- Dill, G. M., Sammons, R. D., Feng, P. C. C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J. L., Farmer, D., Wright, D., & Hauptfear, E. A. (2010). Glyphosate: Discovery,

- Development, Applications, and Properties. *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*, 1–33. <https://doi.org/10.1002/9780470634394.ch1>
- DOF. (2023, febrero 13). *Poder Ejecutivo, Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural: DECRETO por el que se establecen diversas acciones en materia de glifosato y maíz genéticamente modificado*. Diario Oficial de la Federación (DOF). [https://www.dof.gob.mx/index.php/index\\_111.php?year=2023&month=02&day=13#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/index.php/index_111.php?year=2023&month=02&day=13#gsc.tab=0)
- Duke, S. O. (2018). The history and current status of glyphosate. *Pest Management Science*, 74(5), 1027–1034. <https://doi.org/10.1002/ps.4652>
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319–325. <https://doi.org/10.1002/PS.1518;WEBSITE:WEBSITE:SCIJOURNALS;CSUBTYPE:STRING:SPECIAL;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- Fanjul-Moles, M. L., & Gonsebatt, M. E. (2011). Oxidative Stress and Antioxidant Systems in Crustacean Life Cycles. En Abele D., J. P. Vázquez-Medina, & T. Zenteno-Savín (Eds.), *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems* (1a ed., Vol. 1, pp. 208–223). John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/9781444345988.CH15;JOURNAL:JOURNAL:BOOKS;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Feder, M. E., & Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61(Volume 61, 1999), 243–282. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHYSIOL.61.1.243/1>
- Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. En *Cambridge University* (32a ed., Vol. 60, Número 9). <https://doi.org/10.1002/jps.2600600940>
- Gajardo, G. M., & Beardmore, J. A. (2012). The brine shrimp *Artemia*: Adapted to critical life conditions. *Frontiers in Physiology*, 3(1), 25693. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2012.00185/TEXT>
- Ghosh, S. (2023). INSIGHTFUL REVIEW OF BIOHERBICIDES DERIVED FROM PLANTS (PHYTOHERBICIDES). *Journal of the Chilean Chemical Society*, 68(2), 5847–5852. <https://www.jcchems.com/index.php/JCCEMS/article/view/2346>
- Green, J. M., & Siehl, D. L. (2021). History and Outlook for Glyphosate-Resistant Crops. En J. B. Knaak (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 255). Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/398\\_2020\\_54](https://doi.org/10.1007/398_2020_54)
- Gunasekara, R. A. Y. S. A., Rekecki, A., Cornillie, P., Cornelissen, M., Sorgeloos, P., Simoens, P., Bossier, P., & Van den Broeck, W. (2011). Morphological characteristics of the digestive tract of gnotobiotic *Artemia franciscana* nauplii. *Aquaculture*, 321(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2011.07.037>
- Hamidi, M. R., Jovanova, B., & Panovska, K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 60(1), 9–18. [https://bulletin.mfd.org.mk/volumes/Volume%2060/60\\_002.pdf](https://bulletin.mfd.org.mk/volumes/Volume%2060/60_002.pdf)
- Hasan, M., Ahmad-Hamdani, M. S., Rosli, A. M., & Hamdan, H. (2021). Bioherbicides: An Eco-Friendly Tool for Sustainable Weed Management. *Plants*, 10(6), 1–21. <https://doi.org/10.3390/plants10061212>
- Hibshman, J. D., Clegg, J. S., & Goldstein, B. (2020). Mechanisms of Desiccation Tolerance: Themes and Variations in Brine Shrimp, Roundworms, and Tardigrades. *Frontiers in Physiology*, 11, 592016. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2020.592016/FULL>

- IARC. (2017). *Some Organophosphate Insecticides and Herbicides* (OMS, Ed.; 1a ed., Vol. 112). International Agency for Research on Cancer, World Health Organization.
- Iryani, M. T. M., MacRae, T. H., Panchakshari, S., Tan, J., Bossier, P., Wahid, M. E. A., & Sung, Y. Y. (2017). Knockdown of heat shock protein 70 (Hsp70) by RNAi reduces the tolerance of *Artemia franciscana* nauplii to heat and bacterial infection. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *487*, 106–112. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2016.12.004>
- Islam, A. K. M. M., Karim, S. M. R., Kheya, S. A., & Yeasmin, S. (2024). Unlocking the potential of bioherbicides for sustainable and environment friendly weed management. *Heliyon*, *10*(16), e36088. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e36088>
- Junprung, W., Norouzitallab, P., De Vos, S., Tassanakajon, A., Nguyen Viet, D., Van Stappen, G., & Bossier, P. (2019). Sequence and expression analysis of HSP70 family genes in *Artemia franciscana*. *Scientific Reports* *2019 9:1*, *9*(1), 8391-. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44884-y>
- Kariyanna, B., Sushma, R., Sagnika, R., & Sainath, G. (2024). Formulations of Biopesticides: Techniques, Applications, Challenges and Future Prospects. *HEXAPODA*, *31*(1 & 2), 97–113. <https://doi.org/10.55446/HEXA.2024.51>
- Klátyik, S., Simon, G., Takács, E., Oláh, M., Zaller, J. G., Antoniou, M. N., Benbrook, C., Mesnage, R., & Székács, A. (2025). Toxicological concerns regarding glyphosate, its formulations, and co-formulants as environmental pollutants: a review of published studies from 2010 to 2025. *Archives of Toxicology* *2025 99:8*, *99*(8), 3169–3203. <https://doi.org/10.1007/s00204-025-04076-2>
- Kos, M., Kahru, A., Drobne, D., Singh, S., Kalčíková, G., Kühnel, D., Rohit, R., Gotvajn, A. Ž., & Jemec, A. (2016). A case study to optimise and validate the brine shrimp *Artemia franciscana* immobilisation assay with silver nanoparticles: The role of harmonisation. *Environmental Pollution*, *213*, 173–183. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2016.02.015>
- Kremer, R. J. (2023). Bioherbicide development and commercialization: challenges and benefits. En O. Koul (Ed.), *Development and Commercialization of Biopesticides: Costs and Benefits* (1a ed., Vol. 1, pp. 119–148). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95290-3.00016-9>
- Lankadurai, B. P., Nagato, E. G., & Simpson, M. J. (2013). Environmental metabolomics: an emerging approach to study organism responses to environmental stressors. <https://doi.org/10.1139/er-2013-0011>, *21*(3), 180–205. <https://doi.org/10.1139/ER-2013-0011>
- Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*, *42*(8), 656–666. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00060-1)
- Ludevese-Pascual, G., Leopoldo Laranja, J., Ahmed, F., Amar, E., De Troch, M., Bossier, P., & De Schryver, P. (2020). Lipids and fatty acid composition in the crustacean model organism *Artemia* sp. as influenced by poly-β-hydroxybutyrate (PHB) supplementation. *Aquaculture Nutrition*, *26*(6), 2235–2244. <https://doi.org/10.1111/ANU.13160>;ISSUE:ISSUE:DOI
- Lutz, W., & KC, S. (2010). Dimensions of global population projections: what do we know about future population trends and structures? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1554), 2779–2791. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2010.0133>
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *63*(Volume 63, 2012), 73–105. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042811-105439/CITE/REFWORKS>

- Manaffar, R., Maleki, R., Zare, S., Agh, N., Soltanian, S., Sehatnia, B., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Van Stappen, G. (2010). A New Method for Rapid DNA Extraction from Artemia (Branchiopoda, Crustacea). *International Journal of Biological and Life Sciences*, 6(2), 123–127.
- Manieu, C., Olivares, G. H., Vega-Macaya, F., Valdivia, M., & Olguín, P. (2018). Jitterbug/Filamin and Myosin-II form a complex in tendon cells required to maintain epithelial shape and polarity during musculoskeletal system development. *Mechanisms of Development*, 154, 309–314. <https://doi.org/10.1016/J.MOD.2018.09.002>
- Marrone, P. G. (2019). Pesticidal natural products – status and future potential. *Pest Management Science*, 75(9), 2325–2340. <https://doi.org/10.1002/PS.5433;SUBPAGE:STRING:ABSTRACT;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:15264998;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Mashjoor, S., Alishahi, M., & Dezfily, Z. T. (2019). Comparative toxicity assessment of chemical nanosilver and biosynthetic silver nanoparticles produced by marine macroalgae from the Persian gulf in biomarker: artemia nauplii. *Journal of Veterinary Research*, 74(1), Pe73–Pe82. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20193138006>
- Mathur, M., & Gehlot, P. (2018). Recruit the plant pathogen for weed management: Bioherbicide a sustainable strategy. En P. Ghelot & J. Singh (Eds.), *Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspective* (1a ed., Vol. 1, pp. 159–181). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7\\_10/TABLES/4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0393-7_10/TABLES/4)
- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 133–153. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2015.08.012>
- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules* 2014, Vol. 19, Pages 16240-16265, 19(10), 16240–16265. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES191016240>
- Morgan, M. A., Griffith, C. M., Dinges, M. M., Lyon, Y. A., Julian, R. R., & Larive, C. K. (2019). Evaluating sub-lethal stress from Roundup® exposure in Artemia franciscana using 1H NMR and GC–MS. *Aquatic Toxicology*, 212, 77–87. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2019.04.023>
- Morreeuw, Z. P., Castillo-Quiroz, D., Ríos-González, L. J., Martínez-Rincón, R., Estrada, N., Melchor-Martínez, E. M., Iqbal, H. M. N., Parra-Saldívar, R., & Reyes, A. G. (2021). High Throughput Profiling of Flavonoid Abundance in Agave lechuguilla Residue-Valorizing under Explored Mexican Plant. *Plants* 2021, Vol. 10, Page 695, 10(4), 695. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10040695>
- Muñoz, J. P., Bleak, T. C., & Calaf, G. M. (2021). Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. *Chemosphere*, 270, 128619. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.128619>
- OCDE. (2025a, junio 25). *Test Guideline No. 203 Fish, Acute Toxicity Testing*. [https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2019/06/test-no-203-fish-acute-toxicity-test\\_g1gh28f5/9789264069961-en.pdf](https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2019/06/test-no-203-fish-acute-toxicity-test_g1gh28f5/9789264069961-en.pdf)
- OCDE. (2025b, junio 25). *Test Guideline No. 236 Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Section 2: Effects on Biotic Systems*. [https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2013/07/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test\\_g1g34036/9789264203709-en.pdf](https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2013/07/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_g1g34036/9789264203709-en.pdf)

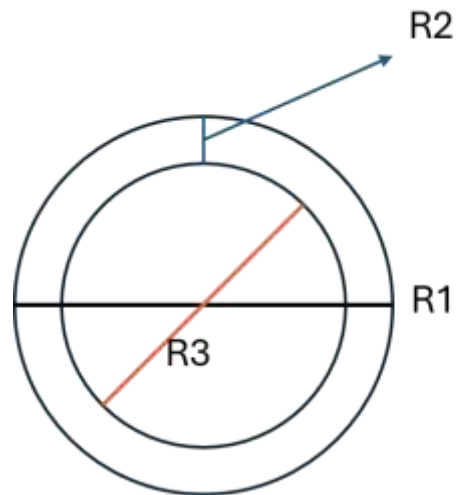
- ONU. (2001, octubre 26). *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. <https://unece.org/DAM/trans/doc/2001/ac10c4/ST-SG-AC10-C4-2001-23e.pdf#10#8>
- Panzacchi, S., Tibaldi, E., De Angelis, L., Falcioni, L., Giovannini, R., Gnudi, F., Iuliani, M., Manservigi, M., Manservigi, F., Manzoli, I., Menghetti, I., Montella, R., Noferini, R., Sgargi, D., Strollo, V., Truzzi, F., Antoniou, M. N., Chen, J., Dinelli, G., ... Mandrioli, D. (2025). Carcinogenic effects of long-term exposure from prenatal life to glyphosate and glyphosate-based herbicides in Sprague–Dawley rats. *Environmental Health* 2025 24:1, 24(1), 36-. <https://doi.org/10.1186/S12940-025-01187-2>
- Peixoto, F. (2005). Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*, 61(8), 1115–1122. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.044>
- Pereira, A. G., Jaramillo, M. L., Remor, A. P., Latini, A., Davico, C. E., da Silva, M. L., Müller, Y. M. R., Ammar, D., & Nazari, E. M. (2018). Low-concentration exposure to glyphosate-based herbicide modulates the complexes of the mitochondrial respiratory chain and induces mitochondrial hyperpolarization in the Danio rerio brain. *Chemosphere*, 209, 353–362. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.06.075>
- Peres Alves de Souza, J., Schnitzler, M. C., Ferreira Silva, I., Thomé, R. G., Gontijo Carneiro, P., & Batista dos Santos, H. (2024). Toxic Effects of Multiwalled Carbon Nanotubes on the Zebrafish (Danio rerio) and the Brine Shrimp (Artemia salina): a Morphological, Histological, and Immunohistochemical Study. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 67, e24230143. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2024230143>
- Pérez-Vázquez, A., Fernández-Peña, M. de L., Castañeda-Chávez, M. del R., Díaz-Rivera, P., Pérez-Vázquez, A., Fernández-Peña, M. de L., Castañeda-Chávez, M. del R., & Díaz-Rivera, P. (2024). Glyphosate: risk or threat to human health and wildlife. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 15(5). <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V15I5.3342>
- Reyes-Agüero, J. A., Aguirre-Rivera, J. R., & Peña-Valdivia, C. B. (2000). Biology and use of Agave lechuguilla Torrey. *Botanical Sciences*, 67(67), 75–88. <https://doi.org/10.17129/BOTSCI.1626>
- Roe, J. H., Bailey, J. M., Gray, R. R., & Robinson, J. N. (1961). Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *The Journal of biological chemistry*, 236(5), 1244–1246. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64157-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64157-2)
- Roer, R., & Dillaman, R. (1984). The Structure and Calcification of the Crustacean Cuticle. *American Zoologist*, 24(4), 893–909. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(60\)90023-2](https://doi.org/10.1016/0010-406X(60)90023-2)
- Ru Tiong, I. K., Lau, C. C., Taib, M. I. M., Waiho, K., Sorgeloos, P., & Sung, Y. Y. (2024). Artemia as a model organism in stress response studies: current progress and future prospects. *Marine Biology* 2024 172:1, 172(1), 16-. <https://doi.org/10.1007/S00227-024-04569-1>
- Saint-Denis, M., Narbonne, J. F., Arnaud, C., & Ribera, D. (2001). Biochemical responses of the earthworm Eisenia fetida andrei exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(3), 395–404. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00177-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00177-2)
- Sánchez Robles, J. H., Luna Enríquez, C. F., Reyes, A. G., Cruz Requena, M., Ríos González, L. J., Morales Martínez, T. K., Ascacio Valdés, J. A., & Medina Morales, M. A. (2023). Initial Study of Fungal Bioconversion of guishe (Agave lechuguilla Residue) Juice for Bioherbicide Activity on Model Seeds. *Fermentation*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/fermentation9050421>
- Sekelsky, J. J., Hollis, K. J., Eimerl, A. I., Burtis, K. C., & Hawley, R. S. (2000). Nucleotide excision repair endonuclease genes in Drosophila melanogaster. *Mutation Research/DNA Repair*, 459(3), 219–228. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(99\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(99)00075-0)

- Sheenan, D., Meade, G., Foley, M. F., & Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, *360*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1042/BJ3600001>
- Silva-Montellano, A., & Eguiarte, L. E. (2003). GEOGRAPHIC PATTERNS IN THE REPRODUCTIVE ECOLOGY OF AGAVE LECHUGUILLA (AGAVACEAE) IN THE CHIHUAHUAN DESERT. I. FLORAL CHARACTERISTICS, VISITORS, AND FECUNDITY 1. *American Journal of Botany*, *90*(3), 377–387.
- Smith, I. K., Vierheller, T. L., & Thorne, C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, *175*(2), 408–413. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90564-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90564-7)
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, *150*(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Souza, C. R. de, Souza-Silva, G., Silva, F. V. M., Cardoso, P. von R., Lima, W. dos S., Pereira, C. A. de J., Mol, M. P. G., & Silveira, M. R. (2024). Ecotoxicological studies of direct and indirect genotoxicity with *Artemia*: an integrative review. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *59*(6), 305–320. <https://doi.org/10.1080/10934529.2024.2384216>
- Storozhenko, V. O., & Yukhymuk, V. V. (2025). Biological herbicides as an ecological alternative to synthetic herbicides. *Fiziologîa roslin i genetika*, *57*(5), 371–404. <https://doi.org/10.15407/FRG2025.05.371>
- Székács, A., & Darvas, B. (2011). Forty Yeats with Glyphosate. En M. Naguib & A. E.-G. Hasaneen (Eds.), *Glyphosate resistance in crops and weeds : history, development, and management* (1a ed., Vol. 1, pp. 247–284). InTech.
- Untergasser, a., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., & Leunissen, J. a. M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, *35*(Web Server), W71–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>
- USEPA. (2002, octubre). *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms Fifth Edition*. United States Environmental Protection Agency. [https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/acute-freshwater-and-marine-wet-manual\\_2002.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/acute-freshwater-and-marine-wet-manual_2002.pdf)
- Valavanidis, A., & Vlachogianni, T. (2009). Integrated Biomarkers in Aquatic Organisms as a Tool for Biomonitoring Environmental Pollution and Improved Ecological Risk Assessment. *Science Advances on Environment, Toxicology & Ecotoxicology Issues*, *1*(1), 1–13. [https://www.researchgate.net/profile/Athanasios-Valavanidis/publication/236623090\\_Integrated\\_Biomarkers\\_in\\_Aquatic\\_Organisms\\_as\\_a\\_Tool\\_for\\_Biomonitoring\\_Environmental\\_Pollution\\_and\\_Improved\\_Ecological\\_Risk\\_Assessment/links/540d8f470cf2f2b29a386ab2/Integrated-Biomarkers-in-Aquatic-Organisms-as-a-Tool-for-Biomonitoring-Environmental-Pollution-and-Improved-Ecological-Risk-Assessment.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Athanasios-Valavanidis/publication/236623090_Integrated_Biomarkers_in_Aquatic_Organisms_as_a_Tool_for_Biomonitoring_Environmental_Pollution_and_Improved_Ecological_Risk_Assessment/links/540d8f470cf2f2b29a386ab2/Integrated-Biomarkers-in-Aquatic-Organisms-as-a-Tool-for-Biomonitoring-Environmental-Pollution-and-Improved-Ecological-Risk-Assessment.pdf)
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *13*(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Varó, I., Perini, A., Torreblanca, A., Garcia, Y., Bergami, E., Vannuccini, M. L., & Corsi, I. (2019). Time-dependent effects of polystyrene nanoparticles in brine shrimp *Artemia franciscana* at

- physiological, biochemical and molecular levels. *Science of The Total Environment*, 675, 570–580. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.04.157>
- Velázquez-Lizárraga, A. E., Ríos-González, L. J., Hernández-Montiel, L. G., Rodríguez-Jaramillo, C., Magallón-Servín, P., Abraham-Jaramillo, E. J., Ascencio, F., & Reyes, A. G. (2026). Multi-Target Herbicidal Effects of Agave lechuguilla Torr. Extract on *Chenopodium album* L.: Germination Inhibition, Metabolic Disruption, and Morpho-Physiological Alterations. *Plants* 2026, Vol. 15, 15(5). <https://doi.org/10.3390/PLANTS15050745>
- Velázquez-Lizárraga, A. E., Ríos-González, L. J., Montiel, L. G. H., Galaviz-Acosta, C. A., Robles, J. H. S., Rodas-Hirales, M. M., Ascencio, F., Magallón-Servín, P., & Reyes, A. G. (2025). Transcriptomic profiling reveals Agave Lechuguilla extract as a multi-target pre-emergent bioherbicide candidate against *Chenopodium album*. *Scientific Reports* 2025 15:1, 15(1), 35796-. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-17383-6>
- Wang, X., & Seed, B. (2007). High-throughput primer and probe design. En D. M. Tevfik (Ed.), *Real-time PCR* (1st Edition, pp. p93-105). Taylor & Francis Group.
- Weston, L. A., & Mathesius, U. (2013). Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 2013 39:2, 39(2), 283–297. <https://doi.org/10.1007/S10886-013-0248-5>
- Zhang, T., Fan, Y., Yang, Q., Zhang, R., & Guo, W. (2026). An integrated review of glyphosate ecotoxicity and environmental fate in aquatic systems using species sensitivity distributions and meta-analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 219, 107025. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2026.107025>
- Zhang, Z., Becerra-Alvarez, A., & Al-Khatib, K. (2025). Physiological action of bioherbicides in weed control: a systematic review. *Frontiers in Agronomy*, 7, 1633565. <https://doi.org/10.3389/FAGRO.2025.1633565/TEXT>

## 11. ANEXOS

### Anexo A.- Diagrama de los parámetros morfométricos



**Figura anexa 1.** Diagrama de los parámetros morfométricos. R1: diámetro corporal total ( $\mu\text{m}$ ), R2: espesor de la cutícula ( $\mu\text{m}$ ) y R3: tamaño del lumen digestivo ( $\mu\text{m}$ ). El círculo representa un organismo de manera transversal y las líneas R1, R2 y R3 indican cada parámetro morfométrico.