

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

EFFECTO DE LA BIOACUMULACIÓN DE PLOMO SOBRE LA TASA
INTRÍNSECA DE CRECIMIENTO (r) Y OTROS PARÁMETROS
POBLACIONALES, LOCALIZACIÓN CELULAR DEL PLOMO, Y
DETERMINACIÓN DE FACTORES DE BIOCONCENTRACIÓN EN
UNA ESPECIE DE ROTÍFERO DULCEACUÍCOLA.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
ÁREA TOXICOLOGÍA

PRESENTA

BIÓLOGO JESÚS ALVARADO FLORES

ASESOR DE TESIS:

DR. ROBERTO RICO MARTÍNEZ

AGUASCALIENTES, AGS. SEPTIEMBRE DE 2010

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Centro de Ciencias Básicas

**BIOL. JESÚS ALVARADO FLORES
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN EL ÁREA DE TOXICOLOGÍA,
P R E S E N T E .**

Estimado (a) Alumno (a) Alvarado:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: **"EFECTO DE LA BIOACUMULACIÓN DE PLOMO SOBRE LA TASA INTRÍNSECA DE CRECIMIENTO (r) Y OTROS PARÁMETROS POBLACIONALES, LOCALIZACIÓN CELULAR DEL PLOMO, Y DETERMINACIÓN DE FACTORES DE BIOCONCENTRACIÓN EN UNA ESPECIE DE ROTÍFERO DULCEACUÍCOLA"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., 17 de septiembre de 2010
"LUMEN PROFERRE"
EL DECANO


DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ RODRÍGUEZ

c.c.p.- Archivo





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Dr. Francisco Javier Álvarez Rodríguez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes
PRESENTE

Estimado Dr. Álvarez:

Por medio de este memorandum doy el visto bueno a la versión de tesis de maestría titulado "Efecto de la bioacumulación de plomo sobre la tasa intrínseca de crecimiento (*r*) y otros parámetros poblacionales, localización celular del plomo, y determinación de factores de bioconcentración en una especie de rotífero dulceacuícola", del alumno Biólogo Jesús Alvarado Flores para que en fecha próxima pueda presentar su defensa de la tesis correspondiente.

Sin otro asunto que tratar, no me resta sino enviarle un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 17 de septiembre de 2010
"SE LUMEN PROFERRE"

Vo. Bo.
Dr. Roberto Rico Martínez
Profesor-Investigador Titular "C"
Departamento de Química
rico@correo.uaa.mx

Vo. Bo.
Dr. en C. Javier Ventura Juárez
Profesor Investigador
Departamento de Morfología
jventur@correo.uaa.mx

Vo. Bo.
Dr. Marcelo Silva Briano
Profesor Investigador
Departamento de Biología
msilva@correo.uaa.mx



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

AGRADECIMIENTOS.

Con paz y amabilidad y un gran respeto agradezco a mi madre,
padre y mi familia.

Gracias Dr. Roberto Rico Martínez, Dr. Javier Ventura Juárez,
Dr. Marcelo Silva Briano, y Dr. Isidoro Rubio Franchini, por su
apoyo incondicional en el desarrollo de la tesis.

Gracias Maestra Araceli Adabache Ortiz por sus observaciones y
ayuda.

Gracias a todos mis amigos y compañeros de laboratorio de
morfología, ecología, 60, por existir y dejarme compartir con
ustedes día a día.

RESUMEN.

Los rotíferos del género *Brachionus* contribuyen con un porcentaje considerable del total de la biomasa del zooplancton y existen 63 especies en el mundo. Se encuentran sujetos a la contaminación del plomo considerado como el tercer lugar de los 129 contaminantes prioritarios para la Environmental Protection Agency de Estados Unidos (EPA) (ATDSR, 2003). Por tal motivo se caracterizó la bioacumulación del plomo (PbNO_3) en el rotífero dulceacuícola *B. calyciflorus*. El parámetro indicador es la tasa intrínseca de crecimiento “ r ”, producción y porcentaje de eclosión de huevos sexuales y asexuales, usando una prueba de toxicidad por exposición crónica de 5 días. Se analizó el efecto del plomo sobre la composición elemental del rotífero en estructuras internas y externas por microanálisis de rayos X por dispersión de energía, además, se monitoreo el metal por espectrofotometría de absorción atómica en la modalidad horno de grafito y se obtuvo el factor de bioconcentración. También se detectó el plomo intracelular *In vivo* por fluorescencia empleando el colorante Leadmium Green®, y se localizó el plomo bioacumulado por histoquímica. Nuestros resultados muestran que la producción y el porcentaje de eclosión decrece conforme se incrementa la concentración de plomo, igualmente r es disminuida. La concentración máxima donde no se observa efecto (CNOE), concentración mínima donde se observa efecto (CMOE) y la concentración en la que hay una reducción del 50% de “ r ” (concentración de efecto 50 ó CE_{50}) son: 0.25 0.5 y 0.84 mg/L Pb respectivamente para el parámetro indicador r . Los principales elementos encontrados son C, O, Ca, Al y Si, observándose una disminución en la detección del Ca en los organismos intoxicados. La principal vía de entrada del plomo es digestiva y su bioacumulación es principalmente en vitelario y mástax.

ÍNDICE DE GENERAL

1. Introducción.	1
1.1 Generalidades de rotíferos.	3
1.2 Rotíferos y su importancia como indicadores de toxicidad.	7
1.3 Características generales del plomo.	8
1.4 El plomo en el medio ambiente.	9
1.5 Mecanismo tóxico del plomo.	10
1.6 Bioacumulación de metales.	14
1.7 Marcadores biológicos de metales.	16
2. Antecedentes: Plomo en México y su toxicidad en invertebrados acuáticos.	17
3. Hipótesis.	21
4. Objetivos.	21
5. Metodología.	22
5.1 Cultivo de rotíferos.	22
5.2 Pruebas toxicológicas.	22
5.3 Detección de plomo intracelular in vivo por fluorescencia empleando el colorante Leadmium Green®.	24
5.4 Determinación del factor de bioconcentración del plomo.	25
5.5 Determinación de la morfología interna y externa del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	26
5.6 Histoquímica al plomo.	27
5.7 Análisis de la morfología interna y externa por microscopía electrónica de barrido (MEB) y la determinación elemental del plomo en la ultraestructura por microanálisis de rayos x por dispersión de energía.	27
6. Resultados.	29
6.1 Morfología interna y externa del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	30
6.2 Bioacumulación de plomo en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	38
6.3 Detección del plomo intracelular in vivo por fluorescencia empleando el colorante Leadmium Green®.	39
6.4 Efecto del plomo en la composición elemental del rotífero en un análisis de rayos x en microscopía electrónica de barrido.	41
6.5 Monitoreo de plomo en el rotífero por espectrofotometría de absorción atómica en la modalidad horno de grafito.	42

6.6 Toxicidad del plomo en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> , sobre la tasa intrínseca de crecimiento “r” y otros parámetros poblacionales.	42
6.7 Efecto del plomo en la producción de huevos amícticos.	45
6.8 Efecto del plomo en el porcentaje de eclosión de huevos mícticos.	45
6.9 Efecto del plomo en la producción de machos.	46
7. Discusión.	47
7.1 Morfología interna y externa del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> : relación estructura-función.	47
7.2 Análisis intracelular de plomo in vivo por fluorescencia con Leadmium Green®.	50
7.3 Bioacumulación de plomo y sus efectos adversos en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	52
8. Conclusión.	58
9. Anexo.	60
10. Glosario.	75
11. Bibliografía.	77

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Propiedades químicas del plomo (rubio, 2009).	9
Cuadro 2. Concentración de plomo en diferentes matrices, presa el Niágara ags. (Rubio, 2009).	17
Cuadro 3. Valores de toxicidad crónica y aguda por plomo (mg/L) en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	19
Cuadro 4. Valores de toxicidad obtenidos en el ensayo crónico con plomo que afecta la tasa intrínseca de crecimiento “r” y la producción de huevos amícticos (partenogenéticos).	43
Cuadro 5. Factores de bioconcentración (FBC) obtenidos en campo y en laboratorio (Rubio, 2009).	53
Cuadro 6. Factor de bioacumulación de plomo en diferentes especies.	54

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Desarrollo embrionario de <i>Monostyla cornuta</i> , adaptado de Pray (1965).	4
Figura 2. Ciclo vital heterogónico del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> (Gilbert 2003).	5
Figura 3. Representación esquemática de la disposición de los grupos coordinantes para calcio y plomo.	12
Figura 4. Sustitución del calcio en la dinámica molecular por intoxicación de plomo (Elaborado por Alvarado-Flores, 2010).	13
Figura 5. Demostración histoquímica del plomo en antenas trocal glandular y hepatopáncreas.	20
Figura 6. Imagen del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> Pallas, visto en el microscopio óptico compuesto.	29
Figura 7. Estructura externa del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	30
Figura 8. Estructuras internas del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	32
Figura 9. Estructuras internas del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	33
Figura 10. Estructuras internas del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	34
Figura 11. Estructuras internas del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	36
Figura 12. Estructuras internas del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> obtenidas con microscopio electrónico de transmisión.	37
Figura 13. Histoquímica al plomo en vitelario y mástax en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	38
Figura 14. Localización de las principales regiones de fluorescencia al plomo con el colorante Leadmium Green®.	39
Figura 15. Organismo completo: análisis de las unidades de fluorescencia al plomo con el colorante Leadmium Green® en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	40
Figura 16. Mástax: análisis de las unidades de fluorescencia al plomo con el colorante Leadmium Green® en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	40
Figura 17. Estómago: análisis de las unidades de fluorescencia al plomo con el colorante Leadmium Green® en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	41
Figura 18. Análisis de la composición elemental mediante dispersión de rayos x por microscopía electrónica de barrido en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	41
Figura 19. Análisis del monitoreo del plomo en el rotífero.	42
Figura 20. Regresión lineal del efecto del plomo en la producción de huevos	43

amícticos (partenogénéticos).

Figura 21. Regresión lineal del efecto del plomo en la tasa intrínseca de crecimiento “ r ”. 44

Figura 22. Regresión lineal de la relación de la producción de huevos amícticos (partenogénéticos) con la tasa intrínseca de crecimiento “ r ”. 44

Figura 23. Gráfico del efecto del plomo sobre el porcentaje de eclosión de huevos mícticos no fecundados (originan machos). 45

Figura 24. Gráfico del efecto del plomo sobre el porcentaje de eclosión de huevos mícticos fecundados (quistes). 46

Figura 25. Gráfico del efecto del plomo en el número de machos. 46



1. INTRODUCCIÓN.

En poblaciones zooplanctónicas, pueden ocurrir cambios en parámetros demográficos en respuesta a perturbaciones químicas, dependiendo de factores químicos, físicos, y biológicos, así como por factores en el momento de la exposición al tóxico. Las poblaciones zooplanctónicas ocupan un lugar intermedio en la estructura trófica de los ecosistemas acuáticos teniendo un rol clave en la transferencia de energía entre productores primarios y otros niveles de consumidores, esto los hace organismos indicadores importantes de los ecosistemas acuáticos (Gagneten y Paggi, 2009).

Un componente significativo del zooplancton son los rotíferos, como las especies del género *Brachionus*, las cuales podemos encontrarlas en ambientes dulceacuícolas (aguas someras, turbias, estanques y reservorios de aguas, y lagos, sujetos a la contaminación por tóxicos), contribuyendo en un porcentaje considerable del total de la biomasa del zooplancton. En los últimos años se ha observado a los rotíferos características factibles de estudios toxicológicos como por ejemplo: su sensibilidad a cambios en la calidad del agua, por consiguiente ha sido reconocido como un organismo indicado para pruebas de toxicidad (APHA, 1998).

La toxicidad es un fenómeno que depende de la concentración de una sustancia en el ambiente. Una sustancia puede ser inofensiva en cierta concentración, pero una vez que se excede de un cierto umbral de concentración, esta sustancia puede producir efectos adversos y por tanto ser considerada tóxica. En el caso de los metales, existen algunos que son esenciales y no esenciales, potencialmente tóxicos que poseen propiedades que los hacen fácilmente acumulables en algunos organismos acuáticos (Bryan et al., 1979). En México se ha reportado niveles más altos de concentraciones de plomo que los permitidos (nivel permitido 0,02 mg/L) por la norma de agua potable (Frías-Espéricueta et al., 2003). Los rotíferos son importantes contribuyentes de un ecosistema acuático que requiere su evaluación, puesto que la presencia de metales en su hábitat puede afectar no solo de forma aguda, sino también de manera crónica a los rotíferos. Eventualmente el plomo que llega a los rotíferos es bioacumulado y puede pasar a través de la cadena trófica. La mayoría de los estudios de toxicidad crónica se centran en características como alimentación y dinámicas poblacionales. Por lo cual el

crecimiento y la reproducción confieren alta importancia biológica y ecológica al evaluar estos aspectos con determinados contaminantes (García-García et al., 2007).

El efecto inmediato de la bioacumulación de metales en los tejidos de los organismos es su probable biomagnificación del contaminante a través de la cadena trófica, además, de tener riesgos en el organismo donde se bioacumula.

Existen reportes donde se ha encontrado depósitos subcelulares de plomo en el camarón común *Crangon crangon* (Andersen y Baatrup, 1988), así como gránulos de plomo en el crustáceo *Carcinus maenas* (Hopkin y Nott, 1979). Todos estos reportes hacen hincapié en que el principal destino final del metal está relacionado con las uniones covalentes y propiedades iónicas. Se han identificado tres procesos de interacción de metales pesados con células de invertebrados: 1) unión a ligandos específicos solubles como son las metalotioneínas, 2) compartimentalización en vesículas como los lisosomas, y 3) formación de precipitados insolubles (Gnassia-Barelli y Romeo, 1993). Cabe mencionar que reportes en rotíferos de bioacumulación en estudios microscópicos de ultraestructura no existen, pero es clara su relación con otros invertebrados al hablar de mecanismos fisiológicos moleculares probables que contribuyen al depósito del plomo en los tejidos.

El plomo que ingieren los organismos es dependiente de la concentración de exposición y del comportamiento del plomo en ambientes acuáticos, y una vez dentro del organismo el plomo reacciona a nivel molecular con diferentes órganos blancos, produciendo: (a) disminución en el metabolismo respiratorio, (b) daño en membranas sinápticas, y (c) efecto adverso en el desarrollo y reproducción (Gnassia-Barelli y Romeo, 1993).

Finalmente todos los efectos adversos del plomo inciden con la supervivencia, crecimiento, reproducción, desarrollo y metabolismo. El plomo ha sido detectado en prácticamente todos los ambientes. Por tanto los datos obtenidos de pruebas de toxicidad del ciclo de vida representan una verdadera aproximación a evaluar los riesgos ecológicos. Sin embargo, las variaciones en la concentración de exposición durante la prueba no suelen relacionarse con la cantidad del tóxico que se bioacumula, en estos

organismos, o es muy escasa la literatura que habla sobre ello (Hernández-Flores, 2006).

1.1 Generalidades de rotíferos.

El filo Rotifera está representado por 2000 especies, de las cuales 1800 pertenecen a la Clase Monogononta. La mayoría de las especies son planctónicas y contribuyen más del 30 % total de la biomasa del plancton. Los rotíferos se caracterizan por presentar una región apical ciliada llamada corona, presentan un mástax que corresponde a una estructura especializada con dientes fuertes unisegmentados. Ostentan simetría bilateral, son pseudocelomados sin ser segmentados. Se encuentran comúnmente en cuerpos de agua dulce acuícolas. Miden alrededor de 1 mm de largo, su cuerpo es elongado, parcialmente transparente. Se reconocen 3 regiones corporales, la cabeza, el tronco y la parte terminal o pie (Ricci y Balsamo, 2000).

Se registran 3 clases: Bdelloidea, Seisonacea y Monogononta; en la Clase Monogononta, las hembras producen tres clases de huevos, grandes (diploides, amícticos) y pequeños (haploides, mícticos) huevos “de verano”, y huevos “de invierno” con gruesa cáscara. Los grandes huevos de verano se desarrollan partenogénicamente en hembras, y los pequeños huevos de verano si no son fecundados se desarrollan partenogénicamente en machos. No obstante, si los pequeños huevos de verano son fecundados, se transforman en huevos de invierno con gruesa cáscara, que pueden permanecer latentes durante varios meses, para acabar de desarrollarse en hembras (Nogrady y Snell, 1993). El desarrollo embrionario de los huevos conlleva diferentes etapas: en un principio las células progenitoras denominadas macrómeros y micrómeros se sitúan de tal forma que permiten la formación de la blástula, la cual originará una gástrula por epibolia, y posteriormente se lleva a cabo el proceso de organogénesis (ver, Figura 1; Pray, 1995).

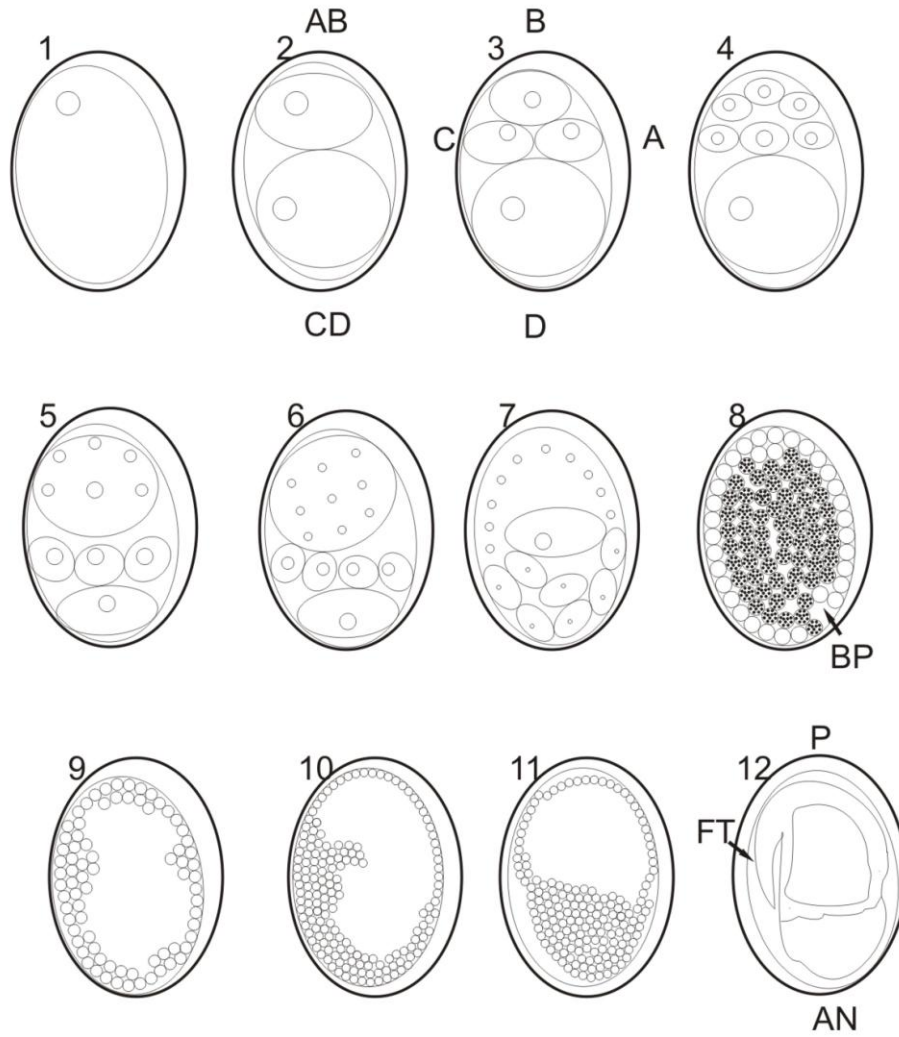


Figura 1. Desarrollo embrionario de *Monostyla cornuta*, adaptado de Pray (1965); 1-4 enclave y formación de 8 células, 5-7 epibolia y comienzo de la formación de los micrómeros, 8 involución y posición del blastoporo, nótese como los micrómeros envuelven a los macrómeros, 9-11 migración del producto y como las células D envuelven a los micrómeros, 12 muestra la orientación de la parte anterior y posterior del producto. Leyendas: AB, AB micrómeros; CD, CD macrómeros; A, A micrómeros; B, B micrómeros; C, C micrómeros; D, D macrómeros; BP blastoporo; FT pie; P posterior; AN anterior.

Los huevos amícticos de hembras difieren morfológicamente y fisiológicamente de los huevos amícticos de hembras partenogénéticas (Gilbert, 2004). Los huevos mícticos de *Brachionus calyciflorus*, constan de una cubierta quitinosa que termina en una abertura u opérculo, más al interior posee otra cubierta o sincitio que recubre al embrión. A diferencia del huevo amíctico, que solo al embrión lo cubre un sincitio (Pourriot y Snell, 1983; Birky y Gilbert, 1971).

Los sexos están separados y hay un fuerte dimorfismo sexual. La hembra posee un órgano reproductivo compuesto por un vitelo que consta de un sincitio con una gran cantidad de núcleos, asociado el sincitio del ovario con la producción del vitelo, y capa folicular. Un corto oviducto se abre a la cloaca. El macho posee testículos en los cuales se puede notar la formación de espermias los cuales menciona Melone y Ferraguti (1994), poseen un movimiento vibrátil por sus flagelos anteriores, también se logra observar un axonema, y un pene como órganos reproductivos, asociados a una glándula genital y vesícula contráctil (Purcell, 1996; Marshall y Williams, 1980).

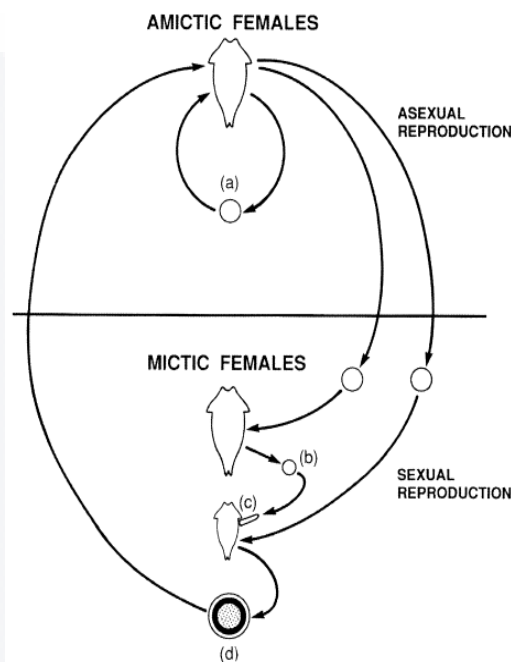


Figura 2. Ciclo vital heterogónico del rotífero *Brachionus calyciflorus* (Gilbert, 2003).

Los rotíferos poseen un sistema excretor, digestivo, un sistema nervioso y muscular además, del reproductor, (el macho generalmente carece de un sistema digestivo). El sistema muscular consta de bandas musculares que recorren transversal, longitudinal, y circularmente a todo el integumento del rotífero y las vísceras. El cual sin un sistema nervioso, neurotransmisor colinérgico, que emplee señales o péptidos trasmisores, la actividad del rotífero sería insignificante, tal sistema consta de un largo ganglio cerebral (llamado cerebro), localizado en la parte ventral de la corona, donde emergen nervios por todo el cuerpo del rotífero, originando los mecanorreceptores, quimiorreceptores y fotorreceptores (Hochberg y Gurbuz, 2007; Hochberg, 2006). El sistema excretor del rotífero le ayuda a mantener el equilibrio osmótico, y a la eliminación de sustancias de desecho, constituido por un sistema protonefridial, túbulos

capilares y mecanismos de exocitosis. En cuanto al sistema digestivo, la corona tiene funciones de captación del alimento atravesando el esófago y faringe hasta su destino final, el estómago, todo el alimento que entra es triturado en la región del mástax por un aparato denominado trofos, quien tiene una gran variedad de formas de importancia taxonómica, por ejemplo el genero *Brachionus* sp, posee un trofos maleado (Clement y Wurdak 1991; Wallace et al., 2006).

Recientemente el sistema neurotransmisor y colinérgico en rotíferos ha sido estudiado por Nogrady y Alai, (1983); Raineri, (1984); Kotikova, (1995, 1998); Kotikova et al., (2005); y Pineda-Rosas et al., (2005), donde se corrobora una vía de síntesis de diferentes moléculas. Los neurotransmisores y neuropéptidos los cuales están implicados en la reproducción y un aparente control en la fertilidad, puesto que dichos péptidos o bien monoaminas son importantes en el control de ciertas hormonas como: la hormona luteinizante y la hormona gonadotropina (Vijayan, 1985).

También poseen mecanismos de exocitosis que sugieren un dispositivo de neurosecreción por vesículas de exocitosis donde enzimas, moléculas como hormonas sexuales (Alvarado-Flores, et al., 2009) y otras proteínas relacionadas con secreciones glandulares (Pérez-Legaspi et al., 2007). Además, este sistema de excreción es empleado en diversos mecanismos, de secreción de sustancias como: ácido gama-aminobutírico (GABA), hormona del crecimiento (GH), hormona gonadotropina corionica humana (HCG), estradiol (E₂), triyodotirosina (T3), 20-hidroxiectidisona (20-HE), 5-hidroxitriptamina (5-HT) y hormonas juveniles (JH), las cuales fueron usadas en la especie *Brachionus plicatilis* para inducir la reproducción y el aumento en la población (Gallardo et al., 2000; Wenresti et al., 1997). Varios de los principios hormonales de los vertebrados o por lo menos sustancias muy próximas a ellas han sido encontradas en tejidos de los invertebrados (Mikhailovich, 1976). Pineda et al., (2005), identificaron receptores de acetilcolina en seis especies de rotíferos. Igualmente Ríos et al., (2005), demostró que las proteínas HSP60 se incrementan en la especie de rotífero *Brachionus plicatilis* durante la exposición a diferentes contaminantes. Algunas feromonas sexuales se han determinado empleando anticuerpos específicos para dicha glucoproteína en rotíferos (Snell et al., 1995), las cuales actúan como un sistema de reconocimiento del compañero de la hembra *B. plicatilis* (Snell y Stelzer, 2005).

1.2 Rotíferos y su importancia como indicadores de toxicidad.

Los invertebrados acuáticos se han empleado con éxito como modelos de pruebas de toxicidad, teniendo en cuenta el hecho de que tiene tiempos cortos de generación y su pequeño tamaño no requiere de un gran costo de manutención (Snell y Moffat, 1992).

Aunque los rotíferos son de gran importancia en la comunidad zooplanctónica y son participantes claves en las redes tróficas, su rol en las pruebas de toxicidad está demostrado y son muy sensibles haciéndolos buenos organismos indicadores de toxicidad. Sin embargo, aún falta por interpretar y caracterizar el proceso de bioacumulación en rotíferos de metales pesados, y su efecto en su ciclo vital.

El cultivo de rotíferos para ensayos toxicológicos, estudios de fisiología y morfología son de gran importancia, por ejemplo el rotífero *Brachionus calyciflorus*, alcanza poblaciones *In Vitro* de hasta 891 rotíferos/mL en condiciones de $0.05-5 \times 10^6$ células/mL a 20 °C (Thorp y Covich, 1991; Rico-Martínez y Dodson, 1992). Por lo cual se han elaborado protocolos de cultivo como el desarrollado por Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (1998).

Snell y Moffat (1992) desarrollaron una prueba de 2 días utilizando el ciclo de vida de *Brachionus calyciflorus*, en esta prueba de exposición crónica emplearon como parámetro indicador la tasa intrínseca de crecimiento poblacional r bajo condiciones no limitantes.

La tasa intrínseca de crecimiento es la capacidad de una población para crecer y se representa por r . Más específicamente es la tasa de crecimiento específico por cada individuo miembro de la población cuando no hay sobrepoblación. El valor r en estas condiciones es máximo y constituye un índice único de la capacidad de una población para crecer, por lo tanto r es una medida ecológicamente importante del crecimiento potencial de una población (Odum, 1986; Brewer, 1994).

Estadísticamente r integra un número de características del crecimiento poblacional, incluyendo tasa de natalidad, tasa de mortalidad y tiempo de desarrollo,

algunas de las cuales pueden ser adversamente afectadas por tóxicos. Una característica de la prueba con rotíferos es que todas las etapas se presentan durante la prueba, incluyendo embriones, juveniles y adultos. Todos los procesos del ciclo de vida son representados, incluyendo desarrollo, maduración, crecimiento y reproducción (Snell y Moffat, 1992).

r se obtiene mediante la siguiente formula:

$$r = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}$$

Donde:

N_t = Número de rotíferos en la poza después de t

N_0 = Número inicial de rotíferos en la poza

t = tiempo

\ln = logaritmo natural

Los organismos acuáticos expuestos a concentraciones pequeñas de metales pueden verse severamente afectados, ya que desarrollarán cambios histológicos o morfológicos en tejidos, cambios en la fisiología, como alteraciones en el crecimiento y desarrollo, torpeza al nadar; alteraciones en la bioquímica del organismo al afectar la actividad enzimática; trastornos en el comportamiento; y trastornos en la reproducción (Rubio, 2009).

1.3 Características generales del Plomo.

El plomo se encuentra en la naturaleza formando una gran variedad de minerales, principalmente la galena (sulfuro de plomo), constituye la fuente principal de producción comercial de este metal. Otros minerales de plomo son: la anglesita (sulfato), cerusita (carbonato), la cocoita (cromato), la wulfenita (molibdato), la pirimorfita (fosfato), la mutlockita (cloruro) y la vanadita (vanadato). En muchos casos, los minerales de plomo pueden contener otros metales. Es un metal blando, maleable, de color plateado o gris azulado; es un elemento químico que se encuentra en el grupo

IVA de la tabla periódica, junto con el carbono, silicio, germanio y estaño; número atómico 82, peso atómico 207.19, gravedad específica de 11.34; punto de ebullición de 1740°C a una atmósfera con una densidad de 11,3 g/cm³ (Nordberg, 1998).

Cuadro 1. Propiedades químicas del Plomo (Rubio, 2009).

Plomo	
Radio iónico (Å)	1,20
Radio atómico (Å)	1,75
Estado de oxidación	+2, +4

El plomo metálico se utiliza en forma de planchas o tubos, también para el revestimiento de cables, como componente de soldadura y empaste en la industria automovilística. Es un material excelente como protector de radiaciones ionizantes, encontrándose en una gran variedad de aleaciones y sus compuestos se preparan y utilizan en grandes cantidades en numerosas industrias. Aproximadamente un 40% del plomo en forma metálica, 25% en aleaciones y 35% en compuestos químicos. Los compuestos más comunes de plomo son: el monóxido (PbO), el dióxido (PbO₂), el tetróxido (Pb₃O₄), el sesquióxido (Pb₂O₃), el carbonato, el sulfato, los cromatos, el arseniato, el cloruro, el silicato y la azida de plomo (Nordberg, 1998).

1.4 El plomo en el medio ambiente.

Los contaminantes orgánicos se pueden encontrar en casi todos los ecosistemas acuáticos y se han reconocido como peligrosos debido a su capacidad para acumularse en las cadenas alimentarias acuáticas y sus posibles efectos tóxicos sobre los organismos. Por lo tanto, muchos de ellos han sido reconocidos como prioritarios por organismos reguladores del medio ambiente. Estudios anteriores mostraron que los niveles de contaminantes en el medio ambiente rara vez se relacionan con los niveles medidos en la biota, incluso cuando las características ambientales se tienen en cuenta. Aparte de ello, los factores intrínsecos del organismo expuesto, como la edad, sexo, estado fisiológico, podrían afectar la acumulación y la distribución interna de los contaminantes y como consecuencia influir en sus efectos (Bervoets, et al., 2009).

Los metales incorporados en el medio ambiente siguen cuatro vías: 1. Son retenidos en el suelo. Fijados por procesos de adsorción, formación de complejos, y precipitación; 2. Son adsorbidos por las plantas e incorporados a las cadenas tróficas; 3. Pasan a la atmosfera por volatilización; y 4. Se movilizan a las aguas subterráneas y superficiales, potenciando su efecto tóxico en los ambientes acuáticos gracias a la modificación química del elemento por procesos bioquímicos. La difusión del plomo es por medio del aire, inherente a la vía antropogénica y natural. La concentración atmosférica de plomo es de $0.001 - 0.01 \mu\text{g}/\text{m}^3$. En aguas subterráneas se detecta entre $1-60 \mu\text{g}/\text{L}$, y se estima que el contenido global promedio en lagos, ríos y otros cuerpos de agua andan entre $1-10 \mu\text{g}/\text{L}$. En suelos se encuentra en la corteza terrestre con una concentración promedio de $13.0 \text{ mg}/\text{Kg}$, en rocas ígneas, metamórficas y sedimentarias presentan concentraciones de $10-20 \text{ mg}/\text{Kg}$, en cambio la roca fosfática supera los $100 \text{ mg}/\text{Kg}$ de plomo (Rubio, 2009).

1.5 Mecanismo tóxico del plomo.

El plomo es el metal tóxico más difundido y detectable en todas las fases del ambiente, no esencial para los organismos terrestres y acuáticos.

El principal riesgo es su toxicidad, siendo su principal mecanismo tóxico la suplantación de cationes polivalentes (esencialmente calcio y zinc) en las maquinarias moleculares del organismo, gracias a su estructura iónica que le permite establecer interacciones favorables con los grupos que coordinan los cationes polivalentes en las proteínas transportadoras de metales (se ha observado que la activación por el plomo de muchas de las proteínas de unión a calcio suelen ser anormales, por lo que exhibe una activación y un funcionamiento atípicos, los cuales pueden ser ocasionados por formaciones no fisiológicas en la proteína tras su asociación al plomo), de adhesión celular, y de unión al ADN, así como canales iónicos, diversas enzimas metabólicas, entre otros blancos moleculares afectando sistema muscular, digestivo, endocrino, respiratorio, y nervioso. Las vías seguidas por el plomo para su absorción dependen de algunos casos del compuesto específico de plomo del que se trate, siendo las más significativas las vías digestivas y pulmonares. La facilidad con que este metal penetra y se distribuye, esta en función de los mecanismos de transporte para la absorción

principalmente calcio, zinc, magnesio y otros metales requeridos por el organismo (Garza, et al., 2005).

El plomo afecta relativamente la totalidad del ambiente celular. La principal vía de entrada de plomo es a través de moléculas de transporte de cationes divalentes (MTCD), canales de potasio, receptores colinérgicos, canales de calcio mono y polivalentes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Li^+ , Cs^+ y Ba^{2+}). Por ejemplo afecta receptores de aspartato; ionotrópicos, metabotrópicos y NMDA (receptores ionotrópicos de glutamato). Daña los proteoglicanos de matriz extracelular, moléculas de adhesión y señalización celular, y produce daño peroxidativo en lípidos y proteínas. Interrumpe el funcionamiento de caderinas (moléculas de adhesión intercelular con un dominio extracelular de unión al calcio). La afinidad del plomo a los canales de calcio está determinada por los 4 residuos de glutamato, gran sitio de afinidad para cationes (locus EEEE; E=glutamato), dicha interacción electrostática es entre los grupos carboxilato de las cadenas laterales de los residuos de glutamato (Garza, et al., 2005).

Dentro de los sitios de unión que logra afectar el plomo están los motivos de proteínas de unión al calcio, tales como: Mano EF (denominado así porque su estructura semeja los dedos pulgar e índice de la mano) para calmodulina y parvalbúmina, y el motivo C2 (conformado por dos hojas β de cuatro hebras ensambladas en β sándwich), para sinaptotagminas I y proteínas cinasas (PKC). Las cinasas dependientes de calmodulina, camk's, calcineurina y las SNARE's, también poseen sitios de ataque del plomo, por su similitud. Por ejemplo el AMPc y/o el óxido nítrico necesita que la calmodulina funcione, la cual modula canales de potasio tipo SK (small-K) y los IK (intermedium K), activados por calcio. Los receptores intracelulares rianodina e inositol trifosfato (IPs) y algunos canales activados por nucleótidos cíclicos pueden ser afectados de igual forma (Finney, et al., 2003).

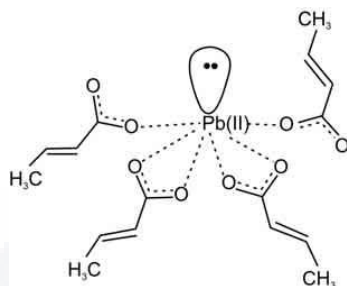
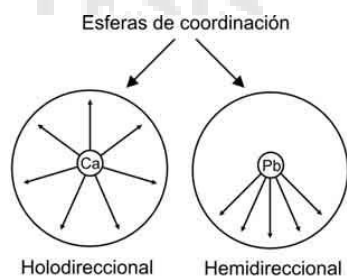


Figura 3. Representación esquemática de la disposición de los grupos coordinantes para calcio y plomo. **A)** los grupos de la esfera de coordinación del plomo tienden a adoptar una disposición hemidireccional por la presencia de un par inerte de electrones en el ion. En el calcio, la disposición suele ser más regular (holodireccional). **B)** Esquema de la disposición hemidireccional adoptada por los grupos que conforman la esfera de coordinación para el plomo en un compuesto con número de coordinación de seis (Garza et al., 2005).

La neurotoxicidad del plomo sobre los segundos mensajeros es devastador en el sistema de señalización celular. El plomo interfiere con el mecanismo sináptico de liberación de transmisión afectando los diversos sistemas de neurotransmisión química (colinérgico, noradrenérgico, GABAérgico y dopaminérgico). Tiene dos efectos sobre las células, en la liberación del neurotransmisor; incrementado la liberación del neurotransmisor o evitando la estimulación de los canales voltaje dependientes. Este doble efecto extracelular e intracelular del plomo en la neurotransmisión es por la suplantación de la acción del calcio (Strozynska y Sulkowski, 2004). El plomo es carcinógeno, teniendo efectos sinérgicos con cadmio, mercurio, cobre, zinc (Hernández, 2006).

El resultado del efecto adverso sobre la maquinaria molecular de la célula es directa en organelas celulares como: mitocondrias reduciendo el metabolismo energético celular y favoreciendo la generación de radicales libres, también inhibe la captura mitocondrial del calcio ya que promueve la apertura del poro de transición mitocondrial, con la consiguiente liberación del citocromo C al citoplasma; en el retículo endoplásmico inhibe las ATPasas de calcio uniéndose posiblemente a

chaperonas moleculares GRP78, además, activa el sistema UPR (Unfolded Protein Response), impidiendo el funcionamiento de proteínas encargadas de unión de ADN como los dedos de Zinc, afecta también la nucleasa APE-1, induce la hidrólisis de ARN, e inhibe la pirimidina 5' nucleotidasa. Interfiere con la señalización de glucocorticoides, y enzimas antioxidantes (Finney, et al., 2003).

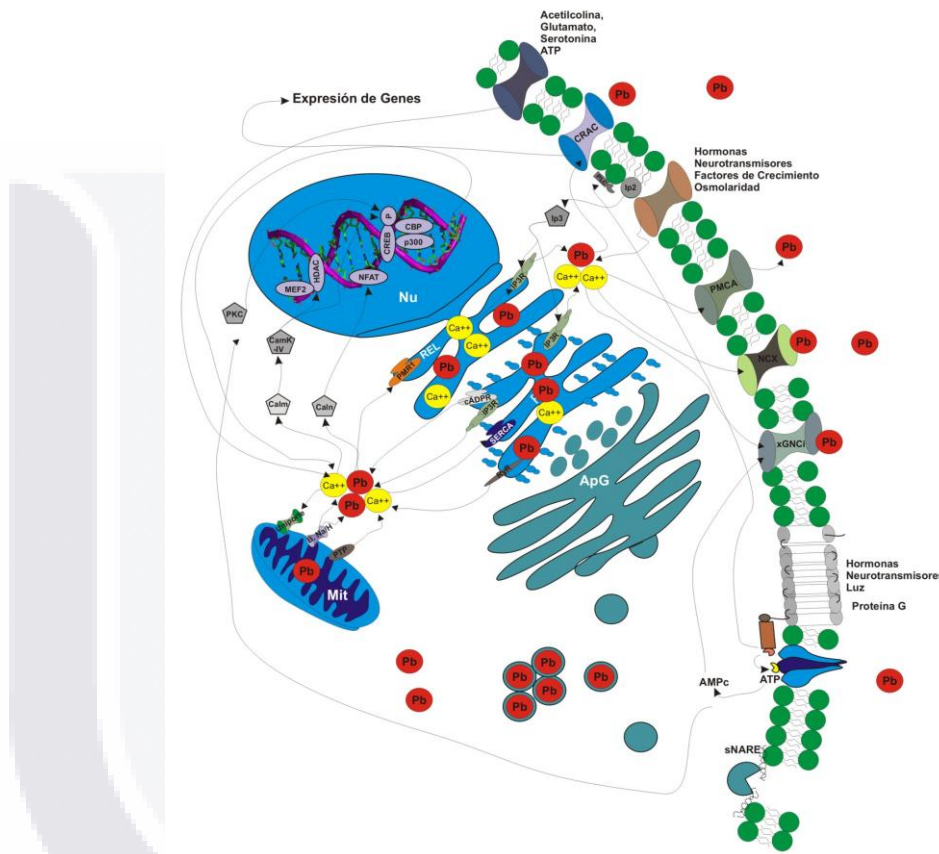


Figura 4. Sustitución del calcio en la dinámica molecular por intoxicación de plomo (Elaborado por Alvarado-Flores, 2010), núcleo (Nu), retículo endoplásmico liso (REL), aparato de Golgi (ApG), y mitocondria (Mit).

El plomo participa en la dinámica bioquímica del calcio en su forma iónica y no iónica alterando el funcionamiento normal de la célula. De tal forma que tanto el plomo como el calcio producen la apoptosis. El Ca y Pb bloquean completamente la permeabilidad de un poro de transición PTP, e inhiben la ciclosporina. El Ca²⁺ y el Pb²⁺, se unen a los sitios de unión del PTP y subsecuentemente abren el canal PTP, iniciando el proceso de apoptosis celular, induciendo la despolarización de la mitocondria y la consecuente liberación del citocromo c activando las caspasas 9 y 3

(He et al., 2000). Afecta de manera indistinta a las organelas celulares, y algunas tienden a acumularlo. El plomo se concentra y produce daño en mitocondrias, núcleo, y retículo endoplásmico.

Finalmente el efecto tóxico del plomo esta en relación sobre lo que logra afectar de la dinámica bioquímica del plomo, sin embargo, existe lo que se conoce por transición de metales en la célula, es decir metales que son acumulados por la células, ya sea como cofactores necesarios o probables catalizadores de reacciones citotóxicas. Son algunas proteínas encargadas de controlar la actividad intracelular de los iones metálicos y ayudar en un funcionamiento normal predeterminado, estos incluyen transporte de membranas, sensores metaloreguladores, proteínas chaperonas que protegen el ion metálico y lo llevan al sitio de acción, siendo que muchas de estas proteínas coordinan su entrada y salida al citoplasma de la célula y puede existir alteraciones en estos mecanismos cuando el ion metálico no es esencial para el organismo (Lydia et al., 2003).

1.6 Bioacumulación de metales.

Las descargas naturales y antropogénicas de los metales influyen en la biodisponibilidad en los sistemas acuáticos. Esta fracción biodisponible no puede ser detectada mediante la medición de concentraciones de metales en la fase soluble, sino que sólo puede apreciarse mediante la determinación de la cantidad del metal incorporado en los organismos. Otra condición inevitable en la evaluación del conocimiento de acumulación, dependiendo de la especie biológica y el elemento químico considerado, es el régimen de exposición aplicada, los mecanismos de homeostasis de cationes, así como las influencias del ciclo vital en la acumulación de metales y el desarrollo de un diseño experimental apropiado en diferentes escalas espaciales y temporales (Khale y Zauke, 2002).

Los mecanismos intracelulares de los organismos utilizados como modelos en estudios de bioacumulación, llegan a tener una gran variabilidad. Así cuando la difusión pasiva es el proceso de asimilación principal, en una cinética de primer orden, se pueden hacer predicciones razonables sobre un amplio rango de concentraciones de exposición, independientemente de la duración del experimento, sin embargo, si esto no sucede, es

decir la captación a través de canales iónicos, con una limitación de la tasa de absorción debido a la cantidad limitada de sitios de entrada, como consecuencia, la relación entre la captación de metales neta y el aumento de las concentraciones de exposición seguirá una curva de saturación, en este caso, la verificación o la extrapolación (lineal) de predicciones en los modelos derivados de la cinética de primer orden, sólo será un éxito para el rango inferior de las concentraciones de exposición, donde el proceso de captación no está limitando la velocidad de absorción (Clason et al., 2003).

La bioacumulación por contaminantes puede ocurrir por el agua, partículas en suspensión, a partir de sedimentos y en las cadenas alimenticias. El ritmo al que se produce la acumulación en los organismos no sólo depende de la disponibilidad del contaminante, sino también de otros factores biológicos, químicos y ambientales además, si el organismo es capaz de excretar o acumular el contaminante (Bryan, 1979).

Bioacumulación significa acumulación neta en un organismo de cualquier sustancia tóxica presente en el medio donde habita dicho organismo (Rubio, 2009). La bioacumulación en la biota acuática se expresa típicamente mediante las proporciones de las concentraciones químicas en el tejido del organismo, en relación con la concentración de exposición de la sustancia química, conocido como Factor de Bioconcentración (FBC), los cuales suelen ser muy variables entre los organismos y, en general inversamente proporcional a la concentración de exposición. Los factores de bioacumulación son frecuentemente 100-1000 veces mayores que los FBC del mismo metal y de las mismas especies, esta diferencia se atribuye a los dos niveles inferiores de exposición en el campo y la inclusión de la ruta de exposición alimentaria (De Forest, et al., 2007).

El factor de bioconcentración (FBC): es la relación de la concentración de tóxico en el organismo respecto a la concentración en el lugar donde habita, donde la concentración del tóxico en organismos acuáticos, usualmente es determinada en estudios de laboratorio.

Factor de bioacumulación (FBA): es la relación de la concentración del tóxico en el organismo respecto a la concentración en el lugar donde habita, pero difiere del

FBC en que la concentración del tóxico en el organismo acuático, resulta de todas las rutas posibles de exposición (dieta, respiración etc.).

El factor de transferencia trófica (FTT): es la relación del tóxico en el tejido de un organismo y la concentración de tóxico en su alimento. En estos casos solo se intoxica por medio de la dieta y no en su hábitat. El término FTT puede incluir el término biomagnificación, cuando la concentración del tóxico en el organismo es mayor que la dieta.

Por consiguiente la concentración de metales en los tejidos y su transferencia en la redes tróficas, nos permite documentar las posibles rutas por las cuales los metales se mueven, tanto así que los invertebrados pueden influir en las concentraciones de los metales acumulados en los macroinvertebrados bénticos y por tanto en peces.

En la bioacumulación de metales existen factores determinantes para que se presente el fenómeno, por ejemplo; los índices de biotransformación (metilación y desmetilación), por efecto de las bacterias metiladoras (bacterias reductoras de sulfato), las variaciones de los factores ecológicos abióticos (características físico-químicas del agua y sedimentos) o bióticos como; hábitat régimen alimentario, naturaleza y cantidad de alimento disponible, y por las variaciones del volumen pluvial según las estaciones y fluctuaciones climatológicas (Rubio, 2009).

1.7 Marcadores Biológicos de Metales.

La estimación de la exposición es considerada el eslabón más débil en la evaluación del riesgo. Y los biomarcadores de productos químicos son de gran importancia, con la finalidad de averiguar si el riesgo es bajo, especial o alto, en términos de anatomía comparada, fisiología, metabolismo, genética, y más en detalle estudios de toxicodinamia y toxicocinética.

Según Kakkar y Jaffery (2005) los podemos dividir en 5 subcategorías:

1. Lesiones moleculares: Aduetos de ADN, hemoglobina glucosilada, aductos de proteínas, aberraciones cromosómicas e inducción de micronúcleos.

2. Metabolismo de agentes exógenos: fenol, DDT, cotinina, retinal, benzopirenos, acroleína.
3. Producción endógena de biomoléculas: acetilcolinesterasa (plaguicidas organofosforados), toxinas en el hígado, cáncer de hígado (α -feto proteína), infarto al miocardio (TGO), traumatismo muscular (Creatinina)
4. Cambios en los tejidos/ cambios celulares: motilidad del espermatozoide, conteo de espermatozoides, actividad de macrófagos, recuentos de glóbulos rojos y la proporción de linfocitos.
5. Sin cambios por agentes exógenos: fibras de amianto, PCB, aflatoxinas, algunos solventes y metales pesados.

La toxicidad de cualquier sustancia química depende de una serie de factores que incluyen su absorción, distribución, metabolismo y excreción. Además, la forma del metal, nivel de exposición, duración de la exposición, toxicodinamia y toxicocinética, su efecto y repercusión a nivel específico y sus consecuencias en el medio ambiente (Kakkar y Jaffery, 2005)

2. ANTECEDENTES: Plomo en México y su toxicidad en invertebrados acuáticos.

La contribución de plomo por México al ambiente en 1995 fue de 179,740 toneladas de plomo concentrado y de refinado 167,970 toneladas a diferencia de Canadá que produjo 146,000 toneladas y Estados Unidos 1.399 millones de toneladas ese mismo año. El plomo se extrae de minas localizadas en 18 entidades federativas, destacando por su importancia la producción de Chihuahua y Zacatecas. También en el país el plomo se genera como co-producto en la obtención de la plata, de la cual México es el principal productor mundial.

Cuadro 2. Concentración de plomo en diferentes matrices, Presa el Niágara Ags. (Rubio, 2009).

Matriz	1999	2006
Plomo en agua (mg/L)	0.01591	0.0038
Plomo en elutriados (mg/L)	-	0.49
Plomo extraíble (mg/Kg)	1.62	5.22
Plomo total sedimento (mg/L)	8.44	-

Los impactos ambientales en antiguas zonas mineras del país, pueden afectar la calidad de mantos acuíferos, suelos y cultivos, así como la salud de los habitantes de comunidades cercanas a dichas zonas (Rubio, 2009).

El plomo se encuentra con concentraciones que oscilan entre 1 a 60 $\mu\text{g/L}$ en el agua, sin embargo, en Estados Unidos (EU) existen registros de concentraciones de plomo en aguas residuales de hasta 25 mg/L (USEPA, 1986). En México, se sabe que el plomo ha contaminado el ambiente desde 1682, hoy día se producen 225,472 toneladas métricas de plomo (Sanín y González-Cossio, 1998). El plomo es uno de los metales tóxicos para los organismos acuáticos, y su toxicidad depende de diferentes factores.

Recientemente el fenómeno de biomagnificación de plomo, ha sido propuesto en el rotífero *Asplanchna brighwellii*, dado que se reporta por primera vez un factor de bioconcentración de 49,300 el cual resulta ser cuatro veces mayor que en especies herbívoras zooplanctónicas (los cladóceros *Daphnia similis* y *Moina micrura*), en un embalse contaminado (presa el Niágara) localizado en Aguascalientes, México. Cabe mencionar que este embalse carece de peces y la especie de rotífero (*A. brighwellii*), es un depredador de especies de invertebrados como *Moina micrura*, lo cual podría explicar su valor tan alto de bioconcentración de plomo en ellos, respecto al de su presa *M. micrura*, siendo este el dato más reciente que indica una probable biomagnificación en un reservorio acuático, en un nivel trófico inferior (Rubio-Franchini, 2008).

Aunque existen aparte del ya mencionado, otros tres reportes de factores de bioconcentración en rotíferos, estos han sido obtenidos en experimentos realizados en el laboratorio, por ejemplo se calculó en la especie *Brachionus calyciflorus* el factor de bioconcentración del selenio (Dobbs et al., 1996), y los policlorobifenilos (PCB) en la misma especie (Joaquim-Justo et al., 1995), y el mono-, di-, y tributilestano en la especie *B. plicatilis* (Hong-wen et al., 2001). Sin embargo, la toxicidad del plomo no ha sido del todo resuelta, sobre todo cuando existe una bioacumulación en ellos, solo existen reportes del efecto en la sobrevivencia del organismo, densidad de población, y mecanismos fisiológicos.

En un estudio realizado por Hernández-Flores y Rico-Martínez (2006), quienes desarrollaron una prueba de toxicidad crónica reproductiva de 5 días, evaluaron el

efecto que posee la concentración del plomo, en la tasa intrínseca de crecimiento (r). Obteniendo valores de concentración de exposición (CE_{50}) para el plomo de 0.057 mg/L^{-1} , usando como medio de exposición al plomo la dieta de alga *Nannochloris oculata*. Además, en el mismo estudio se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer) en la modalidad horno de grafito, el plomo total al final de experimento, encontrando una disminución respecto al plomo inicial, el cual pudo haberse bioacumulado en la especie empleada en este estudio (*Lecane quadridentata*), sin embargo, estos datos no son mostrados respecto el plomo bioacumulado en el rotífero.

Cuadro 3. Valores de toxicidad Crónica y Aguda por Plomo (mg/L) en el Rotífero *Brachionus calyciflorus*.

	CNOE	CMOE	CE20	CL50
Grosell et al., (2005)	0.067	0.194	0.304	
Snell y Janssen (1995)				> 4
Santos-Medrano comm. pers., (2009)				0.77

El significado biológico de la deposición de metales en los tejidos blandos de invertebrados acuáticos es todavía objeto de un intenso debate (Gibson y Barker, 1979; Dall y Moriarty, 1983; Rainbow, 1988). Algunos autores consideran los compartimientos de almacenamientos para las necesidades fisiológicas, como blanco de tóxicos. Varios procesos en los que participan los organismos acuáticos en la absorción de plomo se han reportado, mencionando que la concentración del plomo es el factor más importante que determina la absorción, ya que el plomo puede sustituir al calcio, y probablemente iones de zinc dependientes de la sinapsis, causando daños en diferentes sistemas de neurotransmisión (Gnassia-Barelli y Romeo, 1993).

Por ejemplo en el camarón tigre gigante la deposición de metales fue investigada para el metal plomo por medio de histoquímica y microscopía electrónica de transmisión en hepatopáncreas, estómago y antenas encontrando gránulos de plomo en estos tejidos como se muestra en la figura 5 (Vogt y Quintio, 1993).

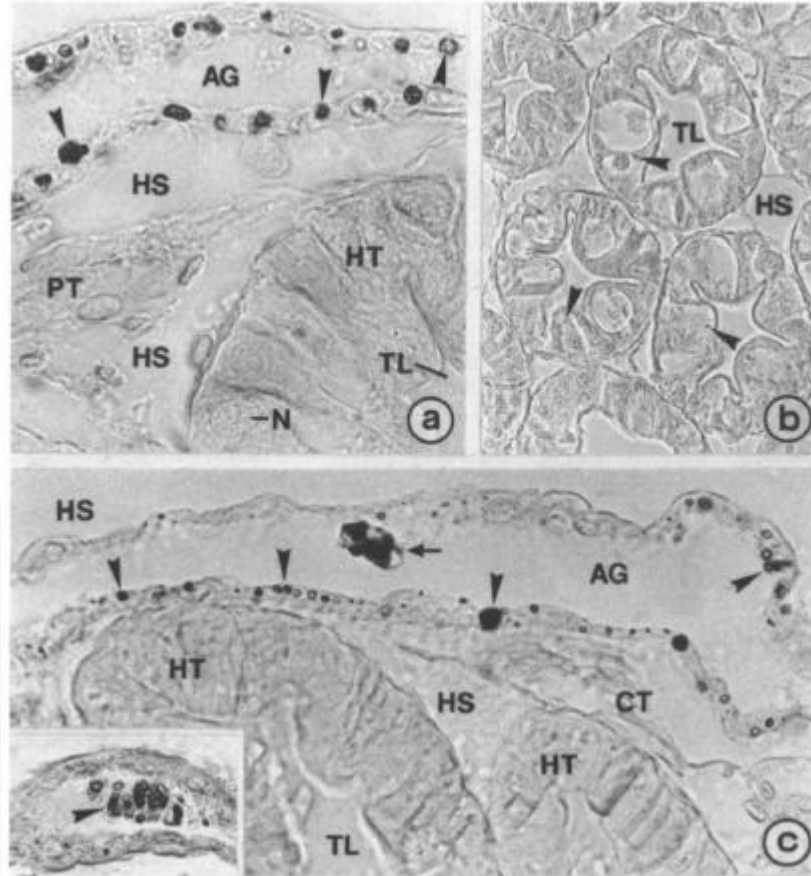


Figura 5. Demostración histoquímica del plomo en antenas trocal glandular y hepatopáncreas. a) Epitelio de la antena, AG) gránulos de plomo (punta de flecha). PT) Pigmentos del tejido, HT) túbulo del hepatopáncreas, libres de gránulos de plomo. SA = espacio de la hemolinfa, N = núcleo, TL = luz tubular; B) Sección transversal de los túbulos del hepatopáncreas con gránulos pequeños (puntas de flecha). C) gránulos de plomo en el epitelio (puntas de flecha) y luz (flecha) de la antena, TC) tejido conectivo.

La bioacumulación de metales en organismos acuáticos (como los rotíferos), su dinámica de movilidad en la maquinaria molecular y la transferencia del contaminante en las redes tróficas, determinan el efecto adverso sobre el organismo, por ejemplo: afecta su desarrollo, la reproducción, su movilidad, el comportamiento y la supervivencia en los ecosistemas dulceacuícolas donde habitan. Además, resulta interesante comprender el mecanismo de entrada, localizar los sitios de acumulación de metales, y comprender la bioacumulación de plomo en el rotífero dulceacuícola *Brachionus calyciflorus*, y las consecuencias sobre la reproducción partenogenética y sexual, principalmente en eclosión de huevos (mícticos y amícticos), número de hembras partenogenéticas y machos, necesarios para la reproducción sexual y formación de huevos de resistencia (quistes; huevos mícticos fecundados).

3. HIPÓTESIS

El plomo reduce la tasa intrínseca de crecimiento r y otros parámetros poblacionales en los rotíferos, por efectos de bioacumulación en ellos.

4. OBJETIVOS

Objetivo general.

1. Caracterizar el efecto en la tasa intrínseca de crecimiento r y otros parámetros poblacionales por bioacumulación de plomo en el rotífero *Brachionus calyciflorus* y además, analizar la distribución del plomo en general en el organismo, así como su localización celular y subcelular.

Objetivos particulares.

1. Examinar el efecto del plomo sobre la tasa intrínseca de crecimiento r , en un rotífero de elección y otros parámetros poblacionales. Obteniéndose valores CNOE, CMOE y CE₅₀.
2. Se obtendrá en laboratorio el Factor de Bioconcentración (FCB) al Pb en el rotífero *Brachionus calyciflorus* por absorción atómica.
3. Se determinará el plomo intracelular en el rotífero *Brachionus calyciflorus* por fluorescencia y además, se caracterizará el proceso de bioconcentración de plomo al identificar por análisis de imagen patrones de fluorescencia al plomo con el colorante Leadmium Green®.
4. Se analizará por microscopia de barrido la ultra-estructura en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, la bioacumulación del plomo, y el efecto en la composición elemental por análisis de rayos X.
5. Se detectará los sitios de bioacumulación de plomo por histoquímica, en el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Cultivo de rotíferos

El rotífero *Brachionus calyciflorus* se cultivó acorde al protocolo de Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (1998). Empleando una cámara bioclimática con un foto-período de 16:8 h (luz/oscuridad), a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los rotíferos se colocaron en cajas Petri con medio EPA (U.S Environmental Protection Agency, 1985), y se alimentaron con el alga verde *Nannochloris oculata* (Cepa LB2194 de la colección de la Universidad de Texas) cultivada en medio Bold's (Nichols, 1973).

5.2 Pruebas Toxicológicas

Ensayo crónico que mide la inhibición de la tasa intrínseca de crecimiento (r) y la inhibición de la producción de huevos partenogenéticos (“hp”)

Se realizaron dos ensayos crónicos.

Ensayo crónico de 5 días.

Se emplearon 5 tratamientos con 6 réplicas. Se usaron neonatos de $< 12\text{h}$ de nacidos para los ensayos. Se colocó 1 neonato por poza en una placa de poliestireno de 24 pozas en un volumen final de 2 mL. Se alimentaron con el alga *Nannochloris oculata* en una concentración final de 1×10^6 células/mL. Las placas fueron colocadas en cámara bioclimática durante 5 días (Revco Scientific, Inc) con un foto-período de luz oscuridad 16:8 h, a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Al término del período correspondiente para cada ensayo se contó el número de organismos vivos y el número de huevos partenogenéticos (huevos depositados en el fondo de la poza y aquellos que aun son cargados por la hembra), para el cálculo de r y hp con las siguientes fórmulas:

$$r = \ln (N_t - N_o) / t$$

N_t = Número de rotíferos vivos en la poza al final del experimento.

N_o = Número inicial de rotíferos en la poza

\ln = logaritmo natural

t = tiempo de exposición

$$hp = (N_t - N_o) + N_h / t$$

N_t : Número de rotíferos vivos en la poza al final del experimento

N_o : Número inicial de rotíferos en la poza

N_h : Número de huevos partenogénéticos en la poza al final del experimento

t : Tiempo de exposición al tóxico

Inhibición del porcentaje (%) de eclosión de huevos amícticos y mícticos por exposición al plomo.

Se determinó en huevos amícticos, huevos mícticos fecundados y huevos mícticos no fecundados el efecto del plomo en la inhibición de la eclosión. Los cuales fueron obtenidos del cultivo de rotíferos.

Huevos amícticos: se consideró 5 concentraciones con 4 réplicas. Se colocaron 10 huevos amícticos por poza en una placa de poliestireno de 24 pozas en un volumen final de 1 mL. La placa fue colocada en cámara bioclimática durante 24 h (Revco Scientific, Inc) con un foto-período de luz:oscuridad de 16:8 h, a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Al final del experimento se contó el número de hembras eclosionadas, finalmente se obtuvo el porcentaje de eclosión respecto al control.

Huevos mícticos no fecundados: se consideraron 3 concentraciones con 5 réplicas. Se colocaron 10 huevos mícticos no fecundados por poza en una placa de poliestireno de 24 pozas en un volumen final de 1 mL. La placa fue colocada en cámara bioclimática durante 24 h (Revco Scientific, Inc) con un foto-período de luz oscuridad 16:8 h, a $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Al transcurso de 12h se contó el número de machos eclosionados y al final de las 24h, finalmente se obtuvo el porcentaje de eclosión respecto al control.

Huevos míticos fecundados: se consideraron 5 concentraciones con 8 réplicas. Se colocaron 10 huevos míticos (quistes) por poza en una placa de poliestireno de 24 pozas en un volumen final de 1 mL. La placa fue colocada en cámara bioclimática durante 72 h (Revco Scientific, Inc) con un foto-período de luz oscuridad 16:8 h, a $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Al final del experimento se contó el número de hembras eclosionadas, finalmente se obtuvo el porcentaje de eclosión respecto al control.

Producción de machos.

Se consideraron 3 concentraciones con 3 réplicas. Se colocaron 10 hembras de menos de 24 horas de nacidas por poza en una placa de poliestireno de 24 pozas en un volumen final de 2 mL. La placa fue colocada en cámara bioclimática durante 24h (Revco Scientific, Inc) con un foto-período de luz oscuridad 16:8 h, a $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Al transcurso de las 24h, finalmente se obtuvo el número de machos vivos presentes en cada tratamiento y se compararon respecto al control.

5.3 Detección de plomo intracelular *In Vivo* por fluorescencia empleando el colorante Leadmium Green® AM.

Acorde al protocolo de Molecular Probes (2005), para el análisis de plomo intracelular, utilizando el colorante Leadmium Green® específico para plomo y cadmio. Con una longitud de excitación y emisión de 490 y 520 nm respectivamente. Se estudió el proceso de bioacumulación de plomo en el rotífero acorde a lo realizado por Rubio (2009), con algunas modificaciones que se describen a continuación:

Preparación del reactivo: al Stock de Leadmium Green® se agregó 50 μL de dimetilsulfoxido (DMSO) a un vial de 50 μg de Leadmium Green®, se mezcló y protegió de la luz. Posteriormente se preparó el colorante Leadmium Green® de trabajo 1:10 en agua des-ionizada agregando 20 μL de solución Stock en 180 μL de agua des-ionizada.

Se consideraron para la determinación de plomo intracelular 3 concentraciones de plomo (0.1, 0.5 y 1.0 mg/L Pb), en tres tiempos de exposición al tóxico (2h, 12h y

18h), se usaron 2 controles, uno de ellos consistió en adicionar 2 concentraciones (0.01 y 0.1 mg/L) del tóxico paratión metilo (como inhibidor del funcionamiento del colorante). Se colocaron 30 organismos de diferentes edades por poza en una placa de poliestireno de 24 pozas en un volumen final de 1 mL para cada tratamiento y tiempo de exposición. Las placas fueron colocadas en cámara bioclimática para cada tiempo de exposición correspondiente (Revco Scientific, Inc) con un foto-período de luz oscuridad 16:8 h, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$. Al término de la exposición al plomo fueron transferidos los rotíferos a medio EPA sin plomo, en un volumen final de 500 μL , inmediatamente se agregó 5 μL del colorante Leadmium Green® de trabajo y se incubaron los rotíferos en cámara bioclimática durante 1h sin luz (Revco Scientific, Inc), a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$. Transcurrida la hora se fijaron con formol al 3% y colocaron en una porta objetos para observarlos en el microscopio de fluorescencia. La fluorescencia se determinó con un espectro de excitación de 450 – 490 nm y con una barrera contra emisiones de 515 nm. Las fotografías fueron obtenidas con la cámara Cool SNAP PRO acoplada al microscopio Axioscop 40 de Zeiss, para cada tratamiento. Se realizó la cuantificación de unidades de fluorescencia con el programa Kodak Digital Science 1D y el estudio del patrón de distribución de fluorescencia al plomo intracelular.

5.4 Determinación del factor de bioconcentración del plomo.

Se determinó el plomo en agua y rotíferos por espectrofotometría de absorción atómica usando un aparato de la marca Perkin-Elmer 3110 (Norwalk, CT) en la modalidad horno de grafito HGA 600 con un auto-muestreador AS-60, acorde al protocolo de Mejía (1997), con un límite de detección para la técnica de 1.8 $\mu\text{g/L}$. Se calculó el factor de bioconcentración (FCB) por medio de la formula de Paquin et al., (2003).

Se emplearon 90 rotíferos del cultivo de *Brachionus calyciflorus* y se expusieron con 1.0 mg/L de plomo durante 24 horas sin alimento en condiciones de laboratorio, en un volumen final de 2 mL. Se consideraron controles de EPA y EPA con plomo sin rotíferos. La determinación del plomo se realizó al inicio del experimento y transcurridas las 24 horas, con 3 réplicas.

5.5 Determinación de la morfología interna y externa del rotífero *Brachionus calyciflorus*.

Microscopia Óptica.

Se realizaron cortes histológicos en el ultramicrotomo (Ultracut R Leica) en inclusiones de rotíferos EPONATE 12 y LR-White.

Procesamiento de la muestras.

Del cultivo de rotíferos se colectaron de 500 a 1000 organismos y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, en un volumen final de 1 mL de medio EPA. Se agregaron 500 μ L de paraformaldehído al 4% y dejó fijar la muestra por 2 h. Posteriormente se lavó tres veces con solución amortiguadora (PBS; Buffer Salino de Fosfato) y se fijaron con tetraóxido de osmio al 2% durante 2h. Los rotíferos se incluyeron en agarosa al 4% (disuelta en PBS; Buffer Salino de Fosfato), con la ayuda de una micropipeta. Una vez incluidos en agarosa se deshidrató la muestra en alcohol (50 a 100%). Se pre-incluyó en la resina correspondiente (LR-White o EPONATE12) en una dilución de 3:1, 2:1 y 1:1, durante 2 horas en cada dilución (ver anexo). Finalmente se realizó la inclusión en un tubo Eppendorf de 500 μ L y se dejó polimerizar 24h a 56°C. Los rotíferos intoxicados con plomo fueron expuestos antes de su procesamiento con 1 mg/L de Pb durante 24 horas en condiciones de laboratorio. Se realizaron cortes semifinos (200 nm a 400 nm de espesor) y finos (70 nm a 90 nm) en el ultramicrotomo (Ultracut R Leica), para ambos tratamientos. A continuación fueron colocados los cortes en laminillas de vidrio para su contraste con azul de toluidina (ver anexo) y finalmente se tomaron fotografías con la cámara Cool SNAP PRO acoplada al microscopio Axioscop 40 de Zeiss.

5.6 Histoquímica al Plomo.

Se realizaron cortes histológicos de 200 nm de los rotíferos incluidos en la resina LR-White, tanto intoxicados como rotíferos control. Los cortes fueron incubados durante 16 horas en dicromato de potasio al 3% a temperatura ambiente y posteriormente contrastados con el colorante azul de toluidina. Se tomaron fotografías. El plomo es convertido en cristales amarillos (cromato de plomo), es considerado ampliamente específico y comprobable por medio de microanálisis de rayos X (Vogt y Quintio, 1994).

5.7 Análisis de la morfología interna y externa por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y la determinación elemental del plomo en la ultraestructura por Microanálisis de Rayos X por Dispersión de Energía.

Se realizó el análisis en el rotífero *Brachionus calyciflorus* (cultivada en laboratorio acorde al protocolo Pérez-Legaspi y Rico-Martínez, 1998). Se colectaron del cultivo de rotíferos 100 organismos de diferentes edades y se colocaron en un tubo Eppendorf en un volumen final de 1 mL y se adicionaron 100 μ L de formol al 3%. Por otro lado los rotíferos intoxicados fueron expuestos 24 horas con una concentración de 1 mg/L de Pb, sin alimento antes de su procesamiento para la microscopia electrónica de barrido. Las muestras se deshidrataron con alcohol (60 a 100%), se eliminó la humedad por medio de una secadora de punto crítico (Tousimis) con CO₂ líquido. Para la determinación de plomo en estructuras internas y externas por Rayos X en el microscopio electrónico de barrido, varios rotíferos se mantuvieron intactos, de modo que pudieran ser identificados mediante microscopia electrónica de barrido. Otros fueron disectados con agujas de alambre de tungsteno, para permitir realizar el análisis ultraestructural. Las muestras fueron luego recubiertas con oro utilizando una cámara DESK II, y se fotografiaron con JEOL LV 5000 MEB. El análisis es representado con histogramas e imágenes de distribución de elementos químicos presentes en las muestras, el espectro se obtiene mediante un software (INCA) que recoge durante un tiempo determinado los fotones emitidos por la muestras, clasificándolos según su energía. El espectro se presenta como un histograma en donde el eje de las “x” tiene unidades de energía (kiloelectrovolts) y el eje de las “y” el número de cuentas o intensidad. El análisis es cualitativo y cuantitativo, con un rango de penetración de los

rayos X de 1000 nm. En las muestras se eligieron sitios de interés como: cutícula, corona, pie, y órganos internos: estómago, mástax, cerebro, músculos, parte interna de la cutícula, cilios de la corona y del estómago, para ver si toda la muestra contiene los mismos elementos o hay variación de estos en un cm^2 .



6. RESULTADOS.

Se cultivó la especie *Brachionus calyciflorus* (Figura 6) en condiciones de laboratorio acorde al protocolo Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (1998). La cual fue identificada mediante claves taxonómicas de Koste (1978).

Reino:	Animalia
Phylum:	Rotifera
Clase:	Monogononta
Orden:	Ploimidia
Familia:	Brachionidae
Género:	<i>Brachionus</i>
Especie:	<i>Brachionus calyciflorus</i>



Figura 6. Imagen del rotífero *Brachionus calyciflorus* Pallas, visto en el microscopio óptico compuesto. **A**, hembra vista con el objetivo de 100X. **B**, macho visto a 40 X. **C**, huevo amítico visto con el objetivo de 40 X. **D**, huevo mítico fertilizado observado con el objetivo a 40X.

6.1 Morfología interna y externa del rotífero *Brachionus calyciflorus*

Se analizó la morfología interna y externa del rotífero *B. calyciflorus* con Microscopía Electrónica de Barrido. En la figura 7, se muestran detalles referentes a estructuras de importancia taxonómica como: antenas mecano-receptoras del rotífero, corona ciliar, pie y espinas. En la figura 8, se logra obtener información adicional sobre la estructura integral de órganos del sistema nervioso, digestivo y muscular. La figura 7 C, muestra una vista superficial del integumento sincitial (pared corporal), capa de filamentos de diferente espesor denominada lamina intra-citoplásmica (lóriga: lg), la cual posee proyecciones en forma de espinas (Es). En la figura 7C y 7D, se observan las antenas mecano-receptoras; la figura 7C muestra la antena dorsal directamente conectada al retrocerebro, mientras que la antena lateral (Al; Fig. D) se encuentra más cercana al estómago y vitelarario. En la figura 7E se muestra el pie extendido con dos dedos, así como las glándulas pedales y sus ductos (detalle en figura 7F).

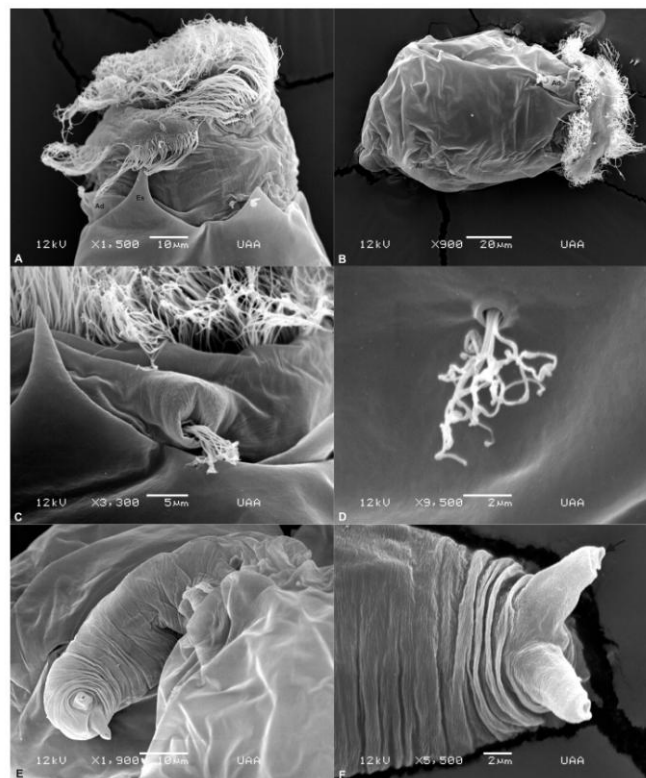


Figura 7. Estructura externa del rotífero *Brachionus calyciflorus*. **A** Corona ciliar (Apr), Antena dorsal (Ad), espinas (Es). **B** Vista general (Habitus) del rotífero. **C** Detalle de la antena dorsal y espinas. **D** Antena lateral (Al). **E** Vista general del pie. **F** Dedos del pie.

Mediante la disección de rotíferos y su observación en el microscopio electrónico de barrido se logró obtener información adicional sobre la estructura integral de órganos del sistema nervioso, digestivo y muscular. En la figura 8A, se ejemplifica un esquema general de la organización de los siguientes sistemas; sistema nervioso: constituido por el retrocerebro (figura 8B; Rc), los sacos cerebrales (figura 8D; Sc), ambos denotan una estructura glandular, y el cerebro o ganglio cerebral (figura 8C; Ce), con numerosas células apiladas entre sí para integrar un órgano receptor-transmisor del ambiente circundante.

El sistema digestivo comprendido por: la corona ciliar, faringe, esófago, mástax (figura 8F y 8H; M), trofos y estómago (Fig. G; Es), en éste último se logró observar los cilios de la parte interior del estómago y determinar la posición de la antena lateral respecto al estómago (figura 8G; Al). El sistema excretor lo constituyen: las células flama (figura 8A; Cf), la glándula del pie (figura 8A; Gp) y glándula del estómago (figura 8A; Ge). En el sistema muscular se observan: músculos transversales (figura 8E; Mt) insertados por dentro de la lóriga del rotífero e interconectados al integumento sincitial y por último, el sistema reproductivo comprendido esencialmente por una glándula sincitial conocida como vitelario (figura 8A; V).

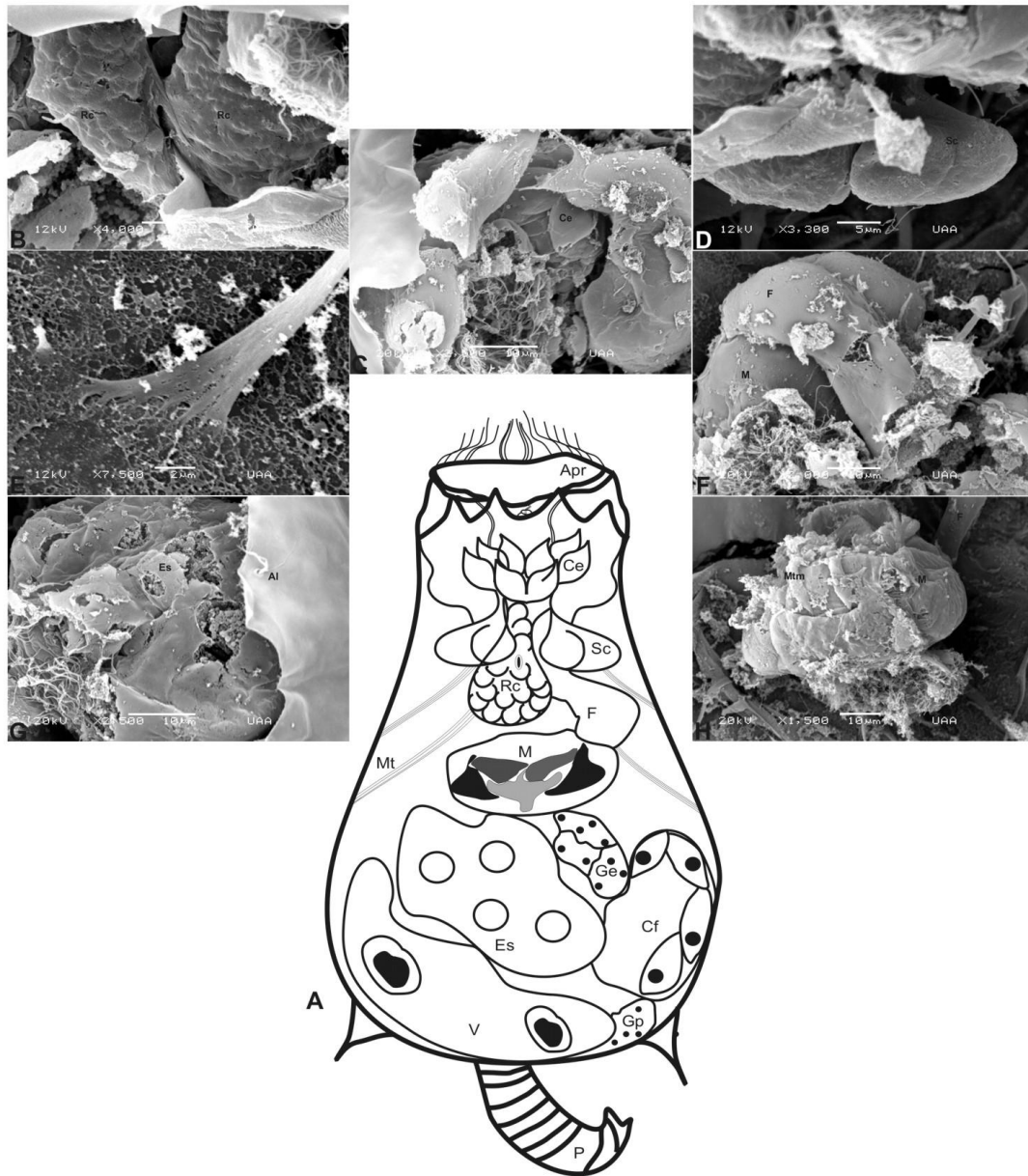


Figura 8. Estructuras internas del rotífero *Brachionus calyciflorus*. **A** Esquema general de la organización de las siguientes estructuras. **B** Retrocerebro (Rc). **C** Cerebro (Ce). **D** Sacos cerebrales (Sc). **E** Músculo transversal (Mt). **F** Mástax (m) y Faringe (F). **G** Estómago (Es) y Antena posterior (Al). **H** Músculo transversal del mástax (Mtm) y mástax (M).

Se estandarizó y desarrollo la inclusión de rotíferos en dos resinas: Eponate 12 y LR-White para el análisis de la organización de los órganos y sistemas del rotífero, logrando examinar su morfología interna (figura 9, 10, y 11). La cual se complemento con el análisis de la ultraestructura por medio de microscopia electrónica de transmisión (figura 12).

El rotífero *B. calyciflorus* presenta órganos multinucleados (formando un sincitio). En la figura 9A, se muestran los cilios (Ci) de la corona y receptores (Rs) en posición lateral al velo bucal (Vb) de la faringe (F), así como la posición del cerebro (Ce) y su disposición de células apiladas (figura 9C). En la figura 9B, se muestra la cavidad de la faringe (F), su velo bucal y el epitelio bucal (Eb), localizado ventral o apicalmente. La posición del retrocerebro (Rc; figura 9D) respecto a la faringe (F), la cual posee gran cantidad de cilios y músculos faríngeos (figuras 9E y 9F), conectados directamente con el mástax (M; figuras 9F) el cual posee un ganglio (Gm; figura 10B).

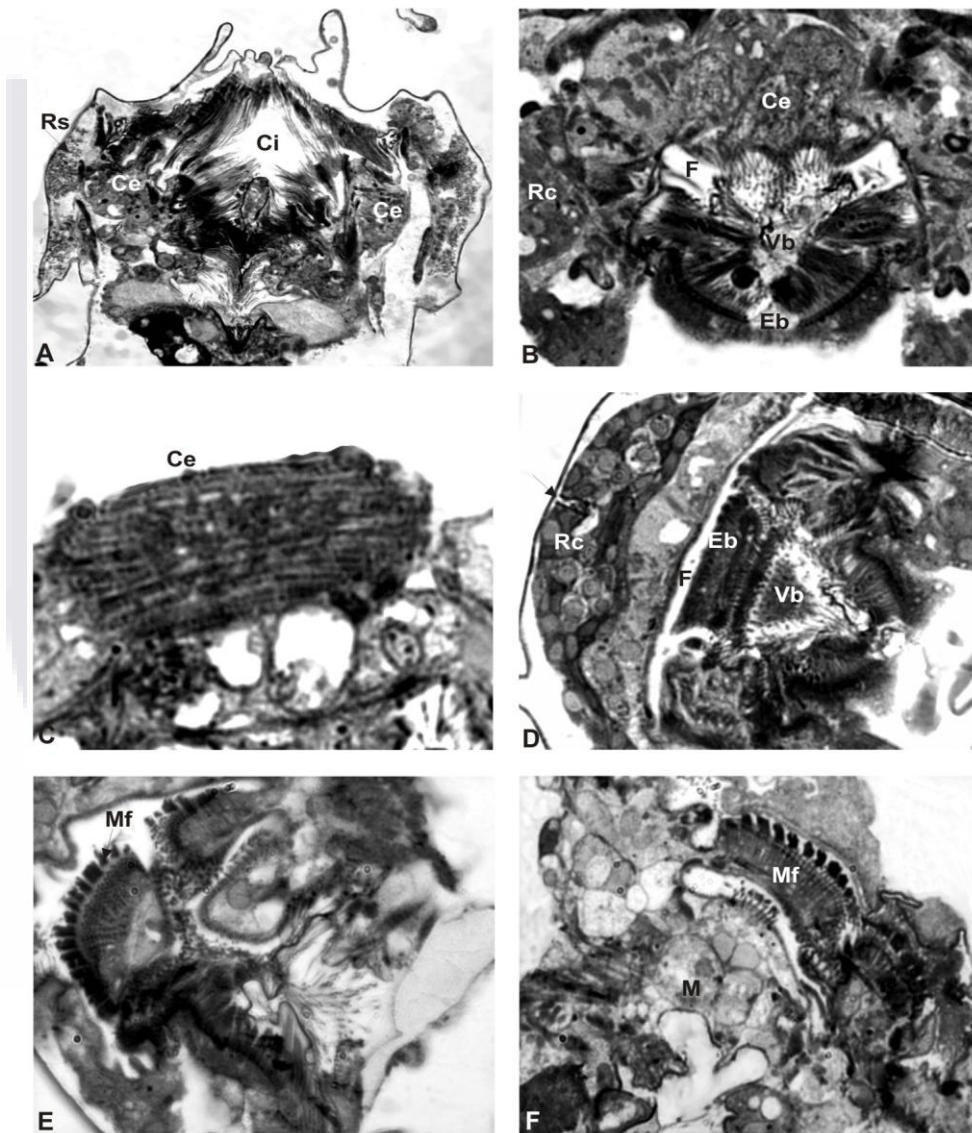


Figura 9. Estructuras internas del rotífero *Brachionus calyciflorus*. **A** Corte transversal de la corona. **B** Corte transversal de la faringe. **C** Cerebro (Ce). **D** Retrocerebro y faringe, corte transversal. **E** Corte longitudinal de los músculos faríngeos. **F** Corte longitudinal del mástax y músculos faríngeos. Claves: Receptores sensoriales de la corona (Rs), cilios de la corona (Ci), cerebro (Ce), retrocerebro (Rc), faringe (F), velo bucal (Vb), epitelio bucal (Eb), mástax (M), y músculos faríngeos (Mf), la flecha indica posición del ojo cerebral.

En el mástax (M) contiene al trofos compuesto por tres unidades funcionales: uncus y un par maleado: donde él uncus lo constituyen tres piezas el fulcrum y un par de rami (singular ramus). Cada maleo consiste en dos partes; manubrio (figura 10C) y uncus (figuras 10B y 10C) con pequeños dientes. El mástax se conecta directamente con el esófago (nótese los cilios del esófago; Cie, en la figuras 10A y 10B) y el estómago (figuras 10E), además, de tener una glándula estomacal (Ge; figura 10E) conectada anteriormente, el estómago está interconectado al sistema excretor, constituido por células flama (figuras 10D) con una importante cantidad de cilios.

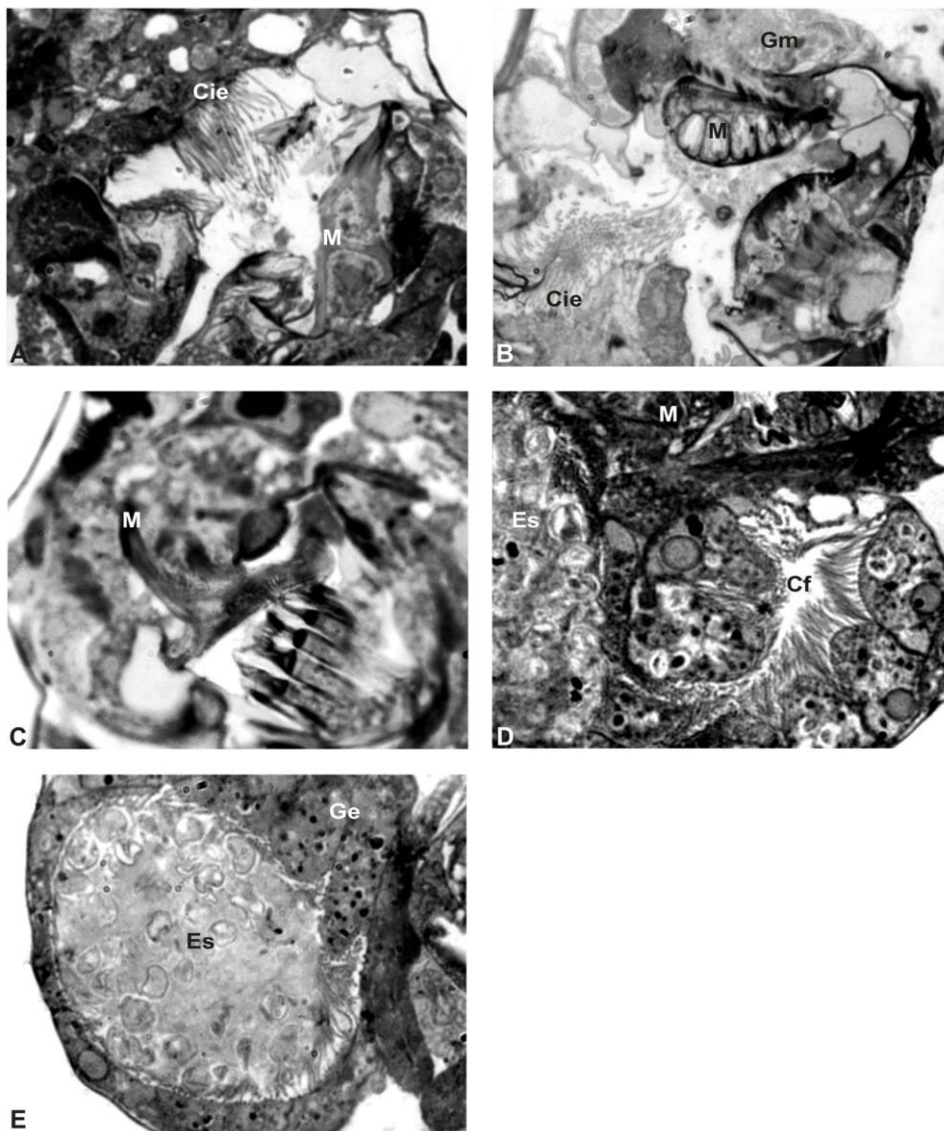


Figura 10. Estructuras internas del rotífero *Brachionus calyciflorus*. **A**, **B** y **C** Corte transversal del mástax. **D** Células flama. **E** Estómago. Claves: Estómago (Es), glándula del estómago (Ge), mástax (M), células flama (Cf), ganglio del mástax (Gm), y cilios del esófago (Cie).

El sistema reproductivo lo comprenden: ovarios, vitelario y la capa folicular. En la figura 11A se muestra el vitelario (V) una glándula sincitial muy grande que ocupa una gran parte del cuerpo del rotífero. En él se observan núcleos grandes del vitelario (Nv) y asociado a ellos, músculos del pie (Mp) y muy cercano a la parte anterior la glándula del pie (Gp). La figura 11A muestra un ovocito maduro (Ovm) y gran cantidad de inclusiones de lípidos (Flecha negra).

En la figura 11E se muestra una implantación cuticular (Ich) de un huevo partenogenético (Hp), en la cual se logra notar la conexión entre la lóriga y la cubierta de huevo antes de ser depositado para su posterior eclosión. Muy cerca a la parte anterior donde se localiza el estómago y vitelario se encuentra la antena lateral (Al), como se muestra en la figuras 11C y 11E, la cual posee células de soporte (Cs) y músculos (ml), con proyecciones de cilios que atraviesan la cutícula y se conectan al interior del rotífero.

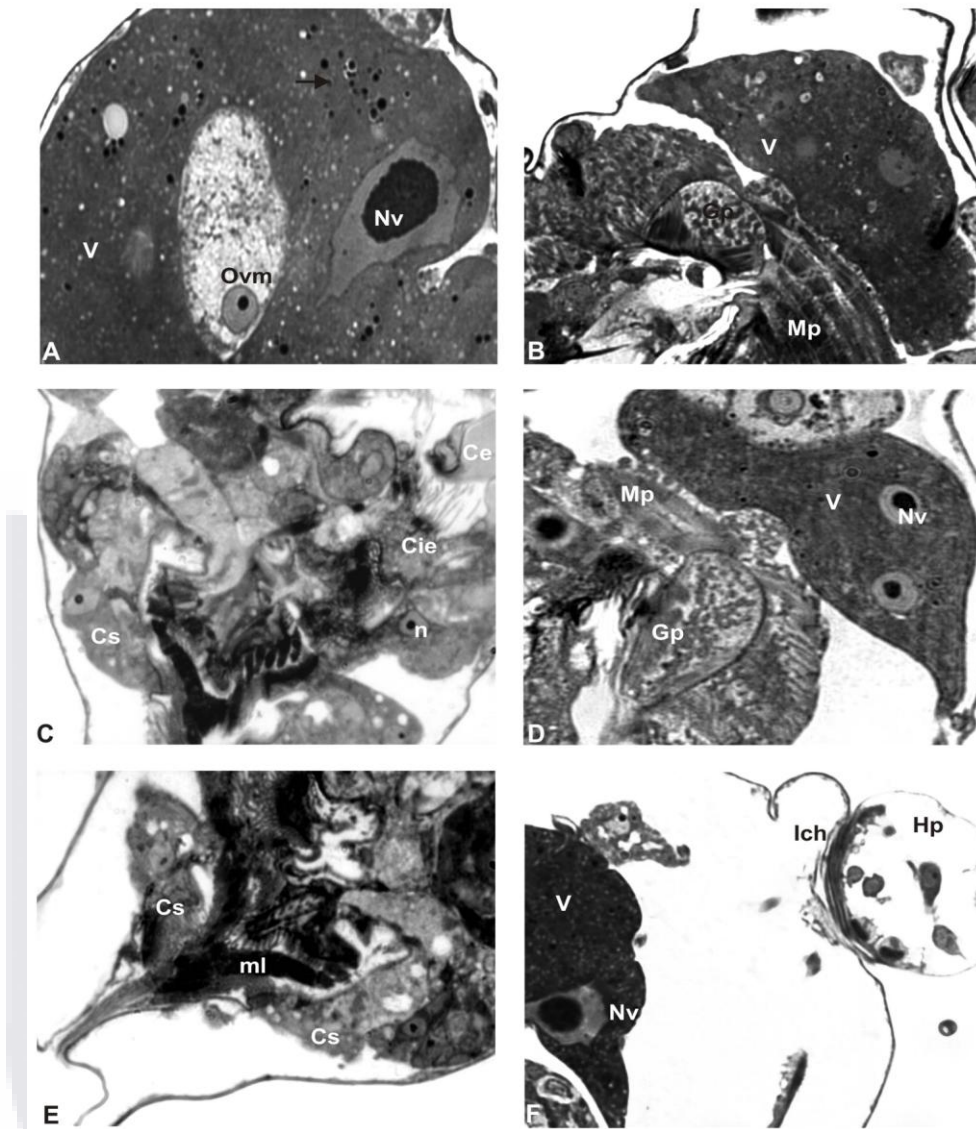


Figura 11. Estructuras internas del rotífero *Brachionus calyciflorus*. **A, B, D** Vitelario (cortes transversales). **C y E** Cortes transversales de la antena lateral. **F** Implantación cuticular del huevo amítico (corte transversal). Claves: Vitelario (V), núcleo del vitelario (Nv), ovocito maduro (Ovm), músculos del pie (Mp), glándula del pie (Gp), núcleos de células de soporte (n), células de soporte (Cs), músculos de la antena lateral (ml), implantación cuticular del huevo partenogenético (Ich), y huevo partenogenético (Hp).

El vitelario posee un gran núcleo (Nv; figura 12B), y gran cantidad de gránulos y inclusiones (figura 12A). Está contiguo al estómago, el cual posee una actividad de secreción y absorción de vesículas y se nota por la gran cantidad de gránulos de excreción (figura 12C). Éstos cilios se muestran a detalle en la figura E y H. También se muestran en la figura 12D e 12I, músculos transversales (Mtr) insertados en la lóriga (Lr) del rotífero. Y por último en la figura 12F, se muestra el integumento sincitial

(pared corporal), capa de filamentos de diferente espesor denominada lamina intracitoplásmica (lóriga: lg), con poros (flecha).

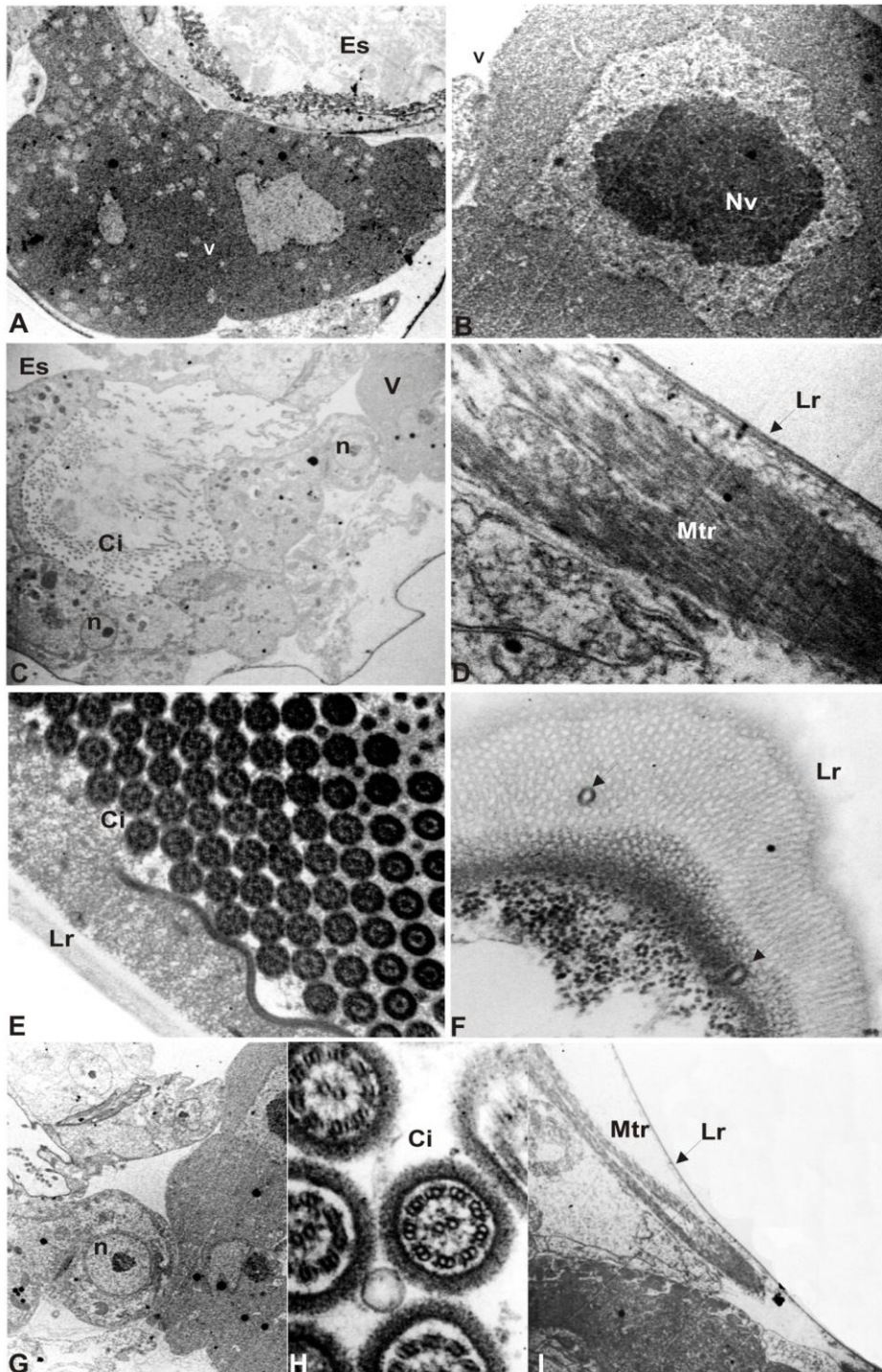


Figura 12. Estructuras internas del rotífero *Brachionus calyciflorus* obtenidas con microscopio electrónico de transmisión. **A** Vitelario y Estómago. **B** Núcleo del vitelario. **C** Corte transversal del estómago. **D** Corte transversal de la lóriga **E** Cilios del esófago. **F** Detalle de lóriga. **G** Células de soporte. **H** Detalle del arreglo 9+2 de los cilios del esófago. **I** Inserción del músculo transversal a lóriga. Claves: Estómago (Es), Vitelario (V), núcleo del vitelario (Nv), núcleos (n), cilios (Ci), lóriga (Lr), músculo transversal (Mtr),

6.2 Bioacumulación de plomo en el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

Las principales regiones de bioacumulación del plomo en el rotífero *Brachionus calyciflorus* son: vitelario y mástax, como se muestran en la figuras 13D, 13E y 13F (flechas).

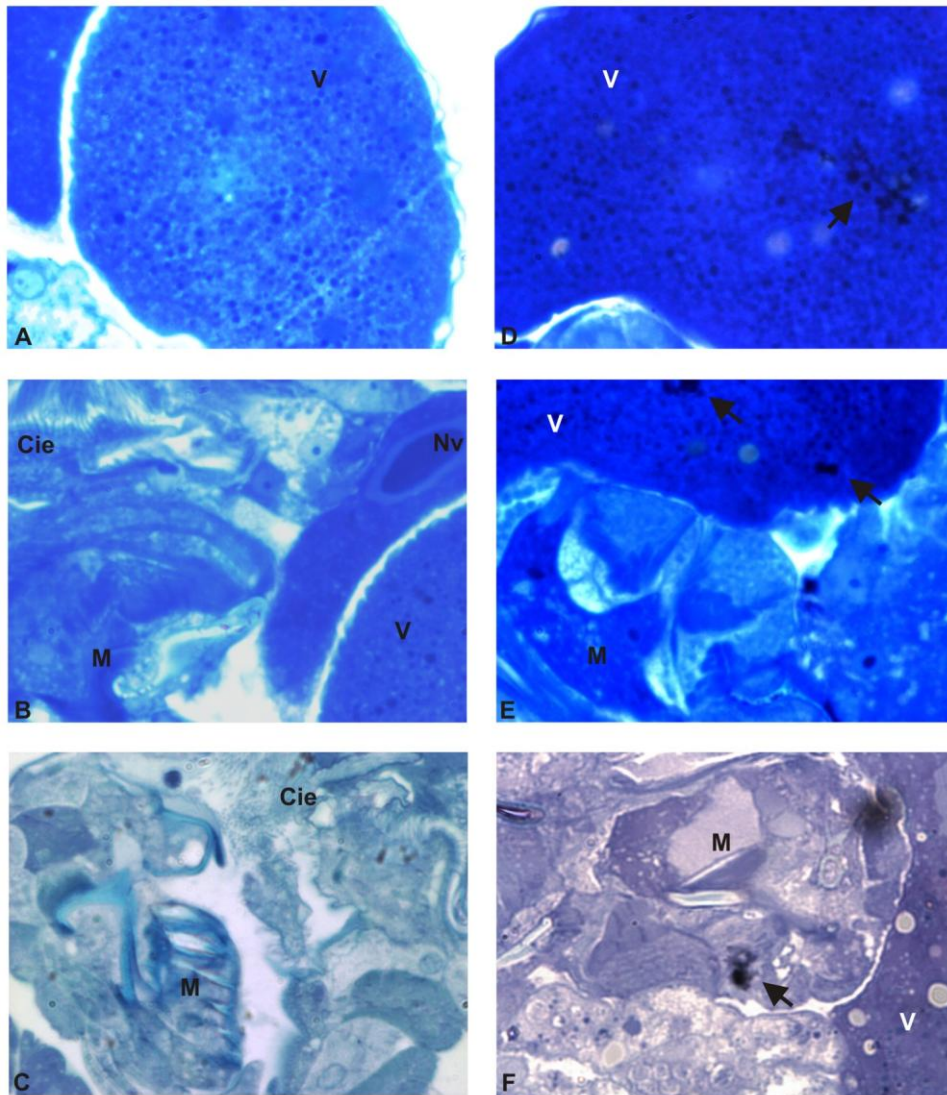


Figura 13. Histoquímica al plomo en vitelario y mástax en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. A, B y C, controles. D, E y F intoxicados. La flecha indica el lugar de bioacumulación de plomo. Claves: Vitelario (V), núcleo del vitelario (Nv), mástax (M), y cilios del esófago (Cie). 100x.

6.3 Detección del plomo intracelular *In Vivo* por fluorescencia empleando el colorante Leadmium Green®.

La principal vía de entrada del plomo es digestiva, como se muestra en la figura en el análisis de fluorescencia, detectando estructuras como mástax, estómago y células flamígeras como los sitios de mayor fluorescencia, tanto en controles como intoxicados, los cuales al incrementarse el tiempo de exposición y la concentración de plomo se aumentan las unidades de fluorescencia, como se observan en la figura 15.

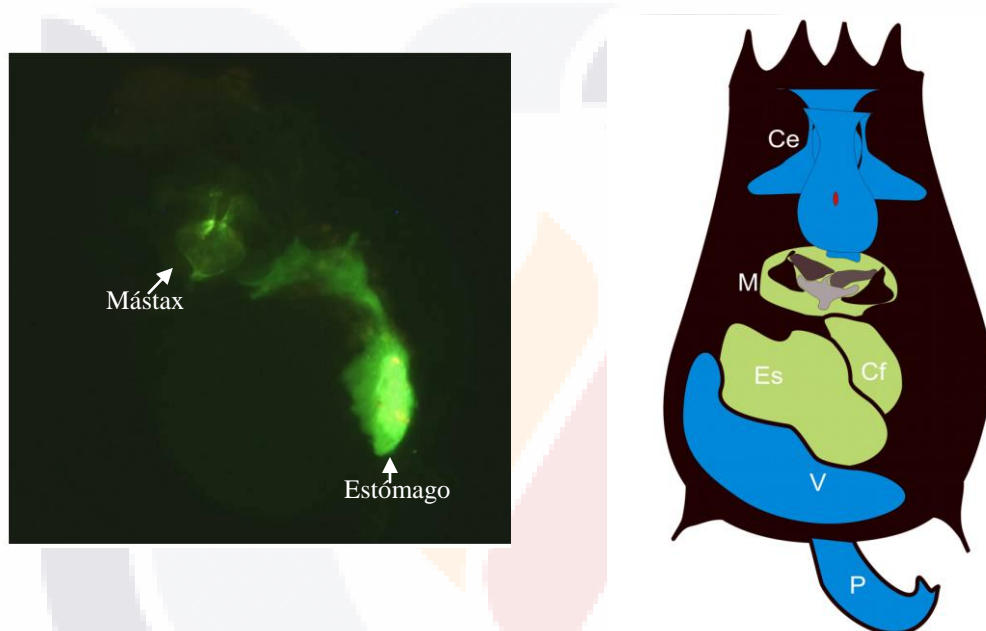


Figura 14. Localización de las principales regiones de fluorescencia al plomo con el colorante Leadmium Green®. Es; estómago, Cf; células flama, V; vitelario, P; pie, M; mástax, Ce; cerebro. El color verde en el esquema indica el sitio de fluorescencia. 20x.

Durante un tiempo de exposición de 12 horas con una concentración de 1.0 mg/L Pb, y en un tiempo de 18 h con 0.5 mg/L Pb, existe diferencias significativas ($p < 0.05$) en las unidades de fluorescencia respecto al control, esto al tomar en cuenta la fluorescencia emitida de todo el organismo (estómago + mástax).

Respecto a la unidades de fluorescencia del mástax (figura 16) se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al control en un tiempo de exposición de 18 h con una concentración de 1.0 mg/L Pb.

En general se observa un comportamiento de incremento de las unidades de fluorescencia conforme se aumenta el tiempo de exposición y la concentración de plomo en: organismo completo, y así también en mástax y estómago, aunque en éste último no existan diferencias significativas (figura 17).

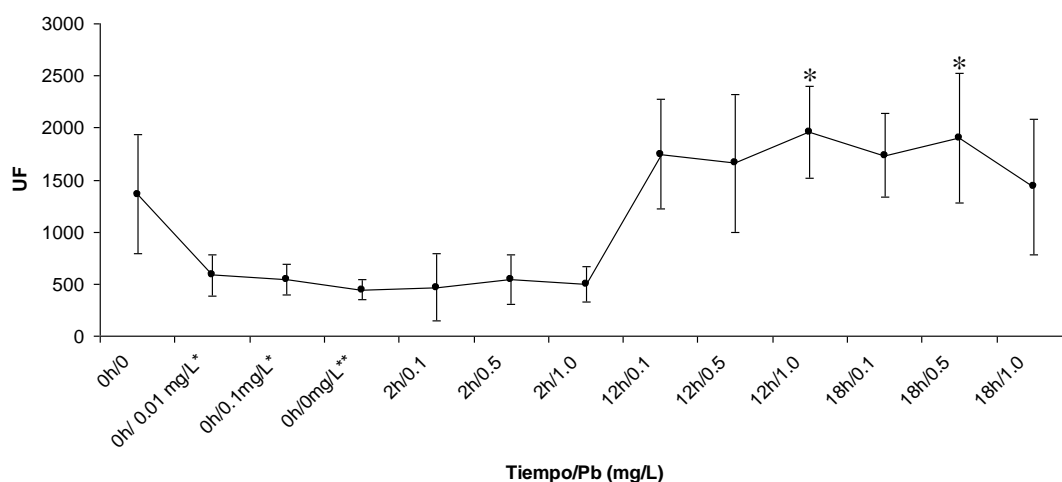


Figura 15. Organismo completo: análisis de las unidades de fluorescencia al plomo con el colorante Leadmium Green® en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. Media \pm desviación estándar. *Diferencias significativas respecto al control $p < 0.05$.

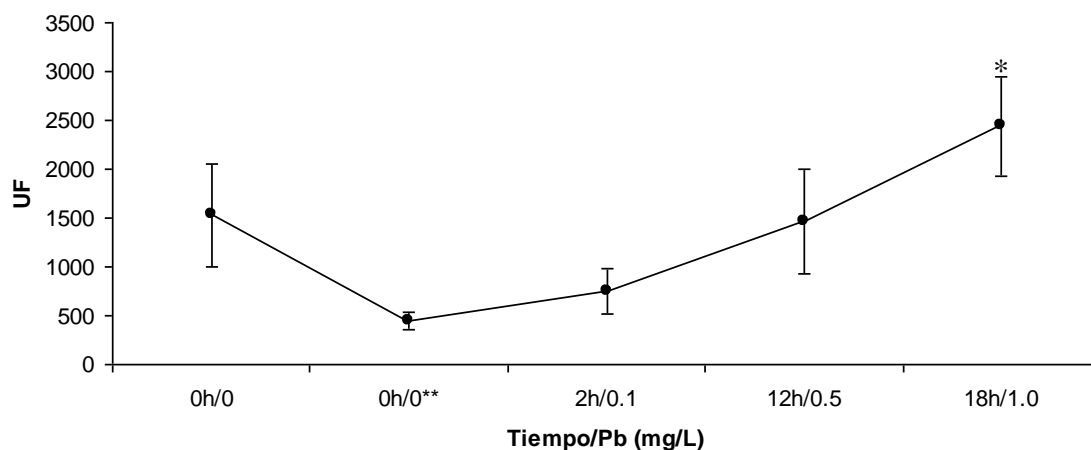


Figura 16. Mástax: análisis de las unidades de fluorescencia al plomo con el colorante Leadmium Green® en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. Media \pm desviación estándar. *Diferencias significativas respecto al control $p < 0.05$. **Neonatos.

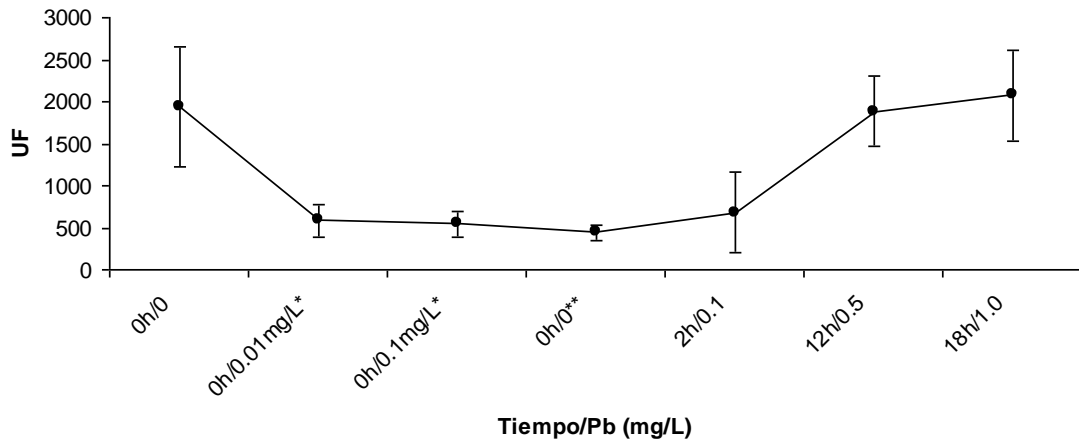


Figura 17. Estómago: análisis de las unidades de fluorescencia al plomo con el colorante Leadmium Green® en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. Media \pm desviación estándar. * Paratión metílico.

6.4 Efecto del plomo en la composición elemental del rotífero en un análisis de rayos X en microscopía electrónica de barrido.

El análisis de la composición elemental de estructuras internas y externas del rotífero *Brachionus calyciflorus*, por medio de dispersión de rayos X en microscopía electrónica de barrido. Se detectan principalmente carbono (C), oxígeno (O), calcio (Ca), silicio (Si) y aluminio (Al), en organismos control y en los intoxicados, observando un decremento en la detección de Ca, Si y Al cuando se intoxica al rotífero por 24 horas con 1 mg/L Pb (Figura 18).

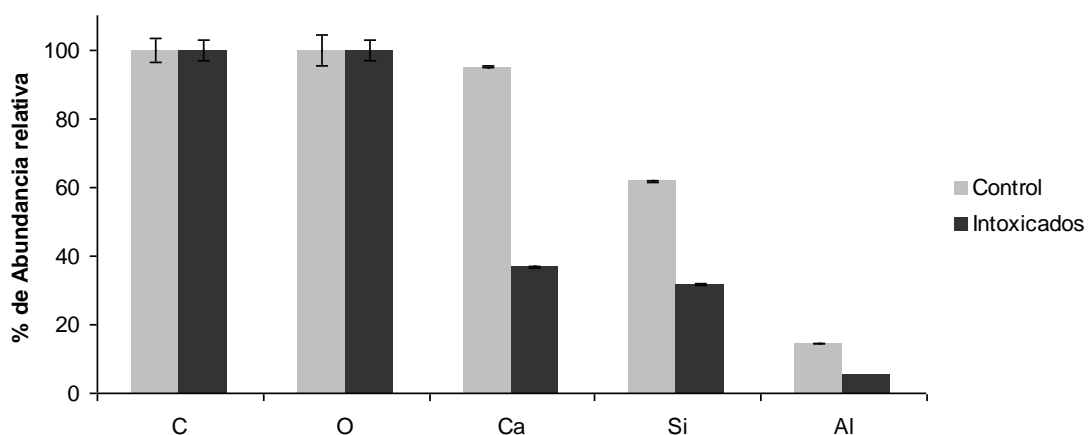


Figura 18. Análisis de la composición elemental mediante dispersión de rayos X por microscopía electrónica de barrido en el rotífero *B. calyciflorus*. Media \pm desviación estándar.

6.5 Monitoreo de plomo en el rotífero por espectrofotometría de absorción atómica en la modalidad horno de grafito.

El análisis del plomo total y el cálculo del factor de bioconcentración (FBC) de plomo en el rotífero cuando es intoxicado por 24 horas con 1.0 mg/L Plomo (Pb). Se observa en la gráfica al comparar la concentración de plomo detectada a las 0h y 24 h después, con y sin rotíferos, prácticamente una disminución del 52.65% del plomo detectado por efecto de los rotíferos (Figura 19). El FBC en el rotífero *Brachionus calyciflorus* es de 115.77.

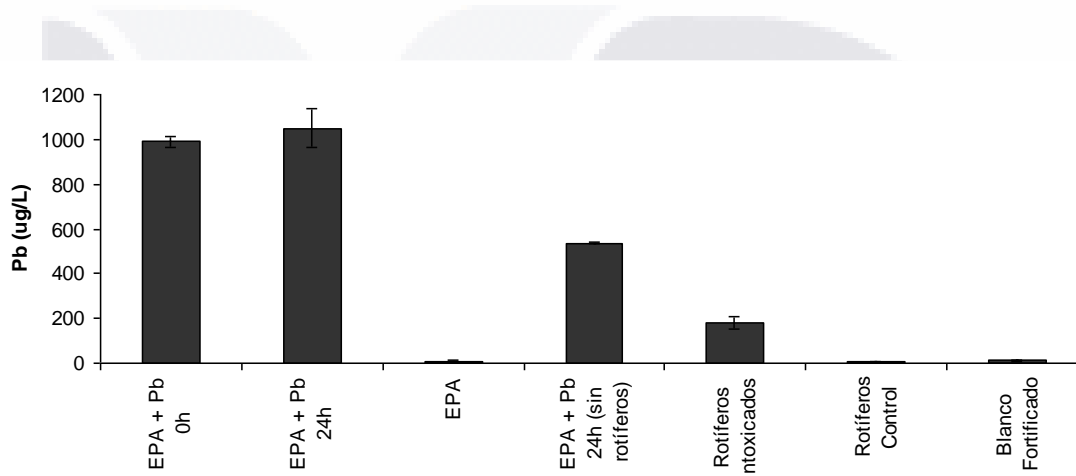


Figura 19. Análisis del monitoreo del plomo en el rotífero. Media \pm desviación estándar.

6.6 Toxicidad del plomo en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, sobre la tasa intrínseca de crecimiento r y otros parámetros poblacionales.

Efecto del plomo en la tasa intrínseca de crecimiento r .

Los valores CNOE y CMOE del parámetro indicador de efecto del plomo sobre el crecimiento de los rotíferos, es decir tasa intrínseca de crecimiento r , son 0.25 y 0.5 mg/L Pb respectivamente, los cuales son muy similares a los obtenidos para la producción de huevos partenogénéticos, no así para los valores CE_{50} , de r y producción de huevos: 0.96 y 0,75 mg/L Pb respectivamente (cuadro 4). Las figuras 6,7 y 8 muestran los gráficos de regresión lineal de r y producción de huevos así como la relación que existe entre estos dos parámetros indicadores de efecto, resaltando en éste

último como cuanto mayor es la tasa intrínseca de crecimiento r , mayor será la producción de huevos partenogenéticos (amícticos).

Cuadro 4. Valores de toxicidad obtenidos en el ensayo crónico con plomo que afecta la tasa intrínseca de crecimiento r y la producción de huevos amícticos (partenogenéticos).

	CNOE	CMOE	CE ₅₀	r ²	CV %	LC 95%
Producción de huevos	0.25	0.5	0.75	0.74	69.56	0.46 - 0.92
r	0.25	0.5	0.96	0.66	25.82	0.52 - 1.39

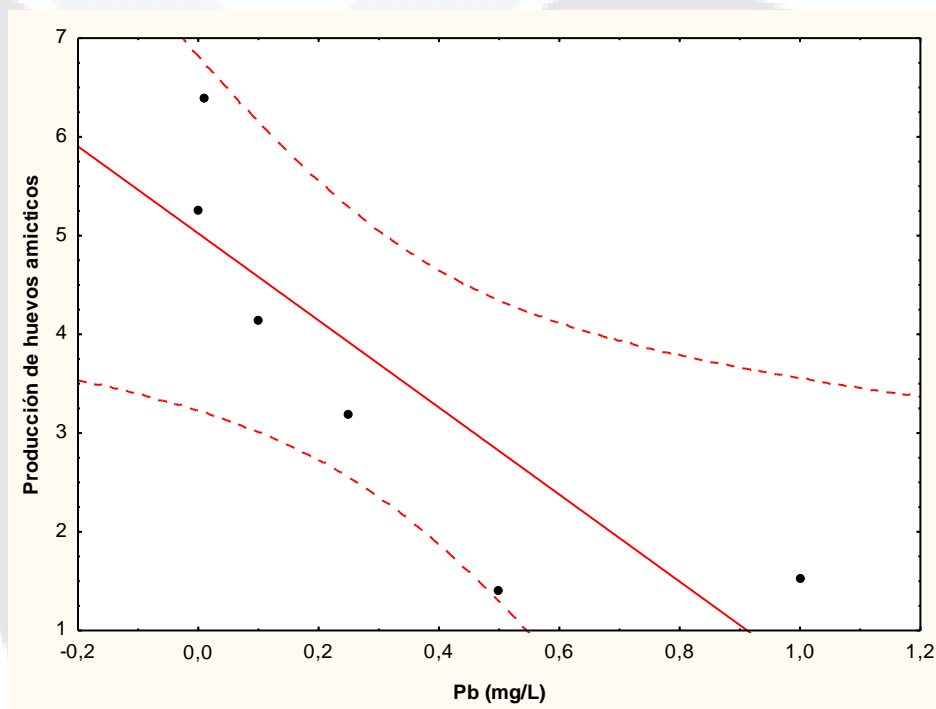


Figura 20. Regresión lineal del efecto del plomo en la producción de huevos amícticos (partenogenéticos).

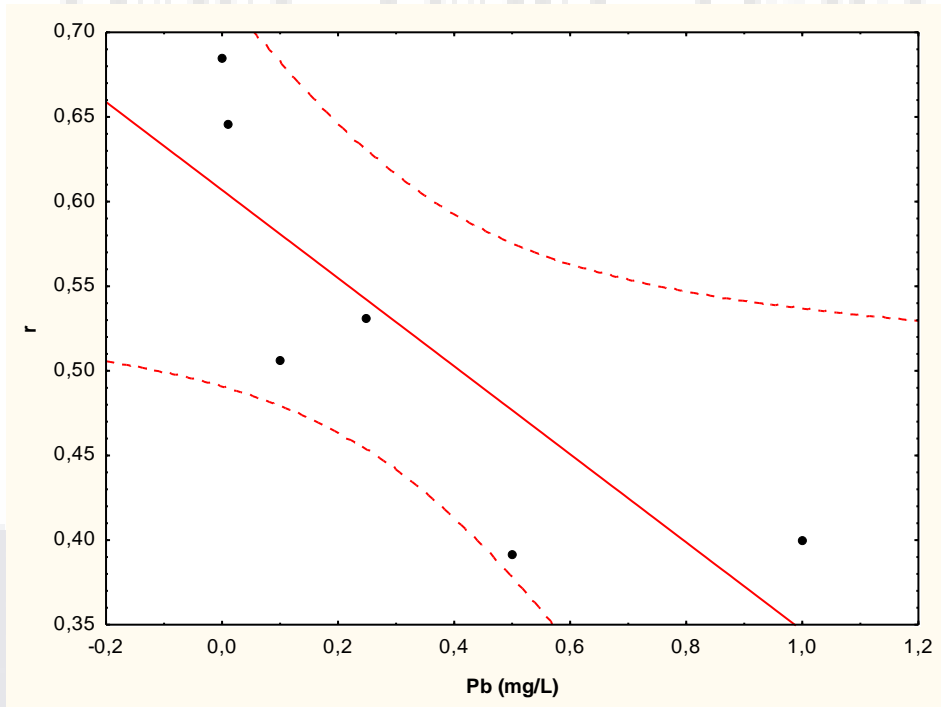


Figura 21. Regresión lineal del efecto del plomo en la tasa intrínseca de crecimiento r .

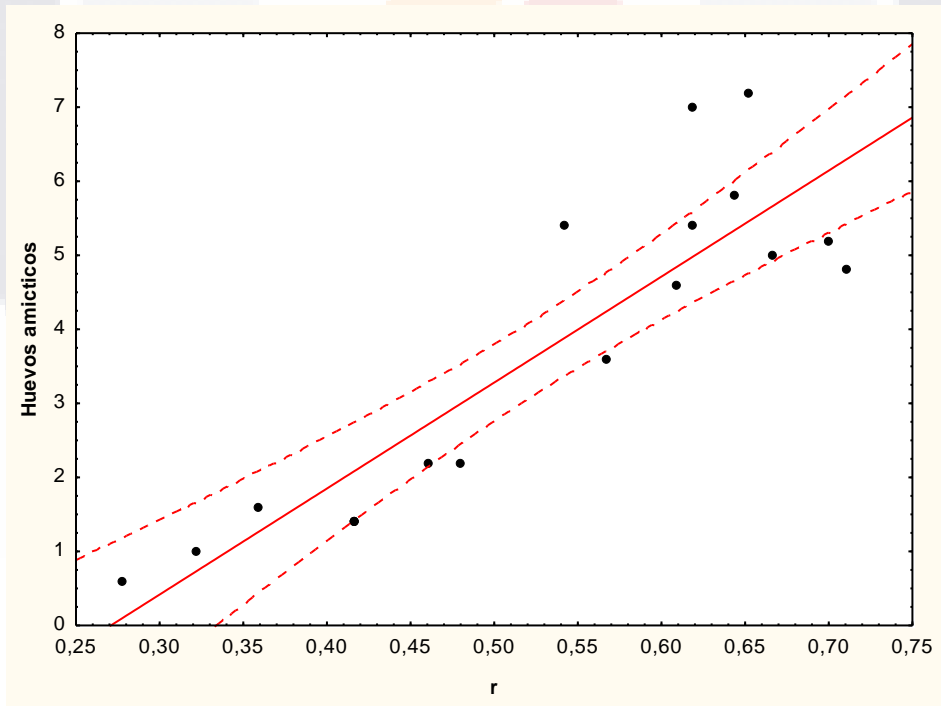


Figura 22. Regresión lineal de la relación de la producción de huevos amícticos (partenogenéticos) con la tasa intrínseca de crecimiento r . Ecuación de regresión: $y = -3.8764 + 14.3148x$; $p = 0.001$, $r^2 = 0.794$.

6.7 Efecto del plomo en la producción de huevos amícticos.

El porcentaje de eclosión de los huevos amícticos ó partenogénéticos del rotífero *B. calyciflorus* es de 100% de eclosión, en 24 horas en un rango de toxicidad de 0.1 – 1.0 mg/L Pb. Lo cual significa que el plomo en ese período y con esas concentraciones de plomo no posee efecto sobre la eclosión.

6.8 Efecto del plomo en el porcentaje de eclosión de huevos mícticos.

En la figura 23 se muestra el porcentaje de eclosión de los huevos mícticos no fecundados (originan machos), donde en un período de 12 horas y 24 horas existe una ligera disminución que no es significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

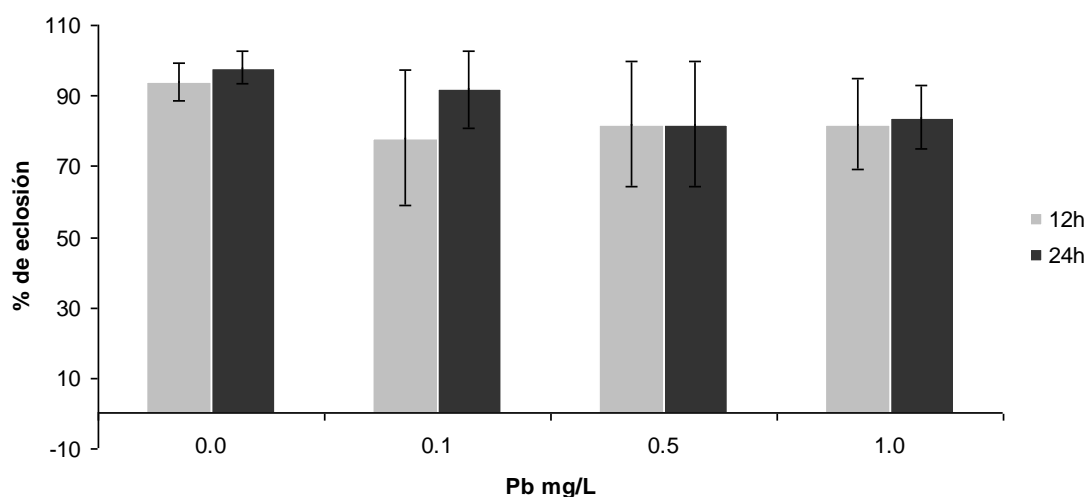


Figura 23. Gráfico del efecto del plomo sobre el porcentaje de eclosión de huevos mícticos no fecundados (que originan machos). Media \pm desviación estándar.

En la Figura 24 se muestra el porcentaje de eclosión de los huevos mícticos fecundados (quistes), donde en un período de 72 horas con una concentración de exposición de 0.01 y 0.5 mg/L Pb, se nota una disminución significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

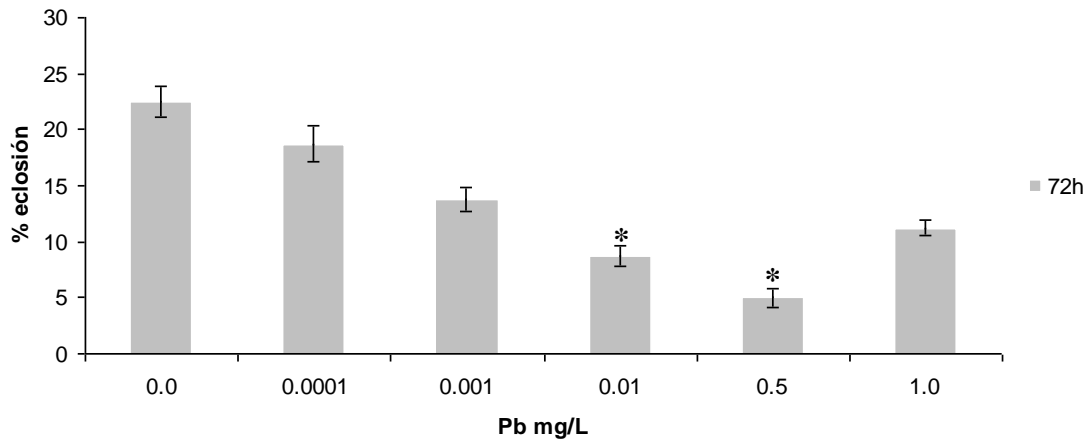


Figura 24. Efecto del plomo sobre el porcentaje de eclosión de huevos mícicos fecundados (quistes). Media \pm un error estándar. *Diferencias significativas respecto al control $p < 0.05$. N=80 para cada tratamiento.

6.9 Efecto del plomo en la producción de machos.

En la figura 25 se muestra un incremento significativo ($p < 0.05$) en la producción de machos cuando se expone el rotífero *Brachionus calyciflorus* con una concentración de 1.0 mg/L Pb durante 48 horas, respecto al control, no así con 0.5 y 0.1 mg/L Pb.

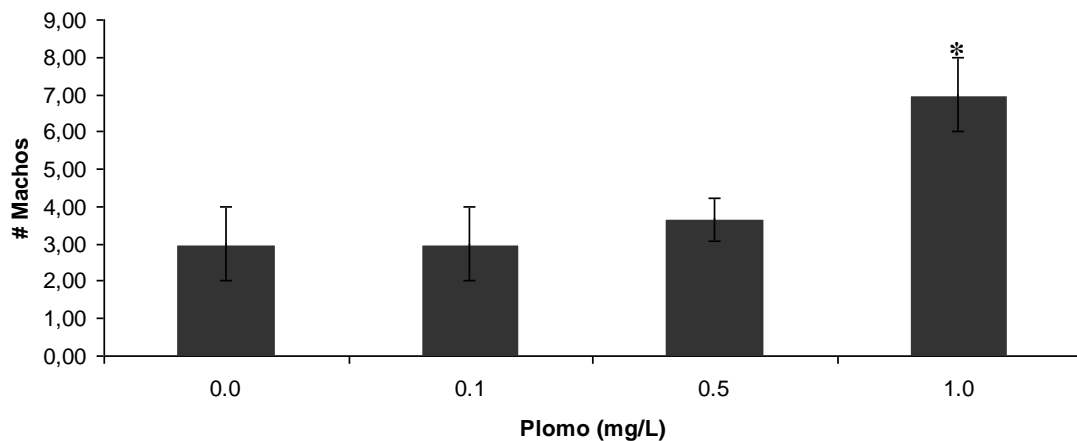


Figura 25. Efecto del plomo en el número de machos. Media \pm desviación estándar. *Diferencias significativas respecto al control $p < 0.05$.

7. DISCUSIÓN.

7.1 Morfología Interna y Externa del Rotífero *Brachionus calyciflorus*: Relación Estructura-Función.

La morfología de los rotíferos ha sido examinada a gran detalle con microscopía electrónica de transmisión (para una revisión ver Clement y Wurdak, 1991), y microscopía electrónica de barrido en estructuras internas y externas (Kleinow y Wratil, 1995), así como para la caracterización de trofos. Estos estudios han revolucionado la comprensión de la anatomía de los rotíferos y la correlación entre la estructura y función de los órganos, contribuyendo significativamente a nuestra comprensión de la taxonomía en rotíferos y su evolución (Wallace, et al., 2006).

Son pocos los estudios sobre la morfología de órganos internos de rotíferos con microscopía electrónica de barrido, destaca el procedimiento desarrollado en *Brachionus plicatilis* por Kleinow et al., (1991), con el cual es posible obtener imágenes con microscopía electrónica de barrido de la superficie e incluso de órganos internos y tejidos. Dicho método proporciona información complementaria relativa de la estructura general de los rotíferos. Nuestros resultados sobre la morfología de órganos internos por microscopía electrónica de barrido (figura 8) en el rotífero *B. calyciflorus* muestran caracteres adicionales sobre la estructura integral de órganos del sistema nervioso, digestivo y muscular. Respecto al sistema nervioso se corrobora la estructura glandular del retrocerebro. En cuanto al cerebro está constituido principalmente por numerosas células (en forma de hoja) apiladas, integrando con los sacos cerebrales un sistema receptor transmisor del ambiente circundante al estar interrelacionado con antenas receptoras, músculos y nervios.

De esta manera los rotíferos poseen especializaciones celulares únicas tales como: receptores sensoriales, revestimientos del tracto digestivo, células musculares estructurales, organización de cilios, uniones celulares, uniones neuromusculares, donde muchas de estas especializaciones fueron descubiertas en el curso de investigaciones en campos de taxonomía, filogenia, comportamiento y fisiología (Clement y Wurdak, 1991). Las cuales se muestran en las figuras 9,10, 11 y 12 para el rotífero *B. calyciflorus* donde se resaltan las conexiones que existen en el rotífero de todos los órganos con la

cutícula y celoma, creando un ambiente de comunicación permanente. Esta fijación de órganos al integumento y entre ellos por medio de nervios y músculos, resulta quizá por la necesidad frecuente y rápida de los movimientos del rotífero, además, implica que el integumento no solo funcione para protección y tensión mecánica, sino que representa el equivalente de un tejido conectivo en constante percepción del medio que lo rodea respondiendo a cambios en el ambiente circundante (Kleinow y Wratil, 1995). Las proteínas son parte importante de la cutícula de los rotíferos, aminoácidos como arginina y lisina y polisacáridos ácidos (Koehler, 1965).

Sus movimientos característicos de filtración y desplazamiento del rotífero *B. calyciflorus* son dirigidos por un sistema neuromuscular; músculos de tipo estriado en diferentes orientaciones longitudinales, circulares, y músculos viscerales. Kotikova et al., (2001), consideran que la musculatura visceral en rotíferos está representada por estructuras musculares del mástax, músculos faríngeos cutáneos, redes de músculos que envuelven órganos internos de la parte posterior, y los músculos cercanos al pie, así como la parte dorsal de la lóriga. Nuestros resultados concuerdan en gran parte al observar en las figuras 9, 10, 11, músculos de faringe y mástax conectados al tracto digestivo, formando un complejo muscular alrededor de todo el tracto digestivo para facilitar el movimiento de filtración, coadyuvando al movimiento ciliar evidente en todo el tracto digestivo hasta llegar al estómago, lo cual se aprecia en las figuras 9, 10 y 11. Más en detalle la figura 8E y 12I nos muestra la unión del músculo trasversal a la lorica, sin embargo, los rotíferos varían en su arreglo muscular y depende de su hábitat y adaptaciones evolutivas. Pérez-Legaspi (2009), compara la musculatura del rotífero *Lecane quadridentata* el cual es epibentónico, destacando la musculatura que posee dicho rotífero, es decir músculos retractiles muy fuertes de la corona y el pie, los cuales probablemente son una especialización para desplazarse en un hábitat bentónico particularmente denso. No obstante el genero *B. calyciflorus*, rotífero planctónico muestra también músculos retractiles de la corona muy fuertes y, músculos dorso ventrales cortos, los cuales pueden estar conectados hacia la corona, también se observa un conspicuo y fuerte complejo de músculos que forman el mástax, particularmente el mástax superior.

La relación estructura-función de los sistemas fisiológicos del rotífero, son de gran importancia y al dilucidar esta relación por medio del apoyo de cortes histológicos,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nos permitió entender con mayor detalle la fisiología del rotífero, por efecto el estudio ultraestructural de órganos digestivos y tegumentos en el rotífero *B. plicatilis* realizada por Jian-Ping y Shun-Jin (1997), en donde se describen el tegumento del rotífero (lóriga) formado por dos capas, una externa gruesa y una interna delgada, con gran cantidad de poros distribuidos irregularmente, estos se logran observar también en el rotífero *B. calyciflorus* en la figura 12F y 12E, menciona también como la superficie interna del tracto digestivo contiene una gran cantidad de cilios los cuales les permiten movilizar todo lo ingerido por filtración, además, representa un epitelio con una gran superficie de intercambio de nutrientes y iones. Las células del estómago y el intestino contienen muchas vesículas endocíticas, vacuolas digestivas, inclusiones de lípidos, lo que indica una función endocítica activa. Los rotíferos poseen una variedad de enzimas hidrolíticas como glucosidasas, proteinasas, trehalasas, sacarasas, maltasas, ARNasas, glucosidasas, galactosidasas, fosfolipasas, y estererasas (Kleinow 1993). Estas enzimas las encontramos en el estómago del rotífero (lipasas), y en la corona (fosfatasa). La células de las glándulas gástricas tiene abundante retículo endoplásmico rugoso, complejo de Golgi y gránulos de secreción para la producción de enzimas digestivas, dándose procesos de adsorción y absorción en el sistema digestivo. La cantidad de carbohidratos y lípidos varía en los rotíferos dependiendo de la edad, y aún más si están en etapa reproductiva (Guisande y Serrano 1989). Oie y Olsen (1997), describen la relación del incremento de proteínas y lípidos (μmol) con la tasa de crecimiento de los rotíferos.

En cuanto al sistema reproductivo del rotífero, principalmente conformado por una glándula sincitial llamada vitelario, con unos núcleos prominentes, representa un órgano importante en el rotífero y de gran tamaño con abundantes inclusiones de lípidos, ribosomas libres, gránulos y vacuolas autofágicas, aunque difieren morfológicamente en las diferentes especies de rotíferos (Clement y Wurdak, 1991), siendo más activo en etapas tempranas del ciclo de vida y respondiendo al hábitat por estrés físico y químico. El sistema reproductivo esta en función de un sistema de señalización neurotransmisor colinérgico, catecolaminérgico y serotoninérgico, además, de un sistema de secreción vesicular de hormonas que intervienen en el ciclo vital del rotífero (Pérez-Legaspi, 2008; Alvarado-Flores, 2009). El vitelario es el encargado de formar los huevos partenogénéticos y sexuales, representando un buen indicador de efecto del crecimiento poblacional adverso en presencia de contaminantes, además,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

puede ser determinado al usar parámetros indicadores como la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (r). Cabe mencionar que la especie *Brachionus calyciflorus* pertenece a un complejo críptico de especies, es decir se encuentran aisladas reproductivamente de otras especies, pero no distinguibles morfológicamente, sino por un análisis de secuencias de ADN (Gilbert and Walsh, 2005). Además, el vitelario de los rotíferos posee gran cantidad de cuerpos de inclusión (lípidos y lisosomas). Los cuerpos de inclusión son los que liberan hidrolasas de los lisosomas primarios que podrían causar muerte celular, además, existe una relación del incremento de cuerpos de inclusión y vacuolas autofágicas en estructuras como: glándula gástrica, estómago y vitelario, conforme se incrementa la edad. Se pueden observar en rotíferos vacuolas autofágicas una vez que cese la producción de huevos partenogénéticos (Herold y Medow, 1970).

7.2 Análisis intracelular de plomo *In Vivo* por fluorescencia con Leadmium Green®

La forma tradicional de evaluar la concentración de metales pesados en un organismo es a través de la determinación del metal en tejidos, órganos, o ser vivo, ignorando los mecanismos y rutas metabólicas que siguen los metales pesados en una célula. En un estudio sobre el proceso de bioconcentración del plomo en cladóceros y rotíferos empleando el reactivo Leadmium Green®, menciona como vía principal de entrada de plomo es a través de su tracto digestivo, aunque puede existir difusión a otros órganos como cerebro y cutícula. Dicha fluorescencia se encuentra localizada en solo algunas estructuras, resalta como principal vía de entrada de plomo los procesos de filtración de los alimentos y respiratorios (Rubio, 2009).

Nuestros resultados obtenidos del análisis de plomo intracelular *In Vivo* en el rotífero *Brachionus calyciflorus* concuerdan con las observaciones realizadas por Rubio (2009) respecto a la vía de entrada de plomo, agregando dos sitios donde se bioconcentra el metal en un período de exposición de 2-18 h: mástax y estómago (acoplado a él un sistema de secreción de células flama). Al examinar el proceso de bioconcentración y la relación de tiempo de exposición y concentración de plomo, existe un comportamiento de incremento de plomo intracelular en dichas estructuras siendo significativas en mástax a las 18 h con 1mg/L Pb, y no significativas en estómago, sin embargo, al evaluar conjuntamente ambas estructuras existen diferencias

significativas a las 12 h con una concentración de exposición de 1 mg/L Pb, y a las 18 h con una concentración de exposición de 0.5 mg/L Pb.

Las diferencias no significativas en el estómago, principal sitio donde llega el metal y lugar de donde parte a otros órganos por absorción y adsorción, se explica por varios factores:

1) Funcionamiento del marcador acetoximetil en su forma esterificada del reactivo Leadmium Green®, ya que dichas sondas poseen grupos éster que cubren los grupos carboxilo de los fluorocromos, convirtiéndose en permeables. Una vez dentro de la célula, las esterasas endógenas los escinden, convirtiendo a la sonda en una forma no permeable que permanece en el interior celular. De esta forma el colorante Leadmium Green® se torna fluorescente en presencia de niveles nanomolares de plomo, incrementando hasta 40 veces su fluorescencia.

2) Efecto del plomo en la actividad enzimática de esterasas del estómago.

Burbank y Snell (1994), reportan actividad de esterasas en el estómago del rotífero *Brachionus calyciflorus*, además, el plomo afecta la actividad enzimática de esterasas, por ejemplo en un estudio realizado en el rotífero *Euchlanis dilatata*, existe una inhibición en la función de esterasas por plomo (CL50 = 20µg/L Pb) (Arias-Almeida, 2010, comm. pers), por lo tanto el funcionamiento del colorante se ve afectado por el plomo causando variaciones en los valores obtenidos de fluorescencia de plomo intracelular en estómago, de esta forma se explicaría que no existe diferencias marcadas de los rotíferos intoxicados respecto al control. Cabe mencionar, que se empleó un inhibidor de esterasas (paratión metílico) como control positivo en la fluorescencia del colorante Leadmium Green®, encontrándose que la fluorescencia claramente disminuye (ver gráfica 3), y de esta manera explicar el fenómeno de bioconcentración de plomo, en estómago y mástax, donde el plomo es adsorbido al epitelio de todo el tracto digestivo, para darse una absorción del metal y pasar a bioacumularse a diferentes órganos del rotífero causando efectos adversos.

7.3 Bioacumulación de plomo y sus efectos adversos en el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

El proceso de bioacumulación en los organismos acuáticos se expresa típicamente mediante las proporciones de las concentraciones químicas en el tejido del organismo (por lo general en todo el cuerpo), en relación con las concentraciones de exposición, el parámetro indicador es el factor de Bioconcentración (FBC), sin embargo, se ha demostrado que los FBC suelen ser muy variables entre los organismos y, en general inversamente proporcional a la concentración de exposición. Estos son determinados en campo y laboratorio (donde fueron simuladas las cadenas alimentarias). Existe una relación inversamente proporcional en cuanto a las concentraciones de exposición en la obtención de los FBC de campo y laboratorio, significativas ($p \leq 0.05$). Siendo frecuentemente 100-1000 veces mayor los FBC en las especies que la concentración de metales en campo, esta diferencia se atribuye a los dos niveles de exposición (consumidores primarios y secundarios) y la inclusión de la ruta de exposición alimentaria. Teniendo implicaciones importantes para las regulaciones ambientales y la utilización de datos de bioacumulación de metales en evaluaciones ambientales de sitios específicos, tales como evaluaciones de riesgo ecológico y salud humana (De Forest et al., 2007).

Recientemente, Rubio (2009), reportó el primer caso de biomagnificación de plomo en algunos organismos acuáticos de niveles tróficos intermedios y/o superiores. Esta relación se ha establecido que ocurre de manera convincente, de acuerdo a los datos presentados entre la cianobacteria *Oscillatoria* sp (productor primario), los cladóceros herbívoros *Moina micrura*, y *Simocephalus vetulus* (consumidores primarios) y los depredadores *Asplanchna brighwellii*, y *Acanthocyclops robustus* (consumidores secundarios). El análisis de datos sobre los FBC de plomo (ver cuadro 5) permite aseverar, que al menos en los primeros niveles tróficos de los integrantes planctónicos de la presa El Niágara, se presenta la bioacumulación; y sobre todo, la biomagnificación de este metal.

Especie	Campo (FBC)	Laboratorio (FBC)
<i>Oscillatoria</i> sp (cianobacteria)	6,413	n.d.
<i>Moina micrura</i> (cladóceros)	70,789	2,367
<i>Simocephalus vetulus</i> (cladóceros)	15,000	3,496
<i>Asplanchna brighwellii</i> (rotífero)	123,684	490
<i>Acanthocyclops robustus</i> (copépodo)	163.158	2,460
<i>Hyaella azteca</i> (anfípodo)	90,263	4,634
Larva de <i>Culex</i> sp (insecto)	1'877,105	557,710
<i>Goodea atripinis</i> (pez)	n.d.	361
<i>Poecilopsis infans</i> (pez)	n.d.	457

Cuadro 5. Factores de Bioconcentración (FBC) obtenidos en campo y en laboratorio (Rubio, 2009).

Nuestros resultados en laboratorio para la obtención del FBC, es bajo respecto a los encontrados en las especies anteriores de invertebrados porque existen diferencias entre organismos y el mecanismo de intoxicación, nuestro FBC es de 115.77 para el rotífero *Brachionus calyciflorus*, que representa el primer reporte de un FBC para el plomo en esta especie, dado que en rotíferos los FBC de plomo son escasos y solo existen dos reportes, el nuestro y otro más obtenido en el rotífero *Asplanchna brighwellii* (Rubio-Franchini et al., 2008), existen otros valores de bioacumulación de plomo en diferentes especies como se muestra en el cuadro 5. La importancia de la obtención de FBC de metales en invertebrados acuáticos resulta ser indispensable al realizar análisis de la toxicidad de contaminantes al evaluar en cuerpos de agua, lagos, y mares. Con ello comprender las consecuencias de la transferencia de metales a través de las cadenas tróficas.

Especie	Referencia
<i>Dreissena polymorpha</i> Pallas (Mejillón cebra)	Chevreuril et al. (1996)
<i>Crassostrea belcheri</i> (Bivalvo), <i>Crassostrea iredalei</i> (Bivalvo)	Lim et al. (1998)
<i>Amblema alicata</i> (Bivalvo), <i>Fusconaia flava</i> (Bivalvo), <i>Quadrula quadrula</i> (Bivalvo)	Mathis y Cummings (1973)
<i>Mytilus edulis</i> (Mejillon atlántico)	Popham y D`Auria (1982)
<i>Cerastoderma edule</i> (Berbechero, verdigon), <i>Tellinella pulchella</i> (Bivalvo)	Schuhmacher et al. (1995)
<i>Mytilus edulis</i> (Mejillón atlántico)	Talbolt (1987)
<i>Mercenaria mercenaria</i> (Almeja)	Trocine and Trefry (1996)
<i>Astyamx mexicanus</i> (Pez), <i>Cichlasoma cyanoguttatum</i> (Pez), <i>Micropterus salmoides</i> (Pez), <i>Notropos lutrensis</i> (Pez), <i>Poecilia formosa</i> (Pez)	Villareal-Trevino et al. (1986).

Cuadro 6. Factor de Bioacumulación de plomo en diferentes especies.

En el rotífero *Brachionus calyciflorus* el proceso de bioacumulación de plomo es principalmente por mecanismos de filtración del medio donde habita, y todo el tracto digestivo posee un rol determinante del proceso de adsorción y absorción de plomo. Los sitios donde se bioacumula el plomo y como lo muestra la histoquímica (ver figura 13) son: mástax y vitelario, sin embargo, el significado biológico de la deposición de metales en los tejidos blandos de invertebrados acuáticos es todavía objeto de un intenso debate (Gibson y Barker, 1979; Dall y Moriarty, 1983; Rainbow, 1988). Algunos autores consideran los compartimientos de almacenamientos para las necesidades fisiológicas, como blanco de tóxicos. Varios procesos en los que participan los organismos acuáticos en la absorción de plomo se han reportado, mencionando que la concentración del plomo es el factor más importante que determina la absorción, ya que el plomo puede sustituir al calcio, y probablemente iones de zinc dependientes de la sinapsis, causando daños en diferentes sistemas de neurotransmisión (Gnassia-Barelli y Romeo, 1993). La neurotoxicidad del plomo sobre los segundos mensajeros es devastador en el sistema de señalización celular.

¿Cual es el efecto tóxico del plomo en los rotíferos? El principal mecanismo tóxico del plomo es la suplantación de cationes polivalentes (esencialmente calcio y zinc) en las maquinarias moleculares del organismo, gracias a su estructura iónica que le permite establecer interacciones favorables con los grupos que coordinan los cationes polivalentes en las proteínas transportadoras de metales, de adhesión celular, y de unión al ADN, así como canales iónicos, diversas enzimas metabólicas, entre otros blancos moleculares afectando sistema muscular, digestivo, endocrino, respiratorio, y nervioso (Garza et al., 2005). Nuestros resultados en cuanto a la detección de plomo por el análisis de la composición elemental de estructuras internas y externas del rotífero *Brachionus calyciflorus*, por medio de dispersión de rayos X en microscopia electrónica de barrido se detecto principalmente carbono (C), oxígeno (O), calcio (Ca), silicio (Si) y aluminio (Al), en organismos control y los intoxicados con plomo con una concentración de 1 mg/L durante 24 horas sin alimento, se observó un decremento en la detección de Ca, Si y Al en los rotíferos intoxicados (ver figura 4). Por efecto del plomo que posee mayor afinidad en los sitios de unión de calcio, que el propio calcio, y dado que sus configuraciones electrónicas difieren, el plomo provoca irregularidades en el funcionamiento dinámico del calcio. Se ha observado que la activación por el plomo de muchas de las proteínas de unión a calcio suelen ser anormales, por lo que exhibe una activación y un funcionamiento atípicos, los cuales pueden ser ocasionados por formaciones no fisiológicas en la proteína tras su asociación al plomo (Garza et al., 2005). Y de esta manera impide la dinámica molecular del calcio, y al mismo tiempo el plomo se bioacumula probablemente en órganos como mitocondrias, retículo endoplásmico y núcleo, vesículas de excreción, unido a proteínas reguladoras de metales (metalotoneínas). Ya que existen algunas proteínas encargadas de controlar la actividad intracelular de los iones metálicos y ayudar en un funcionamiento normal predeterminado, estos incluyen transporte de membranas, sensores metalo-reguladores, proteínas chaperonas que protegen el ion metálico y lo llevan al sitio de acción, siendo que muchas de estas proteínas coordinan su entrada y salida al citoplasma de la célula y puede existir alteraciones en estos mecanismos cuando el ion metálico no es esencial para el organismo (Lydia et al., 2003). Por efecto el plomo participa en la dinámica bioquímica del calcio en su forma iónica y no iónica alterando el funcionamiento normal de los mecanismos celulares de los rotíferos, impidiendo el funcionamiento de sistemas nervioso, muscular, reproductivo, endocrino y digestivo.

Nuestros resultados sobre el efecto adverso del plomo sobre el rotífero *B. calyciflorus* se describen a continuación. El plomo tiene un efecto adverso sobre la tasa intrínseca de crecimiento r . Estadísticamente r integra un número de particularidades del crecimiento poblacional, incluyendo tasa de natalidad, tasa de mortalidad y tiempo de desarrollo, donde algunas pueden ser adversamente afectadas por tóxicos. Una característica de la prueba con rotíferos es que todas las etapas se presentan durante la prueba, incluyendo embriones, juveniles y adultos. Todos los procesos del ciclo de vida son representados, incluyendo desarrollo, maduración, crecimiento y reproducción (Snell y Moffat, 1992). Los valores de toxicidad CNOE y CMOE del parámetro indicador de efecto del plomo sobre el crecimiento de los rotíferos, r son 0.25 y 0.5 mg/L Pb respectivamente, los cuales son muy similares a los obtenidos para la producción de huevos partenogénéticos, no así para los valores CE₅₀, de r y producción de huevos: 0.96 y 0,75 mg/L Pb respectivamente. Grossell et al. (2005), obtuvo valores CNOE y CMOE de 0.067 y 0.194 mg/L Pb respectivamente con un EC₂₀. En cuanto a la toxicidad aguda de plomo en el rotífero *Brachionus calyciflorus* Santos-Medrano (2009, comm. pers.), obtuvo un LC₅₀, de 0.77 mg/L Pb, y Snell y Janssen (1995), reporta un LC₅₀ >4 mg/L Pb.

La toxicidad del plomo es evidente en invertebrados acuáticos, y la relación de la concentración de alimento con el efecto sobre la toxicidad de los metales. Hernández-Flores (2006), compara el efecto tóxico del plomo en relación a la concentración de alimento durante el desarrollo de una prueba crónica, obteniendo valores CE₅₀, con alimento 1×10^5 células/mL de *N. oculata* un CE₅₀ de 0.642 mg/L y 0.61 mg/L Pb en la prueba con concentración de alga de 1×10^6 células/mL; observándose un ligero incremento en la toxicidad del plomo al incrementar la concentración de alimento. Estos valores son superiores a los obtenidos empleando otra alga *Scenedesmus acuminatus* como alimento el mismo rotífero *Lecane quadridentata* (Stokes, 1981). En otra prueba donde se evaluó durante tres días la reproducción del cladóceros *Daphnia magna*, se obtuvo un valor de CE₅₀ de 0.1 mg/L Pb (Biesinger y Christensenm 1972). Y al cambiar el alga como alimento empleando *Selenastrum capricornotum*, Chen y Lin (1997), obtienen un valor CE₅₀ de 2.6 mg/L. Con los cuales se hace evidente la vía digestiva como factor determinante en el efecto tóxico del plomo.

El plomo afecta el sistema reproductivo directamente al disminuir el crecimiento intrínseco poblacional, y no así el porcentaje de eclosión de huevos partenogénéticos, como lo muestran nuestros resultados, sugiriendo que el efecto del plomo es en la formación de ellos y no así al estar listos para eclosionar una vez que son liberados al medio por el rotífero. Sin embargo, existe un efecto adverso sobre los huevos sexuales en cuanto al porcentaje de eclosión: los huevos mícticos no fecundados (que originan machos), presentaron una ligera disminución que no es significativa, estos resultados representan los primeros reportados en cuanto al porcentaje de eclosión por plomo. Además, encontramos también una disminución significativa en cuanto al porcentaje de eclosión de huevos mícticos fecundados (quistes), con una concentración de exposición de 0.01 y 0.5 mg/L Pb, es decir, reduce más del 50% de la eclosión de quistes, los cuales son de gran importancia para la preservación de los rotíferos en condiciones adversas del medio ambiente soportando sequías y temperaturas frías, eclosionando cuando las condiciones son favorables. Nuestros resultados indican que existe un efecto en el ciclo de vida sexual y asexual del rotífero. Al demostrar un incremento significativo en la producción de machos cuando se expone el rotífero *Brachionus calyciflorus* con una concentración de 1.0 mg/L Pb durante 48 horas, respecto al control. Demostrando el efecto de estrés por plomo en el rotífero. Por tanto el plomo posee un efecto adverso en cuanto a la reproducción partenogénica, y sexual respecto a la eclosión de huevos sexuales y perturbación en el incremento del número de machos.

Gama-Flores et al. (2007), evalúa en el rotífero *Brachionus calyciflorus* el efecto del cobre (Cu) y cadmio (Cd) sobre variables poblacionales como: crecimiento poblacional, tamaño de talla, proporción de huevos, y porcentaje de eclosión de huevos partenogénéticos, demostrando como el incremento en la concentración de estos metales pesados y el tiempo de exposición tiene una influencia negativa en el crecimiento poblacional del rotífero, siendo mas grave el cadmio que el cobre, también observo disminución en talla y proporción de huevos, la cual esta relaciona con el crecimiento poblacional, en cuanto al porcentaje de eclosión menciona que hay un 16 -41% de disminución en el porcentaje de eclosión por Cu.

Finalmente el efecto adverso del plomo sobre la reproducción asexual y sexual, por bioacumulación de plomo es evidente, así como la ruta principal por donde se da este fenómeno de bioconcentración de plomo en el vitelario y mástax, estructuras de

importancia en cuanto al funcionamiento normal de los sistemas reproductivos y digestivos. Resulta de gran interés determinar los mecanismos moleculares de daño resultantes por intoxicación de plomo en rotíferos en sus maquinarias celulares.

8. CONCLUSIÓN.

La presente contribución constituye el primer reporte de bioacumulación de plomo (ó de cualquier otro tóxico) en rotíferos donde se estudia la deposición del tóxico (en este caso plomo) usando microscopia electrónica y de rayos X para determinar el destino del plomo en la ultraestructura. El plomo se deposita primordialmente en el vitelario y mástax del rotífero dulceacuícola *Brachionus calyciflorus*. Los estudios de microscopía electrónica fueron complementados con estudios de microscopía de fluorescencia y absorción atómica para determinar la ruta de entrada del plomo en el organismo y determinar el grado de bioacumulación. Finalmente se estudiaron los efectos de la acumulación de plomo en parámetros poblacionales (principalmente el valor r). También se determinó el FBC= 115.77, para el rotífero *Brachionus calyciflorus*, el cual representa el primer reporte de un FBC de plomo en esta especie.

El presente estudio aporta información complementaria sobre la morfología interna y externa del rotífero *Brachionus calyciflorus*. Resaltan estructuras como cerebro, sacos cerebrales, retrocerebro, inserciones de músculos a la cutícula obtenidas por microscopia electrónica de barrido. Dilucidando su forma estructural a detalle.

El aporte de imágenes sobre el sistema digestivo, nervioso, muscular, reproductivo, y sistemas de excreción del rotífero se presentan en detalle para la especie *B. calyciflorus*. Y con ello comprender en detalle funciones específicas de filtración, digestión y reproducción principalmente. También se aporta la composición elemental de la cutícula del rotífero y estructuras internas, prevaleciendo elementos como C, O, Ca, Si y Al.

Se encontró la relación que existe entre el tiempo de intoxicación de plomo y la concentración de exposición, y la vía principal de entrada de plomo en los rotíferos. Destacando el mástax y estómago como órganos donde se bioconcentra el plomo en un período no mayor a 24 horas. Lo cual resulta ser interesante dado que durante ese

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tiempo pueden ser presa de otros invertebrados, contribuyendo a la comprensión del proceso de transferencia de metales en las cadenas alimentarias. Resultando ser relativamente peligrosa la bioconcentración del tóxico en organismos acuáticos filtradores como son los rotíferos, ya que estos son parte importante en la transferencia de energía.

El proceso de adsorción y absorción de plomo y su mecanismo de entrada del plomo descrito, nos permitió comprender y relacionar el efecto del plomo sobre algunos parámetros poblacionales. Es decir, el plomo se bioacumula en vitelario y mástax una vez que entra al organismo, aunque el mecanismo exacto de como se acumula el metal no es claro, el presente estudio, demuestra como desplaza la detección del calcio en el rotífero, infiriendo con ello el efecto del plomo sobre la bioquímica del calcio.

El plomo disminuye la tasa intrínseca de crecimiento r , y la producción de huevos partenogénicos, no así el porcentaje de eclosión de huevos partenogénicos. Por tanto el plomo afecta el proceso de formación de huevos y no así la eclosión una vez que son formados y liberados al medio donde habita. Aunque si afecta el porcentaje de eclosión de huevos sexuales: quistes y huevos micticos no fecundados (que originan machos). Interesantemente el plomo incrementa la producción de machos. Concluyendo lo siguiente sobre el plomo y su efecto adverso sobre el ciclo vital del rotífero *B. calyciflorus*: afecta la reproducción partenogénica, y la reproducción sexual. Por efecto de bioacumulación en vitelario y mástax, afectando probablemente el proceso normal de su digestión y con ello disminuye el metabolismo energético del rotífero afectando la producción de huevos partenogénicos, la cual esta directamente relacionada con el crecimiento poblacional.

Aun falta comprender en detalle los mecanismo moleculares que se ven afectados por el plomo y el proceso dinámico que sigue en la maquinaria molecular celular y las consecuencias exactas del efecto adverso del plomo en los rotíferos. Sin embargo, nuestros datos aportan información relevante del proceso de bioacumulación de plomo en rotíferos.

9. ANEXO.

**MONITOREO DE PLOMO EN EL ROTÍFERO POR
ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA EN LA MODALIDAD
HORNO DE GRAFITO.**

	Media ug/L	Desv. Std.	N
EPA + Pb 0h	989.33	26.10	3
EPA + Pb 24h	1050.67	89.94	3
EPA	8.41	3.36	3
EPA + Pb 24h (sin rotíferos)	537.00	4.24	2
Rotíferos Intoxicados	181.30	29.27	2
Rotíferos Control	7.12	1.80	1
Blanco Fortificado	11.20	1.23	1

**EFEECTO DEL PLOMO EN LA COMPOSICIÓN ELEMENTAL DEL
ROTÍFERO EN UN ANÁLISIS DE RAYOS X EN MICROSCOPIA
ELECTRÓNICA DE BARRIDO.**

Control

	Abundancia Relativa	Desv. Std.	N
C	72.88	3.54	21
O	25.79	4.35	21
Ca	0.25	0.08	20
Si	0.41	0.30	13
Al	0.22	0.02	3

Intoxicados

	Abundancia Relativa	Desv. Std.	N
C	70.39	3.01	19
O	29.15	3.23	19
Ca	0.37	0.11	7
Si	0.78	0.29	6
Al	0.33		1

TABLAS LEADMIUM GREEN®

Organismo completo		UF			
T		Media	Desv. Std.	Err. Std.	N
1	Control (>24h)*	1363.366	576.2003	101.8588	32
2	Control + Paratión Metílico (0.01 mg/L)	587.311*	197.9510	59.6845	11
3	Control + Paratión Metílico (0.1mg/L)	544.093*	147.7635	42.6557	12
4	Control Neonatos (<24h)	443.660*	95.2215	26.4097	13
5	2h 0.1 mg/L Pb	468.439*	321.1039	101.5420	10
6	2h 0.5 mg/L Pb	547.311*	237.3849	68.5271	12
7	2h 1.0 mg/L Pb	494.583*	168.4317	46.7146	13
8	12h 0.1 mg/L Pb	1747.047	526.1696	166.3894	10
9	12h 0.5 mg/L Pb	1660.016	659.0888	219.6963	9
10	12h 1.0 mg/L Pb	1955.459*	439.3604	126.8324	12
11	18h 0.1 mg/L Pb	1734.927	400.5096	115.6172	12
12	18h 0.5 mg/L Pb	1902.322*	624.1061	197.3597	10
13	18h 1.0 mg/L Pb	1432.561	652.3387	206.2876	10

*Diferencias significativas, Comparación de medias por Tukey. ANOVA de una vía altamente significativo, p=0.000.

Mástax

Pb (mg/L)	Tratamientos	N	Media	Desv. Std.	Err. Std.
0.0	0h	19	1529.939	532.0432	122.0591
0.0	0h (n)	13	443.660*	95.2215	26.4097
0.1- 0.5 -1.0	2h	33	747.227*	230.3937	40.1064
0.1- 0.5 -1.0	12h	33	1464.370	535.3240	93.1879
0.1- 0.5 -1.0	18h	26	2444.617*	508.9653	99.8163

*Diferencias significativas, Comparación de medias por Tukey. ANOVA de una vía altamente significativo, p=0.000.

Estómago

Pb (mg/L)	Tratamientos	N	Media	Desv. Std.	Err. Std.
0.0	0h	23	1936.841	707.8888	147.6050
0.0	0h (Pm-0.01)	11	587.311*	197.9510	59.6845
0.0	0h (Pm-0.1)	12	544.093*	147.7635	42.6557
0.0	0h (n)	13	443.660*	95.2215	26.4097
0.1- 0.5 -1.0	2h	25	683.052*	484.7548	96.9510
0.1- 0.5 -1.0	12h	28	1886.279	418.1052	79.0145
0.1- 0.5 -1.0	18h	26	2075.107	539.3085	105.7671

*Diferencias significativas, Comparación de medias por Tukey. ANOVA de una vía altamente significativo, $p=0.000$.

DETECCIÓN DE PLOMO INTRACELULAR *IN VIVO* POR FLUORESCENCIA EMPLEANDO EL COLORANTE LEADMIIUM GREEN®.

Componente A: Leadmium Green® 50 µg en cada vial de 5.

Componente B: PbCl₂, 6 mL de a 10 µM en agua des-ionizada.

Componente C: CdCl₂, 6 mL de a 1mM en agua des-ionizada.

Componente D: Ionomicina, 500 µL de a 500 µM en DMSO.

Componente E: TPEN (tetrakis(2-metilpiridil) etilenediamina).

Componente F: Yoduro de Propidio (PI), 1 mL de a 150 µM en agua des-ionizada.

Componente G: Dimetilsulfóxido (DMSO) 500 µL.

EQUIPO DE FIJACION DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

1. FIJADOR.- Glutaraldehído al 3% con buffer de fosfatos Sorensen pH 7.4
2. SOLUCIÓN LAVADORA.
3. NAVAJAS DE RASURAR NUEVAS.
4. APLICADORES DE MADERA.
5. TELA ADHESIVA Ó MASKING TAPE.
6. LAPIZ

7. TARJETA EN BLANCO Ó PLACAS PEQUEÑAS DE PARAFINA PARA CORTAS.
8. PIPETAS PASTEUR.

INSTRUCCIONES PARA LA FIJACIÓN.

1. Con una pipeta Pasteur poner una gota de glutaraldehído 3% sobre una tarjeta en blanco o una placa de parafina.
2. La pieza biológica que se obtiene se deberá manejar con mucho cuidado (no manipulando demasiado). La pieza tendrá un espesor no mayor de 5 milímetros. Inmediatamente después que se obtenga se colocará sobre la gota del fijador.
3. Con una navaja de rasurar nueva se cortará la pieza (dentro de la gota de fijador) en pequeños pedacitos de aproximadamente 0.5 mm. De espesor ó menos. Cada corte se hace de un solo tajo, teniendo cuidado de no rasgar el tejido.
4. Con un aplicador de madera se pasarán de 2 a 5 pedacitos de tejido a un pequeño frasco para espécimen, contenidos cada frasco de 2 a 3 mL. De Glutaraldehído a 3% a 4°C. Los pedacitos que contendrá el frasco serán los más representativos de la pieza original y los que habrán sido menos manipulados.
5. Si el fijador se pone turbio ó rojizo después de ponerse los pedacitos de tejido, cambiar por fijador nuevo.
6. Utilice un tiempo de fijación con glutaraldehído de 1 a 2 horas.
7. Después de la fijación anterior se tira el fijador retirándose con una pipeta Pasteur con bulbo.
8. Poner solución lavadora (2 a 3 mL.) en el frasco y guardarlo en el refrigerador.
9. El tejido se puede dejar en la solución lavadora por varios días.
10. Al continuarse con el siguiente paso se realizarán 3 cambios de solución lavadora que llevan aproximadamente 10 minutos en total.

INTRUCCIONES PARA LA POST-FIJACIÓN

1. La post-fijación se realizara con tetraóxido de Osmio (OsO_4) con alguno de los amortiguadores (que debe ser el mismo del glutaraldehído y la solución

lavadora) en proporción al 1% durante 1 a 2 horas a 4°C. Dejar en el refrigerador, la post-fijación se hace lentamente.

2. Se lavan los especímenes con solución lavadora ó amortiguadora. Lavar nuevamente para quitar los restos de la post-fijación (hacer en total 3 lavados en 10 minutos). En éste paso se pueden dejar el tratamiento por días.

TECNICA EPON

INSTRUCCIONES PARA LA DESHIDRATAACION

1. Para la deshidratación se utilizan alcoholes graduales desde el 60% absoluto, con un tiempo de 5 a 10 minutos cada cambio.

- | | |
|----------------------|-----------------------------------|
| a) Alcohol 60%..... | 5 minutos. |
| b) Alcohol 70%..... | 5 minutos. |
| c) Alcohol 80%..... | 5 minutos. |
| d) Alcohol 90%..... | 5 minutos. |
| e) Alcohol 100%..... | 3 cambios de 10 minutos cada uno. |

Se utiliza también la ACETONA con los mismos porcentajes. El tejido fibroso necesita más tiempo; ó sea 10 minutos en cada cambio de alcohol y en el último será de 15 minutos los cambios).

2. Se realizarán después 2 cambios de OXIDO DE PROPILENO de 10 minutos cada uno. Cuando se usa la Acetona en la deshidratación no es necesario hacer éste paso (del Óxido de propileno, ya que la acetona si es soluble con el epon). Posteriormente se hace la pre-inclusión.

INDICACIONES PARA LA PRE- INCLUSIÓN

1. Mezclando la primera vez uno a uno óxido de propileno y epon. También se hace esta mezcla con acetona. Se deja en esta solución 1 hora en el frasco tapado y a temperatura ambiente.

2. Después se hace una mezcla de óxido de propileno (ó acetona) y epon 1 a 3 respectivamente durante 1 hora y también con el frasco tapado. Nota: terminado el paso #1 se puede dejar con la misma mezcla a temperatura ambiente, con el frasco destapado y sílica gel (con el fin de no se hidrate) debajo de una campana de vidrio; hasta el siguiente día, que se procederá a la inclusión directamente.

INCLUSIÓN

1. Se sacan los fragmentos ó muestras y se colocan sobre un papel filtro.
2. Se pone un los moldes ó cápsulas una gota de solución fijadora final de Epon.
3. Colocar la identificación escrita con lápiz de punta fina para que quede claro. (Papel Filtro).
4. Colocar en la punta el fragmento ó muestra teniendo cuidado de no manipular demasiado y orientar debidamente con la ayuda de palillos de madera y de una lupa estereoscópica.
5. Llenar bien los moldes con la solución final de epon cuidando que no se le formen burbujas de aire cerca del tejido ya que esto traería problemas al cortar.
6. Se deja un rato a temperatura ambiente, después se meten a la estufa a 60°C a que se polimerice durante 24 horas, quedando listo para cortar.

SOLUCIONES DE RUTINA EN EL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA FIJADORES

1. GLUTARALDEHÍDO AL 3%.

	50%	25%
Glutaraldehído	6 mL	12 mL
Sol. De Trabajo (Buffer)	94 mL	88 mL
Cloruro de Calcio	10 gotas.	

Conservar en frasco ámbar y guardar en el refrigerador. Para lavar al glutaraldehído se procede a lo siguiente: 100 mL de Sol. Madre de glutaraldehído se agregan 1 g de carbonato de bario (BaCO_3) y se centrifuga a 10 rpm durante 20 minutos, al final el pH de la solución deberá ser 5.6.

2. TETRAOXIDO DE OSMIO AL 1%.

Solución de trabajo: buffer de fosfatos	100mL
Cristales de Tetraóxido de ósmio	1g
Cloruro de calcio al 1%	10 gotas

La ampolleta que trae los cristales de tetra oxido de osmio, se lava muy bien y se marca con lápiz de diamante o una sierrita con mucho cuidado colocándose dentro de un frasco ámbar de tapón esmerilado (perfectamente limpio) que tendrá ya la solución amortiguadora; agitarse hasta que se rompa la ampolleta y dejar a temperatura ambiente hasta que el osmio se disuelva. Rotular el frasco y guardar en refrigeración a 4°C.

3. PARAFORMALDEHIDO AL 4% EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA Ph 7.2 a 7.4 (0.1 M).

Para preparar 500 mL...

Calentar 250 mL de agua bi-distilada en una platina a 60°C. utilizando un matraz Erlenmeyer de 1 litro; agregar 20 g de paraformaldehído (polvo blanco) al matraz y agitar con varilla de vidrio ó con una mosca si se utiliza un agitador magnético, tratando de disolver lo máximo el paraformaldehído.

Cuando empieza a salir vapor (evitar perder el formol), agregar sosa (NaOH) al 1N, aproximadamente 30 gotas utilizando una pipeta Pasteur con bulbo.

La sosa se agrega lentamente, agitándose la solución cada vez que se pongan varias gotas. Finalmente la solución se aclarará ó tendrá un aspecto ligeramente blanquecino, se retira la solución de la platina y se enfría con agua. Después de enfriarse la solución. Deberá estar completamente transparente. Se agregan 250 mL de una

solución amortiguadora. Se recomienda la solución de fosfatos al 0.2 M, el de Cacodilatos al 0.2 M ó S-Collidina al 0.2M. Guardar en el refrigerador en botella ámbar perfectamente bien cerrado.

4. PERMANGANATO DE POTASIO AL 0.6% (LUFT).

Permanganato de potasio (KMnO ₄) al 1 ó 2%	12.5 mL
Buffer (Palade) de Acetato de Veronal	5.0 mL
Agua destilada	2.5 mL
Acido Clorhídrico (HCl) al 1N	5.0 mL

Ajustar el pH a 7.3 – 7.4 con (HCl). La fijación no deberá exceder de 1 hora.

5. FIJADOR DE KARNOWSKY (1965) (PARAFORMALDEHIDO 4% GLUTARALDEHÍDO 5%)

1. Disolver 2.0 g de paraformaldehído en polvo en 25 mL de agua destilada por calentamiento de 60 °C a 70°C.
2. Añadir de 1 a 3 gotas de NaOH al 1M hasta que aclare la solución (puede persistir algo de aspecto lechosos).
3. Después de enfriar agregar 5 mL de glutaraldehído al 50% ó 10 mL si es al 25%.
4. Aforar a 50 mL con buffer de fosfatos ó cacodilatos al 0.2 M con pH de 7.4 a 7.6, la solución final deberá tener un pH7.2, si se usó el buffer de cacodilatos, añadir 25 mg de cloruro de calcio anhídrido (CaCl₂).

6. FIJADOR DE PALADE (1952).

Sol. Stock buffer de acetato de veronal	5.0 mL
Acido Clorhídrico (HCl) 0.1 M	5.0 mL
Agua destilada	2.5 mL
Tetraóxido de Osmio al 2%	12.5 mL

SOLUCIONES BUFFERS

1. BUFFER DE FOSFATOS (SORENSEN)

Solución A.

Fosfatos de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	28.4 g
Agua destilada	1000 mL

Solución B.

Fosfatos de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$)	27.6 g
Agua destilada	1000 mL

Solución final de trabajo (0.1 M y pH de 7.4)

Solución A	405 mL
Solución B	95 mL
Agua destilada	500 mL

2. BUFFER DE S-COLLIDINA-HCl. 0.2 M Y Ph 7.33 a 7.40

Solución A

S-Collidina pura	5.34 mL
Agua destilada	100 mL
HCl 1N	18 mL
Agua destilada hasta completar	200 mL

Solución B

HCl concentrado (36-38%)	83 mL
Agua destilada a completar	1000 mL

Solución final.

A 200 mL de la Solución A se añaden 20 mL de la Solución B.

3. BUFFER DE CACODILATOS-HCl. 0.2 M Ph 7.2

Solución A.

Cacodilato de Sódio ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	42.8 g ó 10.7 g
Agua destilada	1000 mL ó 250 mL

Solución B: 0.2 M

Acido Clorhídrico concentrado HCl 35-38%	10 mL
Agua destilada	603 mL

Solución Final de Trabajo.

Solución A	50 mL
Solución B	4.2 mL
Agua destilada hasta completar	200 mL

4. BUFFER TRIS-HCl (Hidroximetil) aminometano 0.05 M pH 7.36 PM Tris=121.14.

Solución A: 0.2M Tris.

Tris	24.3 g
Agua destilada	1000 mL

Solución B: 0.1 N HCl.

Acido clorhídrico concentrado	83 mL
Agua destilada hasta completar	1000mL

Solución de Trabajo.

Solución A (tris 0.2M)	25 mL
Solución B (0.1 N HCl)	42.5 mL
Diluir con agua destilada hasta completar	100 mL

5. Mezcla Crómica

Dicromato Potasio	60 g
Agua caliente	300 mL
Acido sulfúrico	100 mL

Agregar gota a gota el acido sulfúrico, dejar enfriar y aforar a 1000 mL.

PREPARACION DE SOLUCION LAVADORA

0.1 Buffer de fosfatos con 10% de sacarosa y 1% de CaCl₂.

Solución de trabajo de fosfato pH 7.4	200 mL
Sacarosa	20 g
Cloruro de Calcio al 1%	20 gotas

Consérvese en el refrigerador después de rotular el frasco.

NOTA: Puede usarse otro buffer en lugar del de fosfatos.

PREPARACION DE MEDIOS DE INCLUSION

1. RESINA EPON

Solución A.

Epon 812	62 mL
D. D. S. A (Anhídroadenil succínico)	100 mL

Agitar la mezcla durante 30 minutos.

Solución B.

Epon 812	100 mL
N. M. A	89 mL

Agitar la mezcla durante 30 minutos.

Solución Final de Trabajo.

Solución A	3 partes
Solución B	7 partes

Se mezcla perfectamente, agregando 0.15 mL de D. M. P.30 por cada 10 mL de mezcla.

Se agita vigorosamente la mezcla por 5 a 15 minutos, tratando de que NO se formen burbujas; si éstas se forman, se pueden eliminar por medio del vacío. Esta mezcla se debe mantener en el refrigerador (congelador) a 4°C para evitar su polimerización.

NOTA: Esta mezcla final puede cambiarse en la proporción de 4 a 5 si se quiere obtener menor dureza.

PREPARACION DE CONTRASTANTES

1. CITRATO DE PLOMO DE REYNOLDS (1963).

En una probeta volumétrica de 50 mL realizar la siguiente mezcla.

Nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$)	1.33 g
Citrato de Sódio ($\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)2\text{H}_2\text{O}$)	1.76 g
Agua destilada libre de dióxido de carbono	30 mL

Agitar vigorosamente durante 30 minutos, agregar 8 mL de hidróxido de sodio 1 N, completar con agua hasta 50 mL y mezclar por inversión.

2. CITRATO DE PLOMO (Venable 1965).

Citrato de Plomo	0.04 g
Agua destilada	10 mL
Hidróxido de Sódio 10 M (NaOH PM = 40)	0.1 mL (2 gotas)

Se disuelve el citrato de plomo en el agua y se agita vigorosamente lo más posible y posteriormente se agrega la sosa agitando nuevamente; hasta que la mezcla se vuelva transparente, tapar muy bien.

3. ACETATO DE URANILO 4%.

Acetato de Uranilo (CH ₃ COO) ₂ UO ₂ ·2H ₂ O	4 g
Agua tridestilada	100 mL

Disolver el colorante en el agua agitando vigorosamente.

4. CONTRASTE EN BLOQUE (Tsutsume, F. V. 1979).

Acetato de Uranilo 5% en material al 50% (filtrado) 60 minutos.

Lavar en metanol 5% 3 cambios de 10 minutos cada uno.

Deshidratar con alcoholes graduales.

Alcohol 70%	10 min
Alcohol 80%	10 min
Alcohol 90%	10 min
Alcohol 100%	3 X 10 min

Oxígeno prop. 3 cambios de 10 minutos cada uno.

Oxígeno prop. Epon final 1:1 toda la noche.

MÉTODOS DE TINCIÓN PARA CORTES SEMI-FINOS (GRUESOS)

Cortes control

1. AZUL DE TOLOUDINA TRUMP (1961).

1. El corte o sección ya cortada y colocada en el porta-objetos, se pasa a la platina de calentamiento (a 300 ó 350°C) para su completa fijación a la laminilla, por 15 a 30 segundos.

2. Se cubre la muestra perfectamente bien con una gota del colorante azul de toluidina durante 30 segundos a 1 minutos (calentando sin dejar hervir) aproximadamente y esto depende el grosor del corte.
3. Se lava en agua corriente hasta que ya no escurra más colorante.
4. Secar al aire
5. Diferenciar con alcohol de 95% por algunos segundos.
6. Secar al aire libre antes de observar al microscopio si es correcta la diferenciación.
7. Pasar por algunos segundos en Toluol (deshidratar).
8. No es indispensable pero sí se recomienda pasar a Xilol-cresota (para aclarar).
9. Cubrir con resina sintética y observar.

RESULTADOS: En diferentes tonalidades de azul (azul intenso a azul-rosado).

PREPARACION DEL COLORANTE

Azul de Toloudina	0.5 g
Bóraz (tetraborato d Sódio)	1 g
Agua destilada	100 mL

Disolver el bórax en el agua y calentar, esperar que se enfríe un poco y agregar poco a poco el colorante sin dejar de mover hasta deshacer los grumos. Ya disuelta la mezcla filtrar y guardar.

PREPARACIÓN DEL MEDIO BASAL DE BOLD (NICHOLS, 1973) PARA *NANNOCHLORIS OCULATA* (CEPA LB2194 DE LA COLECCIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE TEXAS).

Este medio consiste de lo siguiente: En un litro de agua destilada se agregará los siguientes micro nutrientes: 250 mg de NaNO_3 , 25 mg de $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$, 75 mg de $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 75 mg de KHPO_4 , 175 mg de KH_2PO_4 , 25 mg de NaCl , éstos se agitarán en un matraz colocado en un agitador magnético, durante 11 Horas. Se esterilizarán y se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

agregará 2 mL de vitaminas (Tiamina, Biotina y Vitamina B₁₂) y 2 mL de trazas (NaMoO₄ – 2H₂O, NaFe EDTA, MnCl – 4H₂O, CuSO₄ – 5H₂O y ZnSO₄ – 7H₂O).

PREPARACIÓN DE MEDIO EPA EPA, SEGÚN U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, (1985).

Este medio se preparará así: en un litro de agua desionizada se agregarán 96 mg de NaHCO₃, 60 mg de CaSO₄H₂O, 60 mg de MgSO₄H₂O y 4 mg de KCl, éstos se agitarán en un matraz colocado en un agitador magnético, después se ajustará el pH a 7.5 con HCl o KOH.



10. GLOSARIO.

Absorción: Proceso de asimilación. En el caso de personas y animales, la absorción es el proceso por el cual una sustancia entra en el cuerpo a través de ojos, piel, estómago, intestinos o pulmones.

Adsorción: Proceso por el cual átomos, iones o moléculas son atrapados o retenidos en la superficie de un material, es decir la acumulación de una sustancia en una determinada superficie interfacial entre dos fases.

Ambiente: Hace alusión a las condiciones del entorno, como temperatura y el ruido. En el caso del aire, el aire ambiente se refiere con frecuencia al aire del exterior en oposición al aire en interiores.

Amíctico: Se refiere a la reproducción partenogenética.

Bioacumulación: Acumulación neta, con el paso del tiempo, de metales (u otras sustancias persistentes) en un organismo a partir de fuentes tanto bióticas (otros organismos) como abióticas (suelo, aire y agua).

Biomagnificación: Tendencia de algunos productos químicos a acumularse a lo largo de la cadena trófica, exhibiendo concentraciones sucesivamente mayores al ascender el nivel trófico. La concentración del producto en el organismo consumido es mayor que la concentración del mismo producto en el organismo consumido.

Cadena trófica: Serie o conjunto de organismos, cada uno de los cuales come o degrada al precedente. Representa la dependencia alimenticia de unos organismos hacia otros en cualquier comunidad natural. Rara vez hay más de seis eslabones en la cadena.

Comunidades: Conjunto de poblaciones de seres vivos pertenecientes a diferentes especies y que interaccionan entre si y con el medio, conformando un ecosistema.

Concentración: La cantidad de un producto o de una sustancia química presente en una cantidad dada en suelo, agua, aire, alimento, sangre, cabello, orina, aliento o cualquier otro medio. La concentración se expresa frecuentemente en miligramos por metro cúbico (mg/m^3), partes por millón (ppm), partes por mil millones (ppb, del inglés “parts per billion”) o en porcentaje (%).

Contaminación: Cualquier sustancia que por su concentración posee efectos negativos sobre el entorno, o bien la introducción de una sustancia o forma de energía que puede provocar algún daño o desequilibrio, irreversible o no, en el medio inicial.

Exposición aguda: Contacto con una sustancia que ocurre una sola vez o durante un período de tiempo corto.

Exposición crónica: Contacto con una sustancia que se produce durante un período largo de tiempo.

Hábitat. Lugar y condiciones medioambientales en las que suele vivir un organismo concreto.

Mítico: Se refiere a la reproducción sexual.

Rotífero: Rotífero, del latín *rota*, “rueda” y *fera*, “los que llevan”, constituyen un filo de animales pseudocelomados microscópicos (entre 0.1 y 0.5 mm) con unas 1,800 especies que habitan en aguas dulces, tierra húmeda, musgos, líquenes, hongos e incluso agua salada.

Toxicidad: La capacidad o la propiedad de una sustancia de causar efectos adversos sobre la salud. Una dosis tóxica es una cantidad determinada de una sustancia que podría esperarse que, en condiciones específicas, ocasionara daños a un organismo vivo.

Tóxico: Sustancia tóxica que puede causar efectos adversos en los organismos expuestos, como resultado de interacciones fisicoquímicas con sus tejidos.

Zooplankton: Se denomina zooplankton a la fracción del plancton constituida por seres que se alimentan de materia orgánica ya elaborada por ingestión. Está constituido por protozoos, es decir, protistas diversos, fagótrofos que engloban el alimento fagocitándolo. También por larvas de animales más grandes, como esponja, gusanos, equinodermos, moluscos o crustáceos, y de otros artrópodos acuáticos, así como formas adultas de pequeño tamaño de crustáceos —como copépodos o cladóceros—, rotíferos, y fases juveniles de peces (alevines).

11. BIBLIOGRAFÍA.

1. Alvarado-Flores, J., Montoya-García M. Del R., Ventura Juárez J. and R. Rico-Martínez. 2009. Immunodetection of Luteinizing Hormone (LH), Follicle-Stimulating Hormone (FSH), Thyroid Stimulating Hormone (TSH) and Prolactin (PRL) in *Brachionus calyciflorus* (Rotifera: Monogononta). *Rev. Biol. Trop.* 57 (4): 1049-1058.
2. Andersen, J.T. and E. Baatrup. 1988. Ultrastructural localization of mercury accumulations in the gills, hepatopancreas, midgut, and antennal glands of the brown shrimp, *Crangon crangon*. *Aquat. Toxicol.* 13, 309-324.
3. APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edn. Washington, DC.
4. Bervoets, L., K. Van Campenhout., H. Reynders., D. Knapen., A. Covaci., and Blust R. 2009. Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Ciprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 72: 720-728.
5. Biesinger, K. E., and Christensen G. M. 1972. Effects of various metals on the survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. *J. Fish. Res. Board Can.* 29: 1691-1700.
6. Brewer, R. 1994. The science of ecology. 2a edition. Ed. Saunders College Publishing. EUA. 89-91.
7. Bryan, G. W., M. Waldichuk., R.J. Pentath., and A. Darracott. 1979. Bioaccumulation of marine pollutants (and Discussion). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 286: 483-505.
8. Burbank, S. y T.W. Snell. 1994. Rapid toxicity assessment using esterase biomarkers in *Brachionus calyciflorus* (Rotifera). *Environmental Toxicology and Water Quality.* 9: 171-178.
9. Chevreuil, M., Blanchard, M., Teil, M.-J., Carru, A.-M., Testard, P., Chesterikoff, A., 1996. Evaluation of the pollution by organochlorinated compounds (polychlorobiphenyls and pesticides) and metals (Cd, Cr, Cu and Pb) in the water and in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas) of the River Seine. *Water Air Soil Pollut.* 88, 371-381.
10. Clason, B., S. Duquesne., M. Liess., R. Schulz., and Zauke G.-P. 2003. Bioaccumulation of trace metals in the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri*

- (Stebbing, 1906): comparison of two compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Aquatic Toxicology*. 65: 117-140.
11. Clemént, P y E. Wurdak. 1991. Rotifera. In Harrison, F. Wy E. E. Ruppert (eds), *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Aschelminthes, Vol. 4.* Wiley-Liss Inc., New York.
 12. Dall, W. and D.J.W. Moriarty. 1983. Functional aspects of nutrition and digestion. In: *The Biology of Crustacea, Vol. 5: Internal Anatomy and Physiological Regulation*, edited by L.H. Mantel. Academic Press, New York, pp. 215-261.
 13. De Forest, D. K., K. V. Brix and Adams W. J. 2007. Assessing metal bioaccumulation in aquatic enviroments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology*. 84: 236-246.
 14. Dobbs, M.G., Cherry D.S., and J. Cairns Jr. 1996. Toxicity and bioaccumulation of selenium to a three trophic level food chain. *Environ Toxicol Chem* 15:340–347.
 15. Finney, L. A. y O´Halloran T. V. 2003. Transition metal speciation in the cell: Insights from the chemistry of metal ion receptors. Review. *Science. Metal: Impacts on Health and the Environment*. 300: 931-936.
 16. Frías-Espericueta, M. G., D. Voltolina, J. I. Osuna-López. 2003. Acute toxicity of copper, zinc, iron, and manganese and of the mixtures copper-zinc and iron-manganese to whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. *Bulleti of Environmental Contamination and Toxicology* 71: 68–74.
 17. Gagneten, A. M. and J.C. Paggi. 2009. Effects of Heavy Metal Contamination (Cr, Cu, Pb, Cd) and Eutrophication on Zooplankton in the Lower Basin of the Salado River (Argentina). *Water Air Soil Pollut*. 198:317–334.
 18. Gallardo, G. W., A. Hagiwara., y T. W. Snell. 2000. GABA enhances reproduction of the rotifer *Brachionus plicatilis* Muller: application to mass culture. *Aquaculture Research* 31: 713-718.
 19. Gama-Flores, J. L., M. E. Castellanos-Páez., S. S. S. Sarma., y Nandini S. 2007. Effect of pulsed exposure to heavy metals (copper and cadmium) on some population variables of *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotifera: Brachionidae: Monogononta). *Hydrobiologia*. 593: 201-208.

20. García-García, G., E.A. Picazo-Páez, S. Nandini, and S.S.S Sarma. 2007. Combined effects of sediment and lead (PbCl₂) on the demography of *Brachionus patulus* (Rotifera: Brachionidae). *Hydrobiologia*. 593:209-218.
21. Garza, A., H. Chavez., R. Vega., y Soto E. 2005. Mecanismos celulares y moleculares de la neurotoxicidad por plomo. *Salud Mental*. 28 (2): 48-58.
22. Gibson, R. and E.L. Barker. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 17, 285-346.
23. Gilbert, I. J. 2004. Females from resting eggs and parthenogenetic eggs in the rotifer *Brachionus calyciflorus*: lipid droplet, starvation resistance and reproduction. *Freshwater Biology*.49: 1505-1515.
24. Gilbert, J. J. 2003. Environmental and endogenous control of sexuality in rotifer life cycle: developmental and population biology. *Evolution and Development*. 5(1): 19-24.
25. Gilbert, J.J., and Walsh E. J. 2005. *Brachionus calyciflorus* is a species complex: Mating behavior and genetic differentiation among four geographically isolated strains. *Hydrobiologia*. 546: 257-265.
26. Gnassia-Barelli, M. and M. Romeo. 1993. Some aspects of lead ecotoxicology in the marine Environment. Minireview. *Aquatic Toxicology*. 26:163-170.
27. Grosell, M., R. M. Gerdes., and Brix K. V. Chronic toxicity of lead to three freshwater invertebrates- *Brachionus calyciflorus*, *Chironomus tentans*, and *Lymnaea stagnalis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25: 97-104.
28. Guisande, C., and Serrano L. 1989. Analysis of protein, carbohydrate and lipid in rotifers. *Hydrobiologia*. 186/187: 339-346.
29. He, L., A. T. Poblenc., Medrano C. J. and Fox D. A. 2000. Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of biological chemistry*. 275 (16): 12175-12184.
30. Hernández, SF. 2006. Desarrollo de una prueba de toxicidad por exposición crónica a cinco tóxicos que inhiben la tasa intrínseca de crecimiento *r* del rotífero dulceacuícola *Lecane quadridentata*. Aguascalientes, México. Tesis. Maestría en ciencias área toxicología. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México.
31. Hernández-Flores, S. and R. Rico-Martínez. 2006. Study of the Effects of Pb and Hg Toxicity Using a Chronic Toxicity Reproductive 5-Day Test with the

- Freshwater Rotifer *Lecane quadridentata*. Environmental Toxicology 21:533-540.
32. Herold, R., and Meadow N. D. 1970. Age-related changes in ultrastructure and histochemistry of rotiferan organs. Journal Ultrastructure Research. 33: 203-218.
 33. Hochberg, R. 2006. On the serotonergic nervous system of two planktonic rotifers, *Conochilus coenabasis* and *C. dossuarius* (Monogononta, Flosculariacea, Conochilidae). Zoologischer Anzeiger 245: 53-62.
 34. Hochberg, R., y A. O. Gurbuz. 2007. Functional morphology of somatic muscles and anterolateral setae in *Filinia novaezealandiae* Shield and Sanoamuang, 1993 (Rotifera). Zoologischer Anzeiger 246: 11-22.
 35. Hong-Wen, S., D. Shu-Gui.,H. Guo-Lan H. 2001. Bioaccumulation of butyltins via an estuarine food chain. Water Air Soil Pollut 125:55-68.
 36. Hopkin, S.P. and J.A. Nott. 1979. Some observations on concentrically structured, intracellular granules in the hepatopancreas of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). J. Mar. Biol. Assoc. UK 59, 867-877.
 37. Jian-Ping, Y., and Shun-Jin C. 1997. Ultrastructure of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia. 358: 95-103.
 38. Joaquim-Justo, C., V. Gosselain., J.P. Descy., and J.P. Thome. 1995. Relative importance of the trophic and direct pathways on PCB contamination in the rotifer species *Brachionus calyciflorus* (Pallas). Hydrobiologia 313/314:249-257.
 39. Kakkar, P., and Jaffery F. N. 2005. Biological markers for metal toxicity. Environmental Toxicology and Pharmacology. 19: 335-349.
 40. Khale, J. and Zauke G.-P. 2002. Bioaccumulation of trace metals in the copepod *Calanoides acutus* from the Weddell Sea (Antarctica): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. Aquatic Toxicology. 59: 115-135.
 41. Kleinow, E., H. Wratil., K. Kühle., and Esch B. 1991. Electron microscope studies of the digestive tract of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). Zoomorphology. 111: 67-80.
 42. Kleinow, W. 1993. Biochemical studies on *Brachionus plicatilis*: hydrolytic enzymes, integument proteins and composition of trophic. Hydrobiologia. 255/256: 1-12.

43. Kleinow, W. and Wratil H. 1995. SEM of internal structures of *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Hydrobiologia*. 313/314: 129-132.
44. Koehler, J. K. 1965. A fine-structure study of the rotifer integument. *Journal Ultrastructure Research*. 12: 113-134.
45. Koste, W. 1978. *Rotatoria. Die Rädertiere Mitteleuropas*. 2 vols, Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart, Alemania.
46. Kotikova, E. A. 1995. Localization and neuroanatomy of catecholaminergic neurons in some rotifers species. *Hydrobiologia* 313/314. 123-127.
47. Kotikova, E. A., O. I., Raikova, M. Reuter y M. K. S. Gustafsson. 2005. Rotifer nervous system visualized by FMRF amide and %-HT immunocytochemistry and confocal laser scanning microscopy. *Hydrobiologia* 546: 239-248.
48. Kotikova, E.A. 1998. Catecholaminergic neurons in the brain of rotifers. *Hydrobiologia* 387/388: 135-140.
49. Kotikova, E.A., Raikova, O.I., Flyatchinskaya, L.P., Reuter, M., y M.K.S. Gustafsson. 2001. Rotifer muscles as revealed by phalloidin-TRITC staining and confocal scanning laser microscopy. *Acta Zoologica*. 82: 1-9.
50. Lim, P.-E., Lee, C.-K., Din, Z., 1998. The kinetics of bioaccumulation of zinc, copper, lead, and cadmium by oysters (*Crassostrea iredalei* and *C. belcheri*) under tropical field conditions. *Sci. Total Environ*. 216, 147–157.
51. Lydia, A. F., and O'Halloran T. V. 2003. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors: a review. *Metal: Impacts on Elath and the environment*. 300: 931-936.
52. Marshall, A. J, y W. D. Williams. 1980. *Zoología de Invertebrados*. Reverte. Barcelona. 298-305 pp.
53. Mathis, B.J., Cummings, T.F., 1973. Selected metals in sediments, water, and biota in the Illinois River. *J. Water Pollut. Cont. Fed.* 45, 1573–1583.
54. Mejía J.J., F. Díaz-Barriga, J. Calderón, C. Ríos, y Jiménez-Capdeville M.E. 1997. Effects of lead-arsenic combined exposure on central monoaminergic systems. *Neurotoxicol Teratol*. 9:489-497.
55. Melone, G., y M. Ferraguti. 1993. The Spermatozoon of *Brachionus plicatilis* (Rotifera, Monogononta) UIT Some on Sperm Ultrastructure in Rotifera. *Acta Zoológica (Stockholm)* 75: 81-88.
56. Mikhailovich, N. M. 1976. *Fundamentos de la morfología comparada de los invertebrados*. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Argentina. 466 pp.

57. Nichols, H. W. 1973. Growth media-freshwater. In J. R. Stein (ed.), "Handbook of physiological methods". Cambridge University Press. 7-24.
58. Nogrady, T y M. Alai. 1983. Cholinergic neurotransmission in rotifers. *Hidrobiología* 104: 149-153.
59. Nogrady, T., R. L., y T. W. Snell. 1993. "Guides to the identification of the microinvertebrates of the continental waters of the world 4: Rotifera. Volume 1: Biology, Ecology and Systematics. SPB Academic Publishing. Holanda. 39-44.
60. NOM-117-SSA1-1994. 1994. Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Método de prueba para la determinación de Cd, As, Pb, Sn, Cu, Fe, Zn, y Hg en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrofotometría de absorción atómica. Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA), México.
61. Nordberg, G. 1998. Metales: Propiedades químicas y toxicidad. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Editorial Chantal Dufrense, BA. España. 63.1-63.51
62. Odum, E. P. 1986. Fundamentos de Ecología. Interamericana, México. D. F. 228-231.
63. Oie, G., and Olsen Y. 1997. Protein and lipid content of the rotifer *Brachionus plicatilis* during variable growth and feeding condition. *Hydrobiologia*. 358: 251-258.
64. Paquin, PR., Farley K, Santore RC, Kavvadas CD, Mooney KG, Winfield RP, Wu K-B, Di Toro DM. 2003. Metals in aquatic systems: A review of exposure, bioaccumulation, and toxicity models. Pensacola, Florida: SETAC Press. 140 p.
65. Pérez- Legaspi, I. A., y R. Rico-Martínez. 1998. Effect of temperature and food concentration in two species of littoral rotifers. *Hydrobiologia*. 387/388: 341-348.
66. Perez, AL. 2009. Estudio de los efectos de dos pesticidas en el sistema colinérgico en especies selectas de rotíferos dulceacuícolas. Aguascalientes, México. Tesis. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México.
67. Pérez-Legaspi I. A., M. R. Montoya-García, J. L. Quintanar, E. Salinas, y R. Rico-Martínez. 2008. Identification of exocytotic membrana proteins in three rotifer species. *Hydrobiologia* 600: 147-154.

68. Pineda, Rosas. A., G. E.Santos-Medrano., M. F. Zavala-Reynoso, y R. Rico-Martínez. 2005. Identification of acetilcholinesterase receptors in Rotifera. *Hidrobiology*. 546: 249-253.
69. Popham, J.D., D'Auria, J.M., 1982. Effects of season and seawater concentrations on trace metal concentrations in organs of *Mytilus edulis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11, 273–282.
70. Pourriot, R., y W. T. Snell. 1983. Resting eggs in rotifers. *Hidrobiología* 104: 213-224.
71. Pray, F. A. 1965. Studies of the early development of the rotifer *Monostyla cornuta* Müller. *Transaction of the American Microscopical Society* 84: 210-216.
72. Purcell, J. E. y Macmillan D. L. 1996. Zooplankton sensory ecology and physiology, hartline DK lenz PH. Garden and Breach Publishers. E.U.A. 255-265 pp.
73. Rainbow, P.S. and S.L. White. 1989. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia* 174:245-262.
74. Raineri, M. 1984. Histochemical investigation of Rotifera Bdelloidea. I. Localization of cholinesterase activity. *The Histochemical Journal* 16: 601-616.
75. Ricci, C. y Balsamo M. 2000. The biology and ecology of lotic rotifers and gastrotrichs. *Freswather Biology*. 44: 15-28.
76. Rico-Martínez. R., y Dodson S. I. 1992. Culture of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. *Aquaculture*. 105: 191-199.
77. Rubio, IF. 2009. Estudio de los niveles de plomo en la presa el Niágara y su probable biomagnificación. Aguascalientes, México. Tesis. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México.
78. Rubio-Franchini, I. J.M. Saavedra, and R. Rico-Martínez. 2008. Determination of Lead in Samples of Zooplankton, Water, and Sediments in a Mexican Reservoir: Evidence for Lead Biomagnification in Lower/Intermediate Trophic Levels? *Environmental Toxicology* 10.1002/tox.
79. Sanin, LH., and T. González-Cossio. 1998. Acumulación de Plomo en Hueso y sus Efectos en la Salud. *Boletín de Salud Pública* 40:359–368.

80. Schuhmacher, M., Domingo, J.L., Llobet, J.M., Corbella, J., 1995. Variations of heavy metals in water, sediments, and biota from the Delta of Ebro River, Spain. *J. Environ. Sci. Health A30* (6), 1361–1372.
81. Snell, T. W., y Seltzer. C. P. 2005. Removal of Surface Glycoproteins and transfer among *Brachionus* species. *Hydrobiologia*. 1(8): 267-274.
82. Snell, T.W., and B.D Moffat. 1992. A 2-d life cycle test with the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Environ Toxicol Chem* 11:1249–1557.
83. Snell, T.W., y C.R. Janssen. 1995. Rotifers in ecotoxicology: a review. *Hydrobiologia* 313/314: 231-247
84. Stokes, P. M. 1981. Multiple metal tolerance in copper tolerant green algae, *J. Plant Nutr.* 3 (1-4): 667-678.
85. Struzynska, L., and Sulkowski G. 2004. Relationships between glutamine, glutamate, and GABA in nerve endings under Pb-toxicity conditions. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 98: 951-958.
86. Talbot, V., 1987. Relationship between lead concentrations in seawater and in the mussel *Mytilus edulis*: a water quality criterion. *Mar. Biol.* 94, 557–560.
87. Thorp, J. H. and A. Covich. 1991. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Ed. Academic Press. 205-209.
88. Trocine, R.P., Trefry, J.H., 1996. Metal concentrations in sediment, water and clams from the Indian River Lagoon, Florida. *Mar. Pollut. Bull.* 32 (10), 754–759.
89. U.S. Environmental Protection Agency. 1985. “Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms”. In W. H. Peltier & Weber, C. I. (eds), EPA-600/485-013. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
90. U.S. Environmental Protection Agency. 1986. Superfund record of decision (EPA Region 5). Forest waste disposal site, Genesee County, Michigan. EPA-PB87-189890, U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, USA
91. Vijayan, E. 1985. Role of neurotransmitter and neuropeptides in the control of gonadotropin release: A review. *Biosciences Journal* 2: 207-213.
92. Villarreal-Trevino, C.M., Obregon-Morales, M.E., Lozano-Morales, J.F., Villegas-Navarro, A., 1986. Bioaccumulation of lead, copper, iron, and zinc by fish in a transect of the Santa Catarina River in Cadereyta Jiminez, Nuevo Leon, Mexico. *Bull. Environ. Toxicol. Chem.* 37, 395–401.

93. Vogt, G. and Quinitio E. 1993. Accumulation and excretion of metal granules in the prawn, *Penaeus monodon*, exposed to water-borne copper, lead, iron and calcium. *Aquatic toxicology*. 28: 223-241.
94. Wallace, R.L, T. W. Snell., C. Ricci, y T. Nogrady. 2006. Rotifera. Volumen 1: Biology, Ecology and Systematics.

