



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA

“DETECCIÓN DEL EFECTO DE DISRUPTORES ENDOCRINOS Y METALES
EN LA REPRODUCCIÓN DE ROTÍFEROS DULCEACUÍCOLAS”

PRESENTA

M. en C. Jesús Alvarado Flores

PARA OPTAR POR EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

Dr. Roberto Rico Martínez - Universidad Autónoma de Aguascalientes

Dr. Marcelo Silva Briano - Universidad Autónoma de Aguascalientes

COMITÉ TUTORAL

Dr. Ignacio Alejandro Pérez Legaspi - Instituto Tecnológico de Boca del Río

Dr. Isidoro Rubio Franchini - Laboratorio Estatal de Salud Pública

Dr. Javier Ventura Juárez - Universidad Autónoma de Aguascalientes

Aguascalientes, Ags. Febrero de 2014.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química



ANIVERSARIO
uaa

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos
Decano del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

Estimado M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos:

Por medio de este mensaje damos el visto bueno para que se imprima la tesis de doctorado titulada **"DETECCIÓN DEL EFECTO DE DISRUPTORES ENDOCRINOS Y METALES EN LA REPRODUCCIÓN DE ROTÍFEROS DULCEACUÍCOLAS"**, del M. en C. Jesús Alvarado Flores quien es alumno regular de nuestro programa de Doctorado en Ciencias Biológicas. Cabe mencionar que Jesús ya cumplió con el requisito de publicar un artículo científico como primer autor. Tal es el caso de la siguiente publicación:

Alvarado-Flores J., R. Rico-Martínez, J. Ventura-Juárez, M. Silva-Briano, I. Rubio-Franchini. 2012. Bioconcentration and localization of lead in the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas 1677 (Rotifera: Monogononta). *Aquatic Toxicology* 109: 127– 132.

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

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags., a 17 de enero de 2014
"SE LUMEN PROFERRE"

Co-Director de tesis
Dr. Roberto Rico Martínez
Profesor-Investigador Titular "C"
Centro de Ciencias Básicas
Departamento de Química
Tel. (449) 9108420
Fax (449) 9108401
E-mail: rrico@correo.uaa.mx

Co-Director de tesis
Dr. Marcelo Silva Briano
Profesor-Investigador Titular "C"
Centro de Ciencias Básicas
Departamento de Biología
Tel. (449) 9107400 Ext. 347
Fax (449) 9108401
E-mail: msilva@correo.uaa.mx

Dr. Ignacio Alejandro Pérez Legaspi (ITBOCA)
Profesor-Investigador
Responsable de Laboratorio de Alimento Vivo
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Instituto Tecnológico de Boca del Río Km. 12, Carr. Veracruz- Córdoba, CP 94290
Boca del Río, Veracruz, México.
Tel. (229) 986-0189 Ext. 129
E-mail: ialegaspi@yahoo.com





Centro de Ciencias Básicas

**M. en C. JESÚS ALVARADO FLORES
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS
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 caso práctico titulado: **"DETECCIÓN DEL EFECTO DE DISRUPTORES ENDOCRINOS Y METALES EN LA REPRODUCCIÓN DE ROTÍFEROS DULCEACUÍCOLAS"**, 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.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 17 de enero de 2014
"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Fisiología y Farmacología
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Interesado (a)
JJRG,mjda



Agradecimientos.

Con paz y amabilidad y un gran respeto, agradezco a mi madre, padre y mi familia, que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Gracias Dr. Roberto Rico Martínez, Dr. Marcelo Silva Briano, y Dr. Javier Ventura Juárez, por ser un ejemplo e inspiración en mis ideales científicos y personales, por su apoyo incondicional y sobre todo su amistad. Gracias por enseñarme a recorrer el camino correcto.

Gracias Dr. Alejandro Pérez Legaspi y Dr. Isidoro Rubio Franchini por sus consejos y aciertos en el desarrollo de la investigación. Les agradezco el tiempo que me obsequiaron, en el desarrollo experimental. Sus observaciones y puntos de vista me dieron grandes ideas, para mí presente y mí futuro.

Gracias Maestra Araceli Adabache Ortiz por su gran colaboración y observaciones. Le agradezco especialmente por la paciencia y su entusiasmo al realizar las fotografías de microscopía electrónica. Muchas gracias por su amistad, personalmente admiro su trabajo y dedicación en la obtención de fotografías de zooplancton.

Gracias amigos y compañeros del laboratorio de morfología, ecología, 60, por dejarme compartir con ustedes esta travesía, que día a día fue siempre una aventura inolvidable, entre reactivos, cristalería, microscopios, microorganismos y muchas cosas más. Gracias a mis profesores: Dr. Francisco Morales, Dra. Nora Vasco, Dr. Felipe Tafoya. Gracias Conacyt por la beca otorgada. Gracias UAA. Gracias Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas. Gracias Dra. Consolación. Muchas Gracias Paola Quezada.

Con especial agradecimiento, a su paciencia y comprensión, preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mío. Por tu increíble alegría, bondad y sacrificio me inspiraste a ser mejor para tí, ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de tí, gracias por estar siempre a mi lado, Shantal. Con todo mi amor y cariño te agradezco la luz y paz que le das a mis días.

Finalmente allí, rodeado de buenas gentes que me albergaron, repasé el relato de esta aventura. Es exacto. No se ha omitido en él ni un hecho, ni se ha exagerado un solo detalle. Es la narración fiel de la inverosímil expedición realizada en un elemento inaccesible al hombre, pero cuyo itinerario lo allanará algún día el progreso. Julio Verne.



INDICE GENERAL.

Indice General	1
Indice de Cuadros	8
Indice de Figuras	9
Resumen	15
Abstract	16
1. Introducción.	17
1.1 Contaminación ambiental por Plomo, Zinc, Arsénico, Vinclozolin, FSH y LH.	19
1.2 Efectos adversos de metales pesados y el fungicida vinclozolin sobre la expresión genética y el daño epigenético (herencia transgeneracional).	21
1.3 Mecanismos tóxicos de los metales Arsénico, Plomo, Zinc y el fungicida Vinclozolin.	23
1.3.1 Arsénico.	23
1.3.2 Plomo.	24
1.3.3 Zinc.	26
1.3.4 Vinclozolin.	27
1.3.5 Hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).	28
1.4 Sistema de señalización química en rotíferos.	28
1.5 Modelo de secreción endocrina en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	36
1.6 Efectos adversos del Arsénico, Plomo, Zinc y Vinclozolin en el sistema endocrino de vertebrados e invertebrados.	38

1.7 Regulación celular de las metalotioneínas.	39
1.8 Metales y sus efectos adversos en rotíferos: CL ₅₀ y CE ₅₀ .	44
2. Justificación	45
3. Hipótesis de trabajo	45
4. Objetivo general.	45
4.1 Objetivos particulares	46
5. Metodología.	46
5.1 Cultivo de rotíferos.	46
5.2 Pruebas Toxicológicas.	46
5.2.1 Modelo de disrupción endocrina de acuerdo a Preston <i>et al.</i> , (2000).	47
5.2.2 Pruebas de comportamiento sexual de acuerdo a Snell y DesRosiers (2008).	47
5.2.3 Pruebas de fertilización de acuerdo a Yang y Snell (2010).	47
5.3 Detección de Metalotioneinas.	49
5.3.1 Extracción de ADN, amplificación y purificación de un fragmento del gen MTF-1 y COX1 en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	49
5.3.1.1 Protocolo de extracción de ADN en rotíferos, acorde al kit de purificación para ADN genómico #KO512 de Fermentas.	50
5.3.1.2 Condiciones de amplificación de los genes COX1 y MTF-1, mediante el kit PCR Mix (2X) #KO171 de Fermentas.	50
5.3.2 Inclusión de rotíferos en parafina e inmunodetección de metalotioneinas.	51
5.3.3 Cuantificación de proteínas.	51
5.3.4 Cuantificación de Plomo en extractos de proteínas, usando el colorante	51

especifico Leadmium Green®.

5.3.5 Detección de plomo intracelular In Vivo por fluorescencia empleando el colorante Leadmium Green® AM, en *Brachionus calyciflorus*. 52

5.3.6 Determinación de los factores de bioconcentración del plomo en el ensayo reproductivo de 4 días. 53

5.4 Análisis de sustancias químicas en el agua de rotíferos y extractos de rotíferos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. 54

5.4.1 Experimentos de competencia inter específica de especies de rotíferos dulceacuícolas; *B. calyciflorus* versus *Lecane quadridentata*. 54

5.5 Análisis Morfológico. 55

5.6 Análisis Estadístico. 56

6. Resultados. 58

6.1 Caracterización morfológica del rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville Florida. 58

6.1.1 Estudio de la reproducción sexual de especies potenciales de rotíferos dulceacuícolas para la evaluación de tóxicos con efectos de disrupción endocrina. 59

6.2 Caracterización genética del rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville Florida. 64

6.3 Caracterización toxicológica en el rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville Florida. 67

6.3.1 Efectos adversos de los metales: plomo (Pb), arsénico (As) y zinc (Zn), en la reproducción asexual y sexual del rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville Florida. 68

6.3.1.1 Efecto de los metales Pb, As y Zn en la tasa intrínseca de crecimiento de 68

hembras y machos.	
6.3.1.1.1 Plomo.	68
6.3.1.1.2 Arsénico.	69
6.3.1.1.3 Zinc.	71
6.3.1.2 Efecto del Pb, As y Zn en la tasa de producción de hembras con huevos partenogénéticos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados.	72
6.3.1.2.1 Plomo.	72
6.3.1.2.2 Arsénico.	73
6.3.1.2.3 Zinc.	74
6.3.1.3 Efecto del Pb, As y Zn en la tasa de producción de huevos partenogénéticos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados.	75
6.3.1.3.1 Plomo.	75
6.3.1.3.2 Arsénico.	77
6.3.1.3.3 Zinc.	78
6.3.3 Efectos adversos del disruptor endocrino vinclozolin (Vz) y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) en la reproducción asexual y sexual del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> cepa Gainesville Florida.	79
6.3.3.1 Efecto del disruptor endocrino vinclozolin (Vz) y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) en la tasa intrínseca de crecimiento de hembras y machos.	79
6.3.3.1.1 Vinclozolin.	79

6.3.3.1.2 Hormona luteinizante.	81
6.3.3.1.3 Hormona folículo estimulante.	82
6.3.3.2 Efecto del disruptor endocrino vinclozolin (Vz) y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) en la tasa de producción de hembras con huevos partenogénicos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados.	83
6.3.3.2.1 Vinclozolin.	83
6.3.3.2.2 Hormona luteinizante.	85
6.3.3.2.3 Hormona folículo estimulante.	86
6.3.3.3 Efecto del disruptor endocrino vinclozolin (Vz) y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) en la tasa de producción de huevos partenogénicos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados.	87
6.3.3.3.1 Vinclozolin.	87
6.3.3.3.2 Hormona luteinizante.	89
6.3.3.3.3 Hormona folículo estimulante.	90
6.3.4 Efectos adversos de metales como el plomo (Pb), arsénico (As), y zinc (Zn), del disruptor endocrino vinclozolin (Vz) y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) sobre la cópula y fertilización del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> cepa Gainesville Florida.	91
6.3.4.1 Fertilización.	91
6.3.4.2 Cópula	93
6.3.5 Anormalidades morfológicas ocasionadas por la exposición crónica del	94

disruptor endocrino vinclozolin y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) en el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

6.3.5.1 Deformaciones en hembras por exposición al Vinclozolin.	94
6.3.5.1.2 Fotografías en microscopio óptico de hembras deformes del rotífero dulceacuícola <i>B. calyciflorus</i> en la exposición crónica al vinclozolin (1.2 mg/L).	104
6.3.5.1.3 Análisis de organismos anormales producidos por intoxicación crónica al vinclozolin en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> por microscopia electrónica de barrido.	108
6.3.5.2 Deformaciones en hembras por exposición a la hormona luteinizante.	111
6.3.5.3 Deformaciones en hembras por exposición a la hormona folículo estimulante.	112
6.4 Detección de Metalotioneínas.	116
6.4.1 Inmunodetección de metalotioneínas en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	116
6.4.2 Determinación de los factores de bioconcentración (FBCs) del plomo en el ensayo reproductivo de 4 días.	118
6.4.3 Cuantificación de Proteínas Totales en Rotíferos	119
6.4.4 Cuantificación de Plomo en extractos de proteínas de rotíferos usando el colorante específico Leadmium Green®	120
6.4.5 Análisis de patrones de distribución intracelular de plomo en el rotífero dulceacuícola <i>Brachionus calyciflorus</i> .	121
6.4.6 Diseño de oligonucleótidos, para la amplificación del MTF-1.	122
6.4.7 Extracción de ADN en 7 especies de rotíferos y su amplificación del gen MTF-1.	125

6.5 Análisis de sustancias químicas en rotíferos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	126
6.5.1 Competencia interespecífica en rotíferos.	127
7. Discusión.	129
7.1 Disrupción endocrina en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> por exposición crónica al plomo, zinc, arsénico, vinclozolin, hormona luteinizante y hormona folículo estimulante.	129
7.2 Deformaciones ocasionadas por intoxicación crónica a vinclozolin, hormona luteinizante y la hormona folículo estimulante	135
7.3 Detección de metalotioneínas en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	138
7.4 La reproducción sexual como respuesta al estrés en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	140
8. Conclusión.	143
9. Bibliografía.	146
10. Anexo	158

INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Efectos y mecanismo de acción del Arsénico, Plomo y Zinc en el sistema endocrino en vertebrados e invertebrados (Iavicoli <i>et al.</i> , 2009).	39
Cuadro 2. Evaluación de la toxicidad del plomo (Pb) y zinc (Zn) en distintas especies de rotíferos: (D) Dulceacuícola, (M) Marinas o estuarinas (Rico-Martínez <i>et al.</i> , 2011).	44
Cuadro 3. Longitud y anchura máxima de <i>B. calyciflorus</i> .	59
Cuadro 4. Valores de toxicidad crónica para el plomo, obtenidos en el ensayo reproductivo de 4 días en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	69
Cuadro 5. Valores de toxicidad crónica para el zinc, obtenidos en el ensayo reproductivo de 4 días en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	71
Cuadro 6. Comparación de la longitud máxima y anchura máxima de hembras, machos y huevos normales vs intoxicados con vinclozolin.	98
Cuadro 7. Porcentaje de organismos anormales producidos por intoxicación crónica a vinclozolin (1.2 mg/L) en el rotífero dulceacuícola <i>B. calyciflorus</i> .	99
Cuadro 8. FBCs en hembras y hembra con huevos al día 1, 2, 3 y 4 de exposición crónica al plomo. $CE_{50} = 0.68$ mg/L concentración de exposición.	118
Cuadro 9. Cuantificación de plomo en extractos de proteína de rotífero, expuestos a plomo durante 2h, con una concentración de 3 mg/L de plomo.	120
Cuadro 10. Resultados del análisis espectrofotométrico del ADN de 7 especies de rotíferos dulceacuícolas.	121

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Desarrollo embrionario de *Lecane cornuta*, adaptado de Pray (1965). 31

Figura 2. Ciclo de vida asexual y sexual del rotífero dulceacuícola *Brachionus calyciflorus* (Alvarado-Flores, 2013). 32

Figura 3. Modelo de secreción hormonal en rotíferos (Alvarado-Flores, 2013). 38

Figura 4. Modelo ilustrativo de la función biológica del factor de transcripción de metales (MTF-1). 42

Figura 5. Modelo ilustrativo de como el Zn unido al MTF-1 con sus 6 dominios (dedos de Zinc) se unen al sitio de reconocimiento a metales (MRE), el cual actúa como regulador transcripcional y activador de MT. 43

Figura 6. *Brachionus calyciflorus* 10x. A) Hembra con huevo partenogenético, B) hembra con huevos sexuales no fecundados (origina macho), y C) hembra con huevo sexual fecundado (quiste). 48

Figura 7. Diferentes tipos de huevos en *Brachionus calyciflorus*. A) huevo partenogenético, B) huevo sexual no fecundado (que origina macho), y C) huevo sexual fecundado (quiste) 10x. 48

Figura 8. Macho de la especie *Brachionus calyciflorus* 40x. 49

Figura 9. Longitud máxima y anchura máxima en el rotífero *Brachionus calyciflorus* 10x. 56

Figura 10. Fotografías de hembras, machos, huevos partenogenéticos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados del rotífero *B. calyciflorus*. 58

Figura 11a. Fotogramas de los videos obtenidos de comportamiento sexual de los rotíferos *E. brachionus* y *C. catellina*. 61

Figura 11b. Fotogramas de los videos obtenidos de comportamiento sexual de los rotíferos *B. araceliae*, *B. quadridentatus*. 62

Figura 11c. Fotografías al microscopio electrónico de barrido de rotíferos dulceacuícola cultivados en el laboratorio como especies potenciales para 63

estudios de reproducción sexual.

Figura 12. Extracción de ADN, amplificación (COX1) y purificación del gen COX1 (COX1-P) en el rotífero *B. calyciflorus*. 65

Figura 13. A) Árbol filogenético del rotífero *Brachionus calyciflorus*. 66

Figura 14. Porcentaje de identidad y divergencia de nuestra secuencia del gen COX1 (58.-COX-G_HCO2198) obtenida del rotífero *B. calyciflorus*. 67

Figura 15. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras y machos del rotífero *Brachionus calyciflorus* expuestos al plomo (Pb) durante 4 días. 69

Figura 16. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras y machos del rotífero *Brachionus calyciflorus* expuestos al arsénico (As) durante 4 días. 70

Figura 17. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras y machos del rotífero *Brachionus calyciflorus* expuestos al zinc (Zn) durante 4 días. 72

Figura 18. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogenéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestos al plomo (Pb) durante 4 días. 73

Figura 19. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogenéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestos al arsénico (As) durante 4 días. 74

Figura 20. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogenéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestos al zinc (Zn) durante 4 días. 75

Figura 21. Tasa de producción de huevos partenogenéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos al plomo (Pb) durante 4 días. 76

Figura 22. Tasa de producción de huevos partenogenéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos al arsénico (As) durante 4 días. 77

Figura 23. Tasa de producción de huevos partenogénéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos al zinc (Zn) durante 4 días.	78
Figura 24. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras (ht) y machos (mt) del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> expuestos a vinclozolin (Vz) durante 4 días.	80
Figura 25. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras (ht) y machos (mt) del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> expuestos a la hormona luteinizante (LH) durante 4 días.	81
Figura 26. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras (ht) y machos (mt) del rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> expuestos a la hormona folículo estimulante (FSH) durante 4 días.	82
Figura 27. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogénéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestos al vinclozolin (Vz) durante 4 días.	84
Figura 28. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogénéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestos a la hormona luteinizante (LH) durante 4 días.	85
Figura 29. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogénéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestos a la hormona folículo estimulante (FSH) durante 4 días.	86
Figura 30. Tasa de producción de huevos partenogénéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos al vinclozolin (Vz) durante 4 días.	88
Figura 31. Tasa de producción de huevos partenogénéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos a la hormona luteinizante (LH) durante 4 días.	89
Figura 32. Tasa de producción de huevos partenogénéticos (hp), huevos sexuales	90

no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos a la hormona folículo estimulante (FSH) durante 4 días.

Figura 33. Ensayo de fertilización en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. 92

Figura 34. Ensayo cópula en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. 93

Figura 35. Hembra anormal originada de quistes obtenidos en un ensayo reproductivo de 4 días, la concentración de exposición fue de 1.2 mg/L de vinclozolin. 96

Figura 36. Comparación morfológica de las hembras anormales (expuestas a vinclozolin) vs hembras y machos normales. 97

Figura 37 Alteraciones morfológicas en hembras del rotífero *Brachionus calyciflorus* por exposición crónica al vinclozolin a una concentración de 1.2 mg/L. 98

Figura 38. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras (ht) y machos (mt) del rotífero *Brachionus calyciflorus* sin exponer al vinclozolin (Vz) durante 4 días. 100

Figura 39. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogenéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), sin exponer al vinclozolin (Vz) durante 4 días. 101

Figura 40. Tasa de producción de huevos partenogenéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) sin exponer al vinclozolin durante 4 días. 102

Figura 41. Porcentaje de eclosión de quistes producidos con el disruptor endocrino vinclozolin (1.2 mg/L Vz) y la hormona folículo estimulante (0.0001 mg/ml FSH). 103

Figura 42a. Organismos anormales producidos por intoxicación crónica al vinclozolin (1.2 mg/L) en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, imágenes obtenidas al microscopio óptico. 105

Figura 42b. Organismos anormales producidos por intoxicación crónica al vinclozolin (1.2 mg/L) en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, imágenes obtenidas al microscopio óptico. 106

Figura 42c. Organismos anormales producidos por intoxicación crónica al vinclozolin (1.2 mg/L) en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> , imágenes obtenidas al microscopio óptico.	107
Figura 43a. Imágenes obtenidas al microscopio electrónico de barrido de las alteraciones morfológicas ocasionadas por exposición crónica al vinclozolin (1.2 mg/L), en el rotífero dulceacuícola <i>B. calyciflorus</i> .	109
Figura 43b. Imágenes obtenidas al microscopio electrónico de barrido de las alteraciones morfológicas ocasionadas por exposición crónica al vinclozolin (1.2 mg/L), en el rotífero dulceacuícola <i>B. calyciflorus</i> .	110
Figura 44. Hembra anormal producida por exposición crónica al la hormona luteinizante (LH), la concentración de exposición fue de 0.0001 mg/ml LH, durante 4 días.	112
Figura 45. Hembra anormal producida por exposición crónica al la hormona folículo estimulante (FSH), la concentración de exposición fue de 0.0001 mg/ml LH, durante 4 días.	114
Figura 46. Hembra anormal capaz de producir huevos partenogénéticos, 72 horas después de ser encontrada en el ensayo reproductivo de 4 días.	114
Figura 47. Hembra deforme con el pie unido a la corona, la hembra anormal fue producida por exposición crónica al la hormona folículo estimulante (FSH), la concentración de exposición fue de 0.0001 mg/ml LH, durante 4 días.	114
Figura 48. Tasa de producción de hembras (ht), tasa de producción de hembras con huevos partenogénéticos (hhp), y tasa de producción de huevos partenogénéticos (hp).	115
Figura 49. . Porcentaje de eclosión de quistes producidos con el disruptor endocrino vinclozolin (1.2 mg/L Vz) y la hormona folículo estimulante (0.0001 mg/ml FSH).	116
Figura 50. Detección de MT por inmunohistoquímica en el rotífero <i>Brachionus calyciflorus</i> .	117
Figura 51. Grafica de calibración para el cálculo de proteína total en muestra de rotíferos.	119

Figura 52. Grafica de cuantificación de plomo en extractos de proteínas de rotíferos. Valor promedio más una desviación estándar.	120
Figura 53. Análisis de patrones de distribución de plomo intracelular en el rotífero <i>B. calyciflorus</i> .	121
Figura 54. Alineamiento múltiple de 7 secuencias del gen MTF-1	122
Figura 55. Amplificación del gen MTF-1 en el rotíferos.	123
Figura 56. Árbol filogenético de nuestra secuencia del gen MTF-1 obtenida del rotífero <i>B. calyciflorus</i>	124
Figura 57. Porcentaje de identidad y divergencia de nuestra secuencia del gen MTF-1 obtenida del rotífero <i>B. calyciflorus</i> .	124
Figura 58. Amplificación del gen MTF-1 en 8 especies de rotíferos dulceacuícolas.	126
Figura 59. Cromatogramas correspondiente a la muestra de agua de rotíferos a las 2 horas y 24 horas de contacto con la fibra.	127
Figura 60a. Producción de quistes por competencia interspecífica entre <i>B. calyciflorus</i> (Bc) y <i>L. quadridentata</i> (Lq).	128
Figura 60b. Producción de hembras y machos por competencia interspecífica entre <i>B. calyciflorus</i> (Bc) y <i>L. quadridentata</i> (Lq).	128

Resumen.

La contaminación por metales y plaguicidas en los ecosistemas acuáticos es una problemática de contaminación ambiental mundial, y los efectos adversos que poseen los tóxicos pueden alterar el equilibrio biológico. Los disruptores endocrinos son compuestos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, acoplamiento, acción o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo que son responsables de mantener la homeostasis, reproducción, desarrollo y comportamiento. Por tal razón se caracterizó el efecto adverso de los metales plomo, arsénico y zinc, el fungicida vinclozolin, y las hormonas luteinizante y folículo estimulante, en la reproducción asexual y sexual, usando una prueba de toxicidad crónica reproductiva de 4 días en el rotífero dulceacuícola *Brachionus calyciflorus*. En esta prueba crónica se tomaron en cuenta variables importantes como; producción de hembras y machos, producción de huevos asexuales y sexuales. Se analizó los efectos adversos en la cópula y fertilización. Se analizaron alteraciones morfológicas inducidas por el vinclozolin y las hormonas. Y finalmente se detectó la expresión de proteínas de estrés a metales (metalotioneínas). Los metales plomo, zinc y arsénico tiene efectos disruptores muy potentes sobre la reproducción asexual y sexual en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. Existe inducción de machos: es mayor por intoxicación a plomo, y en menor medida por arsénico y zinc. Los metales afectan el porcentaje de fertilización y cópula. El plomo afecta el porcentaje de eclosión de huevos sexuales. En cambio el vinclozolin y la hormona luteinizante favorecen la reproducción asexual, y en gran medida la reproducción sexual. Se presenta por primera vez una prueba toxicológica reproductiva crónica (4 días), donde se pueden obtener hembras deformes, por efecto de exposición crónica a vinclozolin y las hormonas (luteinizante y folículo estimulante). En el caso del vinclozolin se puede replicar el experimento para estudios posteriores. Se reporta por primera vez en rotíferos efectos adversos de infertilidad transgeneracional por exposición al vinclozolin y la hormona luteinizante. Y en el caso de la exposición al vinclozolin alteraciones morfológicas capaces de ser heredadas a sus descendientes (herencia transgeneracional). Por lo tanto nuestro ensayo de reproducción crónico a 4 días es una herramienta útil para evaluar el efecto de disruptores endocrinos, la prueba de toxicidad reproductiva de 4 días puede ser empleada para estudios histopatológicos, bioquímicos y genéticos en rotíferos.

Abstract.

The contamination by metals and pesticides in aquatic ecosystems is a global environmental pollution problem, and the adverse effects of toxicants can alter the biological balance. Endocrine disruptors (DE) are one of the most dangerous pollutants that interfere with the synthesis, secretion, transport, action or elimination of natural hormones in the body that are responsible for maintaining homeostasis, reproduction, development and behavior. For this reason, I study the adverse effect of the metals: lead, arsenic and zinc, the fungicide vinclozolin, and the luteinizing and follicle stimulating hormones, on the asexual and sexual reproduction, using a 4-day reproductive chronic toxicity test. In this chronic test important variables were taken into account such as: a) production of females and males, b) sexual and asexual egg production, c) fertilization, and d) copulation. Morphological alterations induced by vinclozolin and the two hormones tested were analyzed. Metallothionein expression was also studied. The metals lead, zinc and arsenic cause powerful disruption on the asexual and sexual reproduction of the rotifer *Brachionus calyciflorus*. There is induction of males by metals. The effect of lead is greater, and to a lesser extent by arsenic and zinc. Metals affect the percentage of fertilization and copulation. Lead affects the percentage of sexual egg hatching. On the other hand, vinclozolin and luteinizing hormone favor largely sexual and asexual reproduction. These EDs increase significantly male production, reaching very high population values. However, this large amount of males and females is beneficent to the population in the case of vinclozolin exposure, because there is significant increase of cyst production. However, that does not happen with metals. It is presented for the first time a reproductive toxicology chronic test (4 days), where deformed females are produced, due to chronic exposure to vinclozolin and luteinizing and follicle-stimulating hormones. I reported for the first time in rotifers potential adverse effects of transgenerational infertility by exposure to the vinclozolin and luteinizing hormone. And in the case of exposure to the vinclozolin morphological alterations can be inherited to their descendants (transgenerational inheritance). Therefore, the chronic reproduction test (4 days) used in this work is a useful tool to evaluate the effect of endocrine disruptors, and can be used for histopathology, biochemical and genetic studies in rotifers.

1. Introducción.

Los disruptores endocrinos (DE) son compuestos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, acoplamiento, acción o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo que son responsables de mantener la homeostasis, reproducción, desarrollo y comportamiento (USEPA, 2011). Estos compuestos hoy en día son de interés para la ciencia y su estudio es de vital importancia por el potencial toxicológico y ecotoxicológico para el medio ambiente y el ser humano. La exposición a estos compuestos es evidente por la gran distribución en suelo, agua y aire que existe y así lo reportan diversos estudios en el mundo, además de que poseen características fisicoquímicas capaces de resistir su degradación en el medio ambiente y persistir por mucho tiempo, afectando varios niveles organizacionales de la vida en el planeta. Existen alrededor de 38 disruptores endocrinos (DE): los cuales son principalmente fungicidas (adicionalmente a estos 8 resaltan otros estudios a el vinclozolin), herbicidas (8), insecticidas (20) y nematocida (2); hay 7 químicos industriales y 3 metales importantes en cuanto a su toxicidad ambiental, los cuales son: el cadmio, plomo y mercurio; siendo los principales efectos de estos 38 DE : carcinogénesis, muta génesis, inmunotoxicidad, neurotoxicidad, y evidentemente desordenes hormonales (Min Choi *et al.*, 2010; Heinz-R y Triebskorn, 2013).

La contaminación por metales y plaguicidas a los ecosistemas acuáticos es una problemática de contaminación ambiental mundial, y sus efectos en los organismos que allí habitan afectan a todos los seres vivos y sus ecosistemas, por lo cual el estudio de los efectos adversos de metales y plaguicidas son críticos, ya que todos estos efectos pueden repercutir en la salud humana. Muchos de estos tóxicos poseen efectos adversos específicos como: a) alteración del incremento poblacional o decremento de una especie, alterando las redes tróficas donde interactúan estas especies perjudicadas por tóxicos, b) alteraciones morfológicas o daños a tejidos en especies expuestas por periodos crónicos o agudos al contaminante, y c) mortalidad de muchas especies.

Actualmente se usan invertebrados para evaluar en laboratorio o campo los efectos adversos de disruptores endocrinos, y para la determinación de los efectos adversos de DE. Por ejemplo, los rotíferos son invertebrados ampliamente distribuidos, de gran importancia

ecológica, y que desempeñan un papel importante en el transporte de contaminantes acuáticos en las redes alimentarias, se consideran una herramienta útil en la evaluación de riesgos de contaminantes debido a que su sensibilidad a sustancias tóxicas a veces es mayor que Cladóceros y Copépodos (Dahms, 2010).

Los rotíferos son pequeños invertebrados (de 50 a 2000 μm) empleados en ecotoxicología acuática para la evaluación de múltiples contaminantes químicos, físicos y biológicos; así como de muestras complejas ambientales en condiciones de laboratorio y de campo (Rico-Martínez *et al.*, 2011). Sus características biológicas, relevancia ecológica y facilidad de manejo permiten realizar estudios toxicológicos viables por lo que han sido reconocidos como organismos de prueba adecuados para utilizarlos en pruebas de toxicidad (APHA, 1998).

Se han realizado diversos estudios para detectar los efectos adversos de sustancias contaminantes sobre diferentes especies de rotíferos, principalmente efectos en la reproducción asexual, y no tanto en la reproducción sexual. Generalmente se realizan con el fin de estimar los efectos adversos sobre la mortalidad y el incremento poblacional de los rotíferos. En la actualidad se ha incrementado sustancialmente el estudio toxicológico que evalúan la exposición a sustancias químicas y otros tóxicos estresantes, generando valiosas aportaciones en áreas como: ecología, genómica, filogenia, y fisiología de rotíferos. Y finalmente se han abordado el estudio de los efectos de tóxicos en la expresión genética con la finalidad de dilucidar algunos mecanismos moleculares de toxicidad en rotíferos (Dahms *et al.*, 2010).

Dentro de los principales DE que han sido usados para observar los efectos adversos sobre la reproducción en los rotíferos dulceacuícolas resaltan: pentaclorofenol, clorpirifos, diazinón, fenitron, isoprotioloano, metropeno, flutaminda, testosterona, nolilfenol, precoceno, triyodotironina, 20-hidroxiecdisona, ácido gama-aminobutírico, 5-hidroxitriptamina y la hormona juvenil, donde se describen efectos de incremento o decremento de la reproducción sexual y asexual, inhibición de la fertilización, la cópula y efectos adversos sobre crecimiento poblacional (Zou, 2010).

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 excede cierto umbral de concentración, puede producir efectos adversos y por tanto ser considerada como tóxica (Bryan *et al.*, 1979).

1.1 Contaminación ambiental por Plomo, Zinc, Arsénico, Vinclozolin FSH y LH.

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. 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.

El zinc es ubicuo en el medio ambiente, el zinc es liberado al ambiente desde fuentes naturales y antropogénicas, siendo las emisiones antropogénicas mayores que las emisiones de fuentes naturales (ATSDR, 2003). La concentración de zinc en las aguas superficiales es generalmente 0,05 mg/L, pero puede variar desde 0,002 hasta 50 mg/L (ATSDR, 2003). El zinc es un nutriente esencial para todos los animales y es necesario para la función de un gran número de metaloenzimas. No se volatiliza y se deposita principalmente en los sedimentos a través de la adsorción y precipitación. En el agua, contaminada con zinc en el medio ambiente, principalmente prevalece el estado de

oxidación Zn^{+2} pero se disuelve en los ácidos (O'Neil *et al.*, 2001). En la mayoría de las aguas el Zn existe principalmente como la forma hidratada del catión divalente.

El arsénico es un tóxico muy peligroso y más de un millón de personas están expuestas a concentraciones elevadas de arsénico, principalmente a través del agua potable (más de 50 $\mu\text{g/L}$); por ejemplo se han reportado concentraciones de arsénico en Coahuilina de 390 $\mu\text{g/L}$, Jalisco 263 $\mu\text{g/L}$, Durango 725 $\mu\text{g/L}$ y en San Luis Potosí 194 $\mu\text{g/L}$ (Vega-Loyo, 2009). En México los niveles de arsénico en el agua potable son muy variados, y la mayor parte proviene de fuentes naturales, siendo los pozos profundos los más contaminados por estar en contacto directo con un suelo de origen volcánico (Vega-Loyo, 2009).

La contaminación por fungicidas puede ocurrir a través de la tierra, aire y agua, pero principalmente por la contaminación de aguas superficiales, de hecho la evaluación de agua potable para el vinclozolin se lleva a cabo con la detección de los metabolitos de degradación del vinclozolin: M1 (2-(ácido dichlorophenyl)-carbamoxyloxy-2-methyl-3-butenic 3,5) y M2 (3', 5'-dichloro-2-hidroxi-2-methylbut-3-enanilide). La agencia de protección ambiental de estados unidos (USEPA: por sus siglas en ingles United State Environmental Protection Agency) considera al vinclozolin un fungicida tipo dicarboximida actualmente registrado para su uso en los Estados Unidos de América y Europa (USEPA, 2000). Puede ser transportado al agua superficial mediante pulverización, aplicaciones aéreas y terrestres, y puede estar disponible durante varias semanas a meses después de su aplicación, interesantemente estos metabolitos son más persistentes en agua que el propio vinclozolin (USEPA, 2010).

Las hormonas llegan al ambiente acuático por diversos medios bióticos y abióticos, y los efectos que tiene sobre las poblaciones expuestas son graves, como masculinización, feminización, alteraciones morfológicas, desordenes hormonales, incluso la muerte, y los principales contaminantes hormonales son andrógenos y estrógenos, los cual no necesariamente son efectos adversos, sino que se trata de una modificación de la homeostasis hormonal que puede conducir a una enfermedad, por pequeños cambios en el balance normal de síntesis, secreción o acción de una hormona que podrían comprometer la

función fisiológica normal (Garza-León, 2010). En un estudio realizado en Aguascalientes, Ags. México., se reportan por primera vez disruptores endocrinos presentes en aguas residuales. En la planta de tratamiento del Hospital General Tercer Milenio se detectó 13.20 ng/L de estrona, mientras que en la planta de tratamiento de Aguascalientes (la más grande del estado que se encarga de tratar el 80% del agua residual en Aguascalientes) se detectó 12 ng/L de estrona (Garza-León, 2010). Hasta donde el autor tiene entendido no existen datos de hormonas luteinizante y folículo estimulante como contaminantes en el agua.

1.2 Efectos adversos de metales pesados y el fungicida vinclozolin sobre la expresión genética y el daño epigenético (herencia transgeneracional).

Muchos metales pesados como: zinc, níquel, y cobre son importantes constituyentes de pigmentos y enzimas, sin embargo, todos los metales, especialmente el cadmio, plomo, mercurio y cobre, son tóxicos en concentraciones altas, la toxicidad es menos común en metaloides como el arsénico, cromo, antimonio, selenio y bismuto (Babula *et al.* 2008). La alteración a nivel de expresión genética por causa de metales es principalmente sobre los factores de transcripción de genes, incluso la regulación y activación se ve dañada alterando la respuesta celular a algún estímulo, ya sea abiótico y biótico, de hecho varios estudios han demostrado como los metales pueden activar ciertos factores de transcripción celular como: NF-kB, AP1 y p53 (Leonard *et al.* 2004). Incluso los metales alteran la expresión de un gran número de genes, generalmente transitorios. Por lo tanto los cambios en la expresión de genes a menudo se piensa que son, el resultado indirecto de las cascadas de señales enzimáticas, cambios en la metilación del ADN y estrés oxidativo (ROS), en conclusión los metales son directamente responsables de los cambios en la actividad de los factores de transcripción generando efectos cancerígenos sobre la expresión génica, es por ello que son considerados algunos metales como genotóxicos, entre los metales que logran inducir cambios a nivel genético encontramos: el níquel, el arsénico, el plomo, y en menor medida, el cadmio y cromo, todos ellos capaces de producir alteraciones genómicas que pueden mantenerse a través el tiempo y tener efectos transgeneracionales asociados a mecanismos epigenéticos (Durham y Snow, 2006).

Los mecanismos epigenéticos o los cambios que pueden ser hereditarios, es decir, cambios que pueden conceder efectos sobre la regulación de los genes sin alterar la secuencia genómica son: a) la hipermetilación; que generalmente causa que los genes se apaguen de manera efectiva, y la b) hipometilación, la cual a menudo da lugar a un aumento de los niveles de la expresión génica (aunque experimentos muestran que algunos cambios epigenéticos pueden ser revertidos), los procesos que causan cambios epigenéticos encontramos: la metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitilación, y sumoliación (Mesa-Cornejo *et al.* 2006). Siendo la metilación de ADN el proceso epigenético mejor conocido, en parte debido a que ha sido más fácil de estudiar con la tecnología existente. La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina. El ADN presenta regiones de 1000-1500 pb ricas en dinucleótidos CpG ("islas CpG"), que son reconocidas por las enzimas ADN metiltransferasas, las cuales, durante la replicación del ADN metilan el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija de ADN, en general se considera que la metilación es un proceso unidireccional, de esta manera, cuando una secuencia CpG adquiere metilación de novo, esta modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal, por otra parte, la pérdida de metilación genómica (hipometilación), como evento primario, se asocia frecuentemente con el proceso neoplásico y es proporcional a la severidad de la enfermedad (Mesa-Cornejo *et al.* 2006).

Los fungicidas tipo dicarboximida como el vinclozolin y sus metabolitos inhiben la unión de andrógenos a los receptores de andrógenos nucleares, por lo cual pueden inducir alteraciones importantes (Evans, 2007; Gray y Furr, 2008). El vinclozolin causa infertilidad transgeneracional (transmisión vertical) y susceptibilidad tumoral en ratas (Anway *et al.*, 2006; Skinner *et al.*, 2009). Sin embargo ha sido difícil de repetir en laboratorios estos resultados, el vinclozolin promueve una alteración epigenética en la línea germinal. (Schneider *et al.*, 2008).

Los efectos del vinclozolin en los órganos reproductivos son evidentes y pueden ser heredados a sus descendientes, fenómeno conocido como herencia transgeneracional,

causado por un daño epigenético, todos estos efectos han sido claramente explicados en ratas (Anway *et al.* 2006), estos daños transgeneracionales son ligados de metilación de ADN, donde principalmente los genes que son alterados son genes envueltos en rutas metabólicas, señalización de calcio, y desarrollo vascular, incluso genes de apoptosis celular (Clément *et al.* 2010).

1.3 Mecanismos tóxicos de los metales Arsénico, Plomo, Zinc y el fungicida Vinclozolin.

1.3.1 Arsénico.

El As tiene actividad genotóxica, ya que induce mutaciones puntuales en el locus del gen de la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), aberraciones cromosómicas y células micronucleadas, presentando diferencias en la susceptibilidad de los individuos. El As reduce la proliferación de células mononucleadas de sangre periférica, induce arresto mitótico e inhibe enzimas de reparación del DNA en humanos, como ERCC-1 y PARP-1. También induce la expresión de varios genes relacionados con el desarrollo de cáncer como p53 y p21, lo que conlleva a que las células muestren alteraciones en su ciclo celular y puedan transformarse (Vega-Loyo, 2009). Los mecanismos de alteración en el sistema inmunológico por el As, es principalmente que el As puede fosforilar proteínas específicas que son importantes en la activación y diferenciación de células inmunes.

El As provoca y reprime la expresión de genes, en función de la concentración y duración de la exposición del metal. Afectando a genes de respuesta al estrés celular, control del ciclo celular, genes que regulan las reacciones oxido-reducción, genes implicados en la reparación del ADN. Además, el arsénico puede inducir en experimentos con ratas, la enfermedad de Bowen, la cual se caracteriza por la expresión del gen p53 en comparación con ratas control sin haberse expuesto al metal. El gen p53 es un supresor de tumor que reduce la proliferación celular y la replicación del DNA, ejerce un control sobre el ciclo celular bloqueando la progresión desde la fase G1 a la fase S (Santos-García *et al.*, 2005). También se ha descrito que en dosis bajas de exposición de Arsénico en

queratinocitos, encienden el gen p53, por el contrario en dosis relativamente bajas apaga la expresión del gen. También el Arsénico puede inducir la expresión de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B, probablemente resultado de la activación de vías de transducción de señales celulares, en experimentos con fibroblastos se observó que en dosis altas existe un encendido de dichos factores de transcripción y en dosis bajas un apagado de AP-1 y NF- κ B, factores de transcripción importantes para la reparación del ADN, respuestas inflamatoria y crecimiento celular. La activación de NF- κ B puede aumentar la expresión de citoquinas y factores de crecimiento, que puede ser responsable de la promoción del tumor. En las células endoteliales de aorta, se ha demostrado que una dosis baja aguda con arsénico promueve la acumulación nuclear de NF- κ B. Sólo ha sido descubierto recientemente que el arsénico también puede modificar los patrones de metilación del ADN. Estos cambios en los patrones de metilación inducida por el arsénico son persistentes y desestabilizadores, y tienen el potencial de promover la expresión aberrante de genes implicados en el desarrollo de las células y la regulación, lo que lleva a la inducción de cáncer (Durham y Snow, 2006).

1.3.2 Plomo.

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 directamente el sistema muscular, digestivo, endocrino, respiratorio, y nervioso. 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^+ , Si^{2+} , Li^+ , Cs^+ y Ba^+). 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, 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).

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 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

tesis tesis tesis tesis tesis

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).

El plomo induce 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). El plomo se concentra y produce daño en mitocondrias, núcleo, y retículo endoplásmico.

1.3.3 Zinc.

El zinc carece de actividad redox. El 3 y 10 % de todas las proteínas de los mamíferos necesitan zinc, ya que es necesario para el plegado, cambios conformacionales y actividad. En su forma libre es muy tóxico, por lo tanto el zinc tiene un gradiente de concentración celular altamente regulado de entrada y salida en las membranas plasmáticas y los comportamientos celulares. La complejidad y la importancia del zinc en la homeostasis celular se refleja en la gran cantidad de transportadores especializados para el zinc, reguladores de metales y diferentes isoformas de metalotioneínas.

Las principales características del zinc son: baja producción de radicales libres, gran capacidad de cambio de simetría en su entorno y rápido cambio de ligandos en reacciones y fuera de ellas, sobre todo en las uniones S- y N-donantes de los sistemas biológicos. El zinc permite funciones biológicas importantes como: 1) catalizador; y 2) ion estructural. Ya que es necesario para la función de más de 300 enzimas. El zinc está involucrado en la expresión genética, incluyendo la expresión del gen de la metalotioneína. Desempeña un papel importante en estructura y función de proteínas implicadas en la replicación del ADN y la transcripción inversa, así como en un gran número de factores de transcripción de eucariotas, dominios denominados dedos de zinc. En este contexto el zinc está involucrado en la inducción de proteínas implicadas en la proliferación celular, en la diferenciación

celular, en la detención del crecimiento celular, en la división celular, transmisión celular, producción de factores de crecimiento, activación de protooncogenes, producción de quimiocinas, en la estabilidad del mRNA y el mantenimiento de la matriz celular.

1.3.4 Vinclozolin.

La toxicidad del vinclozolin en general se ha demostrado que por inhalación, vía oral, y cutánea es baja. Los principales efectos tóxicos del vinclozolin son sus metabolitos que están relacionados con actividad antiandrogénica. El vinclozolin [3 - (3,5-diclorofenil)-5-metil-5-vinil-oxazolidina 2,4-diona], es un fungicida ampliamente utilizado en frutas, verduras y vinos, eficaz contra *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Minilium* spp. Es un dicarboximida, actualmente registrados para su uso en los Estados Unidos de América y en Europa. Puede ser transportado a las aguas superficiales a través de la dispersión del rociado de las aplicaciones aéreas y terrestres, y puede estar disponible en suelo y agua durante varias semanas o meses después de la aplicación. De hecho el vinclozolin se degrada en el medio ambiente por hidrólisis microbiana, fotólisis, y degradación abiótica (USEPA, 2000). De hecho, el vinclozolin y sus metabolitos primarios M1 (2 - [(3,5 diclorofenil)-carbamoil] oxi]-2-metil-3-butenoico) y M2 (3', 5'-dicloro-2-hidroxi 2 -metilbut-3-enanilide) son antagonistas para el receptor de andrógenos (AR), el metabolito M2 es antagonista para los receptores de la progesterona (PR), los receptores de glucocorticoides (GR) y de mineralocorticoides (MR). El vinclozolin y sus metabolitos M1 y M2 son agonistas para los dos receptores de estrógeno (ER α y ER β) con una afinidad más baja para ER β (Evans, 2007; Gray y Furr, 2008) . Curiosamente estos dos metabolitos muestran una vida media de más de 180 días, y es probable que haya una gran movilidad en la fase acuosa (USEPA, 2003).

Los estudios muestran que el vinclozolin puede tener actividad antiandrogénica mínima a niveles de dosis pertinentes. El vinclozolin ejerce sus efectos más fuertes durante las etapas de desarrollo de los animales lo que resulta un efecto directo sobre la reproducción. Dado que el receptor de andrógenos está ampliamente conservado en muchas

especies, todos los efectos encontrados en diferentes organismos pueden suceder en el humano.

1.3.5 Hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).

La hormona folículo estimulante (FSH) regula la gametogénesis y el crecimiento, mientras que la hormona luteinizante (LH) regula la maduración, la ovulación y la espermatogénesis (Kawauchi y Sower, 2006), en vertebrados. En algunos invertebrados las hormonas FSH y LH tienen un efecto estimulante en los ovarios de algunos camarones; de hecho la FSH provoca el crecimiento en el número de células somáticas del ovario, y LH la meiosis en células sexuales. La respuesta de los ovarios de crustáceos en presencia de las gonadotropinas FSH y LH de mamíferos, indica que pueden actuar de forma semejante en los invertebrados (Zukowska-Arendarczyk, 1981).

Tales hormonas estimulan la secreción de esteroides sexuales en las gónadas en vertebrados, por ejemplo la LH estimula la síntesis y secreción de testosterona que posteriormente se transforma en estrógenos. Un gran aumento en la concentración de LH induce la formación de folículos maduros en el ovario, ya que cuando el folículo madura, induce la formación del cuerpo lúteo el cual secretará esteroides hormonales como progesterona y estradiol. La hormona folículo estimulante (FSH), estimula la maduración de los folículos ováricos y a su vez la maduración de células espermáticas (Kawauchi y Sower, 2006). Cabe señalar respecto a lo dicho anteriormente en cuanto a las funciones de las hormonas FSH y LH, en rotíferos se ha evaluado principalmente el efecto de posibles disruptores endocrinos en estos invertebrados acuáticos, de hecho los rotíferos parecen ser particularmente sensibles a los andrógenos, y la lucha contra sustancias antiandrogénicas, mientras que los copépodos y cladóceros son generalmente más afectados por los estrógenos. Recientemente Alvarado-Flores *et al.* (2009), detectó las hormonas LH y FSH, TSH (hormona estimulante de la tiroides) y PRL (prolactina) en el rotífero dulceacuícola *Brachionus calyciflorus*.

1.4 Sistema de señalización química en rotíferos.

Los rotíferos como filo poseen un esquema de reproducción complejo y fascinante. El hecho de que logren alternar su reproducción asexual a sexual en respuesta a estímulos externos e internos y cambios en el medio ambiente, como un mecanismo de adaptación, supervivencia y evolución, los hace a los rotíferos, organismos de gran relevancia ecológica, y su facilidad de manejo nos permiten realizar estudios toxicológicos, fisiológicos, estructurales, genéticos, y de comportamiento, rápidos y viables para utilizarlos en pruebas de toxicidad. En muchas especies no se ha encontrado reproducción sexual, incluyendo algunos rotíferos de la Clase Monogononta. Los rotíferos presentan una gran variabilidad en sus caracteres morfológicos, como se pone de manifiesto en el fenómeno de la ciclomorfosis: variación temporal, estacional o no, cíclica de los caracteres morfológicos en una población planctónica, bien resultado de la plasticidad fenotípica, bien de cambios genéticos, muy común en este grupo de organismos (Gómez-Gómez, 1996).

Los rotíferos son pequeños invertebrados (de 50 a 2000 μm), un grupo de vida libre, pseudocelomados planctónicos que se caracterizan por tener una corona de cilios. Su ciclo de vida consiste en dos fases: asexual y sexual, en la reproducción asexual se observan hembras partenogénicas que producen huevos partenogénicos diploides, la fase asexual predomina por un tiempo y durante este lapso de tiempo hay habitualmente una serie de generaciones de reproducción partenogénica. Las hembras partenogénicas (hembras amícticas) producen huevos diploides de cáscara delgada por partenogénesis ameiótica o apomíctica, tras una división ecuacional de maduración. Los huevos amícticos son repentinos, y se desarrollan rápidamente dando lugar a hembras diploides genéticamente idénticas a su madre. La fase sexual comienza cuando ciertos estímulos ambientales, físicos, e internos, inducen la producción de hembras sexuales (denominadas mícticas), también diploides, por parte de las hembras amícticas (hembras asexuales partenogénicas). Las hembras mícticas y las hembras amícticas son indistinguibles morfológicamente, sin embargo, las hembras mícticas son capaces de producir huevos haploides de los cuales originaran machos si estos huevos no son fecundados, por el contrario si son fecundados estos huevos formarían un quiste o huevo de resistencia, de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cual surgirá estrictamente una hembra amíctica. La inducción de la reproducción sexual aun no es del todo clara, estudios importantes en este campo se han realizado especialmente en los rotíferos monogonontes *Brachionus*, *Asplanchna* y *Notomnata*. El estímulo más común es el hacinamiento o incremento de la población, en este estímulo se ha relacionado la producción de una proteína de inducción de la mixis (Mixis Induction Protein: MIP) la cual interactúa con su receptor (Mixis Induction Protein-Receptor: MIP-R), expresado en la región de la corona de las hembras asexuales, que posteriormente inducirán la producción de hembras sexuales, la MIP es un mecanismo descubierto de los que probablemente estén involucrados en la inducción de la reproducción sexual (Snell *et al.* 2008). Existen otros estímulos importantes y muy relacionados con el anterior como es la calidad y cantidad de alimento, el pH, el fotoperiodo, la temperatura y recientemente se comienza a esclarecer un poco los mecanismos de señalización intracelular mediada por sustancias hormonales o parecidas a hormonas, en el interior y exterior del organismo, donde se coordinan la formación de huevos ya sea partenogénicos o sexuales. 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 llevara a cabo el proceso de organogénesis (ver, Figura 1; Pray, 1995). El cambio de reproducción partenogénica a reproducción sexual es una adaptación al entorno en respuesta a cambios en el medio ambiente, que desencadena una serie de mecanismos bioquímicos y moleculares, cuyo fin es sobrevivir. Por ello el estudio de los efectos adversos sobre la reproducción en los rotíferos, resulta fascinante entender los efectos adversos de contaminantes y los riesgos que tienen o podrían desencadenar sobre esta comunidad de organismos parte importante del zooplancton de aguas continentales. Aunque no representan una biomasa importante del plancton, su rápido crecimiento poblacional y elevada tasa metabólica, hacen que posean una función importante en los ciclos de producción de los ecosistemas acuáticos.

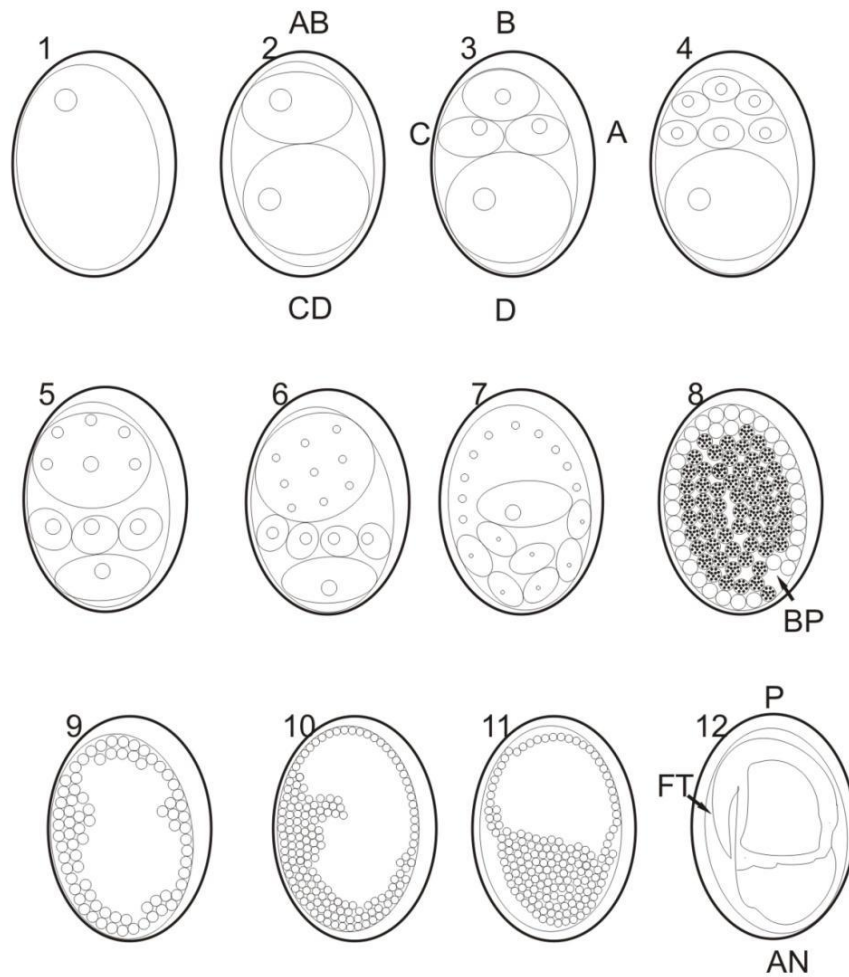


Figura 1. Desarrollo embrionario de *Lecane cornuta*, adaptado de Pray (1965); 1-4 enclave y formación de 8 células, 5-7 epibolia y comienzo de la formación de los micrómeros, 8 involución y posición del blastoporo, nótese como los micrómeros envuelven a los macrómeros, 9-11 migración del producto y 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 (Alvarado-Flores, 2010).

En la etapa sexual existe un comportamiento sexual, sin duda el elemento mejor caracterizado en los rotíferos. La sincronía de machos y hembras sexuales que son capaces de ser copuladas y fertilizadas, se conoce como sistema haplodiploide. Durante los momentos iniciales de la fase sexual, la densidad de machos será tan baja que prácticamente no habrá hembras fertilizadas, y la descendencia de las hembras míticas será prácticamente masculina. Conforme el número de machos crezca, este sistema de retroalimentación determinará que un mayor porcentaje de hembras míticas sea fertilizado, disminuya la producción de machos y se pase a producir huevos míticos ó quistes

(Gómez-Gómez, 1996). La cópula y fertilización en los rotíferos se caracteriza por un reconocimiento conspecífico mediado por una feromona de reconocimiento a la cópula (MRP) expresada en hembras sexuales (hembras míticas), los receptores de reconocimiento (MRP-R) los tienen los machos (Stout *et al.*, 2010), esto permite a los machos elegir cuidadosamente la hembra que podrá ser fertilizada, y el resultado es la formación de los huevos míticos o quistes, embriones en los cuales el desarrollo se ha detenido en una fase temprana. Los quistes son considerados clave del éxito evolutivo de los rotíferos, por su variabilidad genética que permitirá a algunos colonizar otro tipo de hábitas. En la figura 2, se esquematiza el ciclo de vida del rotífero dulceacuícola *Brachionus calyciflorus*.

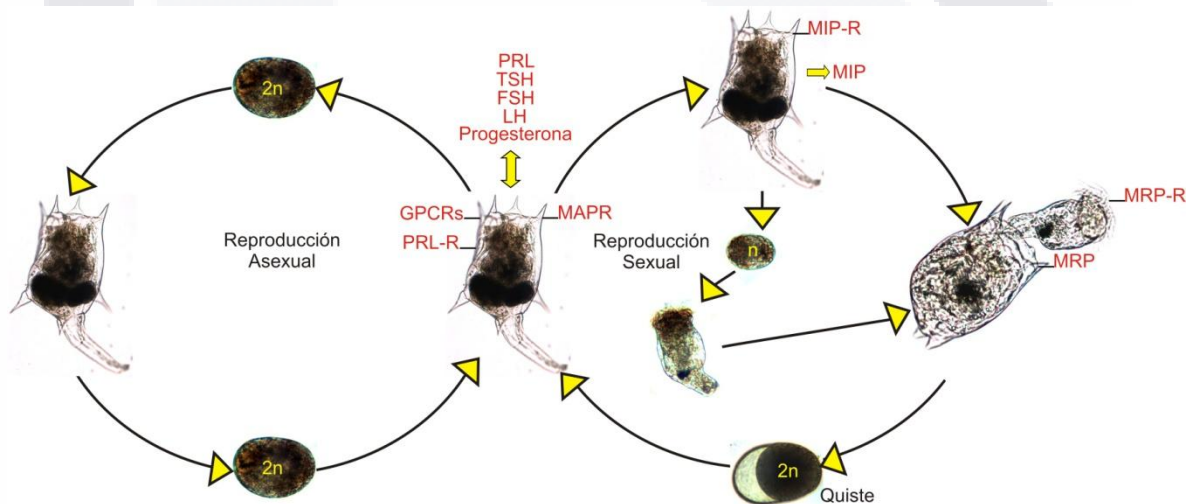


Figura 2. Ciclo de vida asexual y sexual del rotífero dulceacuícola *Brachionus calyciflorus* (Alvarado-Flores, 2013).

El sistema de señalización hormonal en rotíferos o su sistema endocrino como en otros invertebrados controla y coordina procesos bioquímicos, fisiológicos y de comportamiento, mediante mecanismos de señales con neuropéptidos, o productos sintetizados por células neurosecretoras especializadas, por ejemplo ya se han reportado neuropéptidos, esteroides, ecdioesteroides, y terpenoides en diferentes taxas de invertebrados como: Celenterados, Nematodos, Moluscos, Anélidos, Crustáceos, Insectos, Equinodermos, y Tunicados (Wigham *et al.*, 1975; Terakado *et al.*, 1997; Pinder *et al.*, 1999; Wheeler, 2003; Wilhem, 2006; Hutchinson, 2007). En cuanto a rotíferos hay evidencia de que estrógenos y andrógenos afectan significativamente la reproducción

asesual y sexual (Preston *et al.*, 2000) así mismo Gallardo *et al.*, (1997; 2000), evaluó el efecto de las hormonas: ácido gama-aminobutírico (GABA), hormona del crecimiento (GH), hormona gonadotropina coriónica humana (HCG), estradiol (E₂), triyodotirosina (T₃), 20-hidroxiecdisona (20-HE), 5-hidroxitriptamina (5-HT) y hormonas juveniles (JH), sobre el crecimiento poblacional del rotífero *Brachionus plicatilis*.

También se ha descrito que los rotíferos poseen un sistema colinérgico y catecolaminérgico neurotransmisor (Nogrady y Alai, 1983; Raineri, 1984; Kotikova, 1995, 1998; Kotikova *et al.*, 2005; y Pineda-Rosas *et al.*, 2005), el cual corrobora la existencia de una vía de síntesis de neurotransmisores y neuropéptidos posiblemente implicados en procesos del ciclo de vida de los rotíferos, ya que dichos péptidos o bien monoaminas son importantes en el control de ciertas glucoproteínas como: la hormona luteinizante y la hormona gonadotropina (Vijayan, 1985). El sistema de secreción en rotíferos y su proceso de excreción de tales neuropéptidos por las células o sistemas glandulares propios de los rotíferos, ha sido sustentado por Pérez-Legaspi *et al.*, (2008) ya que logró la identificación de proteínas de membrana de exocitosis como la Sintaxina-1, Sintaxina-4, SNAP-23 y SNAP-25, que sugieren un mecanismo especializado de neurosecreción por vesículas de exocitosis en rotíferos, que coordinan la secreción de hormonas en el interior del rotífero y que desencadenan una gran variedad de respuestas, como: el cambio de diploide a haploide hablando de producción de huevos, formación del quiste, expresión de feromonas y receptores de feromonas (en machos).

Por ejemplo, las hormonas tiroideas (TH) regulan una gran variedad de funciones como: el crecimiento, desarrollo y metabolismo celular, incrementan los niveles de las hormonas tiroideas T₃ y T₄. Las hormonas tiroideas han sido reportadas en invertebrados, actuando en conjunto con las hormonas juveniles (JH) de insectos para inducir la metamorfosis. La TH en la medusa *Aurelia*, tiene influencia en la transición entre la zona bentónica a la pelágica, aparentemente sintetiza precursores de hormonas tiroideas como la mono y ditirosina; T₁ y T₂ respectivamente, pero en experimentos con varios Cnidarios la TH tiene un rol en la metamorfosis (Heyland *et al.*, 2004). Así mismo, se han realizado estudios con las hormonas triyodotironina T₃ y T₄ en rotíferos por Gallardo *et al.*, (2000); donde reporta que la hormona T₃, tiene un efecto en la disminución de la talla de hembras

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

míticas, sin embargo no se observa aumento en el crecimiento poblacional. La TSH está presente en todos los vertebrados y algunas clases de invertebrados, por ejemplo la hormona estimulante de la tiroides (TSH) ha sido identificada en el anélido *Eisenia fetida*, en células neuronales o no-neuronales, presentes en el sistema nervioso central y varios órganos periféricos, donde su presencia y localización sugiere que la hormona TSH, puede modificar el metabolismo y/o tener funciones inmunológicas al ser secretadas por el anélido. También se ha reportado en Tunicados la presencia de TSH, la cual posiblemente tiene un rol en la maduración sexual. La TSH regula la producción de tiroglobulina (TGB), la cual a su vez regula la secreción de T3 y T4. (Di Fiore *et al.*, 1997; Wilhelm *et al.*, 2006). Además ya se han reportado los receptores para la hormona estimulante de la tiroides (TSHR) en invertebrados como: *Caenorhabditis elegans* (nematodo), *Drosophila melanogaster* y *Limnaea stagnali*. La expresión de los receptores para TSH en larvas de *D. melanogaster*, sugieren que tienen un rol en el desarrollo del insecto (Kudo *et al.* 2000; Eriksen *et al.* 2000; Hauser *et al.* 1997; Tensen *et al.*, 1994).

Por lo tanto la detección de la TSH en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, está muy probablemente relacionada con funciones importantes en el metabolismo del rotífero, así como su maduración sexual y/o metamorfosis (en hembras y machos), o tal vez un sistema de señalización en respuesta algún tipo de estrés metabólico.

La hormona folículo estimulante (FSH) regula la gametogénesis y el crecimiento, mientras que la hormona luteinizante (LH) regula la maduración, la ovulación y la espermatogénesis (Kawauchi y Sower, 2006), en vertebrados. Tales gonadotrofinas FSH y LH ya se han detectado en algunos invertebrados, por ejemplo en el Crustáceo: Decápodo *Crangon crangon*, donde se evaluó el efecto de dos preparados purificados de gonadotrofinas hipofisarias bovinas: NIH-FSH-S12 y NIH-LHS19, sobre la estructura histológica de los ovarios, donde se encontró que tanto la FSH y LH tienen un efecto estimulante en los ovarios del camarón. La FSH provoca el crecimiento en el número de células somáticas del ovario, y LH la meiosis en células sexuales. La respuesta de los ovarios de crustáceos en presencia de las gonadotrofinas FSH y LH de mamíferos, indica que pueden actuar de forma semejante en los invertebrados (Zukowska-Arendarczyk, 1981).

Tales hormonas estimulan la secreción de esteroides sexuales en las gónadas en vertebrados, por ejemplo la LH estimula la síntesis y secreción de testosterona que posteriormente se transforma en estrógenos. Un gran aumento en la concentración de LH induce la formación de folículos maduros en el ovario, ya que cuando el folículo madura, induce la formación del cuerpo lúteo el cual secretará esteroides hormonales como progesterona y estradiol. La hormona folículo estimulante (FSH), estimula la maduración de los folículos ováricos y a su vez la maduración de células espermáticas (Kawauchi y Sower, 2006). En rotíferos se ha evaluado primariamente el efecto de posibles disruptores endocrinos en estos invertebrados acuáticos, de hecho los rotíferos parecen ser particularmente sensibles a los andrógenos, y a sustancias antiandrogenicas, mientras que los copépodos y cladóceros son generalmente más afectados por los estrógenos. Por ejemplo Preston *et al.* (2000) observo una disminución en la tasa de fertilización en *Brachionus calciflorus* a la exposición a nonifenol (agonista de andrógenos), y con la testosterona (agonista de andrógenos), por otro lado la flutamida (antagonista de andrógenos), posee efectos significativos de incremento en la reproducción sexual (Snell y Joaquim-Justo, 2007).

En rotíferos las hormonas FSH y LH en etapas embriogénicas, y así como en hembras y machos, desempeñan un papel en el desarrollo sexual, comportamiento, maduración y eclosión de huevos, así como un posible mecanismo de encendido para el apareamiento sexual, especialmente la LH. La presencia de las hormonas LH y FSH en huevos micticos y amicticos sugiere que tienen un rol determinante en el desarrollo embriológico, así como gonadal en hembras y machos.

Finalmente la detección de la hormona prolactina en el rotífero *B. calciflorus* (Alvarado-Flores *et al.*, 2009), y por los antecedentes de su detección de la hormona prolactina (PRL) en diferentes grupos de invertebrados, como por ejemplo Quintanar *et al.*, (2007), revelo la prolactina en larvas de *Trichinella spiralis*, (Nematodo) donde relaciona la presencia en el nematodo con funciones inmunomodulatorias que tal vez tenga un rol en la modulación local del proceso infectivo, o el hallazgo de la PRL en *Halocynthia roretzy*, (Terakado *et al.*, 1997), la detección de la PRL en gránulos de células neuronales del insecto *Leucophaena maderae* (Veenstra *et al.*, 1985), así como en *Apis mellifera* (Schmid

et al., 1990) y en *Locusta migratoria* y *Sarcophaga bullata* (Swinnen *et al.*, 1990) en células neurosecretoras, también ha sido detectada en Cestodos como *Ligula intestinalis* (Liu *et al.*, 1995), *Taenia solium* y *Taenia hydatigena* (Liu *et al.*, 1996), en sistema nervioso y reproductivo. Se propone que la PRL en estos invertebrados actúa como un péptido neurotransmisor. La prolactina y su presencia en rotíferos podría estar relacionada con funciones interesantes como lo son la proliferación y diferenciación de numerosos tejidos, órganos reproductores, y más importante la prolactina en rotíferos podría desencadenar señales o vías de transducción para la estimulación de células en proliferación.

Muchas especies de invertebrados han desarrollado una gran diversidad de historias de vida, característico de eventos tales como la formación de larvas, a menudo con una sucesión de diferentes etapas y / o pupas, metamorfosis, puesta de huevos u otros tipos de etapas de descanso, que no se producen en los vertebrados, es evidente que el sistema endocrino de los invertebrados es mucho más diverso que el de vertebrados (Oehlmann y Schulte-Oehlmann, 2003).

1.5 Modelo de secreción endocrina en el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

Por lo anterior la reproducción asexual y sexual en los rotíferos está claro que se encuentra bajo el control de estímulos externos e internos como: temperatura, fotoperiodo, alimento, hacinamiento o crecimiento poblacional, neurotransmisores, y hormonas las cuales desencadenan mecanismos de señalización y comunicación dentro de los organismos y fuera de ellos, estas sustancias son de gran importancia biológica y en un contexto evolutivo de gran interés. El sistema de secreción hormonal en rotíferos aún falta por comprender del todo, y tampoco existe una hormona de rotíferos específica que coordine una acción específica de respuesta en el rotífero. Aunque los resultados obtenidos hasta el momento en rotíferos realizados principalmente por Gallardo *et al.*, (1999, 2000); Alvarado-Flores *et al.*,(2009); Stout *et al.*, (2010); y Yang y Snell (2010), indican que probablemente la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

está controlada por múltiples estímulos, que son captados por mecanoreceptores y quimiorreceptores presentes en el rotífero dispuestos por todo el cuerpo, por ejemplo las antenas dorso ventrales y laterales, el ojo cerebral conectado directamente al retro-cerebro, poros en la cutícula y un sistema de inervación en todo el cuerpo del rotífero por dentro de su cutícula que está en contacto directo con un sistema muscular que le permite controlar y coordinar cambios en el medio acuático. Por lo tanto la GnRH estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FHS). La FSH favorece la partenogénesis (mitosis) y a su vez incrementa la producción de estrógenos que estimulan la liberación de grandes cantidades de LH. La LH favorece la formación de huevos haploides que originan machos, esta condición o etapa del ciclo de vida sexual en el rotífero, o producción de huevos haploides se mantiene por la gran cantidad de LH liberada, favoreciendo el incremento de machos, la LH también incrementa la expresión de feromonas específicas en la hembra que son reconocidas por el macho por un reconocimiento conspecífico mediado por un receptor presente en la corona del macho, este mecanismo favorece la cópula y la fertilización y además sumado a todo esto la presencia de la progesterona ayuda a la formación de quistes. Todos estos mecanismos de control hormonal y secreción están coordinados por estructuras glandulares importantes del rotífero como: vitelario, ganglios y sacos cerebrales y retrocerebro. El vitelario posee la capacidad de ser inducido por hormonas para producir huevos diploides, haploides y quistes. Los quistes 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 amítico y mítico (que origina macho), solo al embrión lo cubre un sincitio (Pourriot y Snell, 1983; Birky y Gilbert, 1971) (Figura 3).

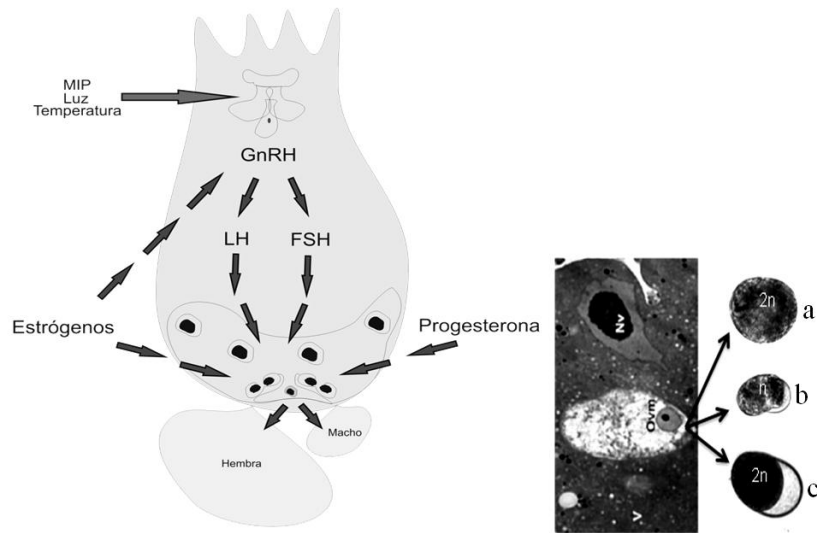


Figura 3. Modelo de secreción hormonal en rotíferos (Alvarado-Flores, 2013). Vitelario (V), ovocito madura (Ovm), núcleo del vitelario (Nv), huevo partenogenético (a), huevo sexual no fecundado (b), y huevo sexual fecundado o quiste (c).

Este modelo de secreción y control hormonal en rotíferos requiere de estudios más finos y detallados. Ya que el uso de sustancias hormonales produce alteraciones morfológicas en los rotíferos, y interrumpe el estado normal del ciclo de vida de los organismos. Finalmente es evidente mencionar que los rotíferos poseen mecanismos bioquímicos y moleculares endocrinos similares a otros invertebrados y vertebrados. Con algunas excepciones que podremos descubrir en el transcurso de nuestra investigación.

1.6 Efectos adversos del Arsénico, Plomo, Zinc y Vinclozolin en el sistema endocrino de vertebrados e invertebrados.

El Arsénico (As), Plomo (Pb) y Zinc (Zn) son considerados disruptores endocrinos, no se conoce si el Pb y Zn tienen efectos de hormesis sobre los organismos, en cambio el Arsénico sí posee hormesis. Tampoco se comprende si la mezcla de estos metales llegará a tener sinergismos o antagonismos sobre el sistema endocrino. En el siguiente cuadro 1 se resumen los principales efectos adversos y mecanismos de acción del As, Zn y Pb sobre el sistema endocrino.

Cuadro 1. Efectos y mecanismo de acción del Arsénico, Plomo y Zinc en el sistema endocrino en vertebrados e invertebrados (Iavicoli *et al.*, 2009).

Metal	Efecto	Mecanismo de Acción
	Incremento de GR,MR,PR,AR,RAR y TR a nivel de transcripción (dosis bajas)	Estimulación o inactivación de actividad de transcripción nuclear de varios receptores hormonales
As	Inhibición de GR, MR, PR, AR, RAR y TR a nivel de transcripción (dosis altas) Inhibición de ER a nivel de transcripción Inhibición de la espermatogénesis	Unión a varios receptores de estrógenos
Pb	Altera la afinidad que poseen los estrógenos y la hormona luteinizante de unirse a su receptor Acción múltiple en la eje hipotálamo – hipófisis - gónadas Reducción a nivel de suero de IGF-1, LH, testosterona y estradiol Alteración del inicio de la pubertad Alteraciones morfológicas y funcionales de los espermatozoides	Reducción de la expresión de la proteína de la regulación aguda de la esteroideogénesis Inhibición de la secreción de LH Incremento de peroxidación de lípidos y plasma seminal Incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno
Zn	Estimulación de la espermatogénesis	Actividad antioxidante Inhibición de la ADNasa Actividad de la estabilización de la membrana

GR = receptor de glucocorticoides; MR = receptores mineral corticoides; PR = receptor de la progesterona; AR = receptores de los andrógenos; RAR = receptor del ácido retinoico; TR = receptor de la hormona tiroidea; ER = receptor de estrógenos; IGF-1 = factor de crecimiento de tipo insulina.

1.7 Regulación celular de las metalotioneínas.

Son múltiples los efectos adversos de los metales As, Pb y Zn en el sistema endocrino, la entrada de estos metales a las células está determinada por: la forma química, la presencia de otros metales, el pH, sus propiedades metálicas, la salinidad, y muy

importante la sensibilidad de la especie animal y su etapa del ciclo de vida. Existen varios mecanismos que describen la entrada de los iones metálicos a las células, como: la entrada a través de canales iónicos, bombas de transporte activo o proteínas transportadoras de membrana (Simkiss, 1998).

Los mecanismos de regulación de metales en el interior de las células más importante es la inducción de las metalotioneínas (MT), ya que poseen un rol crítico en el control de metales como: mercurio, cobre, cadmio, zinc, y plomo; la unión de las MT a los metales constituye uno de los principales mecanismos tóxicos, además de las respuestas secundarias que conlleva la formación de complejos proteínas - metal en las células y las respuestas biológicas que pueden desencadenar. En el citoplasma, el metal libre puede unirse a las MT, o a ligandos de bajo y alto peso molecular, como las metaloenzimas.

Las MT pueden unirse con muchos metales y su afinidad de unión depende del elemento metálico. En condiciones fisiológicas las MT suelen coordinar Zinc y Cobre, no obstante si existe una elevada concentración de otros metales, como Cd, Hg, estos pueden desplazar a los anteriores. Las propiedades moleculares y su estructura característica de una metalotioneína son: proteínas que tienen un peso molecular de 6 a 10 kD, se caracterizan por tener una elevada cantidad de cisteínas que les permite a la proteína la capacidad de unir estrecha y específicamente cationes como Cu^{+1} , Cd^{+2} y Zn^{+2} , su secuencia de aminoácidos oscila entre los 61 a 68 aminoácidos. Solubles en agua y termoestables. Las metalotioneínas forman complejos tiolato – metal mediante un enlace mercáptido. La capacidad de unión de la MT al metal presenta diferente afinidad, según el metal considerado $Hg > Cu > Cd > Zn$ (de 6 a 12 átomo-gramo por mol). El contenido de metales en las MT puede variar en los tejidos. La unión MT- metal, es reversible, normalmente una MT contiene 7 átomos de Zn por molécula. Las MT poseen dos clusters, uno de ellos localizado al extremo N-terminal capaz de coordinar 3 átomos metálicos, y el otro se encuentra en el extremo C-terminal y une 4 átomos metálicos, ambos grupos (cluster) están en un dominio globular llamados β y α respectivamente. De tal manera que una MT está formada por dos dominios idénticos con un centro metálico alrededor del cual se estructura la cadena polipeptídica en forma de giros helicoidales hacia la derecha en caso del dominio β y hacia la izquierda en caso del α (Carrasco-Trancoso, 2000).

El mecanismo de accionamiento de las metalotioneínas por otros metales es indirecto, es decir, el metal inductor de la transcripción de metalotioneínas es el Zinc (Zn), y este mecanismo de acción consiste en la unión del Zn a un factor de transcripción específico para la MT conocido como: factor de transcripción de metalotioneínas (MTF-1), el MTF-1 interacciona con el Zinc y forma un complejo MTF-1-Zn que penetra al interior del núcleo de la célula donde se une a elementos reguladores específicos para metales (MRE), localizados en el promotor del gen de MT, aumentando la síntesis y transcripción de la misma, la expresión de las MTs (Figuras 4 y 5). Puede verse alterada por cambios en la estructura del gen, como amplificación y metilación, y por la diferenciación y desarrollo celular. Posteriormente la MT atrapa al Zinc, o en su caso metales como Arsénico, y Plomo. El efecto de la inducción de metalotioneínas por otros metales es indirecto. La entrada de metales a la célula, la activación de una vía bioquímica celular, el simple efecto tóxico sobre algunos organelos, altera la homeostasis celular que se mantiene en la célula. Por lo tanto, esta alteración inicia un mecanismo de protección a metales, por el exceso de metal en la célula, de hecho el papel de las MT es controlar los niveles necesarios de Zn dentro de la célula. Interesantemente las MT controlan otros metales que resultarían tóxicos para la célula, las MT son mecanismo de protección, y a su vez de adaptabilidad a la exposición a metales. Las MT están ampliamente distribuidas, presentes en procariotas, protistas, hongos, rotíferos, plantas y animales. De hecho la síntesis de MT puede ser inducida por una gran variedad de estímulos, entre los que se incluyen algunos metales, hormonas, toxinas y estrés celular (Klaassen *et al.*, 1999), siendo los metales los inductores más potentes.

La presencia en algunas especies de varias isoformas de MT, con pequeñas diferencias en su estructura primaria, aunque suficientes para diferenciarlas en términos de carga total de proteína, es una indicación de polimorfismo genético (Kägi y Kojima, 1987). Estudios de biología molecular donde amplifican el gen que codifica para MT, han confirmado que las funciones de las diferentes isoformas de las MT son diferentes, algunas isoformas están involucradas en la homeostasis del metal y otras en la detoxificación de metales no esenciales. Los genes que codifican para las MT han sido ya identificados en muchos crustáceos y moluscos (Amiard *et al.*, 2006).

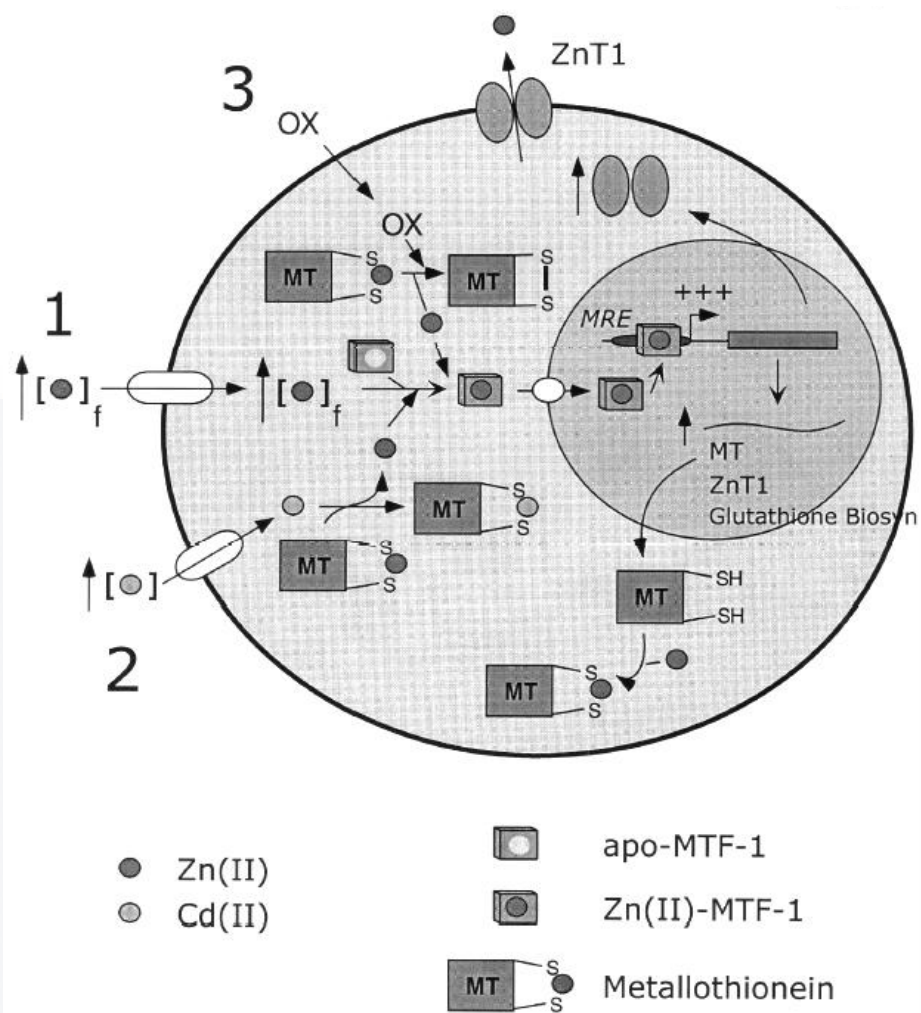


Figura 4. Modelo ilustrativo de la función biológica del factor de transcripción de metales (MTF-1). En este modelo se propone al Cd y el estrés oxidativo como efecto indirecto de la producción de MT (metalotioneína). El Zn es un inductor de MT al acoplarse al MTF-1 y entrar al núcleo para iniciar la inducción de MT (Ureña-Robles, 2006).

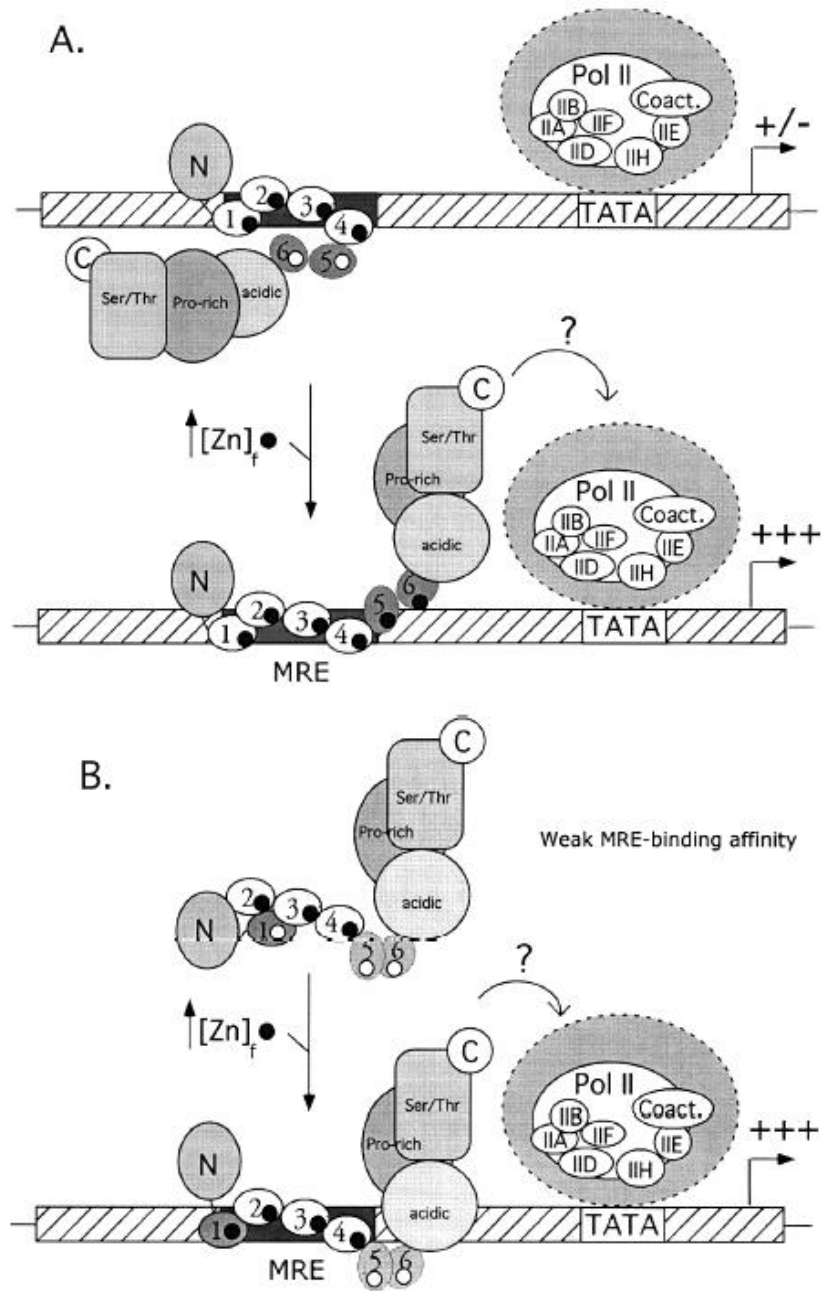


Figura 5. Modelo ilustrativo de como el Zn unido al MTF-1 con sus 6 dominios (dedos de Zinc) se unen al sitio de reconocimiento a metales (MRE), el cual actúa como regulador transcripcional y activador de MT. A) Este modelo consiste en las características fisicoquímicas de los dominios dedos de zinc al sitio de unión del MRE; B) modelo inverso (Ureña-Robles, 2006).

1.8 Metales y sus efectos adversos en rotíferos: CL₅₀ y CE₅₀.

En resumen, existen muchos reportes de efectos adversos ocasionados por metales en rotíferos, principalmente en toxicidad aguda y pocos para la toxicidad crónica, el plomo es uno de los metales más usados en la toxicología acuática en rotíferos, en el cuadro 2 se muestran datos de evaluación de la toxicidad de los metales zinc y plomo en diferentes especies de rotíferos (Rico-Martínez *et al.*, 2011). No existen datos reportados para el arsénico.

Cuadro 2. Evaluación de la toxicidad del plomo (Pb) y zinc (Zn) en distintas especies de rotíferos: (D) Dulceacuícola, (M) Marinas o estuarinas (Rico-Martínez *et al.*, 2011). CL₅₀: Concentración donde el 50% de la población muere. EC₅₀: Concentración donde el 50% de la población evaluada presenta un efecto estadísticamente significativo respecto al control.

Especie	Metal	Criterio de Evaluación	Rango de Sensibilidad (mg/L)	Referencia
<i>Anuraeopsis fissa</i> (D)	Zn	CL ₅₀ 24-h	0.31	Sarma <i>et al.</i> , 2007
	Pb	CL ₅₀ 24-h	4	Janssen <i>et al.</i> , 1994
<i>Brachionus calyciflorus</i> (D)	Zn	CL ₅₀ 24-h	1.30 – 1.65	Snell <i>et al.</i> , 1991; Nelson y Roline 1998
	Pb	CE ₂₀ 48-h	0.125	Grosell <i>et al.</i> , 2006
<i>Brachionus havanaensis</i> (D)	Zn	CL ₅₀ 24-h	2.27	Juárez-Franco <i>et al.</i> , 2007
<i>Brachionus patulus</i> (D)	Pb	CL ₅₀ 24-h	6.15	García-García <i>et al.</i> , 2007
<i>Brachionus plicatilis</i> (M)	Pb	CL ₅₀ 24-h	4	Snell <i>et al.</i> , 1991
<i>Brachionus Rubens</i> (D)	Zn	CL ₅₀ 24-h	0.55	Sarma <i>et al.</i> , 2007
<i>Lecane hamata</i> (D)	Pb	CL ₅₀ 48-h	0.68	Pérez-Legaspi y Rico-Martínez 2001
<i>Lecane luna</i> (D)	Pb	CL ₅₀ 48-h	0.14	Pérez-Legaspi y Rico-Martínez 2001
<i>Lecane quadridentata</i> (D)	Zn	CL ₅₀ 48-h	0.123	Torres-Guzmán <i>et al.</i> , 2010
<i>Philodina acuticornis</i> (F)	Pb	CE ₅₀ 24-h	47.4 - 150	Buikema <i>et al.</i> 1974; Kegley <i>et al.</i> 2010
	Zn	CE ₅₀ 24-h	2.4	Buikema <i>et al.</i> , 1974

2. Justificación.

El sistema endocrino en rotíferos y los detalles de sus vías de señalización aún no se han aclarado, pero si se ha demostrado que probablemente son susceptibles a perturbaciones por contaminantes ambientales (Zou, 2010). Hoy en día los disruptores endocrinos y metales los encontramos en ecosistemas acuáticos, ocasionando interrupciones en cuanto a la reproducción de organismos dulceacuícolas. Sin embargo solo algunos metales y metaloides (Arsénico) están catalogados como disruptores endocrinos en invertebrados acuáticos. En estudios previos se encontraron indicios que metales como el plomo poseen características de interrupción a la reproducción asexual y sexual en un invertebrado acuático (Alvarado-Flores, 2010). Así mismo, se han identificado la expresión de hormonas tipo gonadotrofinas, lactogénicas y tiroideas, en el rotífero *Brachionus calyciflorus* (Alvarado-Flores *et al.*, 2009), las cuales representan el primer reporte en un rotífero. Aunado a que existen pocos estudios que evalúen los efectos adversos crónicos sobre la reproducción asexual y sexual de rotíferos, componente principal de comunidades zooplanctónicas, este estudio pretende incrementar y caracterizar el efecto adverso de disruptores endocrinos y metales sobre la reproducción asexual y sexual de rotíferos dulceacuícolas.

3. Hipótesis de trabajo.

Los metales: plomo, arsénico y zinc, así como los disruptores endocrinos: vinclozolin (fungicida), hormona folículo estimulante (FSH), y la hormona luteinizante (LH), poseen efectos, capaces de alterar la reproducción sexual y asexual de rotíferos. Tales efectos pueden ser estimados mediante pruebas de toxicidad que evalúan parámetros reproductivos, morfológicos, y expresión de proteínas de estrés a metales.

4. Objetivo general.

Caracterizar el efecto de metales y disruptores endocrinos en la reproducción de rotíferos dulceacuícolas

4.1 Objetivos particulares.

1. Estudiar los efectos del Pb, As, y Zn en la reproducción asexual y sexual de rotíferos dulceacuícolas, en un modelo de disrupción endocrina.
2. Estudiar los efectos del Vinclozolin, FSH y LH en la reproducción asexual y sexual de rotíferos dulceacuícolas en un modelo de disrupción endocrina.
3. Estudiar los efectos de Pb, As, Zn, Vinclozolin, FSH, y LH en pruebas de apareamiento y fertilización en rotíferos dulceacuícolas.
4. Realizar una caracterización morfológica de la especie estudiada, analizando longitud máxima y anchura máxima de hembras, machos, huevos partenogenéticos, huevos sexuales fecundados y no fecundados.
5. Estudiar la presencia de metalotioneínas en un rotífero dulceacuícola.

5. Metodología.

5.1 Cultivo de rotíferos.

Se cultivó una especie de rotífero dulceacuícola de acuerdo al protocolo de Pérez-Legaspi y Rico-Martínez (1998). Empleando una cámara bioclimática con un fotoperiodo de 16:8 h de oscuridad: luz, a una temperatura de 25° C +/- 2° 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* (strain LB2194 of the University of Texas Collection) cultivada en medio basal Bold's (Nichols, 1973).

5.2 Pruebas Toxicológicas.

Se evaluó el efecto adverso de disruptores endocrinos como el fungicida vinclozolin ((Pestanal ®: CAS No. 5047-44-8, Sigma, Co. Saint Louis MO, USA), hormona folículo estimulante (FSH: Sigma-Aldrich), y la hormona luteinizante (LH: Sigma-Aldrich) y los metales plomo, arsénico y zinc (estándares de absorción atómica de Sigma Co. St Louis, MO, USA). El vinclozolin fue disuelto en acetona (Supelco Co.

Bellefonte, PA, USA). Se utilizó una especie de rotífero dulceacuícola de acuerdo a los siguientes protocolos con algunas modificaciones que se describen a continuación:

5.2.1 Modelo de disrupción endocrina de acuerdo a Preston *et al.*, (2000).

Se colocaron 5 hembras partenogénicas o amicticas o asexuales en un volumen total de 2 mL por poza, en placas de poliestireno de 24 pozas, se alimentaron con *Nannochloris oculata* en una concentración final de 5×10^6 células/ml, durante 96 horas en una cámara bioclimática a una temperatura de $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ con un fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad. Al final del experimento se midieron las siguientes variables: a) cantidad de hembras partenogénicas sin huevos, b) cantidad de hembras partenogénicas con huevos, c) cantidad de hembras partenogénicas con huevos no fecundados, d) cantidad de hembras con huevos fecundados, e) número de machos, f) huevos sexuales (quistes y huevos no fecundados que originan machos) y g) huevos asexuales o partenogénicos (Figuras 4, 5 y 6).

5.2.2 Pruebas de comportamiento sexual de acuerdo a Snell y DesRosiers (2008).

Se obtuvieron hembras y machos menores de < 12 horas de edad de los cultivos de rotíferos. Las hembras y los machos fueron previamente expuestos al tóxico durante 6 horas en un volumen total de 500 μl por poza, en placas de poliestireno de 24 pozas. A las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente en una cámara bioclimática. Al término del tiempo de exposición al tóxico se hizo el ensayo de cópula el cual consistió en: colocar 1 machos y 1 hembra en 50 μl de medio EPA, en una porta objeto, los cuales fueron observados durante 5 minutos y si existe cópula, se contó como 1 evento de cópula, si no existe cópula se consideró como un valor de 0. Fueron video-grabados los proceso de cópula durante 5 minutos en controles e intoxicados.

5.2.3 Pruebas de fertilización de acuerdo a Yang y Snell (2010).

Se obtuvieron hembras y machos menores de < 12 horas de edad de los cultivos de rotíferos, se colocaron 6 machos y 2 hembras en un volumen total de 1 mL por poza, en

placas de poliestireno de 24 pozas, estuvieron expuestos al tóxico durante 48 horas en cámara bioclimática a las condiciones de cultivo experimentales mencionadas, se alimentaron con *Nannochloris oculata* en una concentración final de 5×10^6 células/mL. El parámetro indicador fue la producción de quistes: huevos sexuales fecundados. En la figura 6 se muestran las diferencias de los huevos que produce el rotífero *Brachionus calyciflorus*, en la figura 7, la fotografía con la letra C, es nuestro parámetro indicador.



Figura 6. *Brachionus calyciflorus* 10x. A) Hembra con huevo partenogenético, B) hembra con huevos sexuales no fecundados (origina macho), y C) hembra con huevo sexual fecundado (quiste).

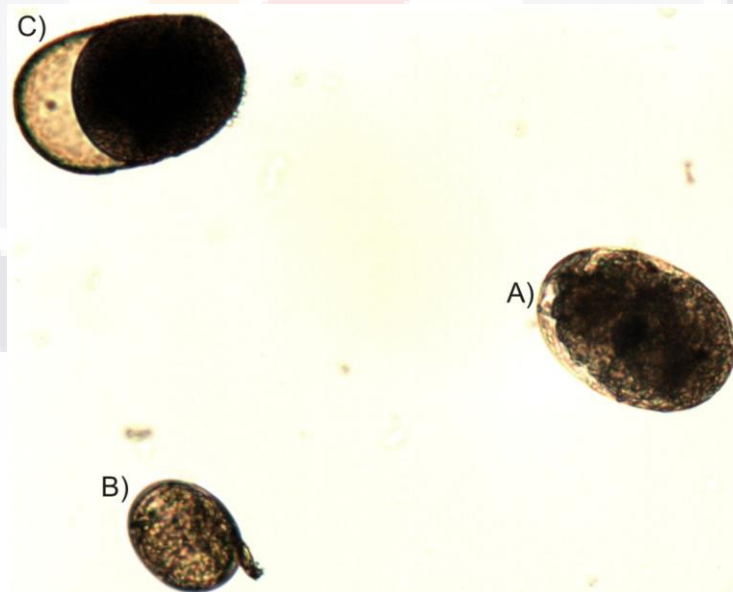


Figura 7. Diferentes tipos de huevos en *Brachionus calyciflorus*. A) huevo partenogenético, B) huevo sexual no fecundado (que origina macho), y C) huevo sexual fecundado (quiste) 10x.



Figura 8. Macho de la especie *Brachionus calyciflorus* 40x.

5.3 Detección de Metalotioneinas.

5.3.1 Extracción de ADN, amplificación y purificación de un fragmento del gen MTF-1 y COX1 en el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

Se realizó la extracción de ADN acorde al kit de purificación para ADN genómico #KO512 de Fermentas. Para verificar la obtención de ADN genómico de alto peso molecular se realizó una electroforesis a 90V con muestras de 5 μ l en un gel de agarosa al 1%. Por medio de un análisis espectrofotométrico se cuantificó la cantidad de ADN recuperado y se determinó su pureza.

5.3.1.1 Protocolo de extracción de ADN en rotíferos, acorde al kit de purificación para ADN genómico #KO512 de Fermentas.

Se colectaron 500 rotíferos de diferentes edades en un tubo Eppendorf en un volumen final de 1 mL, se colocaron a 4°C durante 20 minutos para concentrar en el fondo del tubo Eppendorf a los rotíferos, a continuación se quitó el medio EPA y se lavó con agua destilada tres veces repitiendo los pasos anteriores, hasta concentrar los 500 rotíferos en el fondo del tubo Eppendorf. Al concentrado de rotíferos se agregó 200 μ l de Buffer TE, después se agregó 400 μ l de Buffer de lisis, se agitó en vortex 5 minutos, y se incubaron a 65°C durante 5 minutos. Al término de la incubación se agregó 600 μ l de cloroformo y se

emulsifico por inmersión de 3 a 5 veces, se centrifugó a 12,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se agregó 800 µl de solución de precipitación, se emulsifico 3 a 5 veces por 1 a 2 minutos y se volvió a centrifugar a 12, 000 rpm durante 5 minutos. Se removió el sobrenadante y a la pastilla que se encuentra en el fondo se disolvió en 100µl de NaCl 1.2 M. Finalmente se agregó 300 µl de etanol y se dejó a -20°C durante 24 horas, para después centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos, y quitar el etanol, lavar con etanol tres veces y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente, para poder agregar 100 µl de agua ultrapura inyectable.

5.3.1.2 Condiciones de amplificación de los genes COX1 y MTF-1, mediante el kit PCR Mix (2X) #KO171 de Fermentas.

Las reacciones se corrieron: 2 minutos de desnaturalización a 95°C, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 90 segundos a 72°C, y por ultimo, una extensión de 7 minutos a 30°C.

Los oligonucleotidos usados son:

COX:

- F`COX (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')
- R`COX (5'-TAAACTTCAGGG TGACCAAAAAATCA-3')

MTF-1:

- F'MTF-1 (5'TCCCCAGACCAGATTCAGCTCAC-3')
- R'MTF-1 (5'ACCGCCTTTCCACAGCCAGACT-3')

Se realizó una purificación de los genes amplificados: COX1 y MTF-1 en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, utilizando el kit para purificación de PCR StrataPrep de Stratagene y se mandaron secuenciar al Langebio.

5.3.2 Inclusión de rotíferos en parafina e inmunodetección de metalotioneínas.

Se obtuvieron 1000 hembras partenogénicas de diferentes edades de los cultivos de rotíferos y se colocaron en 1.0 mL de medio EPA en un tubo Eppendorf para microcentrifuga de 1.5 mL. Se fijaron con 100 µl de paraformaldehído al 4% por 2 horas. Posteriormente se centrifugaron a 4,000 rpm durante 2 min y se eliminó el sobrenadante. Después los rotíferos fueron incluidos en agarosa al 2 %. Al término de la inclusión en agarosa, se hizo la deshidratación con diferentes concentraciones de alcoholes (50, 60, 70, 80 90 y 100 %). Finalmente se realizó la transfusión, preinclusión e inclusión en parafina de los rotíferos. Se realizaron tinciones de hematoxilina/eosina para observar estructuras de interés y caracterizar los cortes e identificar los mejores laminillas para la inmunodetección de las metalotioneínas. La detección de las metalotioneínas se realizó usando el método del complejo Peroxidasa Avidina-Biotina (Hsu y col., 1981) manipulando el paquete ABC Vectasina (Dimension Laboratories Inc., CA, E. U. A.) con ligeras modificaciones (Quintanar y Salinas, 2002).

5.3.3 Cuantificación de proteínas.

Se empleó el método Bio Rad DC Protein Assay; usando el reactivo A' ya que la extracción de proteínas totales en rotíferos emplea SDS al 2%.

5.3.4 Cuantificación de Plomo en extractos de proteínas, usando el colorante específico Leadmium Green®.

Se obtuvieron 500 rotíferos de la especie *Brachionus calyciflorus*; controles y intoxicados con 3.0 mg/L de plomo durante 2 horas, los cuales se colocaron en 1 ml de medio EPA en un tubo Eppendorf para microcentrifuga de 1.5 ml. Los rotíferos se centrifugaron a 7,000 revoluciones por 30 minutos dos veces, eliminando con ayuda de una micropipeta de 100 µl el sobrenadante entre cada centrifugación y conservando los tubos en hielo para concentrar la mayor cantidad posible de rotíferos en la pastilla y evitando así su resuspensión. Posteriormente, se agregaron 30 µl de la solución Sample Buffer (gel

concentrador, SDS 10 %, glicerol, bromofenol y β -mercaptoetanol) a la pastilla de rotíferos sin medio EPA. Se utilizó 5 μ l de un marcador de bajo peso molecular más 25 μ l de Sample Buffer. Al mismo tiempo, se calentó en baño María a 100° C durante 5 minutos, los tubos con las muestras de rotíferos, y el marcador de peso molecular. Después, se calentó solamente los tubos con muestras de rotíferos durante 15 minutos a 60° C en baño María. De esta manera se obtuvieron 30 μ l del material necesario para la cuantificación de plomo en proteínas, y su cuantificación por medio de espectrofotometría.

La detección de plomo en proteínas se realizó empleando 30 μ l de proteínas totales más 5 μ l de colorante (por triplicado) y se colocaron en pozas de cajas multipozas negras de 96 pozos para fluorómetro y después fueron colocadas en el Modulus Microplate Multimode Reader Turner Biosystems módulo de cuantificación de fluorescencia el cual posee un filtro verde con una longitud de excitación de 525 nm, y una longitud de emisión de 580 – 640 nm, siguiendo El 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.

Preparación del reactivo: al Stock de Leadmium Green® se agregó 50 μ L de dimetilsulfoxido (DMSO) a un vial de 50 μ g 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 μ L de solución Stock en 180 μ L de agua desionizada.

5.3.5 Detección de plomo intracelular In Vivo por fluorescencia empleando el colorante Leadmium Green® AM, en *Brachionus calyciflorus*.

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 Alvarado-Flores (2010), 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 la concentración de plomo igual a 1.0 mg/L Pb, en tres tiempos de exposición al tóxico (2h, 12h y 18h), se usaron neonatos de < 12 de nacidos. Se colocaron 30 organismos 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 (Revco Scientific, Inc) para cada tiempo de exposición correspondiente con un foto-período de luz oscuridad 16:8 h, a 25 °C ± 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 30 minutos sin luz (Revco Scientific, Inc), a 25 °C ± 2. Transcurridos los 30 minutos 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.

5.3.6 Determinación de los factores de bioconcentración del plomo en el ensayo reproductivo de 4 días.

Se determinó solamente el plomo en agua y rotíferos por espectrofotometría de absorción atómica usando un aparato Analyst 800, con autosampler 90, y TGHA, acorde al protocolo de Mejía (1997), con un límite de detección para la técnica de 1.8µg/L. Se calculó el factor de bioconcentración (FCB) por medio de la fórmula de Paquin *et al.*, (2003).

5.4 Análisis de sustancias químicas en el agua de rotíferos y extractos de rotíferos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Se realizó una detección de sustancias químicas en rotíferos por Microextracción en Fase Sólida (SPME). Utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas: detector de masas selectivo equipado con una columna HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25- μ m). Las condiciones del equipo y la detección de las sustancias químicas en rotíferos acorde a las condiciones establecidas por Garza-León (2010), para la detección de hormonas en agua residuales y potables. El agua usada para la detección en rotíferos fue la empleada para el cultivo normal de la especie (aguas reconstituida), se obtuvo una muestra de 50 ml de un frasco de cultivo de 250 ml de la cámara bioclimática cultivado por 96 horas con una densidad de inicial de 1000 rotíferos y una densidad de alimento (alga *Nannochloris oculata*) de 5×10^6 células/ml, la cual fue inmediatamente centrifuga a 12,000 rpm durante 12 minutos para eliminar los rotíferos y el alga y obtener 5 mililitros de sobrenadante, a la cual se colocó en un vial de vidrio ámbar. Posteriormente se introdujo la fibra de poliacrilato de 85 μ m (la cual fue pre-acondicionada en el equipo, colocándola 2h a 300°C en el puerto de inyección), aproximadamente 20 mm dentro de la muestra y se dejó en contacto durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación moderada con una barra magnética. Finalmente se colocó la fibra en el cromatógrafo de gases para la detección de semioquímicos. El mismo procedimiento se realizó para los extractos de rotíferos que fueron aproximadamente 1000 organismos en un volumen total de 1 mililitro, el extracto de rotífero se genero por agitación con esferas pequeñas de vidrio en el vortex a máxima potencia durante 10 minutos, posteriormente se centrifugo y se obtuvo el sobrenadante al cual se realizó la detección de semioquímicos por fibras.

5.4.1 Experimentos de competencia inter específica de especies de rotíferos dulceacuícolas; *B. calyciflorus* versus *Lecane quadridentata*.

El experimento se llevo a cabo en condiciones de cámara bioclimática a una temperatura de 25 °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Se alimentaron con una concentración de alga *Nannochloris oculata* igual a 5×10^6 células/ml

(Cepa LB2194 de la colección de la Universidad de Texas) cultivada en medio Bold's (Nichols, 1973). El experimento duró 4 días.

Los experimentos se realizaron por triplicado de la siguiente manera para *B. calyciflorus* **versus** *Lecane quadridentata*:

- 1 10Bc = 10 Organismos de *B. calyciflorus*.
- 2 10Lq = 10 Organismos de *L. quadridentata*.
- 3 5Bc 5Lq = 5 Organismos de *B. calyciflorus* y 5 Organismos de *L. quadridentata*.
- 4 8Bc 2Lq = 8 Organismos de *B. calyciflorus* y 2 Organismos de *L. quadridentata*.
- 5 8Lq 2Bc = 8 Organismos de *L. quadridentata* y 2 Organismos de *B. calyciflorus*.

5.5 Análisis Morfológico.

Mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido se analizaron estructuras de interés en los rotíferos dulceacuícolas controles e intoxicados, además se realizó una caracterización morfológica tomando como parámetro indicador las siguientes medidas: longitud máxima y anchura máxima, de hembras partenogenéticas, machos, huevos partenogenéticos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados (quistes). Las fotografías fueron obtenidas con JEOL LV 5000 MEB y el análisis morfológico se hizo con el programa Infinitum Analyze and Capture (Figura 9).

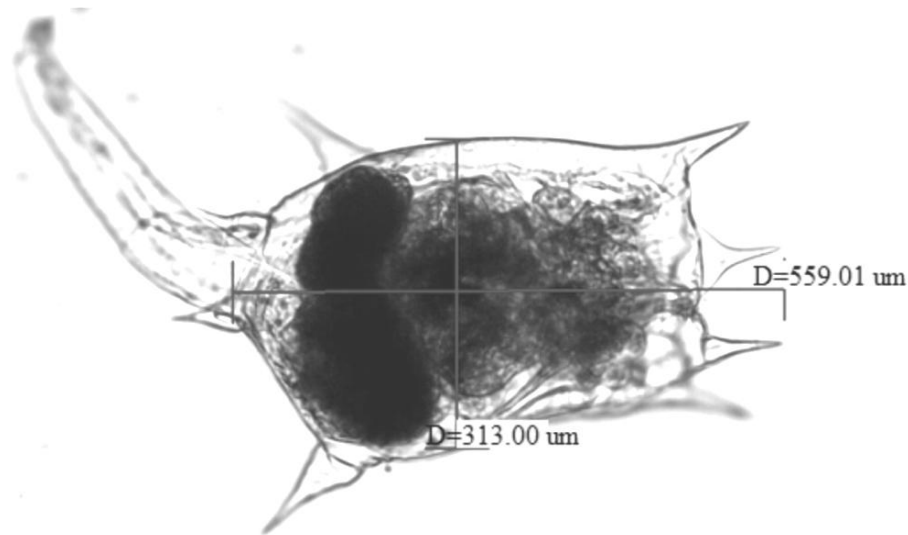


Figura 9. Longitud máxima y anchura máxima en el rotífero *Brachionus calyciflorus* 10x.

5.6 Análisis Estadístico.

Para el modelo reproductivo de 4 días se empleó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), y pruebas de comparación (Duncan), todo esto para determinar los puntos CNOE, CMOE, y por último análisis de regresión múltiple para obtener el valor de CE₅₀ (Concentración donde el 50 % de la población evaluada presenta un efecto estadísticamente significativo con respecto al control).

Los valores fueron analizados mediante la siguiente fórmula: $r = \ln (Nt - No) / t$; donde r = tasa de intrínseca de crecimiento de hembras y machos; Nt = Número de rotíferos vivos en la poza al final del experimento; No = Número inicial de rotíferos en la poza; \ln = logaritmo natural; t = tiempo de exposición.

Para las variables de hembras con huevos, huevos y machos se utilizó las siguiente fórmula: $x = \ln (Nt) / t$; x : hembras con huevos sexuales y asexuales, ó machos ó huevos sexuales y asexuales presentes al final del experimento; Nt : hembras con huevos sexuales y asexuales, ó machos ó huevos sexuales y asexuales encontrados al final del experimento; \ln = logaritmo natural; t = tiempo de exposición.

Los resultados de inhibición de eclosión huevos sexuales fecundados y no fecundados (que origina machos), y cópula son presentados en %. Los resultados de los ensayos de fertilización de 48 horas, los datos son presentados en un total de producción de quistes. Así mismo los datos de competencia inter específica de rotíferos los datos se presentan como un total de organismos encontrados a las 96 horas.



6. Resultados.

6.1 Caracterización morfológica del rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville Florida.

La longitud y anchura máxima de hembras, machos, huevos partenogenéticos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados (quistes) del rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville Florida se muestran en el cuadro 3. En la figura 10 se muestran fotografías de hembras, machos y los diferentes tipos de huevos que produce el rotífero *B. calyciflorus*.

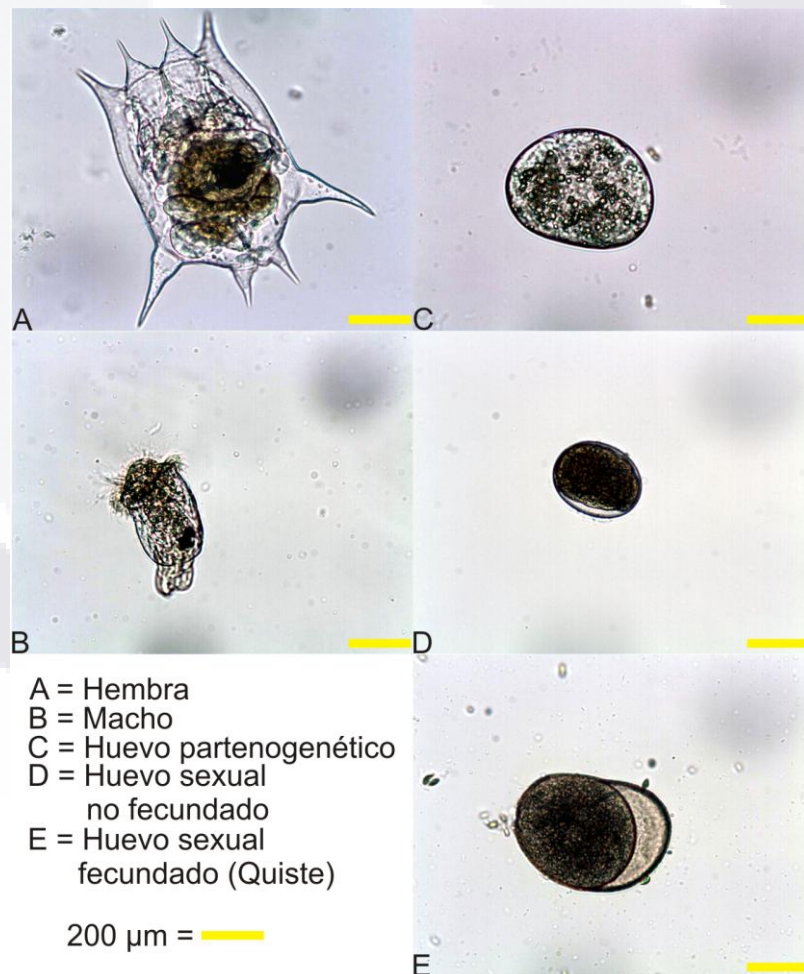


Figura 10. Fotografías de hembras, machos, huevos partenogenéticos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados del rotífero *B. calyciflorus*.

Cuadro 3. Longitud y anchura máxima de *B. calyciflorus*.

	Longitud máxima	Anchura máxima	N
Hembras	478.91 ± 37.26	271.63 ± 34.43	20
Machos	213.29 ± 12.83	109.51 ± 10.13	20
Huevos partenogénéticos	261.22 ± 22,10	197.76 ± 18.22	20
Huevos sexual fecundado	256.44 ± 20.29	182.41 ± 19.32	20
Huevos sexual no fecundado	142.07 ± 13.43	123.9 ± 10.78	20

6.1.1 Estudio de la reproducción sexual de especies potenciales de rotíferos dulceacuícolas para la evaluación de tóxicos con efectos de disrupción endocrina.

En el presente trabajo se utilizó el rotífero *Brachionus calyciflorus* como organismo de prueba para los tóxicos considerados en el estudio, sin embargo se analizó y estudio la reproducción sexual de otras especies de rotíferos que podrían ser considerados para estudios posteriores por su potencial y sus características fascinantes reproductivas en cuestión de reproducción sexual, a continuación se describen los resultados obtenidos de especies de rotíferos como: *Cephalodella catellina*, *Filinia novaezealandiae*, *B. araceliae*, *B. quadridentatus*, *Epiphanes brachionus*, *Lecane cornuta* y *B. ibericus* (rotífero marino: cepa de Veracruz, México). Se realizaron principalmente videos sobre su comportamiento sexual.

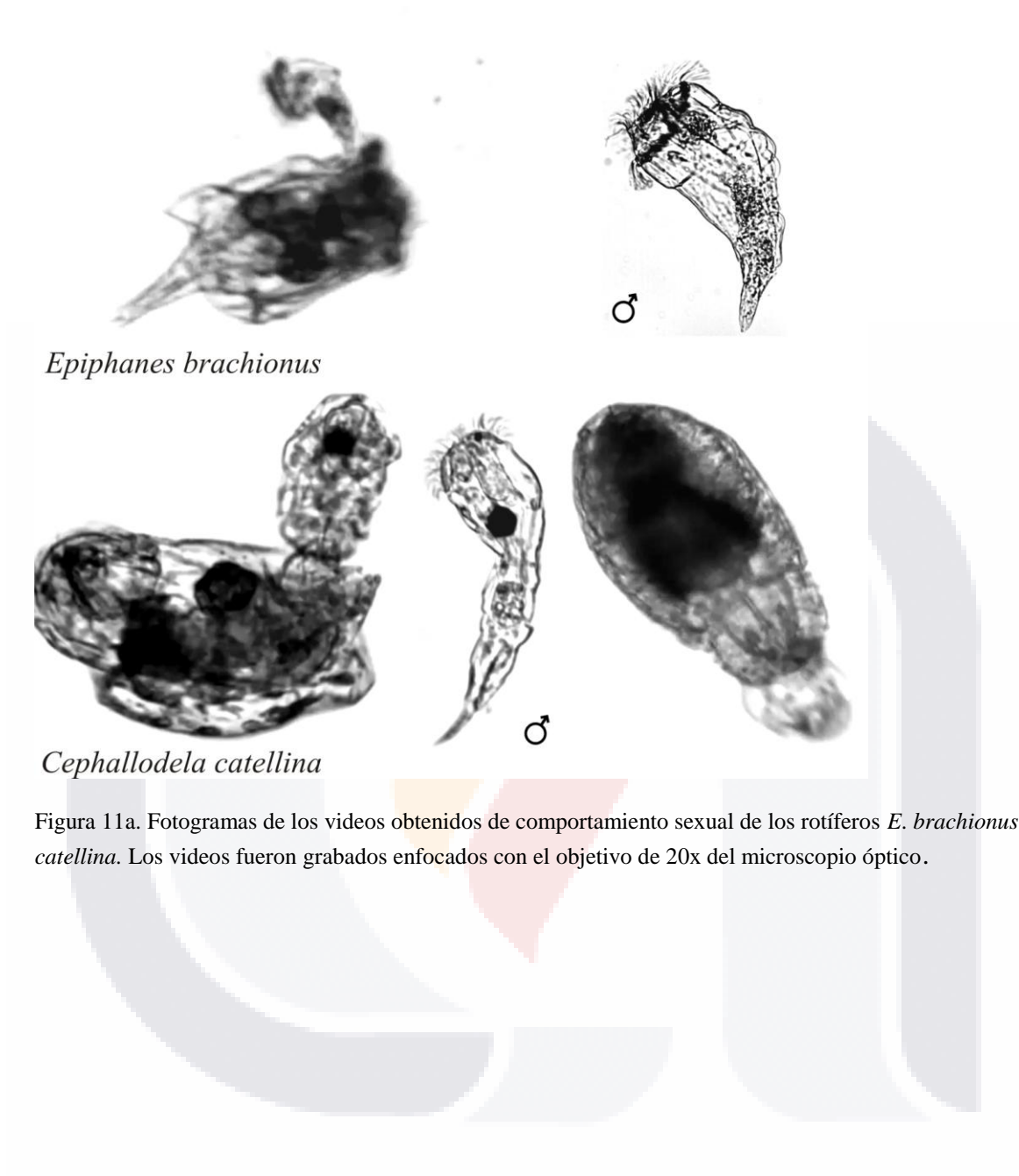
Se reporta por vez primera el macho del rotífero *F. novaezealandiae* (Figura 11b). La hembra de la especie *B. quadridentatus* es copulada en repetidas ocasiones incluso al mismo tiempo por 5 machos. Caso contrario en el rotífero *B. araceliae*, *E. brachionus* y *F. novaezealandiae*. La cópula es realizada en la corona de los rotíferos, en todos los organismos videograbados, excepto en *F. novaezealandiae*, la cual se lleva acabo justo en la parte anterior del rotífero donde sobresalen sus espinas. El rotífero *B. araceliae* tiene un comportamiento interesante respecto a otros rotíferos, ya que generalmente el macho es quien busca a la hembra, caso contrario en el rotífero *B. araceliae*. El macho se fija en el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fondo y mueve su corona haciendo círculos con ella en un eje, lo que facilita el contacto con la hembra que está alrededor del macho, para posteriormente el macho realizar el reconocimiento específico y copular la hembra. La hembra y el macho giran constantemente al momento de la cópula, y claramente se observa que la hembra del rotífero *B. araceliae* puede cambiar de dirección los giros con sus alas (video de reproducción sexual de *B. araceliae*).

Se reporta por vez primera el comportamiento sexual del rotífero *Cephalodella catellina*; el cual a diferencia de otros comportamientos se hicieron las siguientes observaciones que pueden ser apreciadas en el video de reproducción sexual de *C. catellina*: a) la cópula puede suceder en la corona de la hembra y/o incluso en la parte posterior de la hembra justo donde sale el pie del rotífero, b) la transferencia de espermatozoides puede ser por medio del pene-pie y/o un sifón situado en la corona del macho, el cual incrusta en la corona de la hembra, este sifón o estructura tubular puede servir de gancho para sujetar a la hembra (Figura 11a), c) la hembra se comporta renuente a ser copulada, y tiende a ser de comportamiento agresivo con otras hembras de su propia especie, y d) la hembra mata a los machos al final de la cópula con movimientos circulares que son impactos directos al macho y los cuales terminan destrozando al macho, en esta etapa la hembra puede estar atrapando espermatozoides liberados por este comportamiento, o solo esta asegurando que no se reproduzca o intente copular nuevamente el macho. Dichas observaciones son consistentes y se pueden observar claramente en el video de reproducción sexual de *C. catellina*.

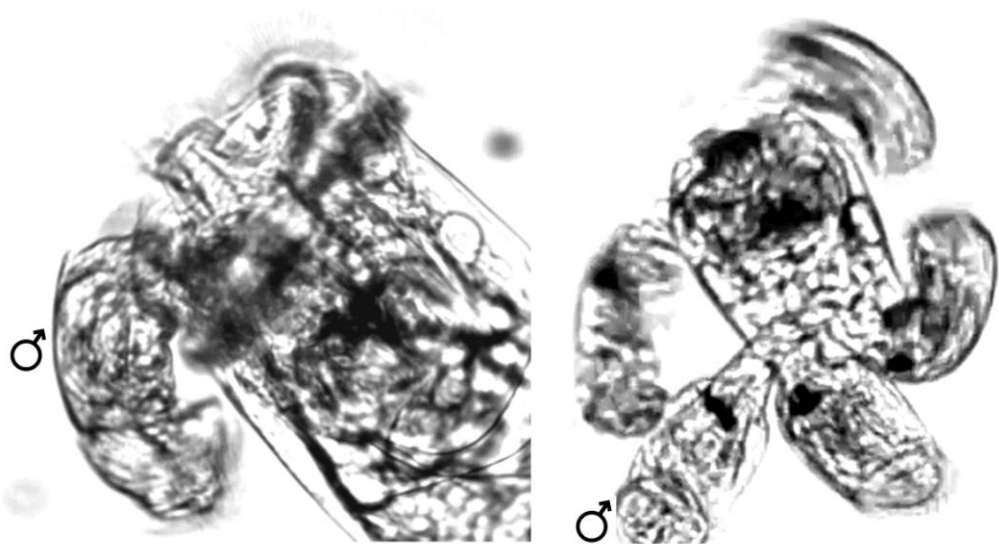
Por otro lado, se cultivaron constantemente por más de 6 meses la especie *Lecane cornuta* sin lograr observar machos. De igual manera pero con mayor tiempo de cultivo (12 meses), el rotífero *Brachionus ibericus*, no presento machos. Solo se observo la reproducción partenogenética. Aunque cabe señalar que son dos especies de rotíferos (Figura 11c) con un potencial para la inducción de la reproducción sexual por tóxicos capaces de hacerlo.



Epiphanes brachionus

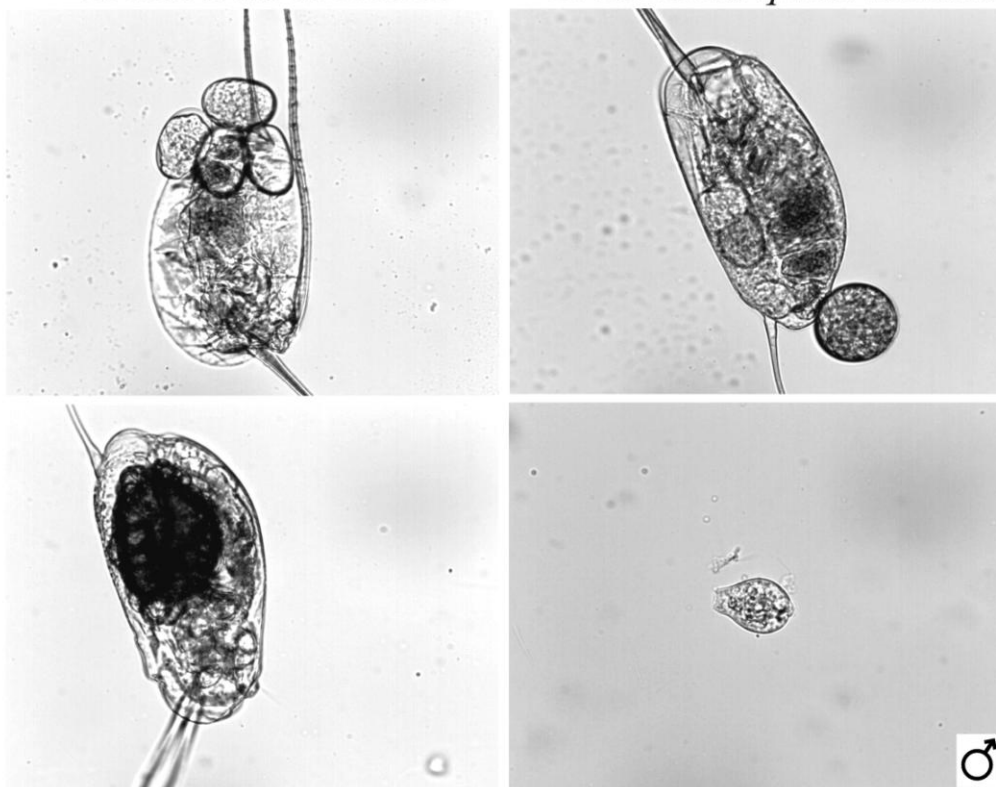
Cephalodella catellina

Figura 11a. Fotogramas de los videos obtenidos de comportamiento sexual de los rotíferos *E. brachionus* y *C. catellina*. Los videos fueron grabados enfocados con el objetivo de 20x del microscopio óptico.



Brachionus araceliae

Brachionus quadridentatus



Filinia novaezealandiae

Figura 11b. Fotogramas de los videos obtenidos de comportamiento sexual de los rotíferos *B. araceliae*, *B. quadridentatus*. Para el rotífero *F. novaezealandiae* son fotografías digitales. Los videos fueron grabados enfocados con el objetivo de 20x del microscopio óptico.

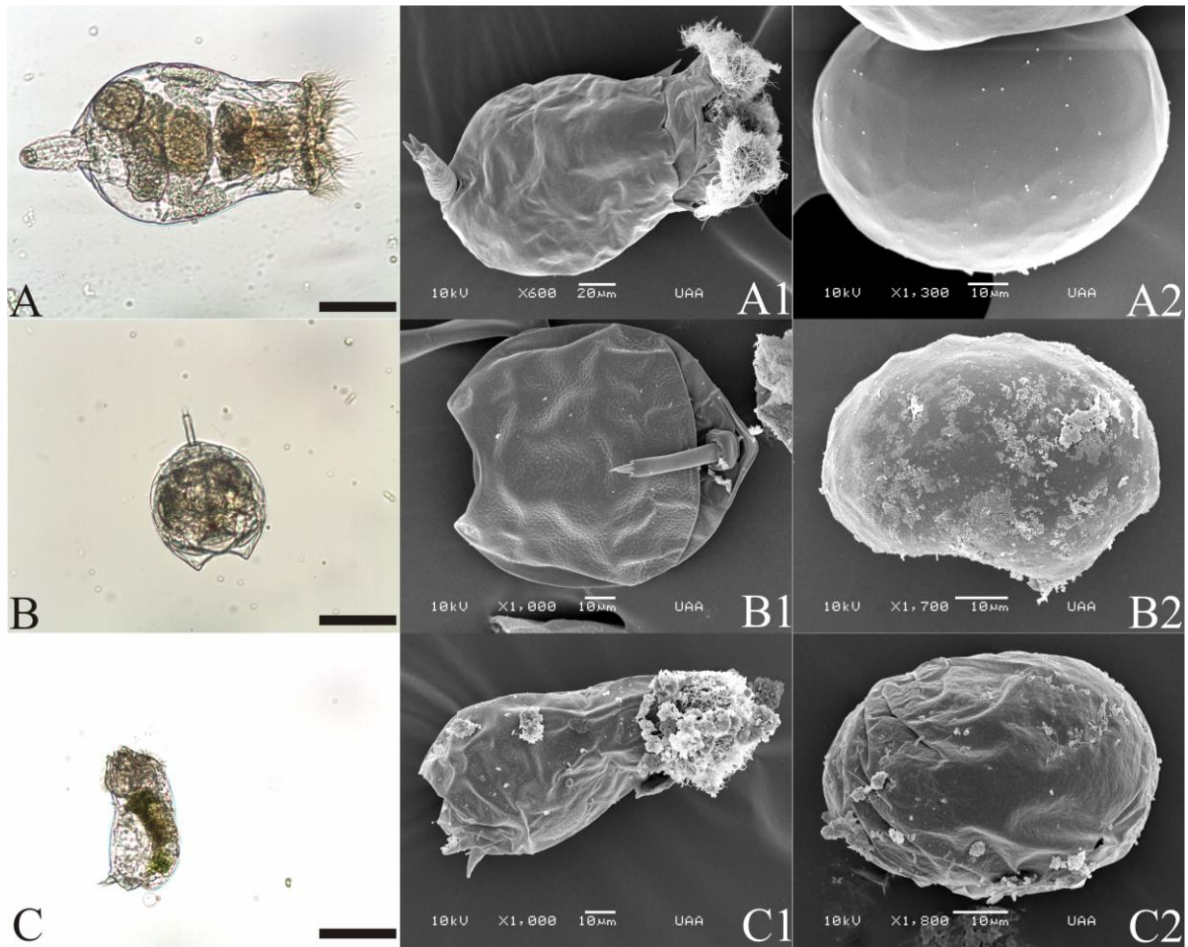


Figura 11c. Fotografías al microscopio electrónico de barrido de rotíferos dulceacuícola cultivados en el laboratorio como especies potenciales para estudios de reproducción sexual. A) *Brachionus ibericus*, A1) Vista dorsal de *B. ibericus*, A2) huevo partenogenético de *B. ibericus*; B) *Lecane cornuta*, B2) Vista dorsal de *L. cornuta*, B3) huevo partenogenético *L. cornuta*; C) *Cephalodella catellina*, C1) Vista dorsoventral de *C. catellina*, y C3) huevo partenogenético de *C. catellina*. La barra negra indica 200 µm.

6.2 Caracterización genética del rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville Florida.

Todos los ensayos toxicológicos fueron realizados con el rotífero *B. calyciflorus* cepa Gainesville Florida. En nuestra cepa se logró obtener ADN genómico de alto peso molecular (110 ng/ μ l; $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 0.64$), se amplificó el gen COX1, posteriormente se purificó y se mandó secuenciar al Langebio. La secuencia del gen COX1 obtenida, fue comparada usando un alineamiento múltiple (ClustalW) en el programa MegAlign 5.00 1993-2000 DNASTAR Inc., con 10 secuencias de genes COX1 reportadas en el rotífero *B. calyciflorus* en la base de datos del NCBI. Los datos de la extracción de ADN, amplificación y purificación se muestran en la figura 8. Se obtuvo un árbol filogenético de nuestra cepa con 10 cepas representativas de la base de datos y adicionalmente el alineamiento de 29 secuencias de rotíferos del gen COX1 (datos del NCBI), los resultados se muestran en la figura 13, se obtuvieron los porcentajes de identidad, y divergencia (Figura 14). Nuestra cepa *B. calyciflorus* tiene un porcentaje de identidad del 92% con el rotífero *B. calyciflorus* cepa Florida (numero de acceso NCBI: DQ07167). Nuestra cepa es idéntica genéticamente al rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Florida reportada en el NCBI.

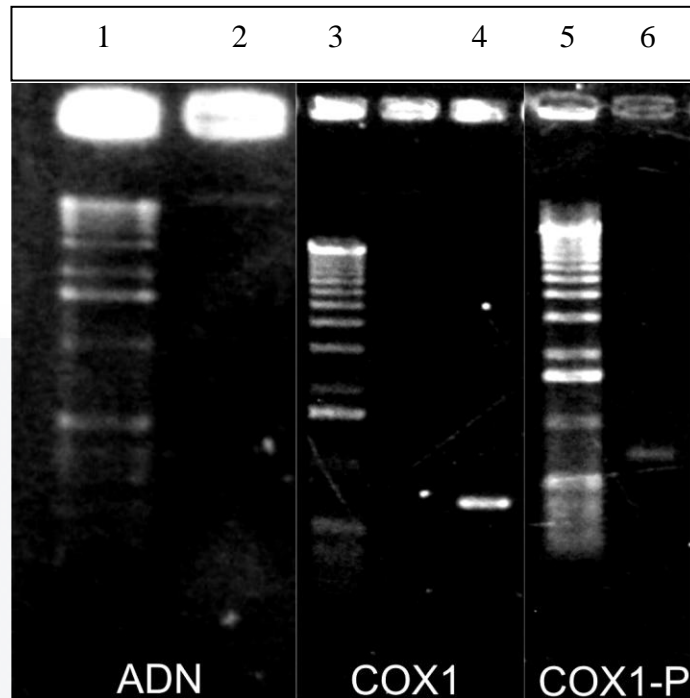
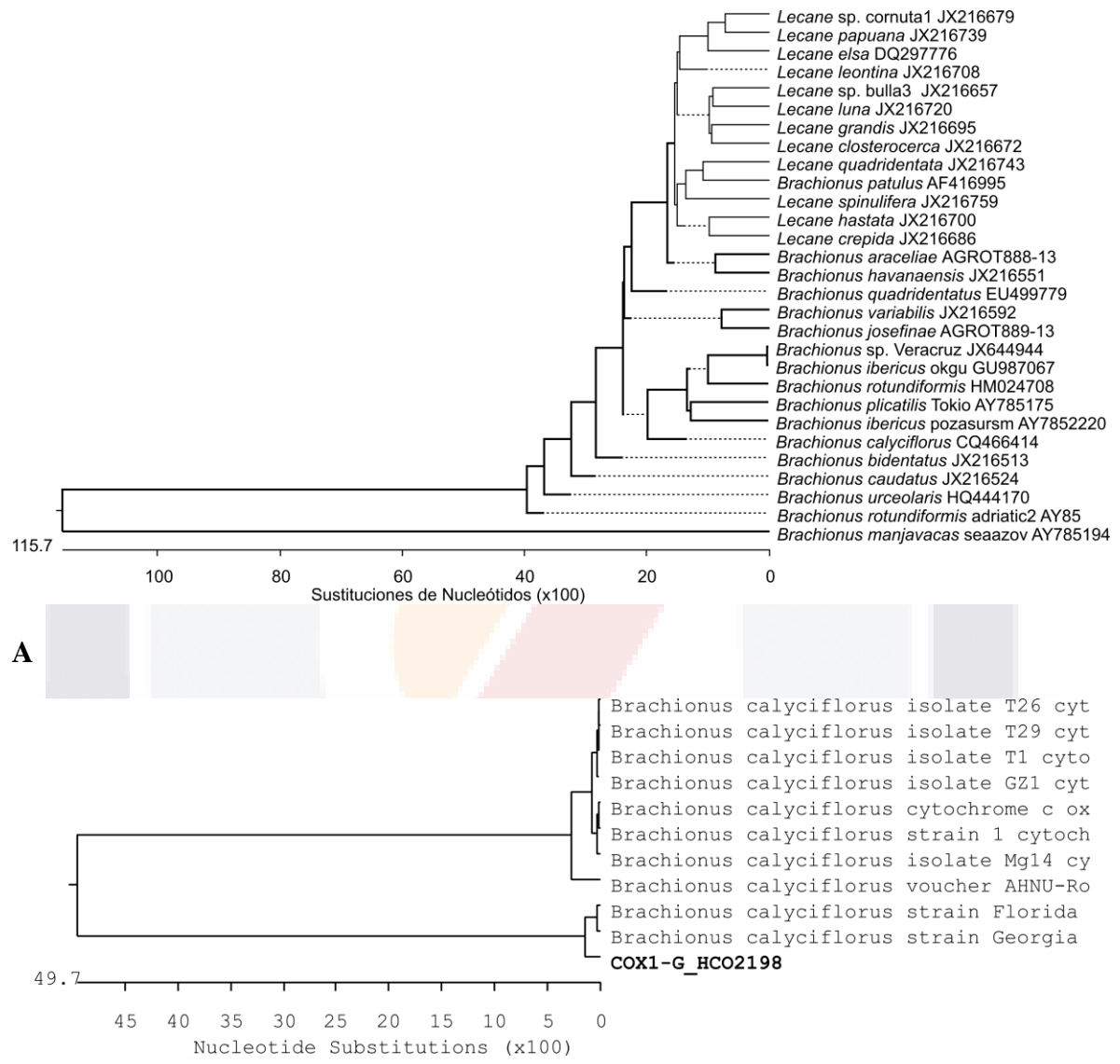


Figura 12. Extracción de ADN, amplificación (COX1) y purificación del gen COX1 (COX1-P) en el rotífero *B. calyciflorus*. Carriles: 1, 3 y 5 = marcador de peso molecular; 2 = ADN; 4 = amplificación del gen COX1; y 6 = purificación del gen COX1.

Secuencia del gen COX1 amplificado del rotífero *B. calyciflorus* cepa Gainesville Florida.

```
GGGTGACCAAAAAATCAAATAAGTGTTGGTATAATACAGGATTGCCTCCACC
TGCAGGATCAAAGAAAGAAGTATTAATAATTACGATCAGTTAAAAGCATTGTAA
TAGCACCAGCTAATACTGGAAGCCTAGTAATTAATAAAAATTGCTGTTACAGCA
ACAGCTCATAAGAATAAAGGCAAACGATCTAAAGAAATTCTCTTTGTTGTACG
AGAACAGATAATTGTAGTTAAAAAATTAATTCTACCTAAAATAGAAGAAATAC
CAGATAAATGAAGCCTAAAAATAGCTAAATCTACTGAAATACCTCTATGGTAT
CTGGAATCAGATAGAGGAGGATAAACAGTTCAACCTGTGCCAACACCTGCATC
AATTGCTGAGGAAAGAAGTAAAAACATAAAAAGCTGGAACATAAAAGTCAAAAA
GATAAATTATTCATTCGAGGAAATGCCATATCTGCTACTCCTAACATAAGAGGA
ATTAACCAGTTACCAAAACCTCCTATAGAGACAGGCATAACTATAAAGAAAAT
TATTACAAAGGCATGAGCTGTTACTAAAACATTATAAAGATGCTCATCTCCTAA
ATAAGAACCAACTACACCTAACTCTAAACGAATTAATAAATCTCATTCTTAAACC
AATTAAACCAGCTCAAATACCAAAAATAAAAATAAAGAGTCCCAATATCTTTAT
GAA
```



B

Figura 13. **A)** Árbol filogenético del rotífero *Brachionus calyciflorus* obtenido del alineamiento de 29 especies de rotíferos (los números de acceso de la base de datos del NCBI están justo a un lado del nombre específico de cada rotífero); **B)** Árbol filogenético de la secuencia obtenida del gen COX1 (COX1-G_HCO2198) secuenciada del rotífero *B. calyciflorus*, comparada con 10 secuencias del gen COX1 reportadas en el rotífero *B. calyciflorus* en la base de datos del NCBI.

		Percent Identity												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
Divergence	1	■	44.2	40.5	44.5	44.0	44.0	43.9	47.6	92.0	91.4	40.0	1	58.-COX-G_HCO2198
	2	95.3	■	95.3	99.4	98.7	98.7	98.4	95.9	40.6	40.6	91.0	2	Brachionus calyciflorus cytochrome c ox
	3	97.1	1.3	■	95.5	96.7	96.7	96.4	91.7	43.0	43.0	94.7	3	Brachionus calyciflorus isolate GZ1 cyt
	4	93.3	0.5	1.4	■	98.7	98.7	98.4	95.7	41.2	40.7	91.3	4	Brachionus calyciflorus isolate Mg14 cy
	5	95.2	1.3	0.0	1.4	■	100.0	99.7	94.9	40.8	40.4	91.8	5	Brachionus calyciflorus isolate T1 cyto
	6	95.2	1.3	0.0	1.4	0.0	■	99.7	94.9	40.8	40.4	91.8	6	Brachionus calyciflorus isolate T26 cyt
	7	95.7	1.6	0.3	1.7	0.3	0.3	■	94.6	40.6	40.3	91.5	7	Brachionus calyciflorus isolate T29 cyt
	8	96.3	0.2	1.4	0.3	1.3	1.3	1.6	■	39.7	39.6	87.8	8	Brachionus calyciflorus strain 1 cytoch
	9	0.0	99.3	97.3	97.2	99.2	99.2	99.6	96.6	■	100.0	42.7	9	Brachionus calyciflorus strain Florida
	10	0.0	99.6	96.5	99.0	100.4	100.4	100.8	95.4	0.0	■	42.8	10	Brachionus calyciflorus strain Georgia
	11	99.5	5.8	4.9	5.7	5.2	5.2	5.5	5.6	98.5	97.8	■	11	Brachionus calyciflorus voucher AHNU-Ro
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		

Figura 14. Porcentaje de identidad y divergencia de nuestra secuencia del gen COX1 (58.-COX-G_HCO2198) obtenida del rotífero *B. calyciflorus*, comparada con 10 secuencias de genes COX1 reportadas en el rotífero *B. calyciflorus* en la base de datos del NCBI.

6.3 Caracterización toxicológica en el rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville Florida.

La detección del efecto adverso de los metales: plomo (Pb), arsénico (As) y zinc (Zn); las hormonas: hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH); y del fungicida vinclozolin (Vz), fueron caracterizados usando un ensayo reproductivo de 4 días donde se consideró: tasa intrínseca de crecimiento de hembras o producción total de hembras (ht), machos (mt), tasa de producción de hembras con huevos asexuales o huevos partenogenéticos (hhp), hembras con huevos sexuales no fecundados que originan machos (hhm), hembras con huevos sexuales fecundados o conocidos también como quistes (hq), y finalmente la tasa de producción de huevos asexuales o partenogenéticos (hp), huevos sexuales no fecundados que originan machos (hm), así como la tasa de producción huevos sexuales fecundados conocidos como quistes (q). El ensayo reproductivo de 4 días permitió analizar en detalle el incremento o decremento de hembras, machos, huevos asexuales y huevos sexuales producidos al final de la exposición a metales, hormonas y el fungicida, especificando el efecto adverso en la reproducción del rotífero *B. calyciflorus* (organismo modelo para la estimación de los niveles de disrupción endocrina). El ensayo reproductivo permitió observar incrementos de machos y disminución de ellos en sincronía con

incrementos y decrementos de hembras, así mismo la producción de huevos partenogenéticos y sexuales, así como la cantidad de hembras que estaban en ese momento del análisis cargando huevos asexuales o sexuales. A continuación se describen en detalle los resultados obtenidos.

6.3.1 Efectos adversos de los metales: plomo (Pb), arsénico (As) y zinc (Zn), en la reproducción asexual y sexual del rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville Florida.

6.3.1.1 Efecto de los metales Pb, As y Zn en la tasa intrínseca de crecimiento de hembras y machos.

6.3.1.1.1 Plomo.

Es evidente como se observa en la figura 15, el efecto adverso del plomo en la reproducción asexual al disminuir drásticamente la tasa de producción de crecimiento de hembras (ht), conforme se incrementa la concentración de plomo, sin embargo es muy interesante resaltar el efecto positivo del plomo sobre la tasa de producción de machos (mt), en contraste a lo observado en las hembras. La concentración efectiva 50 (CE₅₀) para el parámetro indicador de crecimiento intrínseco de hembras es de 0.68 mg/L, más detalles sobre los valores toxicológicos se observan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Valores de toxicidad crónica para el plomo, obtenidos en el ensayo reproductivo de 4 días en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. Los valores son expresados en mg/L.

Parámetro	Tóxico: Plomo mg/L
CNOE	0.1
CMOE	0.5
CE ₅₀	0.68
r ²	0.75
Limite de confianza	0.36 – 1.0

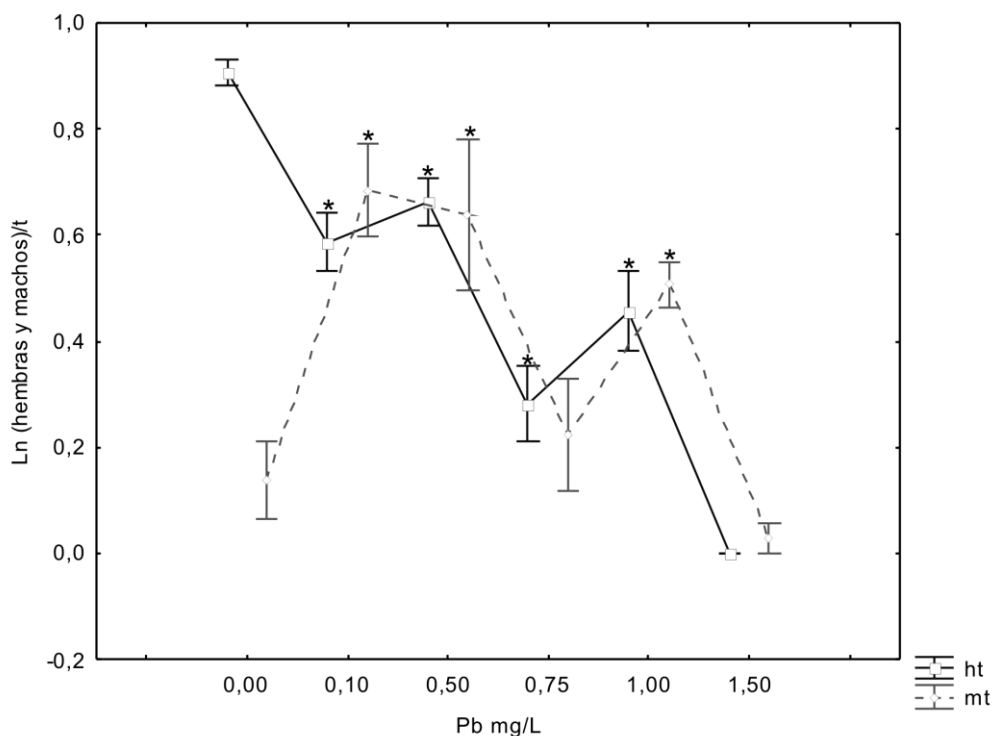


Figura 15. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras y machos del rotífero *Brachionus calyciflorus* expuestos al plomo (Pb) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.1.1.2 Arsénico.

El efecto adverso del arsénico sobre la tasa de producción de hembras y machos se describe de la siguiente manera: en las concentraciones 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 y 0.5 mg/L arsénico no hay diferencias significativas respecto al control, es decir no disminuye ni

aumenta la producción de hembras, sin embargo en este mismo rango de concentraciones si se observa un incremento significativo de la producción de machos, pero solo únicamente en la concentración de exposición 0.025 mg/L de arsénico. Interesantemente en las concentraciones de exposición de 1.0 mg/L, 1.5 mg/L, y 2.0 mg/L de arsénico (Figura 16), se observa un incremento significativo de producción de hembras y machos, fascinantemente conforme se incrementa la exposición a arsénico, llegando a un límite de 7.0 mg/L de arsénico, se logró observar un decremento en la tasa de producción de hembras y machos, estos últimos desapareciendo totalmente. El arsénico es un potente disruptor endocrino inductor de la producción de hembras y machos, ya que responden de manera similar a la exposición crónica del arsénico, existiendo por lo tanto una respuesta adversa sobre la reproducción sexual y asexual.

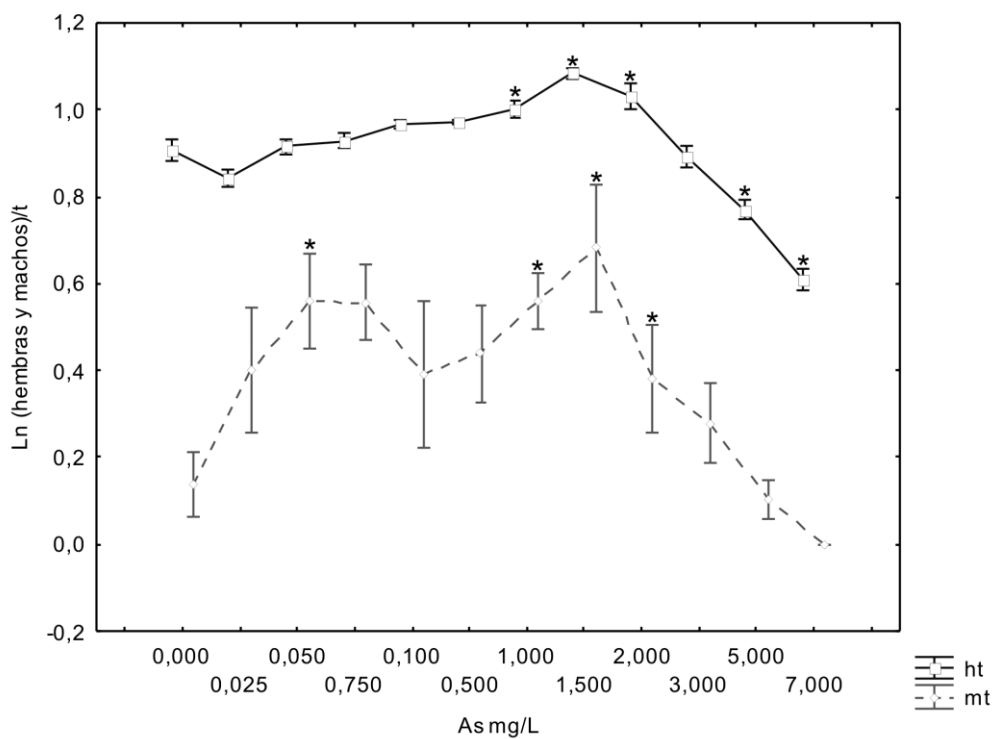


Figura 16. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras y machos del rotífero *Brachionus calyciflorus* expuestos al arsénico (As) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.1.1.3 Zinc.

El zinc disminuye abruptamente la tasa de producción de hembras totales (ht) conforme se incrementa la concentración de exposición (Figura 17), el valor de la concentración efectiva 50 (CE₅₀) es de 0.92 mg/L, más detalles sobre los valores toxicológicos se observan en el cuadro 5. La tasa de producción de machos totales (mt) alcanza su punto máximo de producción a una concentración de zinc de 0.1 mg/L, y a partir de la concentración de 0.75 mg/L hasta 1.5 mg/L no se observan machos.

Cuadro 5. Valores de toxicidad crónica para el zinc, obtenidos en el ensayo reproductivo de 4 días en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. Los valores son expresados en mg/L.

Parámetro	Tóxico: Zinc mg/L
CNOE	0.25
CMOE	0.5
CE ₅₀	0.92
r ²	0.92
Limite de confianza	0.73 – 1.09

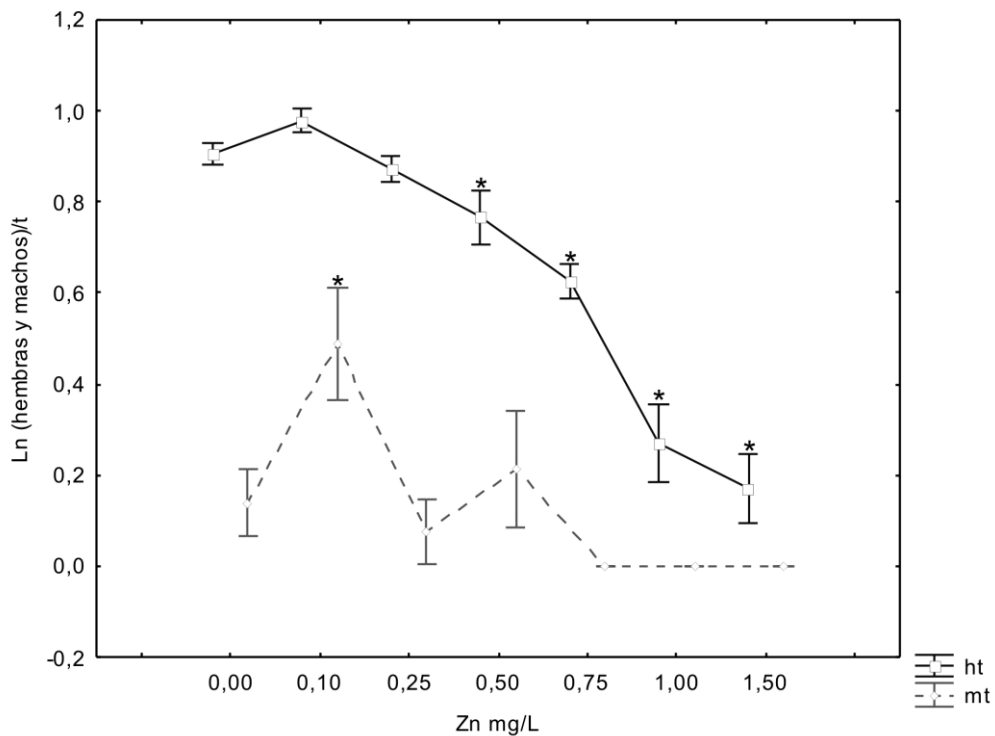


Figura 17. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras y machos del rotífero *Brachionus calyciflorus* expuestos al zinc (Zn) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.1.2 Efecto del Pb, As y Zn en la tasa de producción de hembras con huevos partenogenéticos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados.

6.3.1.2.1 Plomo.

El plomo disminuye la producción de hembras con huevos partenogenéticos (hhp) a partir de la concentración de 0.1 mg/L, esta tendencia se observa en todas las concentraciones empleadas en el ensayo reproductivo de 4 días (Figura 18). A diferencia de la producción de hembras con huevos sexuales no fecundados que originan machos (hhm), ya que el plomo a una concentración de 1.0 mg/L favorece su producción. El plomo si induce la producción de hembras con quistes en un rango de exposición de 0.5 – 1.0 mg/L.

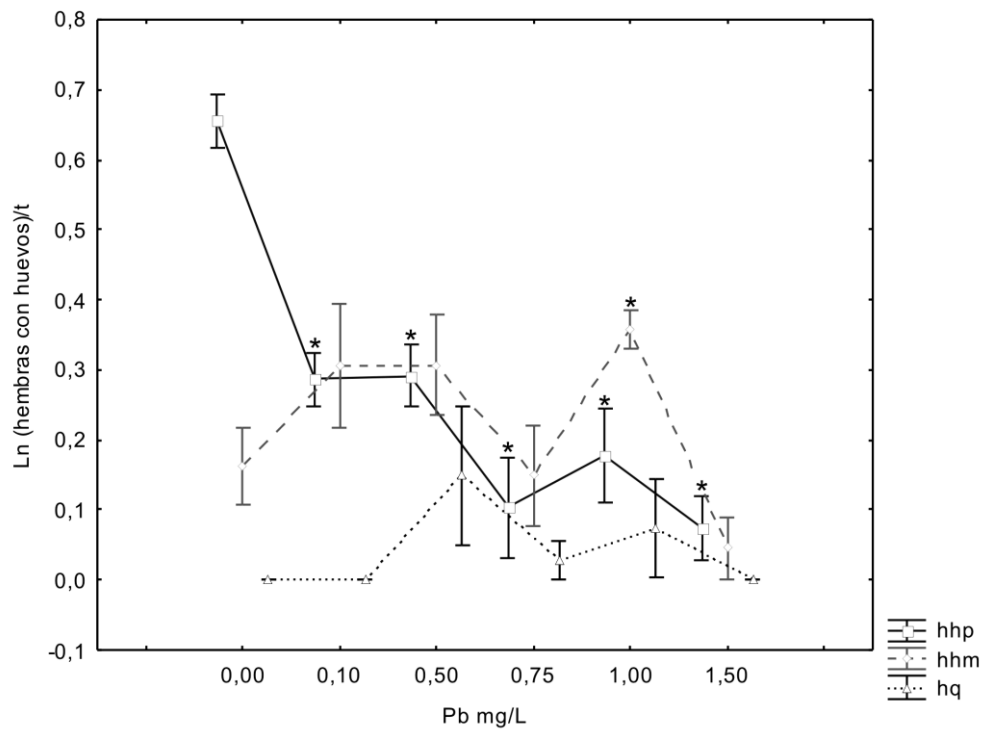


Figura 18. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogenéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestos al plomo (Pb) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.1.2.2 Arsénico.

El arsénico disminuye la tasa de producción de hembras con huevos partenogenéticos (hhp) a una concentración de 0.025 mg/L y 7.0 mg/L, en contraste se incrementa a la producción de hembras con huevos partenogenéticos (hhp) en la concentración de 1.5 mg/L (Figura 19). Es importante señalar e interesante que exista un incremento de la producción de hembras con huevos sexuales no fecundados que originan machos (hhm) una concentración de 1.5 mg/L, ya que coincide con un incremento de hembras con huevos partenogenéticos. La producción de hembras con quistes (hq), no se incrementa, solo se observó un ligero incremento pero no significativo en la concentración de exposición 1.0 mg/L.

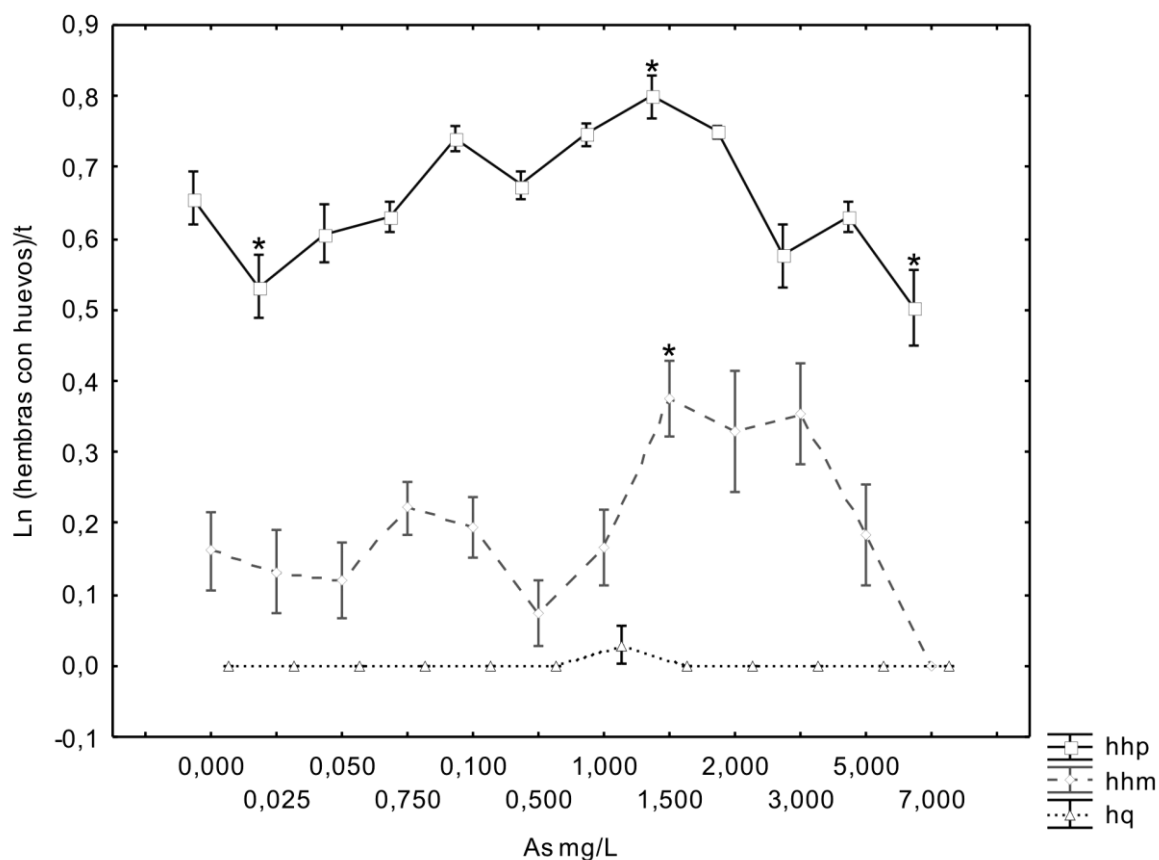


Figura 19. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogénicos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestas al arsénico (As) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.1.2.3 Zinc.

El zinc disminuye la tasa de hembras con huevos partenogénicos (hhp) y la tasa de producción de hembras con huevos sexuales no fecundados que originan machos (hhm) (figura 20). No hubo presencia de hembras con quistes en ninguna concentración de exposición considerada para el ensayo reproductivo de 4 días.

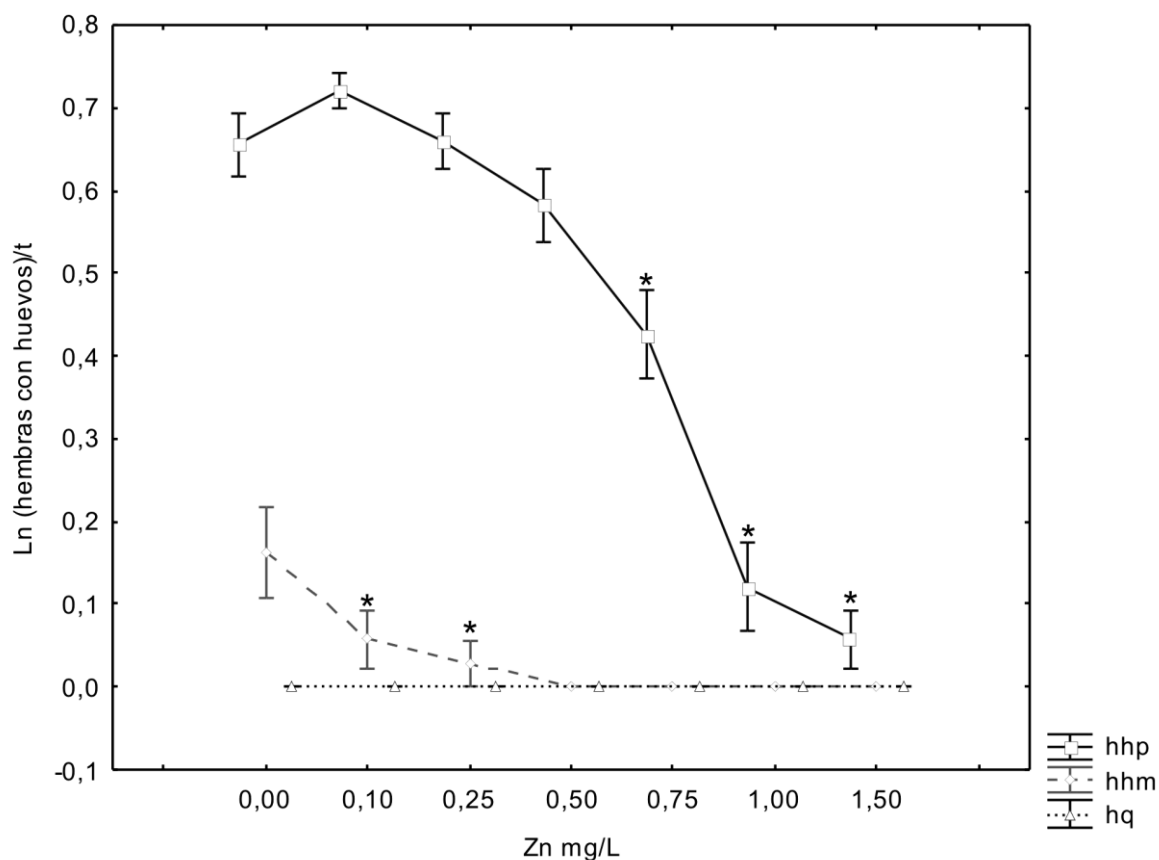


Figura 20. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogénéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestas al zinc (Zn) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.1.3 Efecto del Pb, As y Zn en la tasa de producción de huevos partenogénéticos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados.

6.3.1.3.1 Plomo.

El plomo disminuye en todas las concentraciones de exposición en el ensayo reproductivo de 4 días, la producción de huevos partenogénéticos (hp). Y se observa una tendencia de incremento de huevos sexuales no fecundados que originan machos (hm), siendo un incremento significativo respecto al control en la concentración de exposición de

1.0 mg/L (Figura 21). La producción de quistes (q) se incrementa justo en los picos más altos de producción de machos. Es evidente que existe una gran variación en la producción de huevos sexuales no fecundados que originan machos.

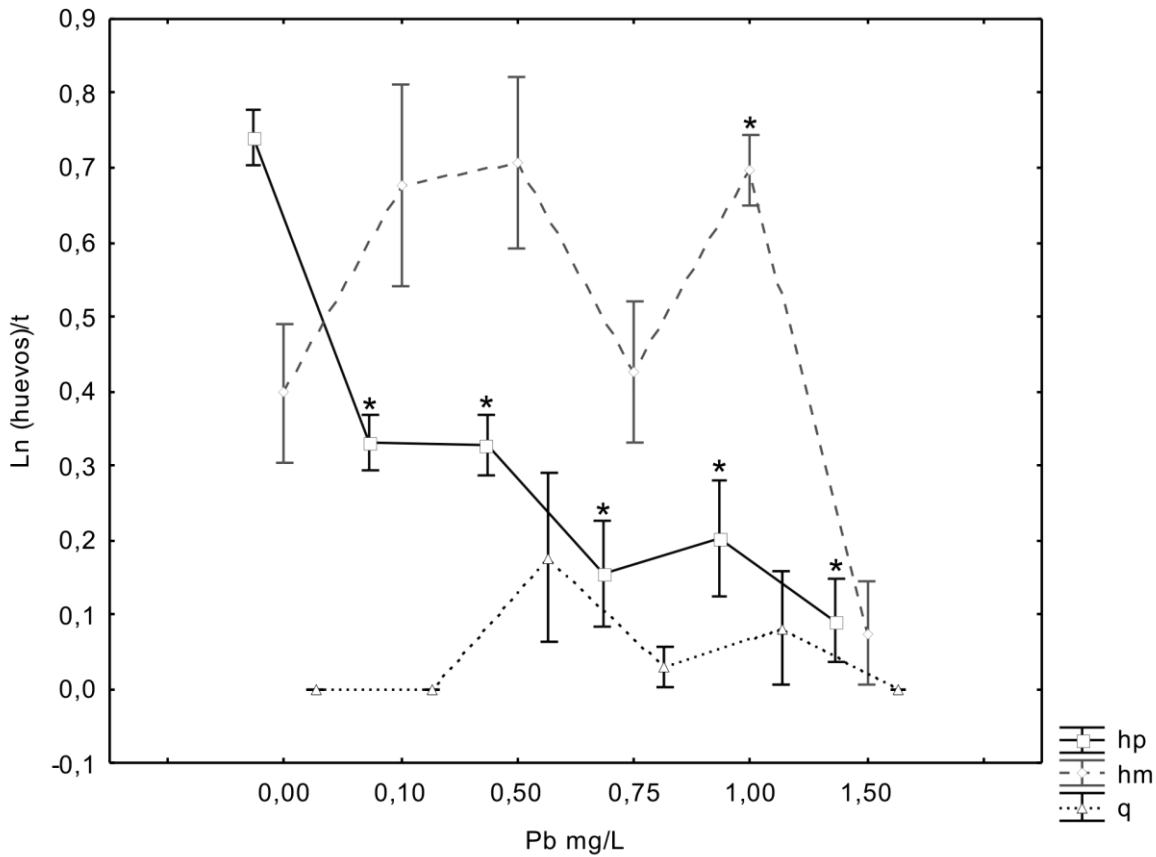


Figura 21. Tasa de producción de huevos partenogénicos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos al plomo (Pb) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.1.3.2 Arsénico.

La producción de huevos partenogénéticos disminuye en las concentraciones de exposición de 0.025 mg/L y 7.0 mg/L. Y la producción de huevos sexuales no fecundados que originan machos (hm) se incrementa significativamente respecto al control en la concentración de 2.0 mg/L. La producción de quistes es nula excepto por un ligero incremento en la concentración de 1.0 mg/L (figura 22).

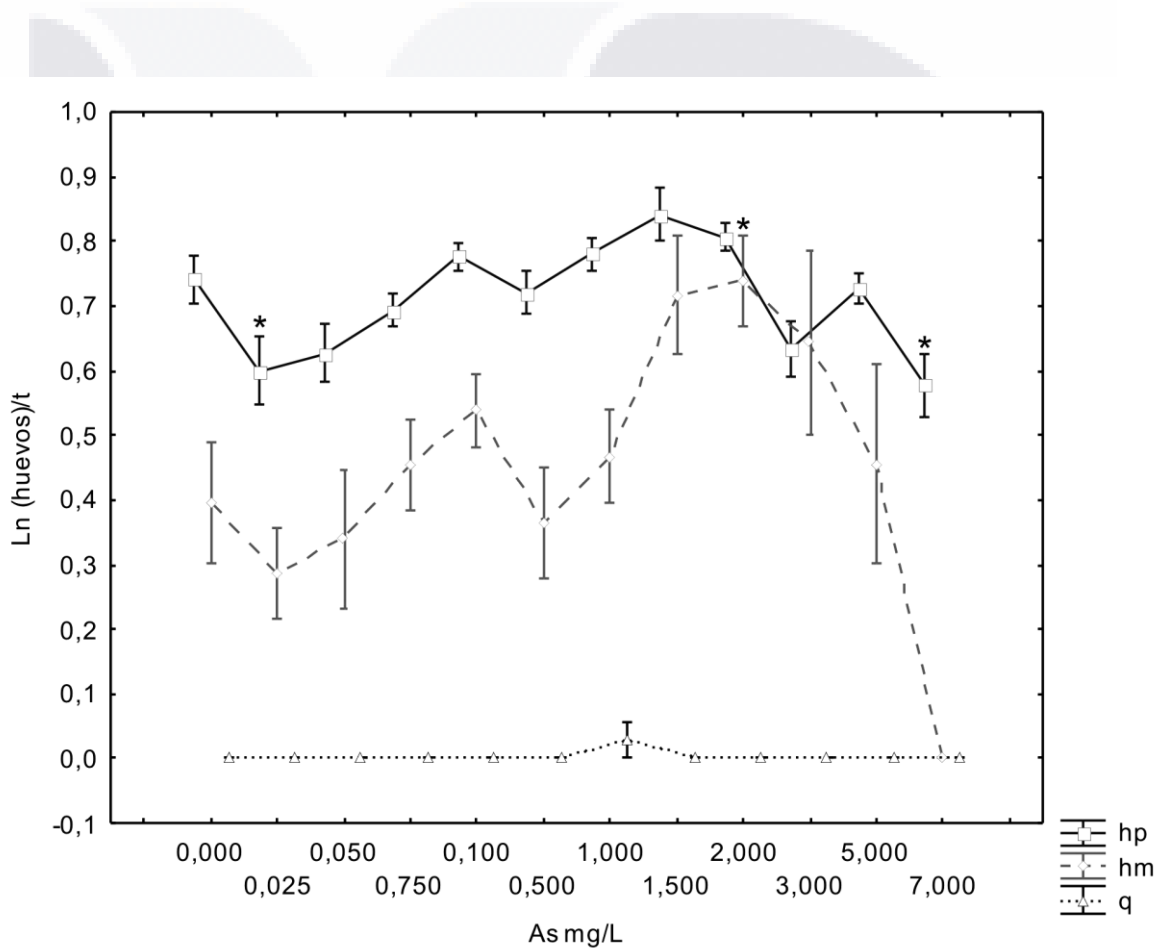


Figura 22. Tasa de producción de huevos partenogénéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos al arsénico (As) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.1.3.3 Zinc.

La producción de huevos partenogénéticos, y huevos sexuales no fecundados que originan machos disminuye al incrementar la concentración de zinc. La producción de quistes es nula (figura 23).

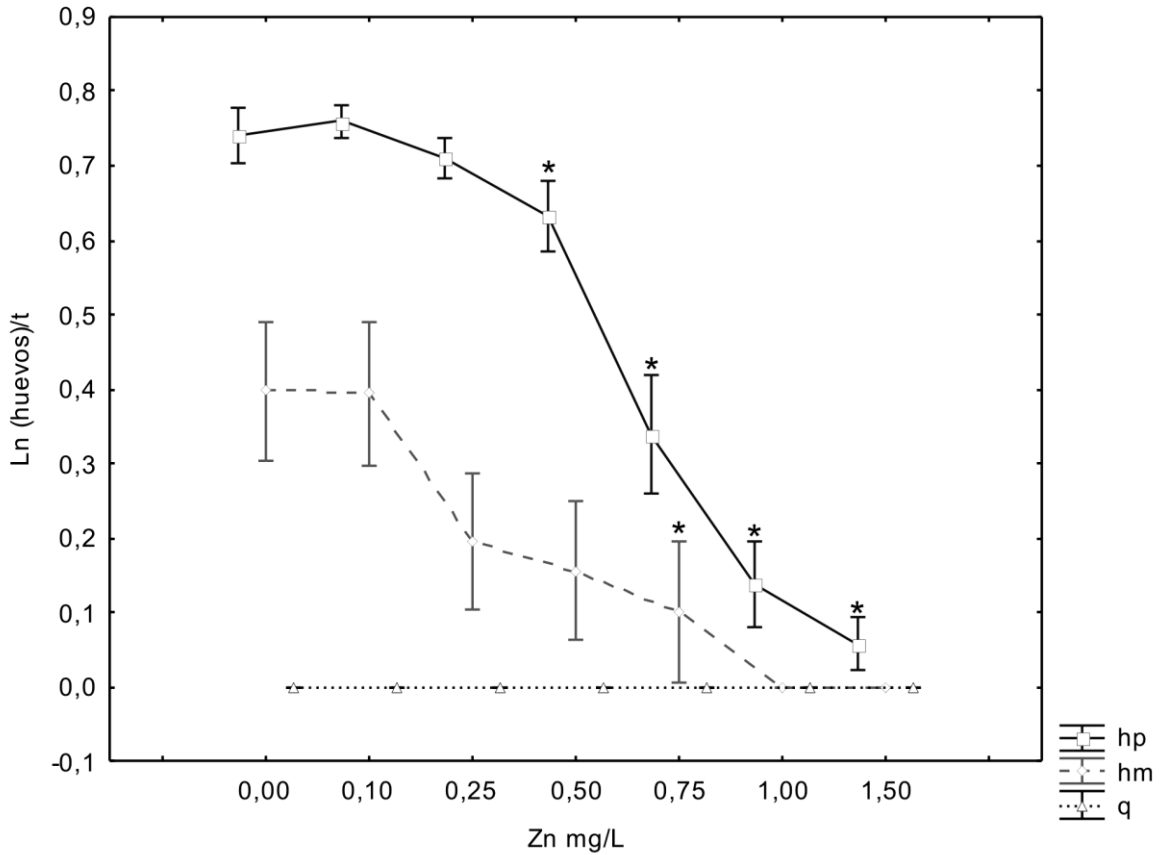


Figura 23. Tasa de producción de huevos partenogénéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos al zinc (Zn) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.3 Efectos adversos del disruptor endocrino vinclozolin (Vz) y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) en la reproducción asexual y sexual del rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville Florida.

6.3.3.1 Efecto del disruptor endocrino vinclozolin (Vz) y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) en la tasa intrínseca de crecimiento de hembras y machos.

6.3.3.1.1 Vinclozolin.

Como se logra observar en la figura 20 el vinclozolin es un potente disruptor endocrino porque incrementa significativamente en todas las concentraciones de exposición la producción de hembras y de machos. Se puede observar en la producción de machos un efecto de claro de U invertida (hormesis), una de las características que poseen los disruptores endocrinos (Figura 24).

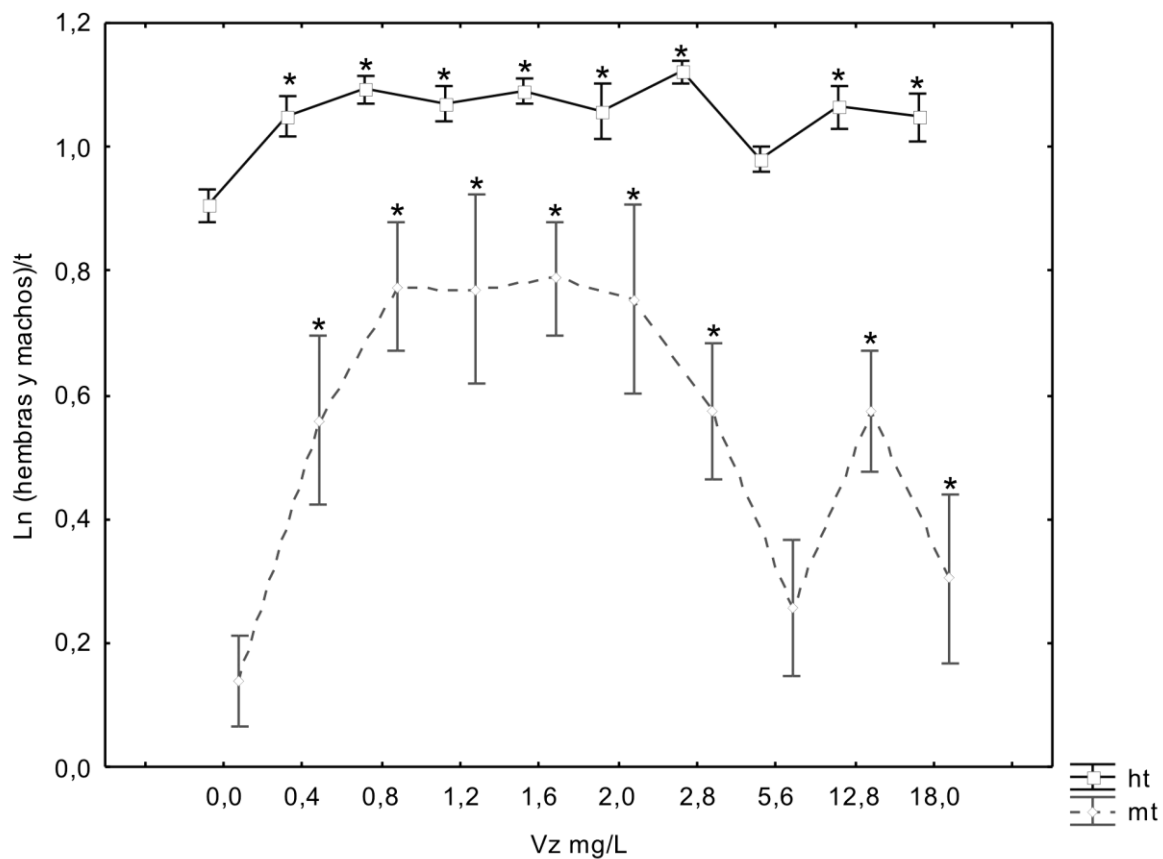


Figura 24. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras (ht) y machos (mt) del rotífero *Brachionus calyciflorus* expuestos a vinclozolin (Vz) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.3.1.2 Hormona luteinizante.

La hormona luteinizante favorece la producción de hembras, y favorece increíblemente la producción de machos alcanzado valores de producción tan altos que son muy cercanos a los observados en hembras (Figura 25).

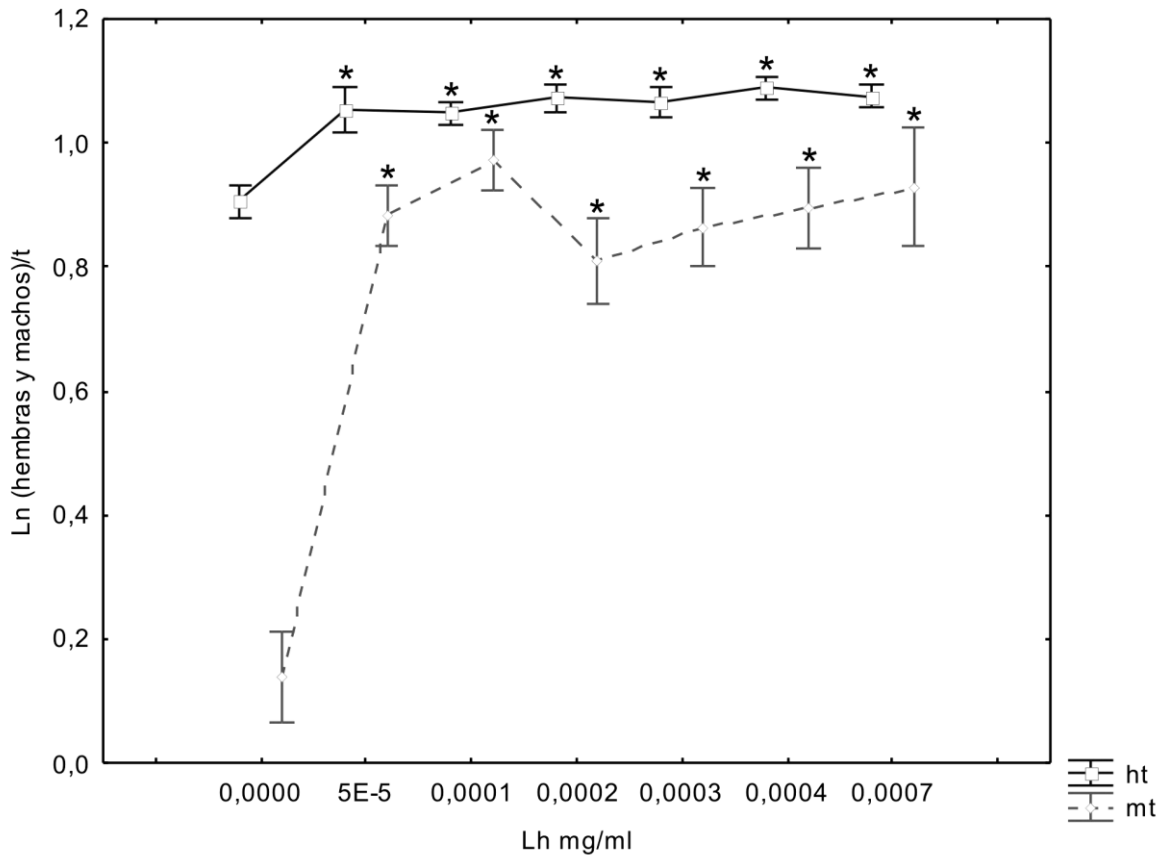


Figura 25. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras (ht) y machos (mt) del rotífero *Brachionus calyciflorus* expuestos a la hormona luteinizante (LH) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.3.1.3 Hormona folículo estimulante.

La hormona folículo estimulante no tiene efecto alguno en la producción de hembras. En cuanto a la producción de machos se observa un incremento no significativo, ya que se observan muchas variaciones en la producción total de machos (Figura 26).

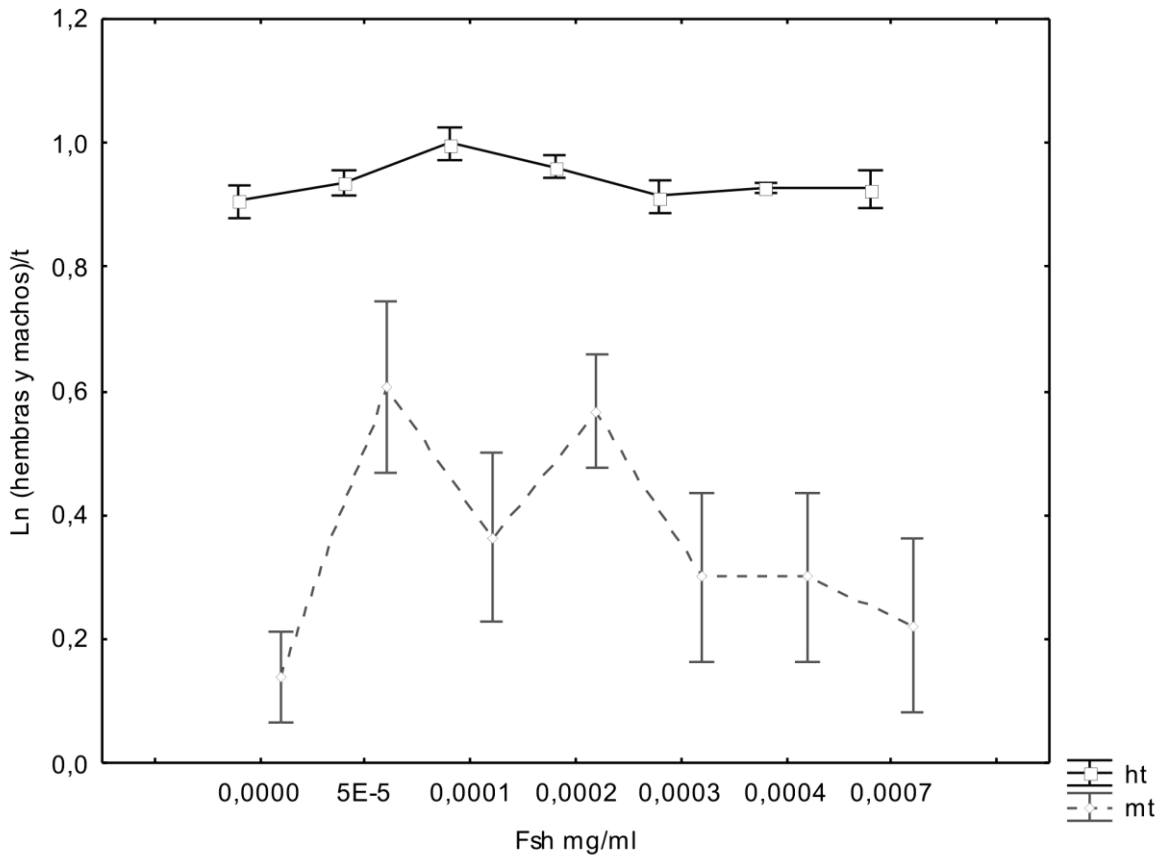


Figura 26. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras (ht) y machos (mt) del rotífero *Brachionus calyciflorus* expuestos a la hormona folículo estimulante (FSH) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.3.2 Efecto del disruptor endocrino vinclozolin (Vz) y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) en la tasa de producción de hembras con huevos partenogenéticos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados.

6.3.3.2.1 Vinclozolin.

El disruptor endocrino vinclozolin incrementa la producción de hembra con huevos partenogenéticos (hhp), a una concentración de exposición de 2.8, 12.8 y 18 mg/L. En cuanto a la producción de hembras con huevos sexuales no fecundados que originan machos, no existen diferencias significativas respecto al control, sin embargo si existe una tendencia de incremento alcanzando el pico más alto de producción a una concentración de exposición de 2.8 mg/L de vinclozolin. En la producción de hembras con quistes se observa que conforme se incrementa la concentración de vinclozolin se da incremento de hembra con quistes alcanzando su punto máximo de producción en la concentración de exposición de 2.0 mg/L de vinclozolin. Siendo este incremento significativo respecto al control (Figura 27).

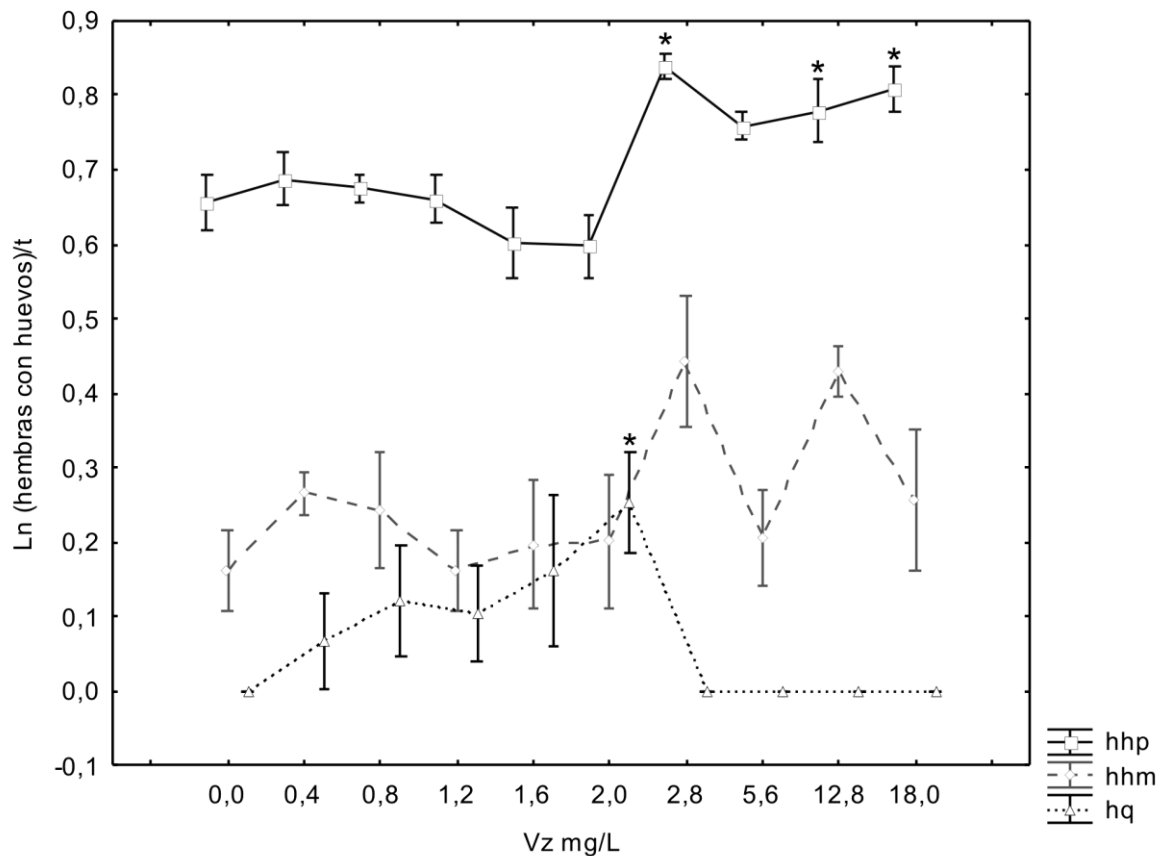


Figura 27. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogénéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestas al vinclozolin (Vz) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.3.2.2 Hormona luteinizante.

No existen diferencias significativas respecto al control en la producción de hembras con huevos partenogénéticos, hembras con huevos sexuales no fecundados que originan machos y hembras con quistes (Figura 28).

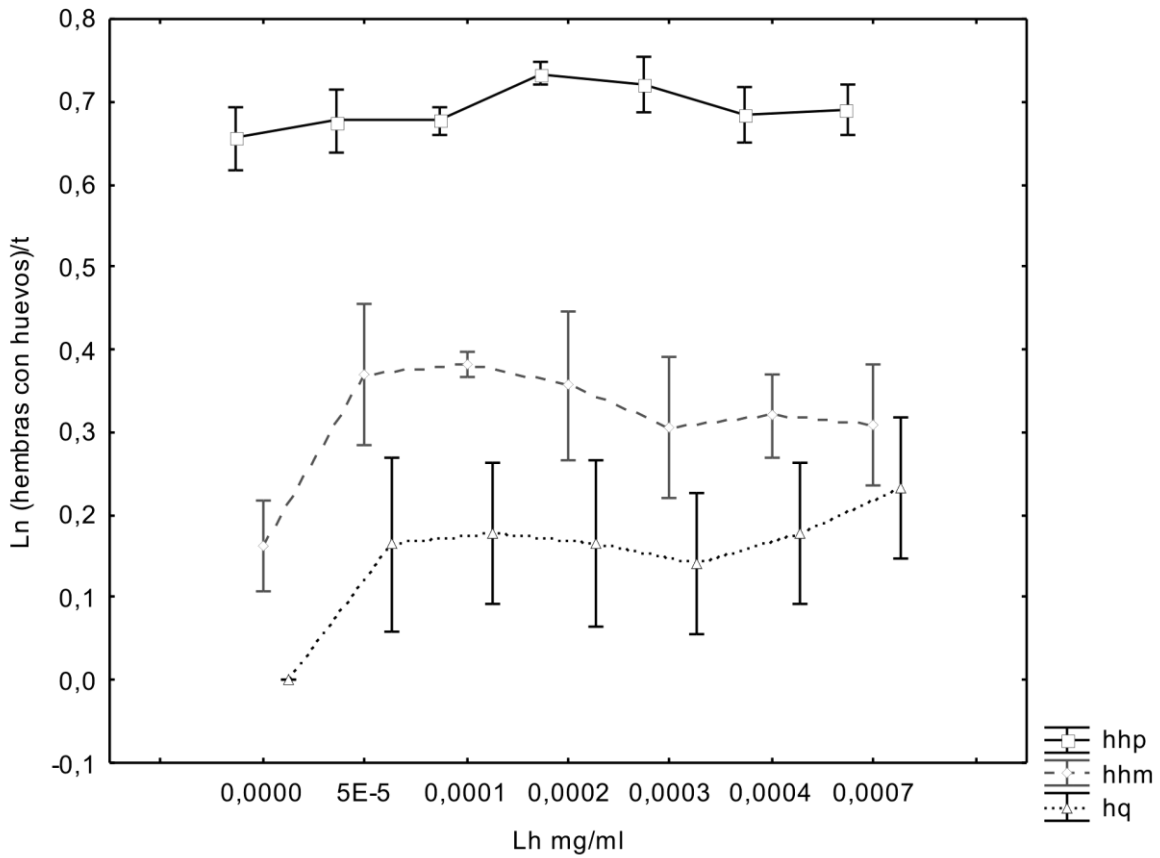


Figura 28. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogénéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestas a la hormona luteinizante (LH) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.3.2.3 Hormona folículo estimulante.

No existen diferencias significativas respecto al control en la producción de hembras con huevos partenogénéticos, hembras con huevos sexuales no fecundados que originan machos y hembras con quistes (Figura 29).

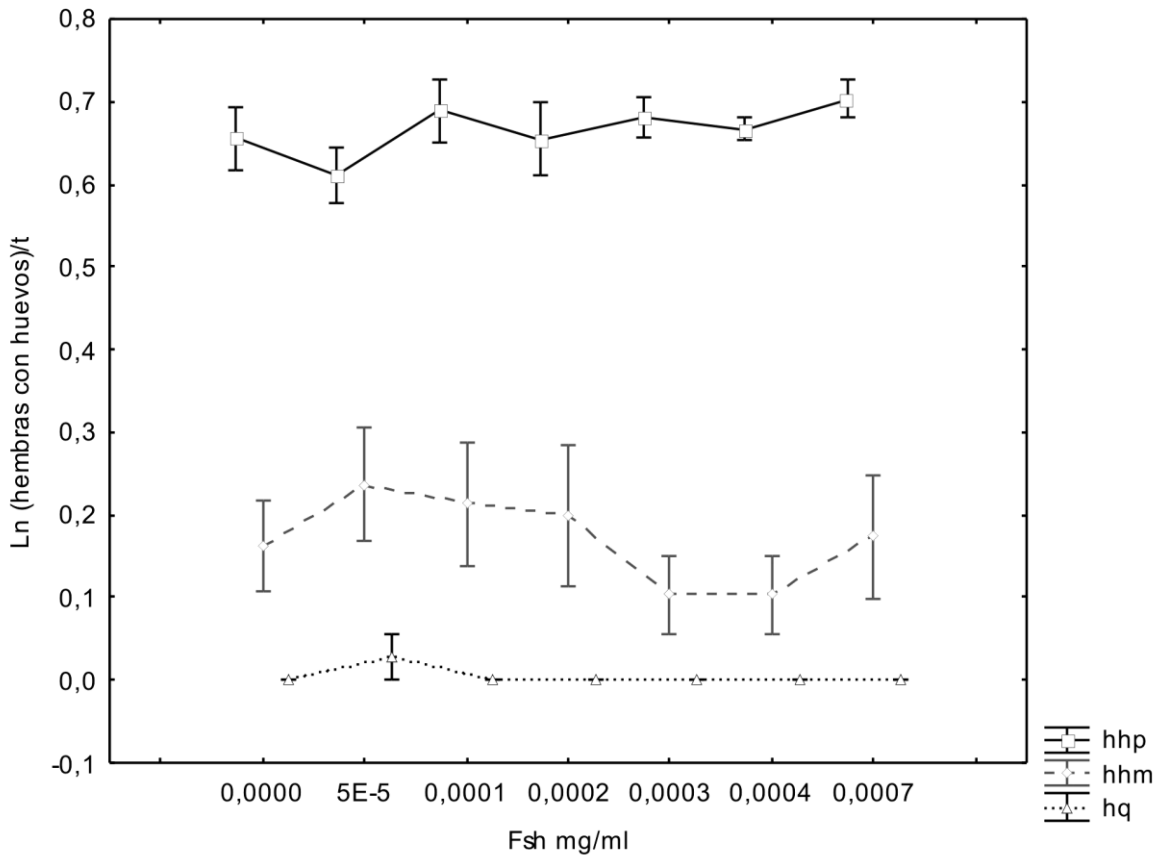


Figura 29. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogénéticos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), expuestas a la hormona folículo estimulante (FSH) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.3.3 Efecto del disruptor endocrino vinclozolin (Vz) y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) en la tasa de producción de huevos partenogenéticos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados.

6.3.3.3.1 Vinclozolin.

No existen diferencias significativas respecto al control en la producción de huevos partenogenéticos, y huevos sexuales no fecundados que originan machos, se observan grandes variaciones en la producción de los huevos que originan machos. En cuanto a la producción de quistes si se observa un incremento significativo respecto al control en la concentración de exposición de 2.0 mg/L. Este importante señalar y muy interesante analizar que este incremento de producción de quistes está muy cercano a los puntos donde se observa mayor producción de huevos partenogenéticos y huevos sexuales no fecundados que originan machos (Figura 30).

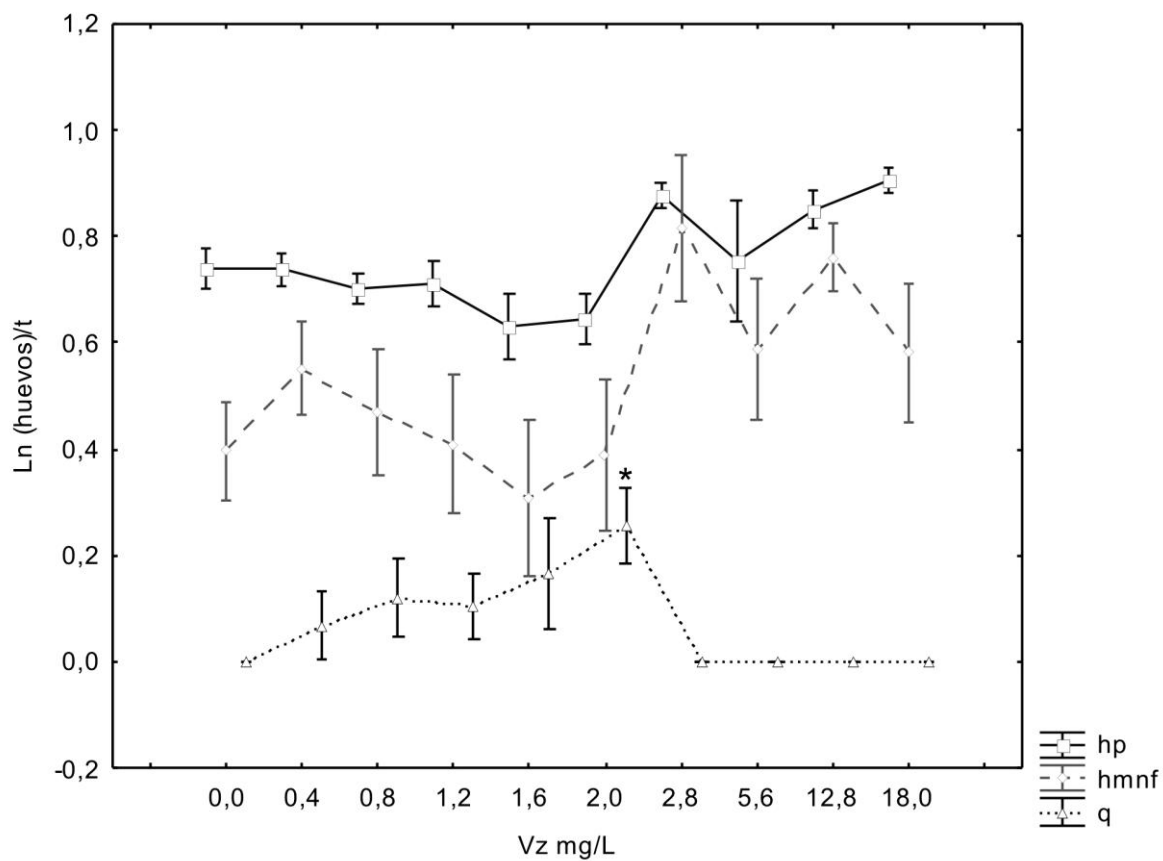


Figura 30. Tasa de producción de huevos partenogenéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos al vinclozolin (Vz) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.3.2 Hormona luteinizante.

No existen diferencias significativas respecto al control en la producción de huevos partenogénéticos, huevos sexuales no fecundados que originan machos y quistes. Fascinantemente la producción de huevos sexuales no fecundados que originan machos logra alcanzar la misma producción de huevos partenogénéticos, sin embargo por sus amplias variaciones no existen diferencias significativas. La producción de quistes se incrementa en todas las concentraciones exposición pero con grandes variaciones (Figura 31).

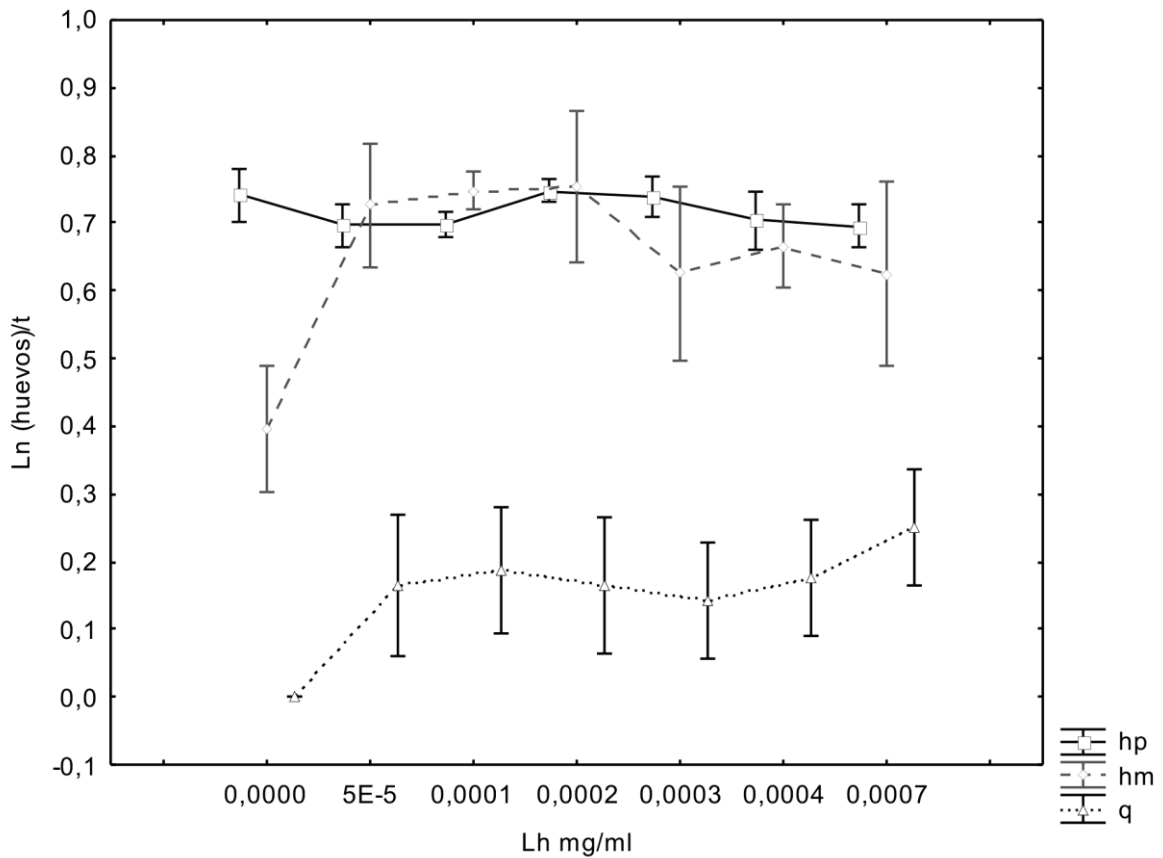


Figura 31. Tasa de producción de huevos partenogénéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos a la hormona luteinizante (LH) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.3.3 Hormona folículo estimulante.

No existen diferencias significativas respecto al control en la producción de huevos partenogenéticos, huevos sexuales no fecundados que originan machos y quistes. La producción de huevos sexuales no fecundados que originan machos tiene una tendencia a incrementarse y posteriormente disminuir, de igual manera pero en menor medida los huevos partenogenéticos, por lo tanto la hormona folículo estimulante no tiene efecto alguno sobre la producción de huevos. La producción de quistes es nula, solo se observa un ligero incremento en la concentración de exposición de 0.00005 mg/ml (Figura 32).

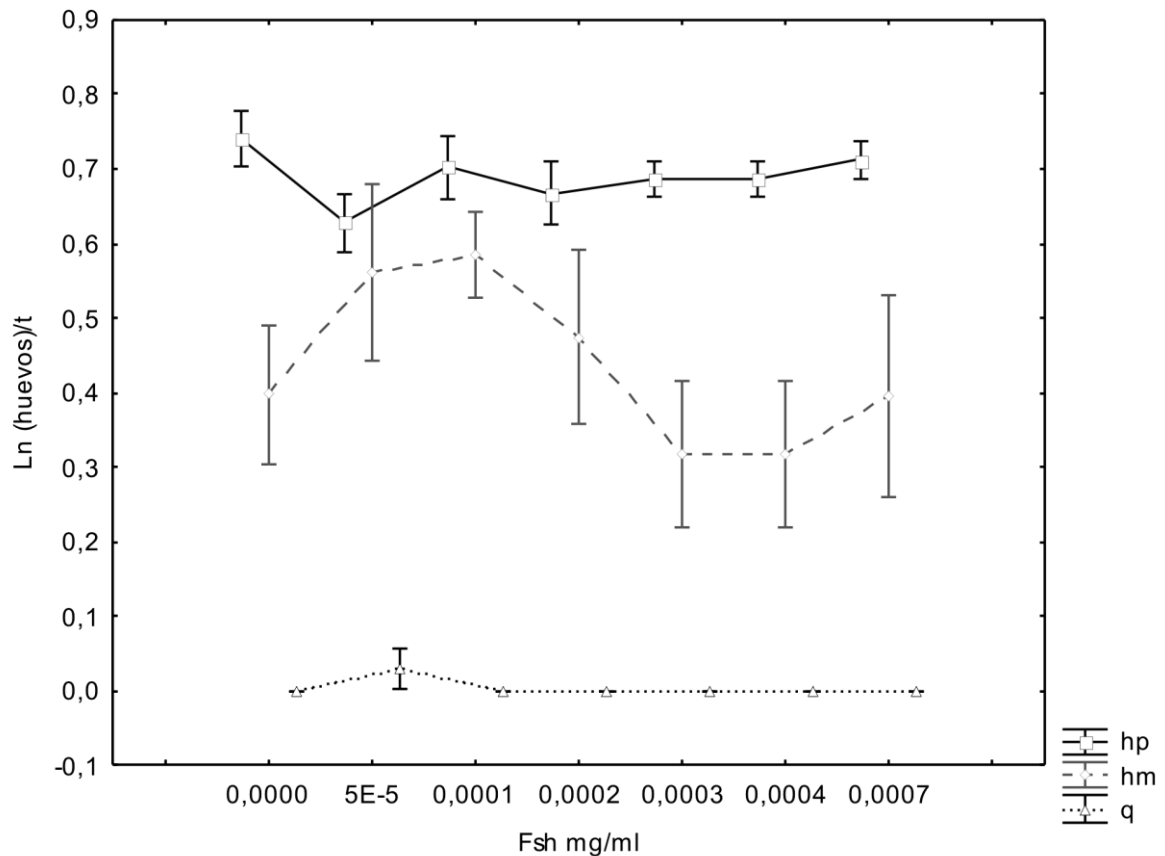


Figura 32. Tasa de producción de huevos partenogenéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) expuestos a la hormona folículo estimulante (FSH) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

6.3.4 Efectos adversos de metales como el plomo (Pb), arsénico (As), y zinc (Zn), del disruptor endocrino vinclozolin (Vz) y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) sobre la cópula y fertilización del rotífero *Brachionus calyciflorus* cepa Gainesville Florida.

6.3.4.1 Fertilización.

La producción de quistes en el ensayo de fertilización es un parámetro indicador para evaluar el efecto sobre la reproducción sexual. Los resultados obtenidos indican que solo hay un incremento significativo en el metal Zn a una concentración de exposición de 0.1 mg/L. El plomo y el arsénico tienden a incrementar la producción de quistes en el ensayo de fertilización, sin embargo no es significativa por sus variaciones tan amplias. El disruptor endocrino vinclozolin y la hormona folículo estimulante no producen quistes mediante el ensayo de fertilización, y la hormona luteinizante produce muy poca cantidad de quistes (Figura 33).

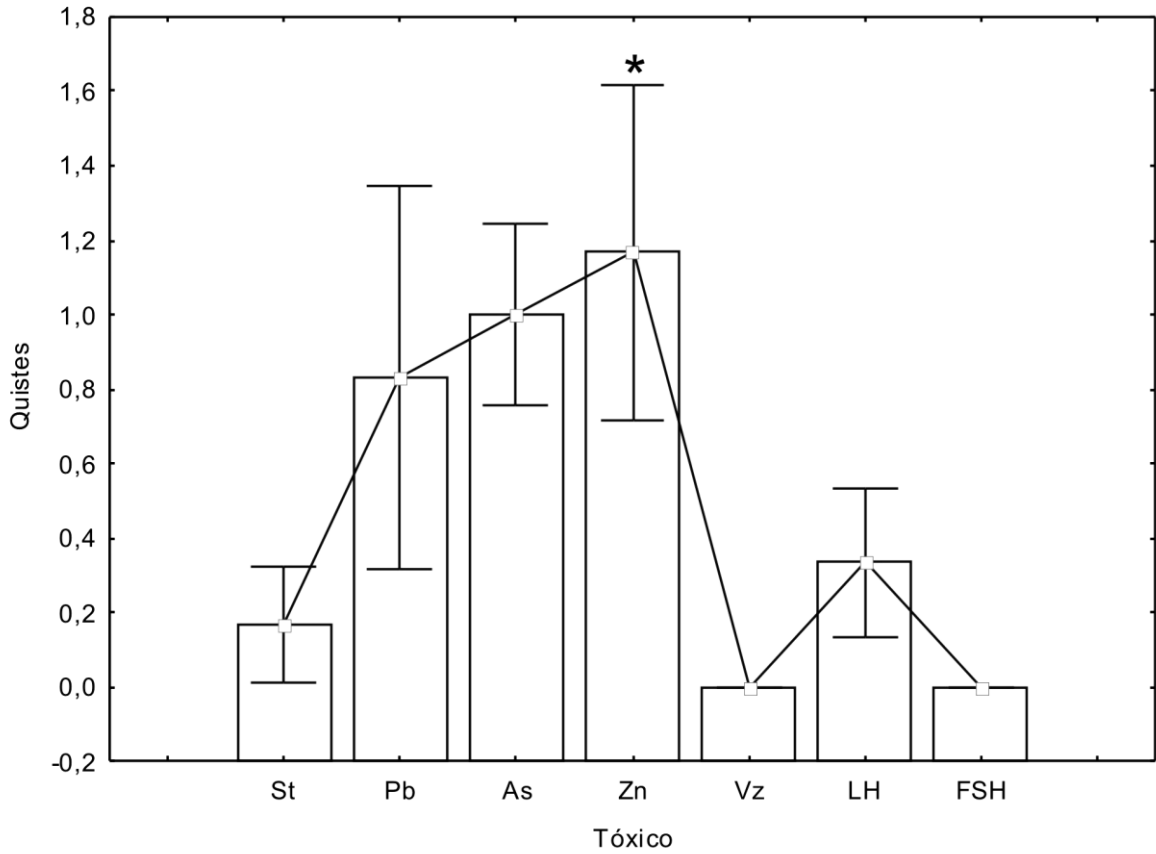


Figura 33. Ensayo de fertilización en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. El parámetro indicador del ensayo de fertilización es la producción de quistes. La concentración de exposición es diferente para cada experimento: St = 0.00, Pb = 0.5 mg/L, As = 0.05 mg/L, Zn = 0.1 mg/L, Vz = 1.2 mg/L, LH = 0.0001 mg/ml y FSH = 0.0001 mg/ml. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en el valor promedio de producción de quistes más el error estándar. N=6.

6.3.4.2 Cópula

El plomo disminuye considerablemente el porcentaje de copulación conforme se incrementa la concentración de exposición, reduciéndola hasta porcentajes de 10% de cópula (Figura 34).

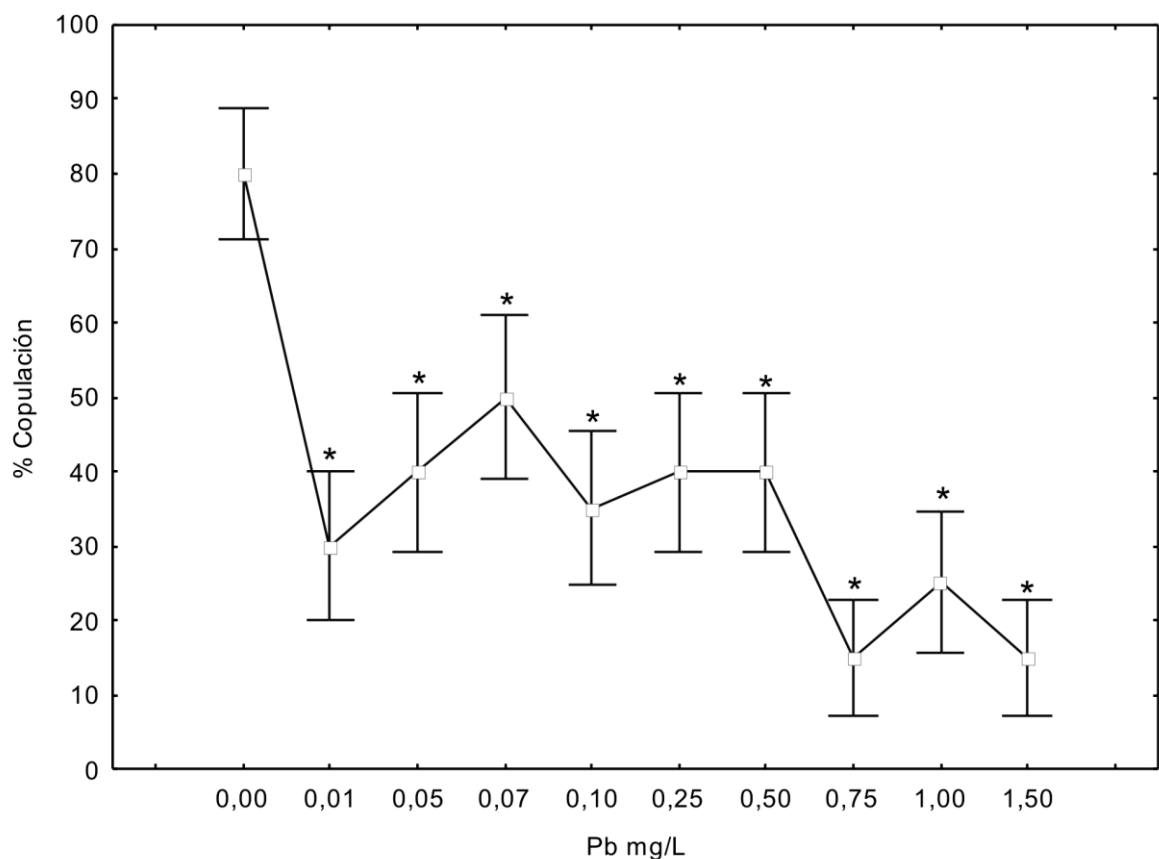


Figura 34. Ensayo cópula en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. El parámetro indicador del ensayo cópula esta represento como % de copulación. EL tóxico es plomo y el rango de exposición es de 0.01 – 1.5 mg/L. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en % de copulación más el error estándar. N=20.

6.3.5 Anormalidades morfológicas ocasionadas por la exposición crónica del disruptor endocrino vinclozolin y las hormonas: hormona luteinizante (LH: luteinizing hormone) y la hormona folículo estimulante (FSH: follicle-stimulating hormone) en el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

6.3.5.1 Deformaciones en hembras por exposición al Vinclozolin.

El vinclozolin ocasiona anormalidades morfológicas en los rotíferos a los 4 días de exposición (Figura 36). Se encontraron 10 hembras anormales: 2 en 0.4 mg/L; 1 hembra en cada una de estas concentraciones: 0.8, 1.6, 2.0, 2.8 y 5.6 mg/L; y 3 hembras anormales en 1.2 mg/L de vinclozolin. También se detectaron 10 hembras con un enorme vitelario en la concentración de 1.2 mg/L (Figura 37b). Así mismo se observaron 10 huevos ovalados, enormes y de un color café oscuro en la concentración de 1.2 mg/L. Finalmente se tomó una muestra de 20 machos de la concentración de 1.2 mg/L de vinclozolin para el análisis morfométrico, ya que en esta concentración se observó el mayor número de producción de hembras anormales en el ensayo reproductivo de 4 días.

Las 3 hembras anormales encontradas en la concentración de exposición 1.2 mg/L de vinclozolin, representan solamente un 0.66% de la población total de rotíferos obtenidos al final del experimento, el total de hembras corresponde a 457 (normales + anormales), esto resultado es únicamente para 6 replicas, pero cuando se realizan un total de 18 replicas más el porcentaje de anormalidades es de 0.63%, es decir 18 hembras anormales de un total de 2868 hembras registradas. El porcentaje de anormalidades es consistente y puede ser replicado (Cuadro 7).

Las características morfológicas de las hembras anormales son muy diferentes de las hembras normales, las hembras deformes son: cuerpo del rotífero muy redondo, su mástax se mueve muy poco en ocasiones carece de movimiento, es amorfo, por otro lado la cutícula claramente se deforma, y su movimiento no es libre, específicamente tiende a ser giratorio en un solo eje de rotación, la corona de cilios siempre está dentro de la cutícula, y no se observan definidas algunas estructuras como: el estómago y su vitelario, las hembras deformes presentan un gránulo en la parte inferior del cuerpo del rotífero, estos gránulos

son característicos observarlos en machos de esta especie, y solo exclusivamente se pueden ver en los machos (Figura 36). Todas las hembras anormales fueron aisladas en una poza de una placa de 24 pozas de poliestireno en 1 ml de medio EPA, alimentadas con el alga *Nannochloris oculata*, en condiciones de cámara bioclimática a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 de oscuridad. Todas las hembras permanecieron vivas durante 48 horas. Increíblemente la hembra deforme resultado de una exposición con 5.6 mg/L de vinclozolin, fue capaz de tener reproducción sexual con un macho, el macho hizo el reconocimiento conespecífico a la hembra, y posteriormente procedió a la cópula, desafortunadamente no fue fértil, es decir, ya que no se logró producir el huevo sexual fecundado o quiste, la hembra de igual manera que las demás deformes murió a las 48 horas de ser aislada en una poza.

Las hembras con un vitelario enorme son significativamente diferentes respecto al vitelario normal de la especie *Brachionus calyciflorus*, los huevos enormes y oscuros también son más grandes que los huevos partenogénéticos y quistes (Cuadro 6).

Los machos estudiados en la concentración de 1.2 mg/L, son significativamente un poco más grandes que los machos producidos sin tóxico, más detalles en el cuadro 6.

Se produjeron 45 quistes en hembras expuestas con 1.2 mg/L de vinclozolin del ensayo reproductivo de 4 días. Se obtuvo el porcentaje de eclosión que corresponde a un 82.22% de eclosión en 24 horas. Los rotíferos neonatos obtenidos de los quistes producidos con el tóxico vinclozolin, se analizaron con el ensayo reproductivo de 4 días, sin intoxicarlos con vinclozolin. Al final del experimento se observó nuevamente una hembra deforme (Figura 35), con malformaciones estructurales en la cutícula, y el mástax. Esta hembra heredó los efectos adversos del vinclozolin, ya que presentó anomalías morfológicas evidentes que anteriormente se presentaron en organismos expuestos al vinclozolin por 4 días. Estos son los primeros datos de evidencia epigenética e infertilidad transgeneracional (ya que esta hembra deforme es incapaz de reproducirse) ocasionada por el vinclozolin en el rotífero dulceacuícola *Brachionus calyciflorus*.

La cepa analizada obtenida de la eclosión de quistes producidos con la concentración de 1.2 mg/L de vinclozolin, fue más productiva, es decir, la tasa de

producción de hembras y machos es significativamente mayor que una cepa de organismos obtenidos de quistes producidos de cultivos estándares mantenidos en condiciones de laboratorio. De igual manera la tasa de producción de hembras con huevos partenogénéticos y hembras con huevos sexuales no fecundados que originan machos son significativamente mayores a la cepa control, y también la tasa de producción de machos fue mejor en la esta cepa (descendiente de rotíferos expuestos al vinclozolin) que en la control (Figuras 38, 39 y 40 respectivamente).

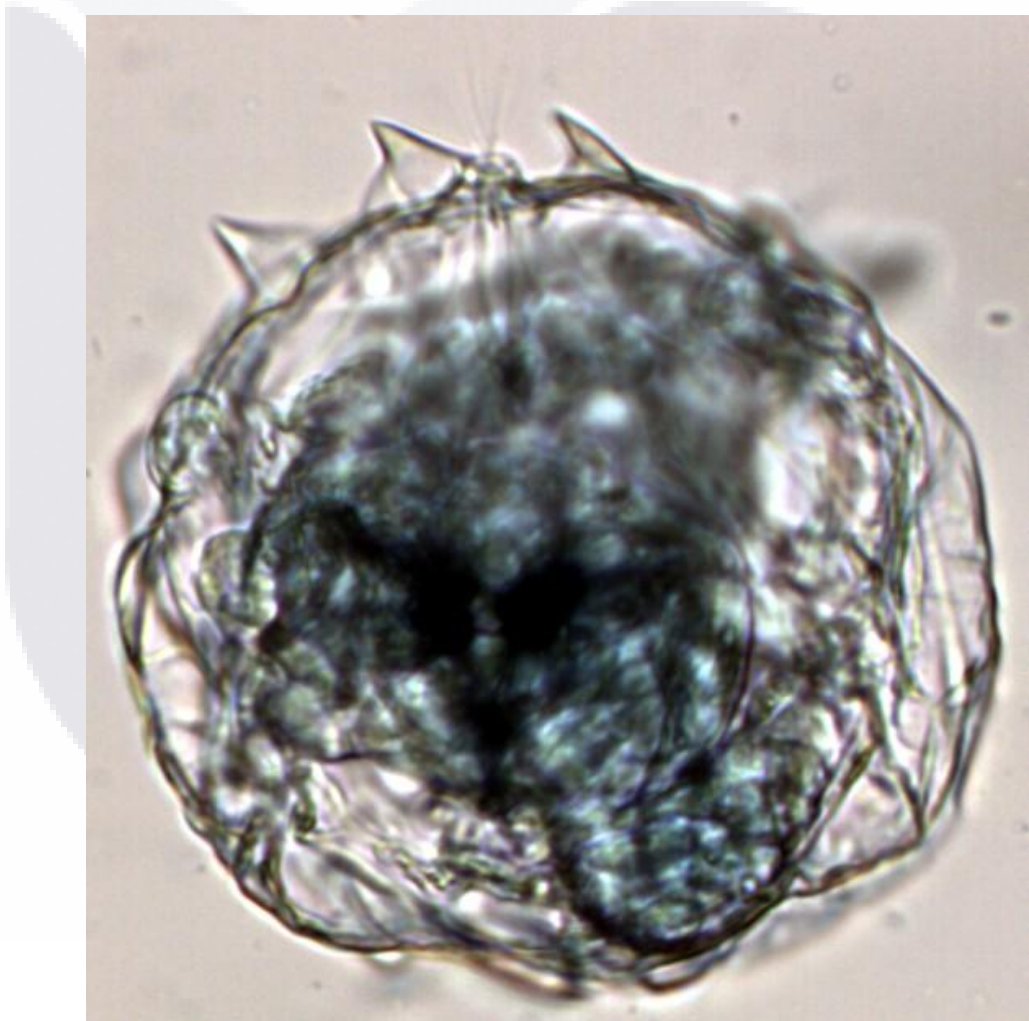


Figura 35. Hembra anormal originada de quistes obtenidos en un ensayo reproductivo de 4 días, la concentración de exposición fue de 1.2 mg/L de vinclozolin, fotografía obtenida de un video, aumento del microscopio óptico = 20x.

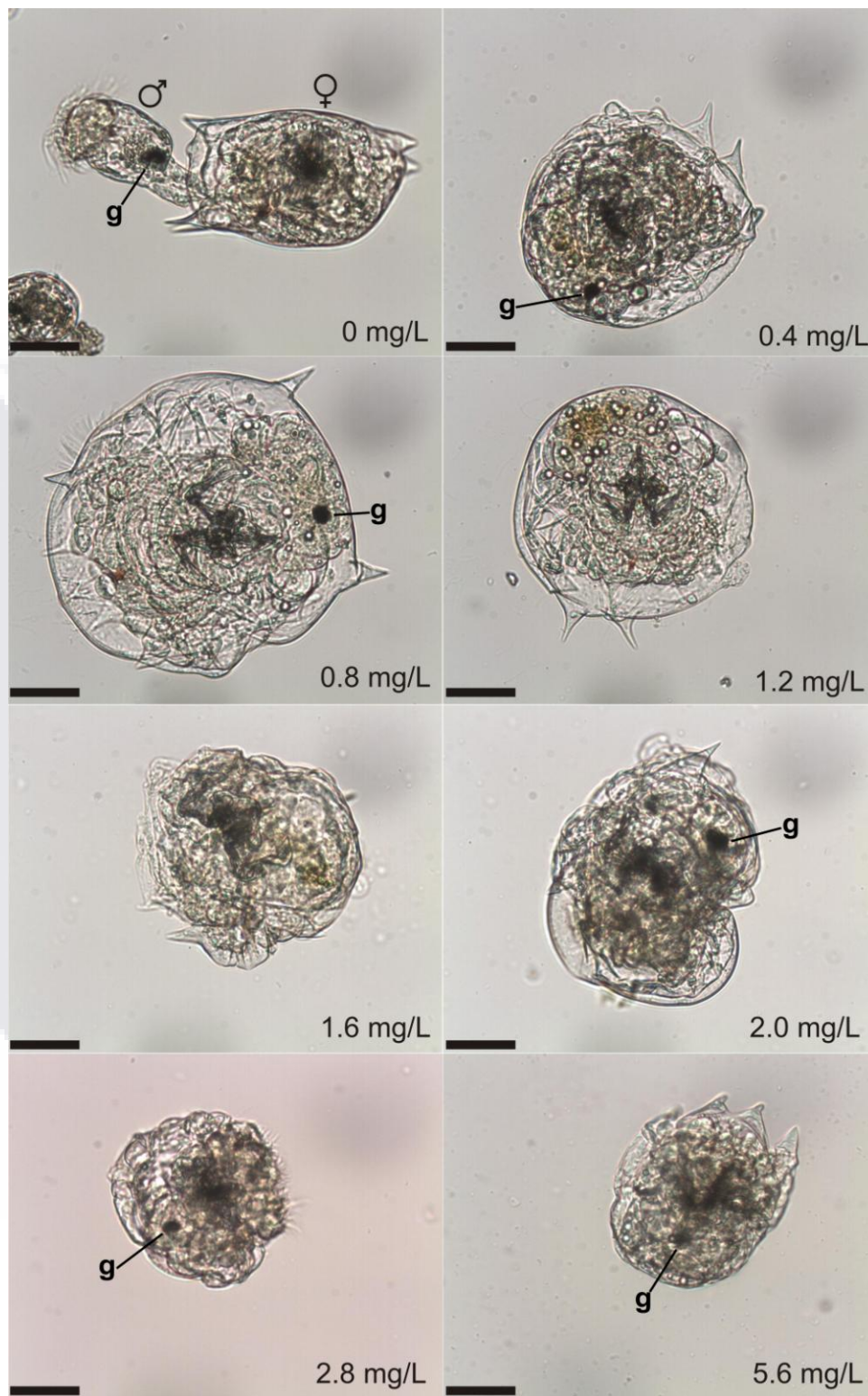


Figura 36. Comparación morfológica de las hembras anormales (expuestas a vinclozolin) vs hembras y machos normales. Se muestran los gránulos característicos de los machos (g) y no visibles en hembras normales. La barra negra indica 200 µm.

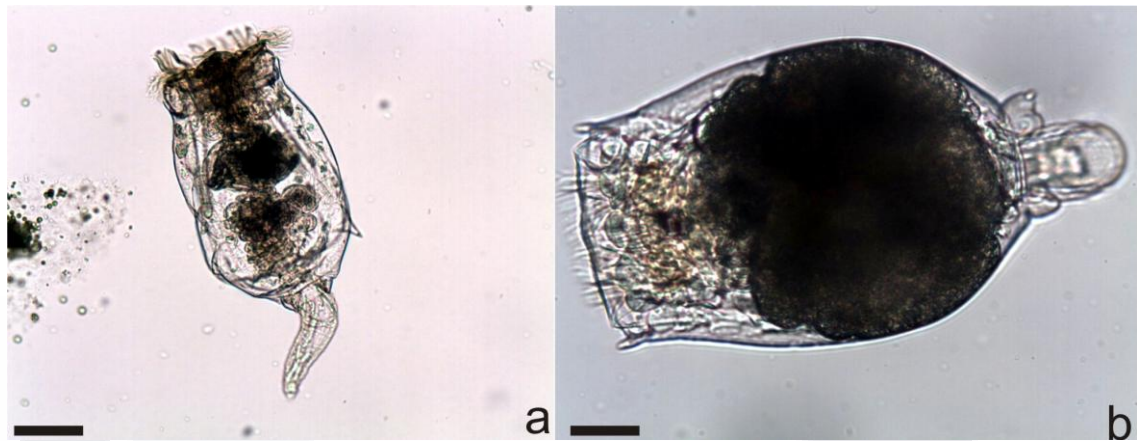


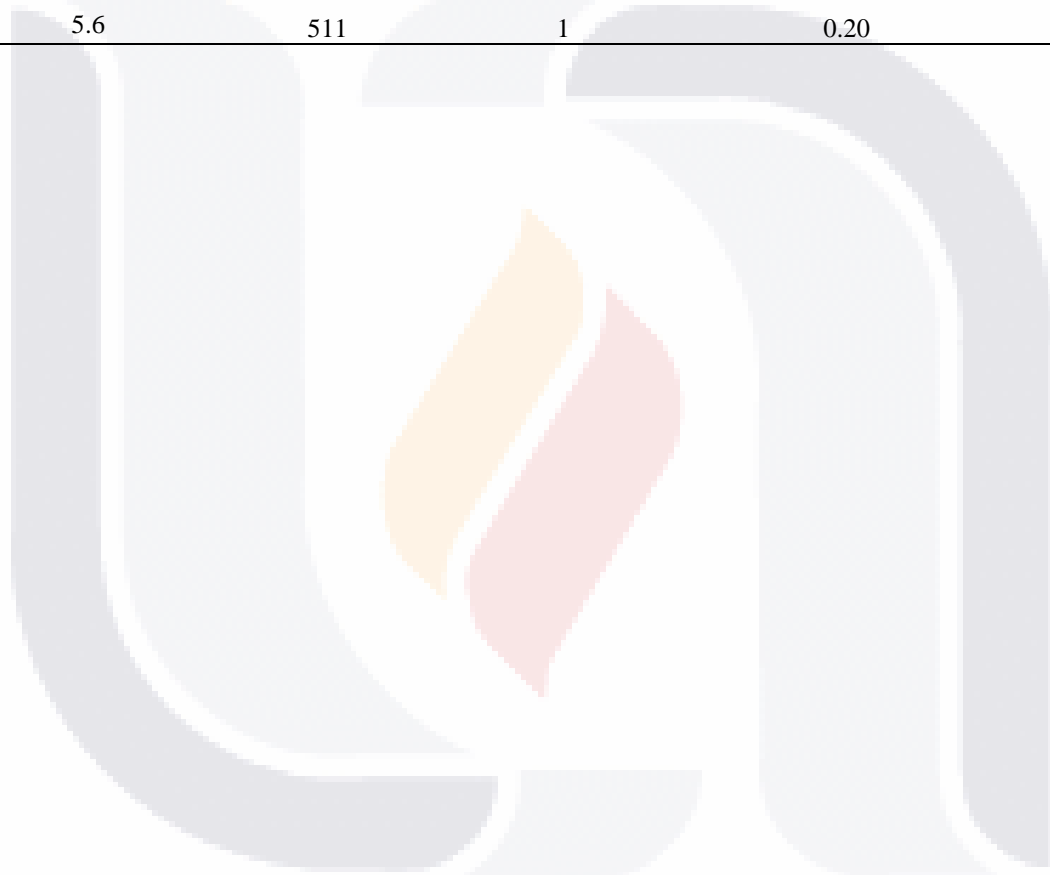
Figura 37 Alteraciones morfológicas en hembras del rotífero *Brachionus calyciflorus* por exposición crónica al vinclozolin a una concentración de 1.2 mg/L. a) hembra normal, b) hembra con un enorme vitelario. La barra negra es igual a 100 μm .

Cuadro 6. Comparación de la longitud máxima y anchura máxima de hembras, machos y huevos normales vs intoxicados con vinclozolin. n= 10 de hembras con vitelario anormal, n = 20 de machos, y n= 10 huevos anormales. Los valores son el promedio y su desviación estándar.

	Hembras	
	Longitud máxima (μm)	Anchura máxima (μm)
Hembras normales	743.68 \pm 151.60	554.72 \pm 134.02
Hembras anormales (1.2 mg/L Vz)	965.48 \pm 37.35*	676.47 \pm 35.07*
p *	0.00028	0.01238
	Machos	
	Longitud máxima (μm)	Anchura máxima (μm)
Machos normales	317.67 \pm 19.14	223.96 \pm 15.95
Machos anormales (1.2 mg/L Vz)	332.95 \pm 24.88*	236.72 \pm 14.33*
p *	0.04082	0.01365
	Huevos	
	Longitud máxima (μm)	Anchura máxima (μm)
Quistes normales	517.99 \pm 39.36	365.73 \pm 37.79
Huevos partenogenéticos normales	467.53 \pm 30.21	369.56 \pm 32.95
Huevos anormales (1.2 mg/L Vz)	571.92 \pm 18.54* ⁺	412.21 \pm 19* ⁺
p *	0.00101	0.00838
p ⁺	0.00000	0.00899

Cuadro 7. Porcentaje de organismos anormales producidos por intoxicación crónica a vinclozolin (1.2 mg/L) en el rotífero dulceacuícola *B. calyciflorus*.

Vinclozolin (mg/L)	Hembras totales	Hembras deformes	Hembras deformes (%)	Réplicas
0.4	540	2	0.37	6
0.8	608	1	0.16	6
1.2	457	3	0.66	6
1.2*	2868	18	0.63	21
1.6	474	1	0.21	6
2	477	1	0.21	6
2.8	664	1	0.15	6
5.6	511	1	0.20	6



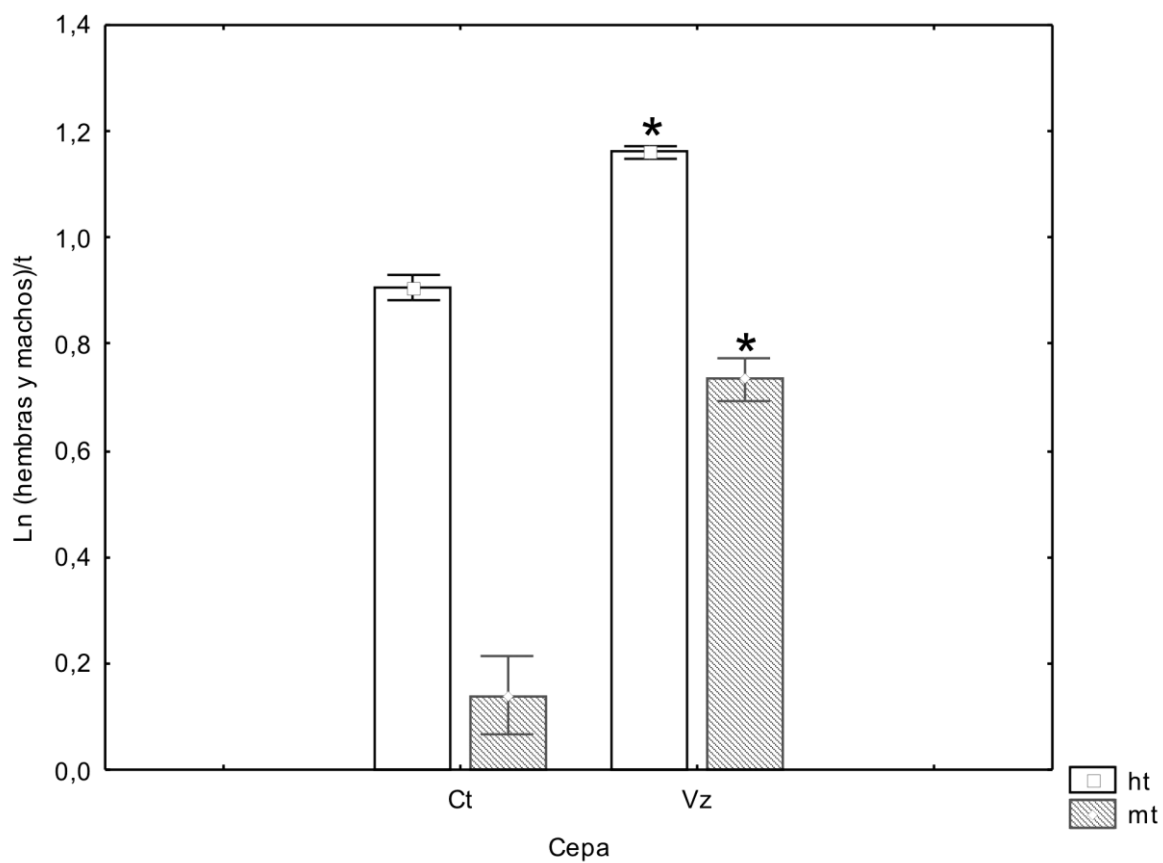


Figura 38. Tasa intrínseca de crecimiento de hembras (ht) y machos (mt) del rotífero *Brachionus calyciflorus* sin exponer al vinclozolin (Vz) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

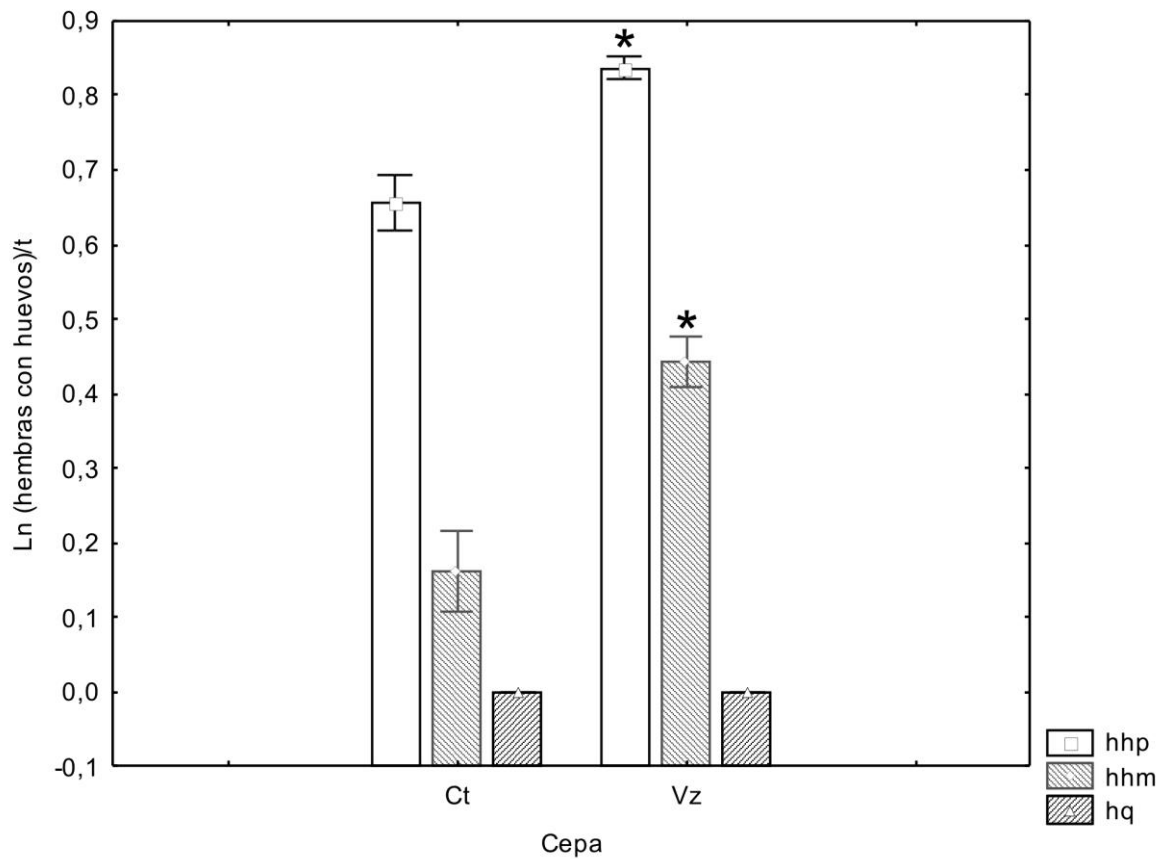


Figura 39. Tasa de producción de hembras asexuales con huevos partenogénicos (hhp), hembras sexuales con huevos sexuales no fecundados (hhm: que originan machos) y hembras sexuales con huevos sexuales fecundados o quistes (hq), sin exponer al vinclozolin (Vz) durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

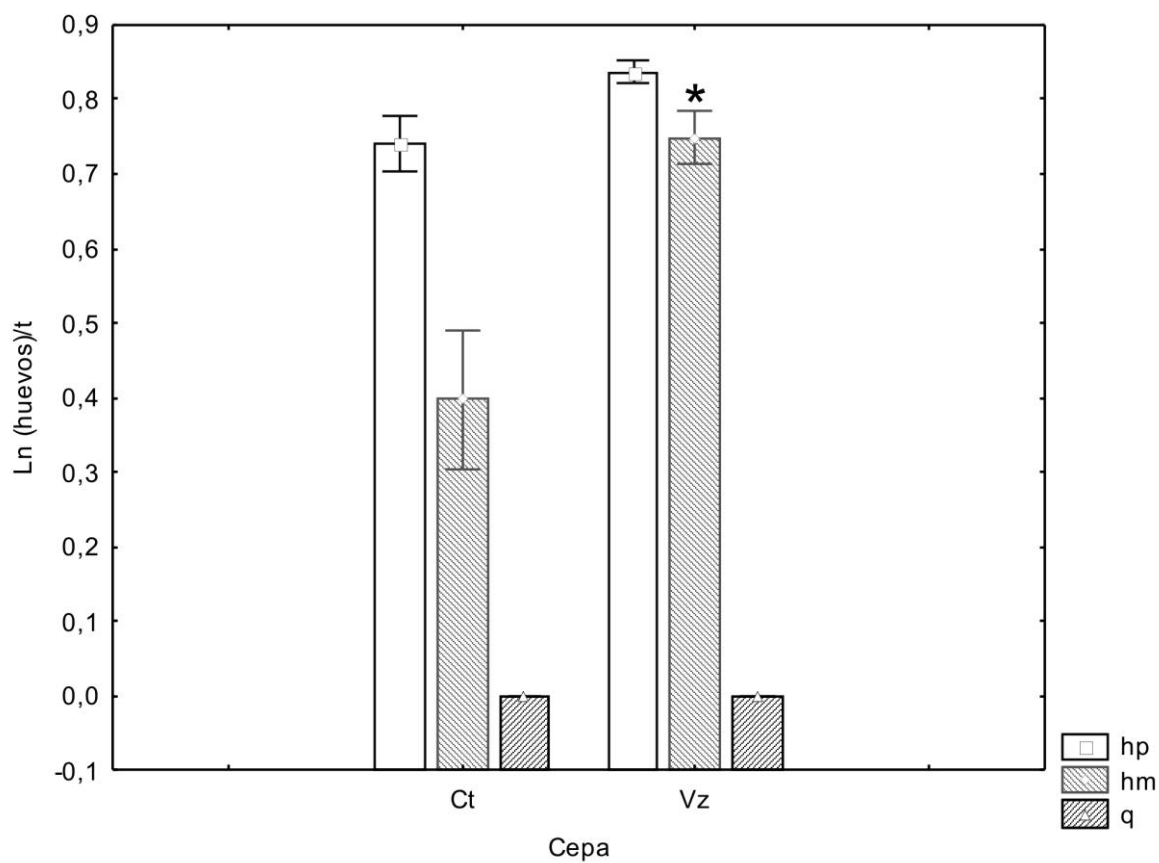


Figura 40. Tasa de producción de huevos partenogénéticos (hp), huevos sexuales no fecundados (hm: que originan machos) y huevos sexuales fecundados o quistes (q) sin exponer al vinclozolin durante 4 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados en Ln y son el valor promedio más el error estándar. N=6.

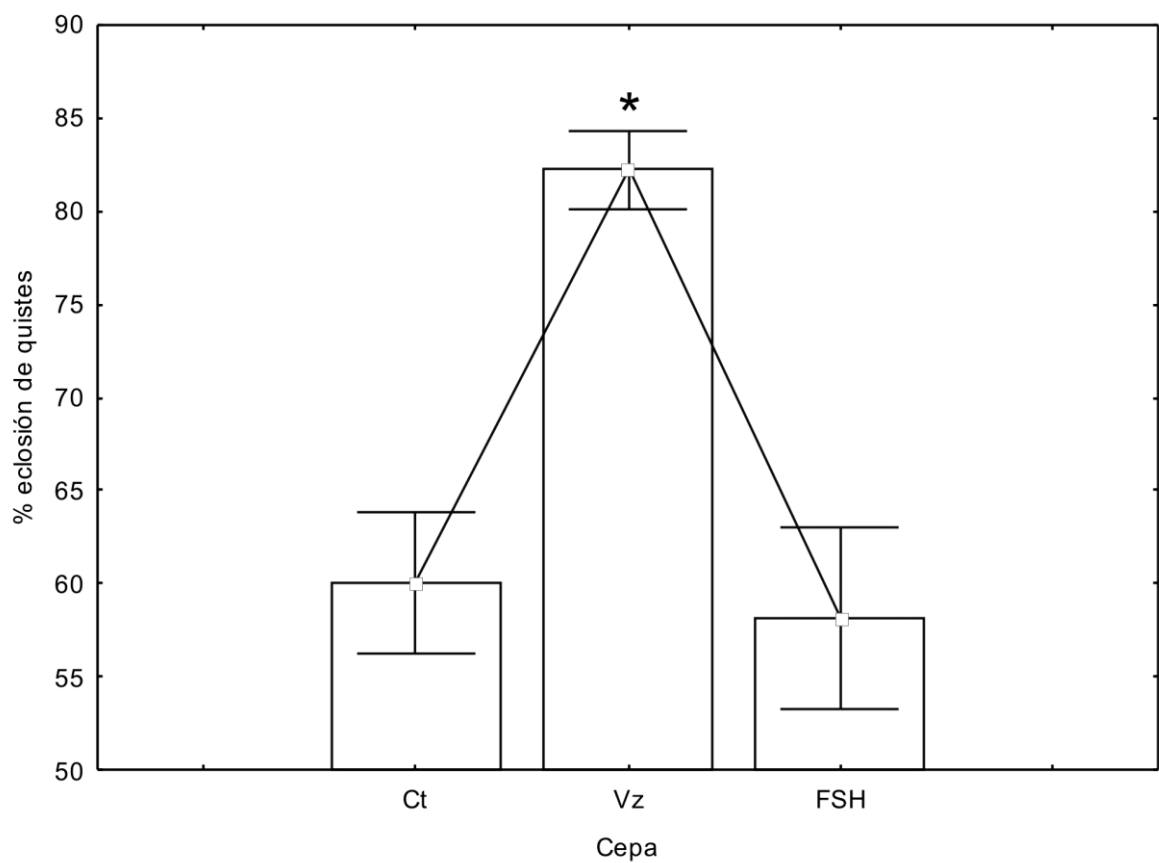


Figura 41. Porcentaje de eclosión de quistes producidos con el disruptor endocrino vinclozolin (1.2 mg/L Vz) y la hormona folículo estimulante (0.0001 mg/ml FSH). Ct = quistes producidos sin tóxicos.

6.3.5.1.2 Fotografías en microscopio óptico de hembras deformes del rotífero dulceacuícola *B. calyciflorus* en la exposición crónica al vinclozolin (1.2 mg/L).

La exposición crónica al vinclozolin con una concentración de 1.2 mg/L durante 4 días produce deformaciones en las hembras. Se lograron encontrar al final de 21 replicas un total de 18 hembras con una gran variedad de deformaciones, de un total de 2868. Lo cual representa el 0.63% de la población afectada por estas deformaciones.

Las deformaciones son las siguientes y pueden ser observadas en las figuras 42a, 42b y 42c. Las deformaciones en las hembras incluyen espinas torcidas (Figuras 42a-3, 42b-8 y 11), cuadradas (Figura 42b-9), o anchas (Figura 42c-16) e incluso en algunos casos ausentes (Figuras 42a-2 y 4). Hay gigantismos (Figura 42a-4) y enanismo (Figura 42a-1) a la vez en estos organismos, su cutícula es probablemente la más dañada en estos rotíferos anormales, ya que se logran observar torceduras (Figura 42a-2 y 4), bordes (Figuras 42b-8 y 9) o protuberancias, plegamientos (Figura 42b-7 y 39c-17), lo que es una fusión con el pie del rotífero. En las figuras 42a, 42b y 42c, se presentan el total de los 18 organismos deformes. Y más adelante se detalla las principales deformaciones con microscopía electrónica de barrido.

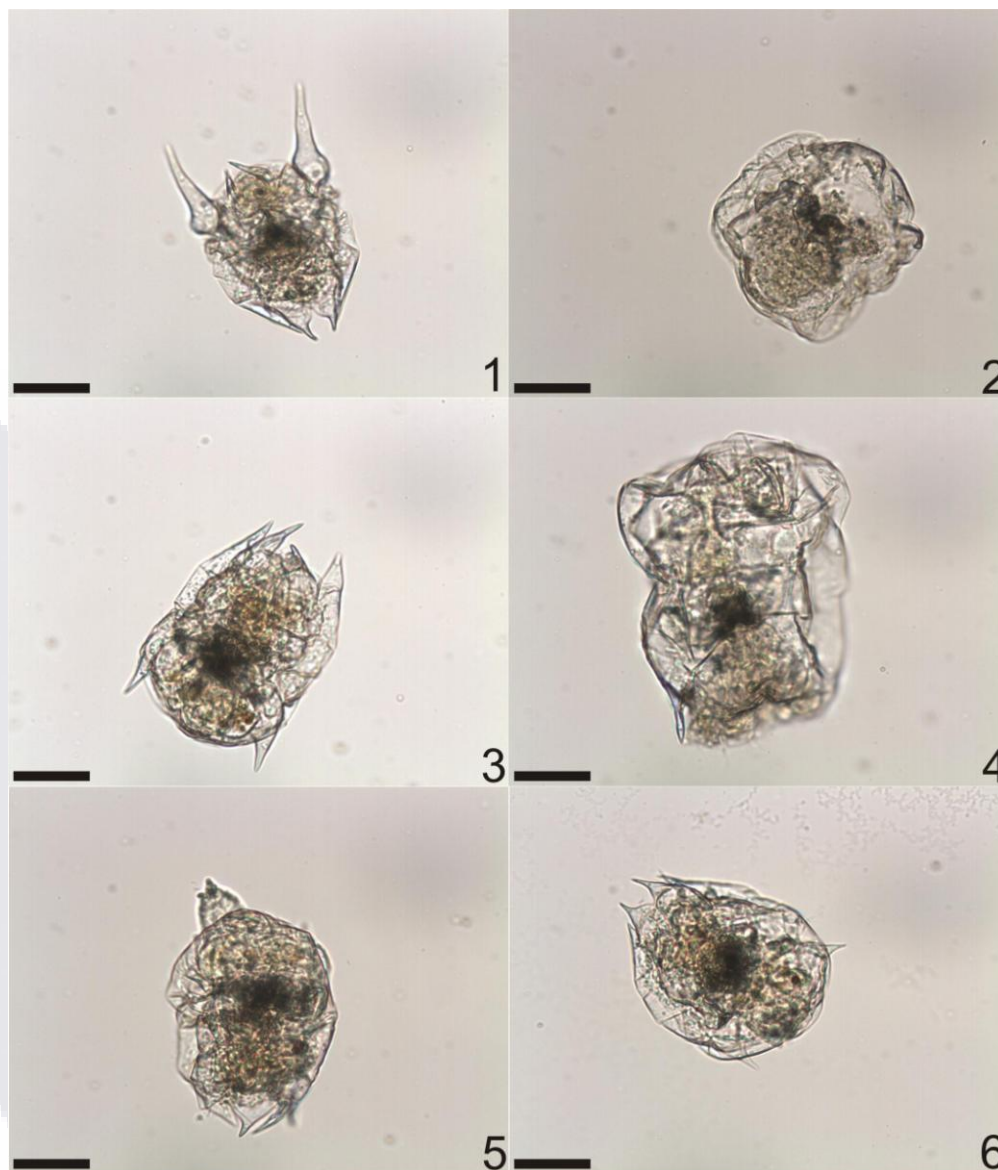


Figura 42a. Organismos anormales producidos por intoxicación crónica al vinclozolin (1.2 mg/L) en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, imágenes obtenidas al microscopio óptico. Las imágenes representan 18 organismos con malformaciones marcadas de los 38 cuantificados en las 21 réplicas. La barra negra indica 200 μm .

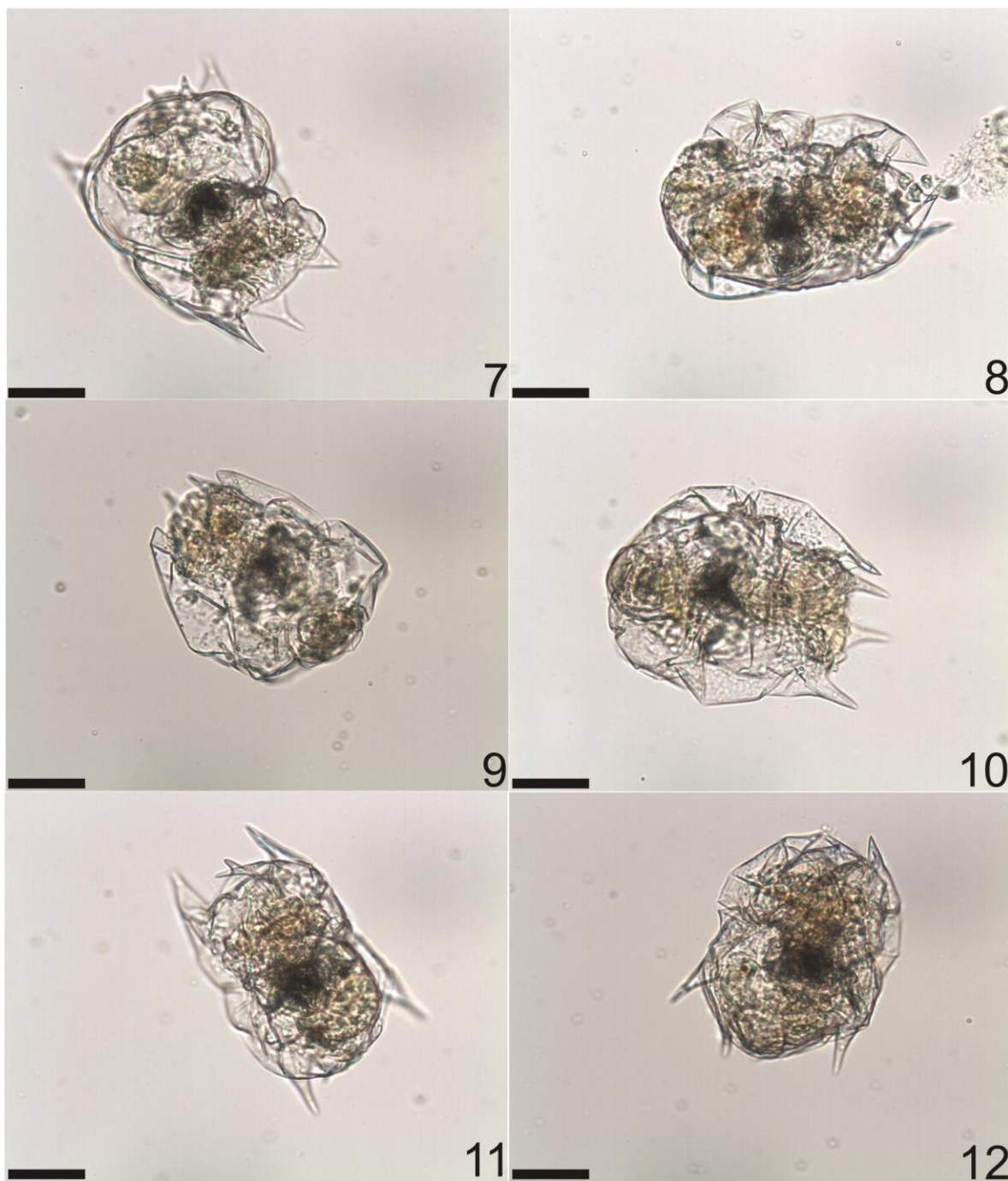


Figura 42b. Organismos anormales producidos por intoxicación crónica al vinclozolin (1.2 mg/L) en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, imágenes obtenidas al microscopio óptico. Las imágenes representan 18 organismos con malformaciones marcadas de los 38 cuantificados en las 21 réplicas. La barra negra indica 200 μm .

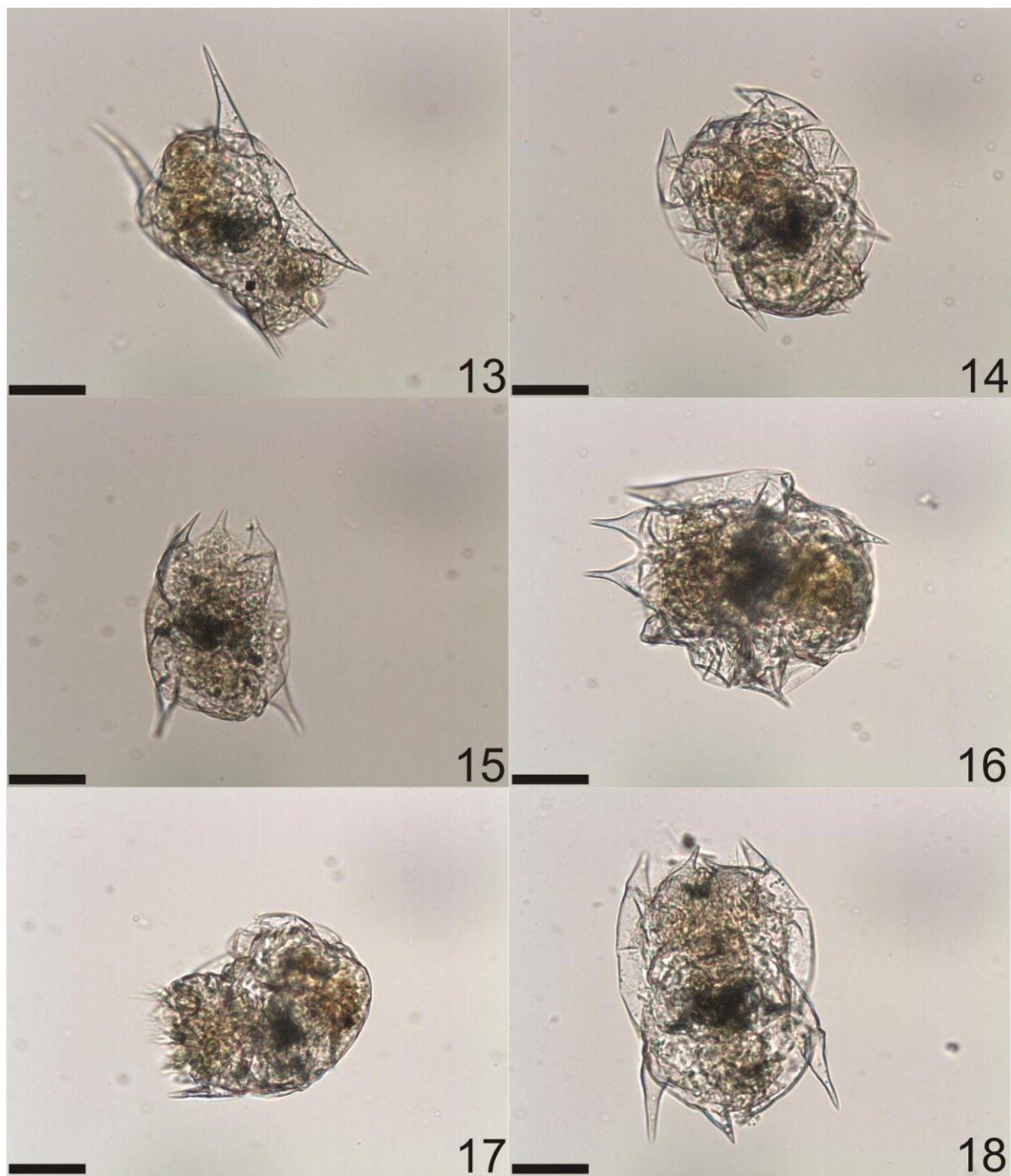


Figura 42c. Organismos anormales producidos por intoxicación crónica al vinclozolin (1.2 mg/L) en el rotífero *Brachionus calyciflorus*, imágenes obtenidas al microscopio óptico. Las imágenes representan 18 organismos con malformaciones marcadas de los 38 cuantificados en las 21 réplicas. La barra negra indica 200 μ m.

6.3.5.1.3 Análisis de organismos anormales producidos por intoxicación crónica al vinclozolin en el rotífero *Brachionus calyciflorus* por microscopia electrónica de barrido.

Se realizó la caracterización detallada de las deformaciones en las hembras producidas por exposición crónica al vinclozolin con una concentración de 1.2 mg/L. las características propias estructurales y normales de un rotífero sano se pueden observar en las figuras 43a-a α y a β . El daño más severo es la fusión del pie del rotífero a la cabeza o corona del organismos (Figura 43a-b,b α y b β . Impidiéndole sus movimientos normales, puesto que son capaces de sobrevivir en estas condiciones pero con una curvatura en el cuerpo y con movimientos circulares constantes en un solo eje. En la figura 43a-c, c α y c β , se muestran fotografías donde se hace evidente la ausencia de un pie, a diferencia de las figuras 43a-d, d α y d β , donde se nota claramente el pie pero con tres dedos, algo inusual en la especie porque normalmente solo tienen dos. Y finalmente espinas cuadradas y torcidas (43a-e, e α y e β . Las hembras forman un vitelario enorme (Figura 43b-b). Existe enanismo en hembras con pliegues en cutícula (Figura 43b- c). Las espinas se entrecruzan (Figura 43b-d α) y la cutícula forma pliegues (Figura 43b-e α) en todo el cuerpo del rotífero.

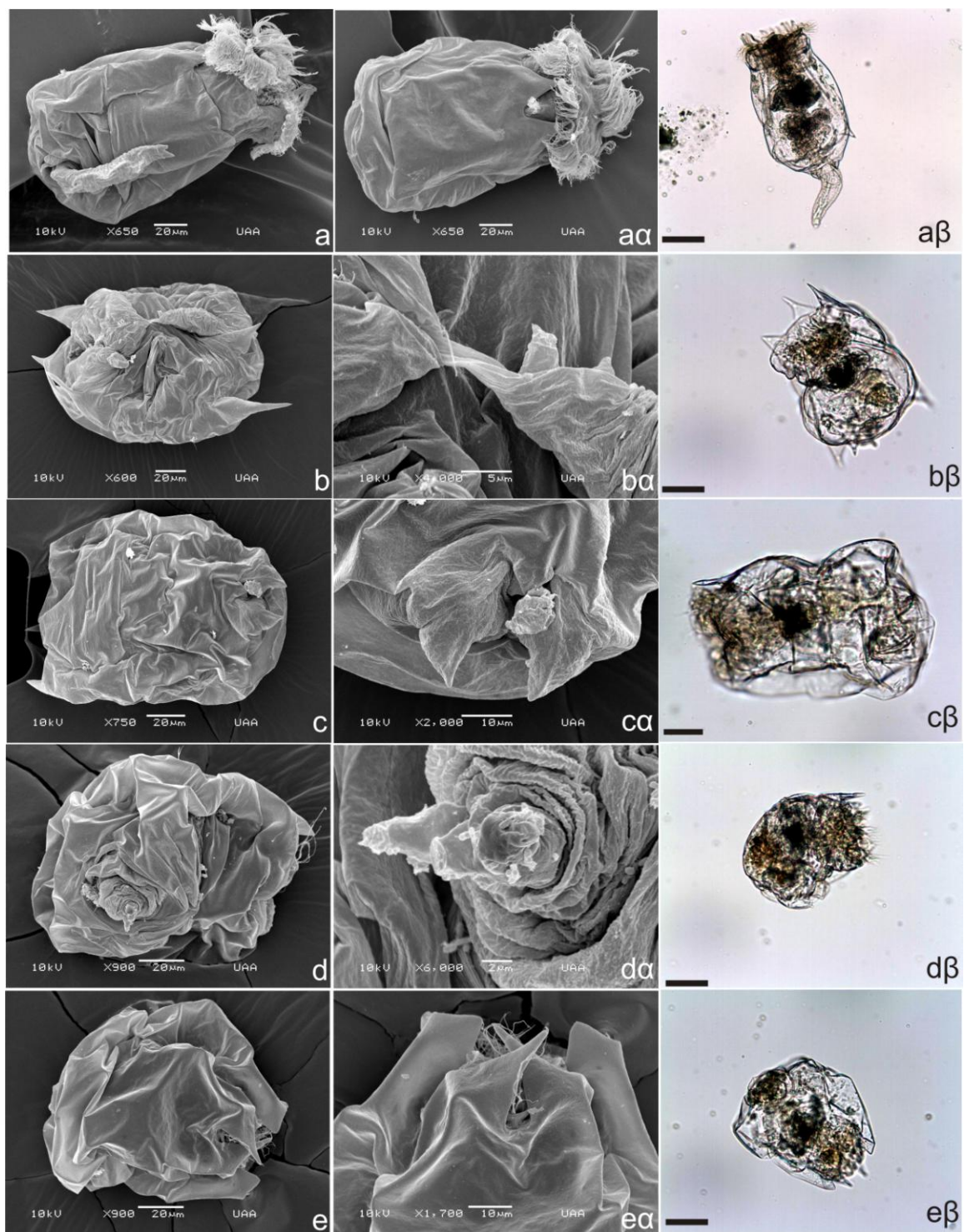


Figura 43a. Imágenes obtenidas al microscopio electrónico de barrido de las alteraciones morfológicas ocasionadas por exposición crónica al vinclozolin (1.2 mg/L), en el rotífero dulceacuícola *B. calyciflorus*. Las imágenes mostradas provienen de los 18 organismos mostrados en la figura 38. La barra negra indica 100 μ m.

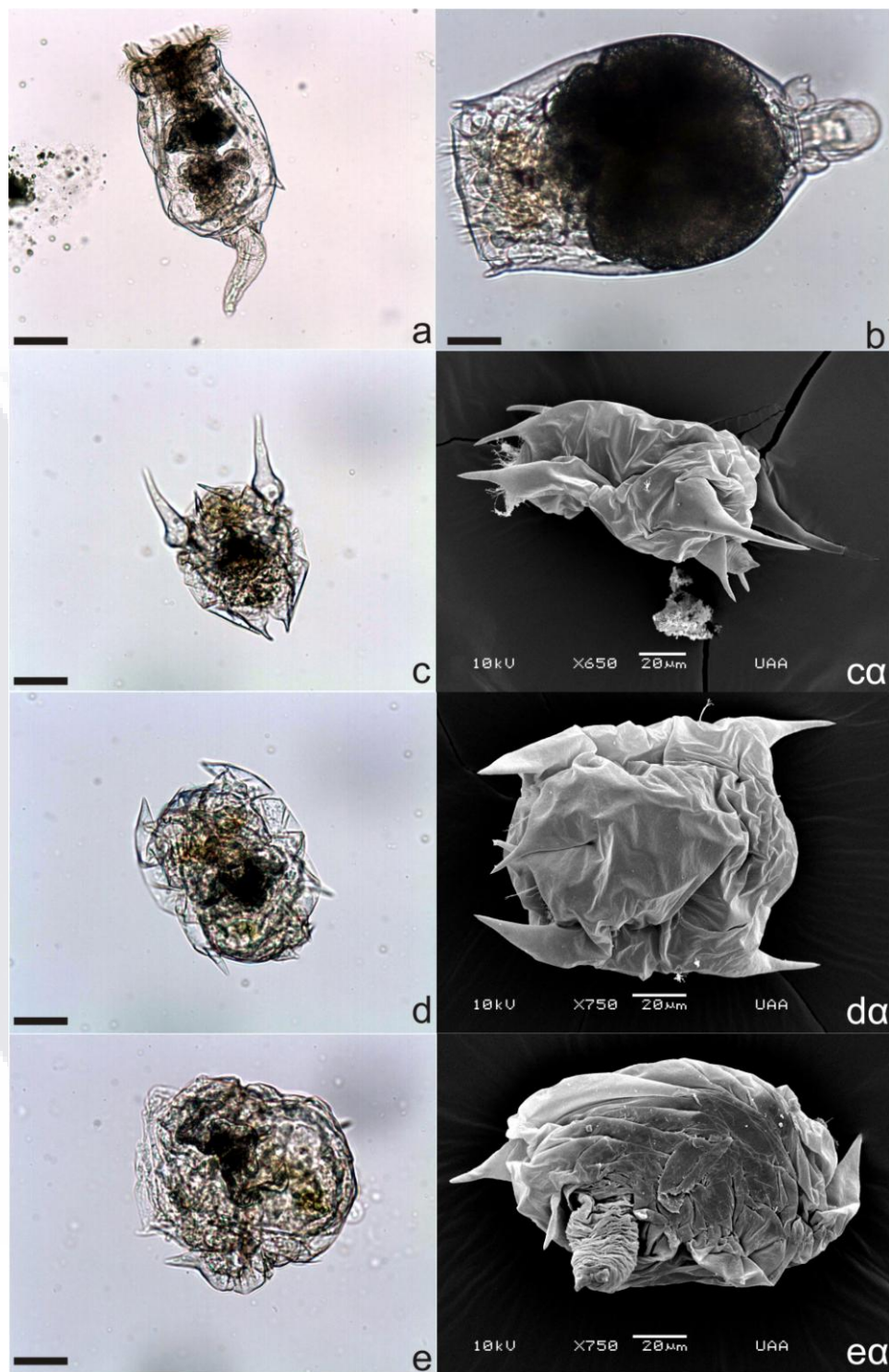


Figura 43b. Alteraciones morfológicas en hembras del rotífero *Brachionus calyciflorus* por exposición crónica al vinclozolin a una concentración de 1.2 mg/L. a) hembra normal, b) hembra con un enorme vitelario, c) y ca) hembra con enanismo, d) y da) hembra con espinas curvas, e) y ea) hembra con cutícula deforme. La barra negra es igual a 100 µm.

6.3.5.2 Deformaciones en hembras por exposición a la hormona luteinizante.

La hormona luteinizante produjo hembras deformes: se encontraron 2 hembras anormales; una de ellas en la concentración de exposición de 0.0001 mg/ml, y la otra en una concentración de exposición de 0.0003 mg/ml, de un total de 612 hembras (normales + anormales) producidas en el ensayo reproductivo de 4 días. Las 2 hembras anormales constituyen el 0.33% del total de la población estudiada. Las hembras anormales presentan un desplazamiento circular y giran en su propio eje, carecen de movimiento libre, si poseen estructuras importantes como: mastax, corona, y estómago, pero se observan con claras deformaciones. Las hembras anormales producidas por exposición a la hormona luteinizante, y que fueron encontradas al final del experimento (4 días), fueron aisladas en una poza de una placa de 24 pozas de poliestireno en un volumen total de 1 ml de medio EPA, y alimentadas con el alga *Nannochloris oculata*. Ambas hembras anormales fueron capaces de vivir solo 48 horas en condiciones de cámara bioclimática a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. No son capaces de reproducirse. En la figura 44 se observan la hembra deforme producida por exposición crónica al la hormona luteinizante (LH), la concentración de exposición fue de 0.0001 mg/ml.

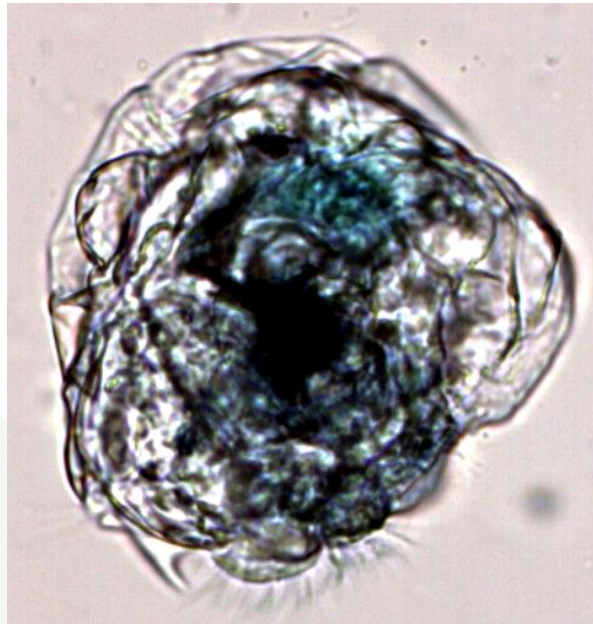


Figura 44. Hembra anormal producida por exposición crónica a la hormona luteinizante (LH), la concentración de exposición fue de 0.0001 mg/ml LH, durante 4 días. Fotografía obtenida de un video, aumento del microscopio óptico = 20x al momento de hacer el video.

6.3.5.3 Deformaciones en hembras por exposición a la hormona folículo estimulante.

La hormona folículo estimulante fue capaz de producir hembras deformes, aunque estas hembras deformes si son capaces de reproducirse partenogénicamente, cabe resaltar que las deformaciones no son tan marcadas como las anteriores por el vinclozolin y la hormona luteinizante. Se encontraron 6 hembras anormales de un total de 549 hembras (normales + anormales) producidas en el ensayo reproductivo de 4 días. Las 6 hembras anormales representan el 1.09% del total de la población estudiada. Las hembras anormales fueron encontradas en las siguientes concentraciones: 1 en 0.00005 mg/ml, 1 en 0.0002 mg/ml, 2 en 0.0003 mg/ml, y 2 hembras anormales en una concentración de exposición de 0.0004 mg/ml. Todas las hembras anormales fueron aisladas en una poza de una placa de 24 pozas de poliestireno en un volumen total de 1 ml de medio EPA, y alimentadas con el alga *Nannochloris oculata*. Cinco hembras anormales fueron capaces de vivir solo 48 horas en condiciones de cámara bioclimática a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Una de las hembras anormales producida en la concentración de exposición de 0.0004 mg/ml presenta

anormalidades en el pie del rotífero, el pie se encuentra pegado a la corona de cilios y no logra despegar, lo que sugiere que esta fusionado por la curvatura del cuerpo del rotífero (Figura 47). Solo una hembra anormal producida en la concentración de exposición de 0.0004 mg/ml de hormona folículo estimulante, fue capaz de reproducirse partenogenéticamente 72 horas después de ser aislada, formo un huevo partenogenético del cual eclosionó una hembra perfectamente normal, por reproducción partenogenética, esta hembra normal fue aislada en una poza de una placa de 24 pozas de poliestireno en un volumen total de 1 ml de medio EPA, y alimentada con el alga *Nannochloris oculata*. De la cual se logro obtener una cepa de rotíferos en condiciones de cámara bioclimática. Dicha cepa de rotíferos fue mantenida durante 15 días en donde se obtuvieron un total de 105 quistes. La cepa se logro cultivar por 2 meses. Se obtuvo el porcentaje eclosión de los 105 quistes, el resultado obtenido es un 58.10% de eclosión, similar a los producidos en ese lote de quistes del cultivo normal de rotíferos y comparados con los producidos por vinclozolin, claramente los quistes de vinclozolin eclosionan mejor (Figura 49). Los organismos obtenidos de los quistes eclosionados formados del cultivo clonal de los organismos anormales producidos por exposición a la hormona folículo estimulante, se les realizo un ensayo reproductivo de 4 días, sin exposición a tóxico (en este caso hormona folículo estimulante) y los resultados son los siguientes: se observo una disminución en la tasa intrínseca de crecimiento o producción total de hembras, esta disminución es significativa comparada con el control (Figura 48). El control corresponde a organismos eclosionados de quistes obtenidos en cultivos estándares en condiciones de laboratorio. No hubo diferencias significativas en la producción de hembras con huevos partenogenéticos (hhp), y la producción de huevos partenogenéticos (hp). La reproducción sexual fue nula, no existió producción de machos, tampoco hembras con huevos sexuales.

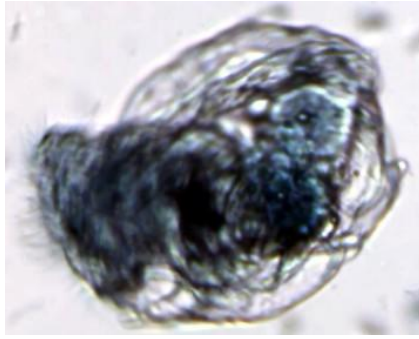


Figura 45. Hembra anormal producida por exposición crónica al la hormona folículo estimulante (FSH), la concentración de exposición fue de 0.0001 mg/ml LH, durante 4 días. Fotografía obtenida de un video, aumento del microscopio óptico = 20x.

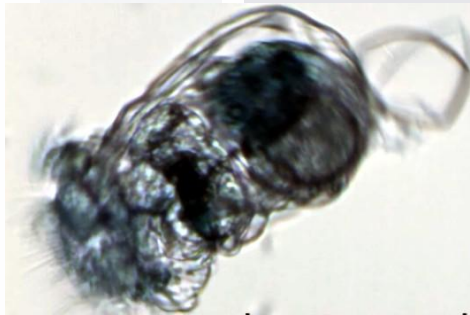


Figura 46. Hembra anormal capaz de producir huevos partenogenéticos, 72 horas después de ser encontrada en el ensayo reproductivo de 4 días. La concentración de exposición fue de 0.0001 mg/ml FSH durante 4 días. Fotografía obtenida de un video, aumento del microscopio óptico = 20x.

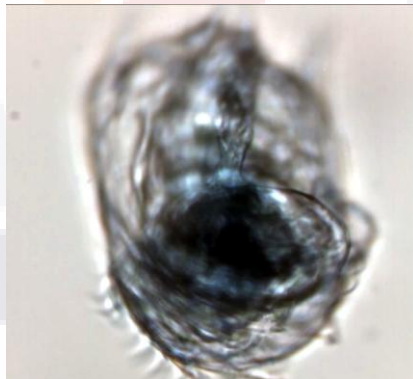


Figura 47. Hembra deforme con el pie unido a la corona, la hembra anormal fue producida por exposición crónica al la hormona folículo estimulante (FSH), la concentración de exposición fue de 0.0001 mg/ml LH, durante 4 días. Fotografía obtenida de un video, aumento del microscopio óptico = 20x.

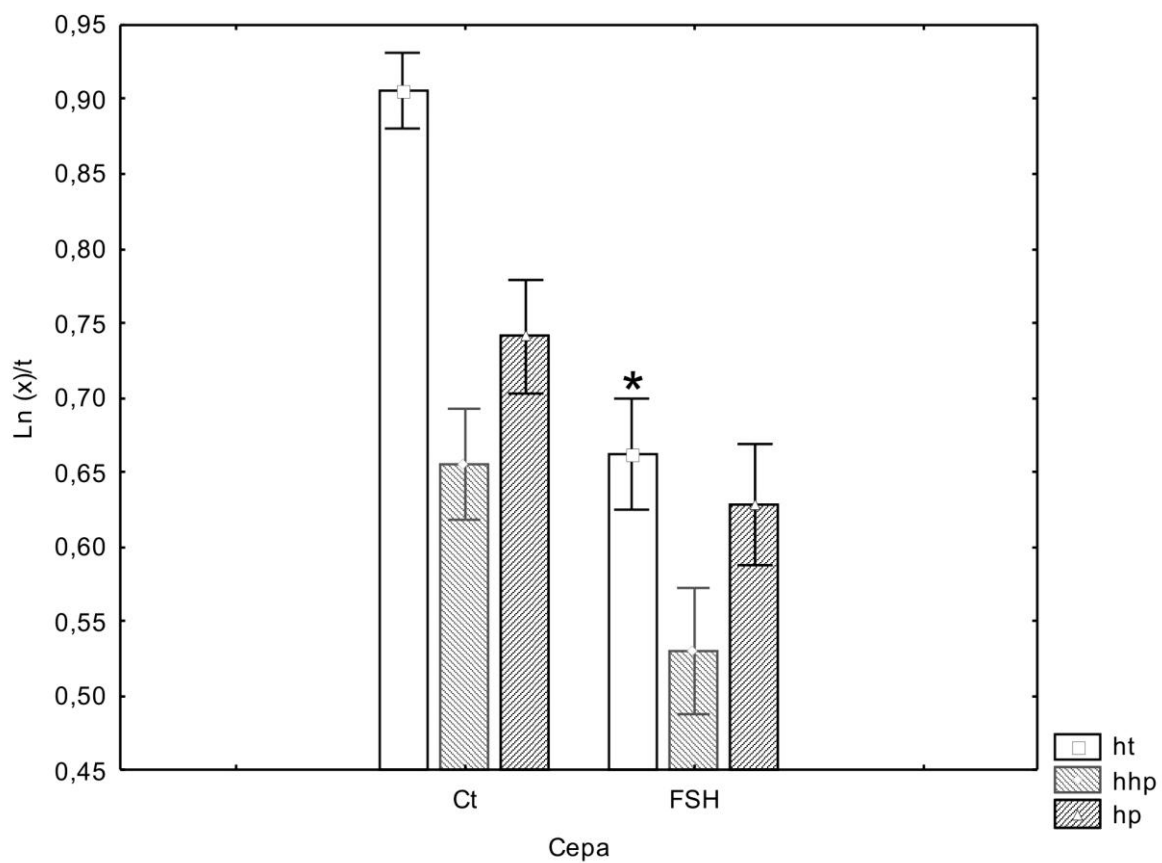


Figura 48. Tasa de producción de hembras (ht), tasa de producción de hembras con huevos partenogenéticos (hhp), y tasa de producción de huevos partenogenéticos (hp). De los organismos obtenidos de quistes producidos por intoxicación con la hormona FSH (0.0001 mg/ml FSH). Los asteriscos (*) representan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$). Los datos están representados como Ln y son en el valor promedio más el error estándar. N=6. X = a la variable ht, hhp y hp.

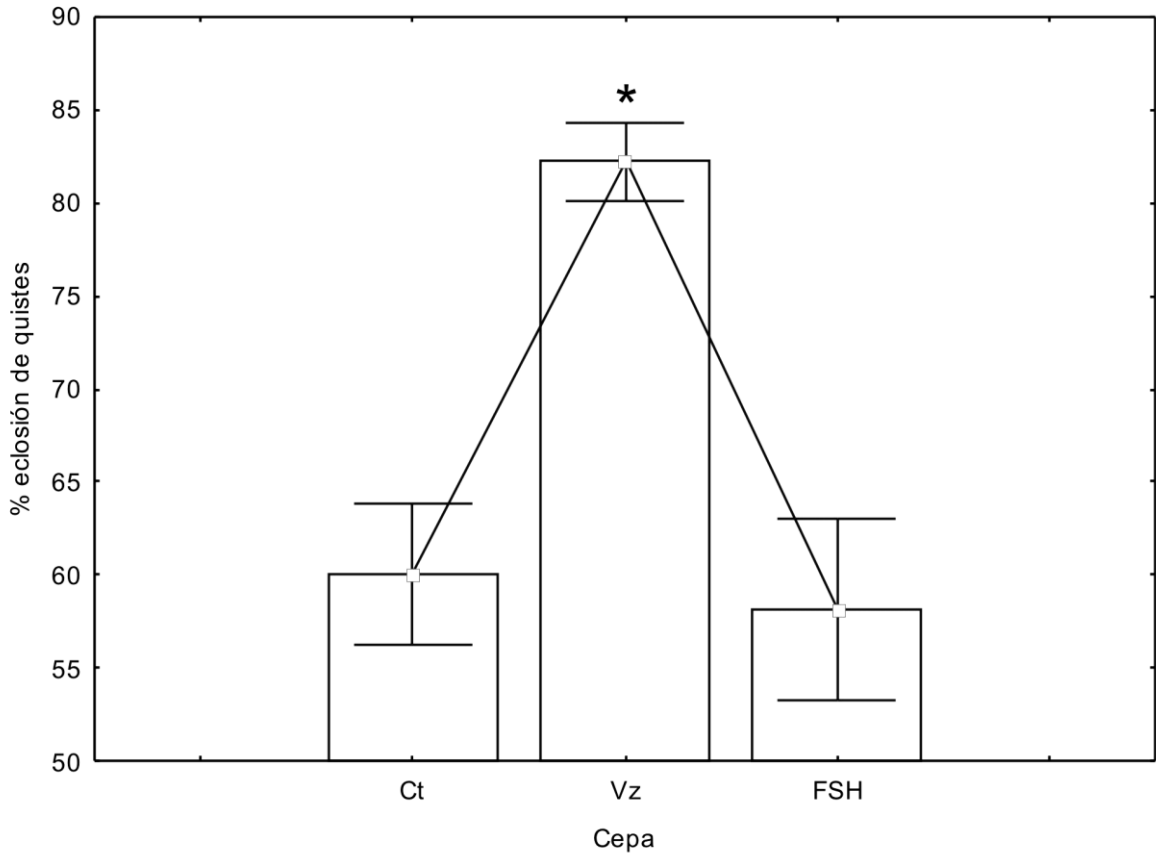


Figura 49. . Porcentaje de eclosión de quistes producidos con el disruptor endocrino vinclozolin (1.2 mg/L Vz) y la hormona folículo estimulante (0.0001 mg/ml FSH). Ct = quistes producidos sin tóxicos.

6.4 Detección de Metalotioneínas.

6.4.1 Inmunodetección de metalotioneínas en el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

La detección de MT es evidente en regiones importantes del rotífero, como estómago, epitelio ciliar del estómago, glándulas anexas al estómago, en tejido cercano al mástax y mástax, a lo largo de todo el tracto faríngeo y su epitelio característico ciliar, y en huevos partenogénéticos. También en zonas cercanas al sistema de ganglios cerebrales (ver Figura 50).

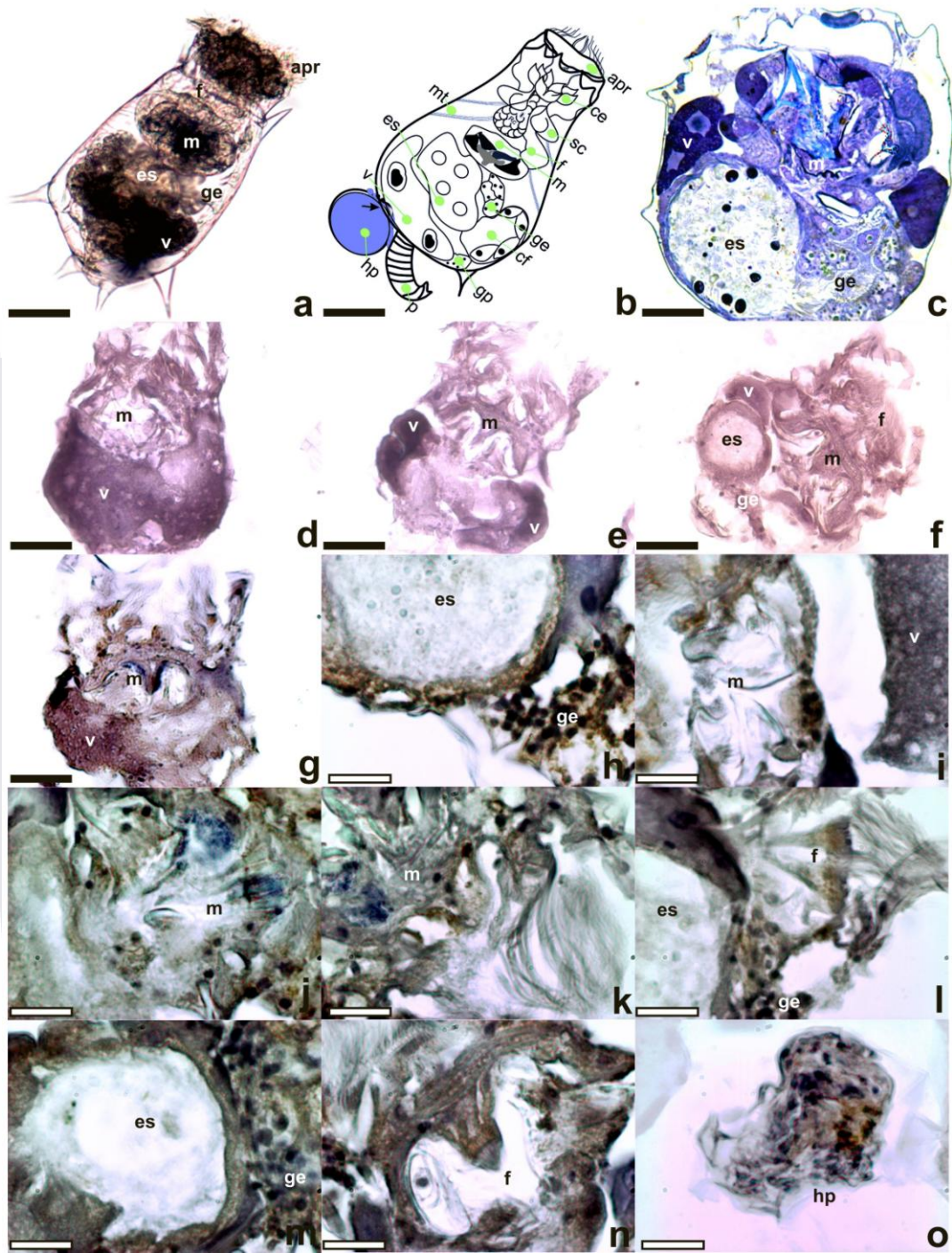


Figura 50. Detección de MT por inmunohistoquímica en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. a) imagen de referencia; b) esquema general: apr(), ce(), sc(), f(), m(), ge(), cf(), gp(), p(), hp(), v(), es(), mt(); c) corte longitudinal de hembra (400 nm); d, e, y f) corte longitudinal de hembras controles (5μm); g) corte longitudinal de hembras inmunomarcadas a MT; h, i, j, k, l, m, n, y o) cortes longitudinales de diferentes hembras inmunomarcadas a MT. El color café oscuro indica reacción positiva, fueron contrastadas todos los rotíferos con hematoxilina, excepto la figura c, está fue teñida con azul de toluidina. La barra negra indica 100 μm, la barra blanca con marco negro indica 10μm, excepto en la figura o allí es igual a 100 μm.

6.4.2 Determinación de los factores de bioconcentración (FBCs) del plomo en el ensayo reproductivo de 4 días.

Para analizar el comportamiento del plomo en el ensayo reproductivo de 4 días, se determino los factores de bioconcentracion en hembras y hembras con huevos al día 1, 2 3 y 4. Del experimento, los resultados se muestran en el cuadro 8. Es evidente que en el día 2 es cuando existen un FBC mayor que en los días posteriores, y es evidente que el FBC es mayor en hembras que tienen huevos, que en hembras que no tienen huevos. Y este fenómeno se observa en todos los 4 días que se llevo a cabo el experimento. Por lo tanto el plomo es bioconcentrado en mayor media por hembras que están en una etapa activa de producción de huevos.

Cuadro 8, FBCs en hembras y hembra con huevos al día 1, 2, 3 y 4 de exposición crónica al plomo. CE₅₀ = 0.68 mg/L concentración de exposición.

Día	Hembras (FBC)	Hembras con huevos (FBC)
1	*	81
2	13.5	394
3	7	20.5
4	0.71	1.9

*al día 1 toda las hembra tienen huevos.

6.4.3 Cuantificación de Proteínas Totales en Rotíferos.

Se realizó una extracción de proteínas totales en rotíferos, y la cantidad de proteína extraída es = 0.84 mg/L \pm 0.24 (n=3). Para los experimentos de análisis de cuantificación de plomo en extractos proteicos de rotíferos usando un colorante específico para plomo llamado Leadmium Green ®. Los cálculos de proteína total fueron obtenidos en base a la curva de calibración que se observa en la figura 51.

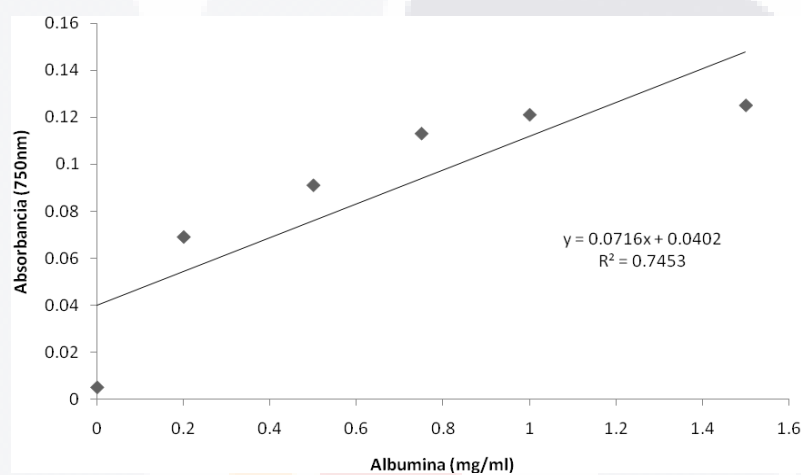


Figura 51. Grafica de calibración para el cálculo de proteína total en muestra de rotíferos.

6.4.4 Cuantificación de Plomo en extractos de proteínas de rotíferos usando el colorante específico Leadmium Green®

El plomo es quelado por proteínas de rotíferos, y se hace evidente al cuantificarlo por medio del colorante específico para plomo Leadmium Green ® en extractos de proteínas de rotíferos. Como se observa en la figura 52, las unidades de fluorescencia son mayores para los extractos con plomo que los extractos sin plomo con y sin colorante. Los valores reales de fluorescencia están en detalle en el cuadro 8. El tiempo de exposición al plomo fue de 2 horas, con ello se infiere que un periodo corto de intoxicación los rotíferos son capaces de atrapar el plomo por medio de proteínas presentes en el rotífero.

Cuadro 9. Cuantificación de plomo en extractos de proteína de rotífero, expuestos a plomo durante 2h, con una concentración de 3 mg/L de plomo.

Pb mg/L	Uf	Desviación Estándar	n
0,0 (control sin leadmium green)	53.783087	4.592748	3
0,0 (control con leadmium green)	415.791667	15.079674	3
3,0 (intoxicado con leadmium green)	529.411333	16.115794	3

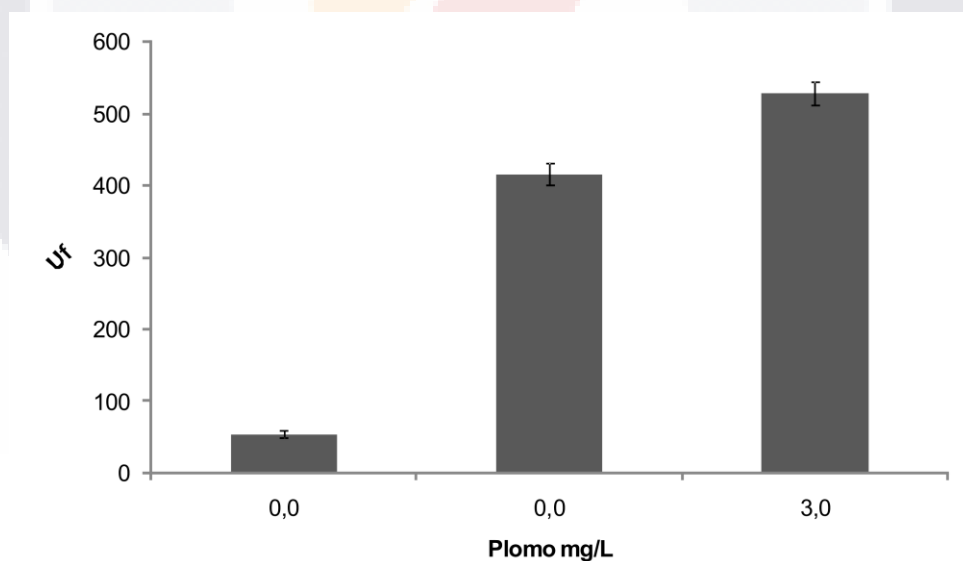


Figura 52. Grafica de cuantificación de plomo en extractos de proteínas de rotíferos. Valor promedio más una desviación estándar. N = 3.

6.4.5 Análisis de patrones de distribución intracelular de plomo en el rotífero dulceacuícola *Brachionus calyciflorus*.

El análisis de patrón de distribución de plomo en el rotífero dulceacuícola *B. calyciflorus*, fue caracterizado usando un colorante que emite fluorescencia cuando hay plomo intracelular. Como se observa en las figura 53, los sitios donde se acumula el plomo en el rotífero son: estómago y mástax principalmente. La concentración de exposición utilizada para todos los experimentos fue de 1.0 mg/L Pb. La principal vía de entrada del tóxico es el proceso de filtración. Más detalle de patrones de fluorescencia en el anexo.

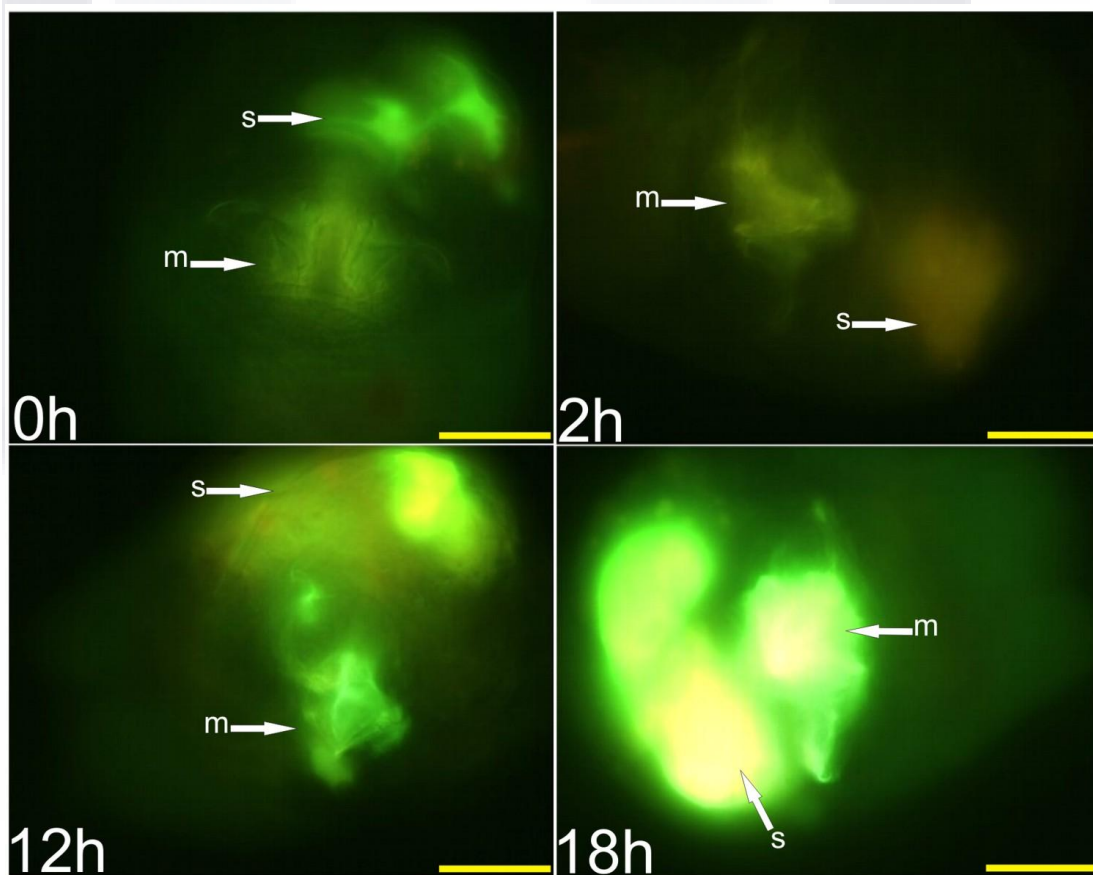


Figura 53. Análisis de patrones de distribución de plomo intracelular en el rotífero *B. calyciflorus* usando un colorante específico para plomo: Leadmium Green ®. La concentración de exposición fue de 1 mg/L plomo. m = mástax, s = estómago. La barra amarilla es igual a 200 μ m.

6.4.6 Diseño de oligonucleótidos, para la amplificación del MTF-1.

En la búsqueda del mecanismos de trafico de proteínas que controlan metales en rotíferos y por los resultados anteriores de detección de metalotioneínas, se procedió con el diseño de oligonucleótidos del factor de transcripción a metalotioneínas (MTF-1) a partir del gen MTF-1 de *Xenopus laevis* (numero de acceso NCBI = NP_001090252.1). Con este gen se hizo un alineamiento múltiple (ClustalW), con 6 secuencias de la base de datos del NCBI y se determino las regiones más conservadas (Figura 54).



Figura 54. Alineamiento múltiple de 7 secuencias del gen MTF-1: el color amarillo indica la región más conservada del mismo gen en las 7 especies cuando se hace el alineamiento múltiple (ClustalW), en la pagina de Internet: www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/

El diseño de oligonucleotidos fue realizado tomando en cuenta la región más conservada, usando el programa Windows 32 PrimerSelect 5.00 1993-2001 DNASTAR Inc.

Los oligonucleótidos obtenidos son:

- F'MTF1 (5'TCCCCAGACCAGATTCAGCTCAC-3')
- R'MTF1 (5'ACGCCTTTCCACAGCCAGACT-3')

Amplifican un fragmento de 248 pb.

La amplificación del gen MTF1 en el rotífero *B. calyciflorus* cepa Gainesville Florida, se muestra en la figura 55.

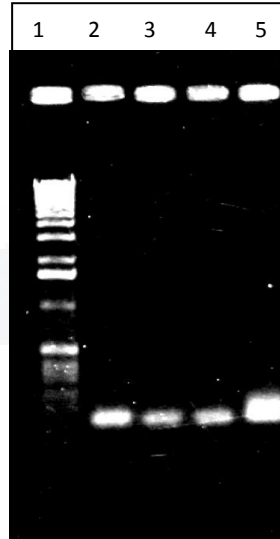


Figura 55. Amplificación del gen MTF-1 en el rotíferos. Carriles: 1 = marcador de peso molecular; 2 = *B. calyciflorus*, 3 = *Brachionus araceliae*, 4 = *Brachionus* sp. Veracruz, 5 = *Lecane cornuta*.

Secuencia del gen MTF1 amplificado del rotífero *B. calyciflorus* cepa Gainesville Florida.

```

CTCAGTAGTCTTCTCGTTAGCTGTGGTCACTTGTGACGTTGTGACATCGTGTAGGAGCGTTAAGGC
GTTATTCACGTCCC GGCTGTGACACTCAGTGAGGAGAGAACGCGTGCGCAACCTACTTTATAGTT
TGGGAAA ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTGTTTTACCTCAGGGTGAAACACT
GAAAGACGGTTGCGGCTGTCGCTTTTCGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTCATTGGTGAGGTAA
CGGCACGCCAAGGCGACGATGTATGCTTCCTTGAGAGGGGAGAACGGCGAACTGGTAATTGATAC
ACCCTCCCTACTCCTTCCGCAGAGGGTGTGCGGAATCTGTCACCATGGGCGAAAGGCTGTGGGA
GCAACGCCCCGTGAGTGAAGAAGATTTCCCGTTCTTATACTCTGTTGGCAGCAAACAGCAACTC
CACTAGTAACTGGCTGTATTCTGGACGGTTGCATTATTAACATGCCCCGGCTAATTGTGCGGCGC
GAGGGAGCGGAAATCCGTCGCTGTGGAGGCTTTCTAAGGGATTTATAGAGAGG
    
```


Se obtuvo un árbol filogenético y el porcentaje de identidad y divergencia del gen MTF-1 en el rotífero *Brachionus calyciflorus* (figuras 56 y 57).

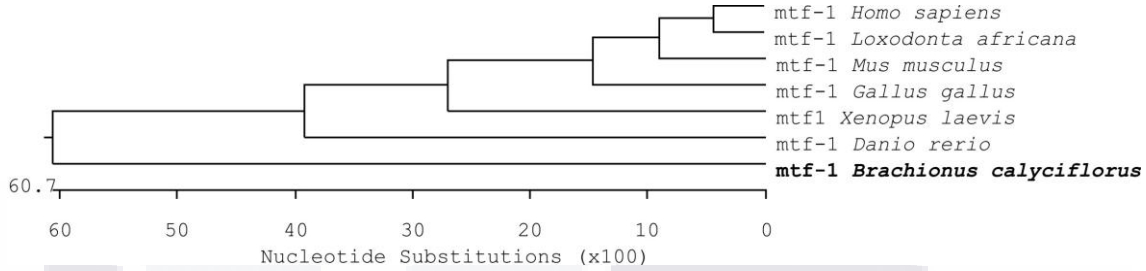


Figura 56. Árbol filogenético de nuestra secuencia del gen MTF-1 obtenida del rotífero *B. calyciflorus*, comparada con 6 secuencias de genes MTF-1 reportadas en los organismos: *Xenopus laevis*, *Mus musculus*, *Loxodonta africana*, *Homo sapiens*, *Gallus gallus* y *Danio rerio* en la base de datos del NCBI

		Percent Identity								
		1	2	3	4	5	6	7		
Divergence	1	█	3.3	6.0	5.6	3.2	4.6	3.0	1	mtf1 brachionus calyciflorus
	2	130.7	█	48.7	63.0	48.8	58.0	23.4	2	mtf1 xenopus laevis
	3	114.0	57.4	█	88.8	76.0	70.3	34.6	3	mtf-1 mus musculus
	4	124.4	49.8	11.7	█	92.4	76.5	49.6	4	mtf-1 Loxodonta africana
	5	125.3	55.2	23.0	7.8	█	77.4	33.4	5	mtf-1 homo sapiens
	6	124.7	53.5	32.4	24.1	28.9	█	45.7	6	mtf-1 gallus gallus
	7	117.7	77.5	84.9	66.4	87.7	69.3	█	7	mtf-1 danio rerio
		1	2	3	4	5	6	7		

Figura 57. Porcentaje de identidad y divergencia de nuestra secuencia del gen MTF-1 obtenida del rotífero *B. calyciflorus*, comparada con 6 secuencias de genes MTF-1 reportadas en los organismos: *Xenopus laevis*, *Mus musculus*, *Loxodonta africana*, *Homo sapiens*, *Gallus gallus* y *Danio rerio* en la base de datos del NCBI.

6.4.7 Extracción de ADN en 7 especies de rotíferos y su amplificación del gen MTF-1.

Se logró obtener ADN genómico de alto peso molecular en varias especies de rotíferos dulceacuícolas y marinas, como se muestra en el cuadro 10. Y se probaron los oligonucleótidos diseñados que amplifican el MTF-1. Para las 7 especies se logró amplificar el gen MTF-1 (Figura 58), lo cual indica que estos oligonucleótidos son específicos para rotíferos. Y además el gen MTF-1 está presente en rotíferos marinos, dulceacuícolas, y endémicos.

Cuadro 10. Resultados del análisis espectrofotométrico del ADN de 7 especies de rotíferos dulceacuícolas.

Especie de rotífero	$A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$	Concentración de ADN (ng/ μl)
<i>Lecane cornuta</i>	1.214	170
<i>Brachionus plicatilis</i>	1.3	195
<i>Brachionus calyciflorus</i> UAA	1.250	175
<i>Brachionus araceliae</i>	1.171	205
<i>Filinia novaezealandiae</i>	1.258	1975
<i>Brachionus calyciflorus</i> Cepa Isla San Marcos	1.243	3885
<i>Brachionus calyciflorus</i> Cepa Parque México	1.253	1630

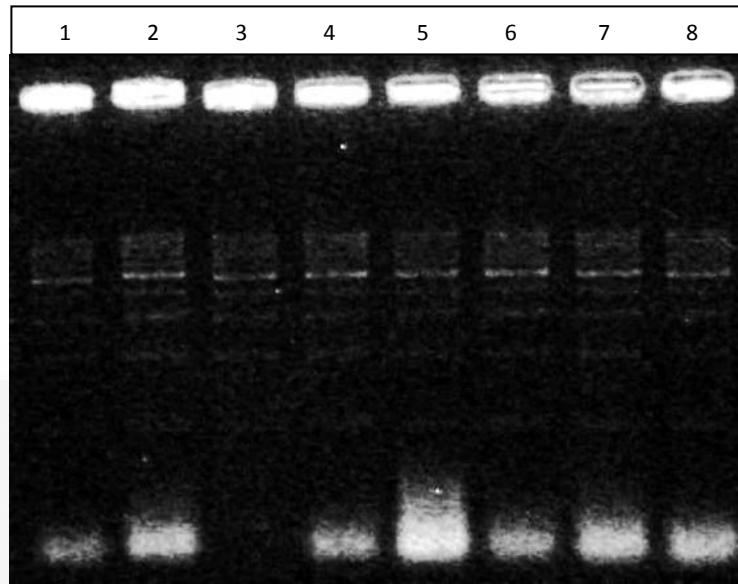


Figura 58. Amplificación del gen MTF-1 en 8 especies de rotíferos dulceacuícolas. Carriles: 1= *L. cornuta*, 2= *B. plicatilis*, 3= no amplifico, 4= *B. calyciflorus* Cepa UAA, 5= *B. araceliae*, 6= *F. novaezealandiae*, 7= *B. calyciflorus* Cepa Isla San Marcos, 8= *B. calyciflorus* Cepa Parque México.

6.5 Análisis de sustancias químicas en rotíferos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Se realizó la detección de sustancias químicas en rotíferos por Microextracción en Fase Sólida (SPME). Y los resultados no son muy claros, existen sustancias que detecta el equipo, las cuales son probablemente producto del metabolismo energético de los rotíferos como algunos ácidos grasos. Mientras que en los extractos no se logró detectar sustancias interesantes. El método de extracción puede influir mucho en la detección, al final se obtuvieron cromatogramas (figura59) con una gran cantidad de sustancias presentes en el agua de cultivo de rotíferos. Las sustancias que se lograron detectar en los rotíferos son: ácido hexanóico, ácido octanóico, ácido oxálico, silanol, piperazina, trimetilfosfina, floroglucinol, ftalatos, naftalenos y estradiol.

Sin embargo estas sustancias son comparadas con la biblioteca del equipo y sus porcentajes de parecido son bajos ya que están alrededor de un 30 a 50 % de coincidencia con la molécula.

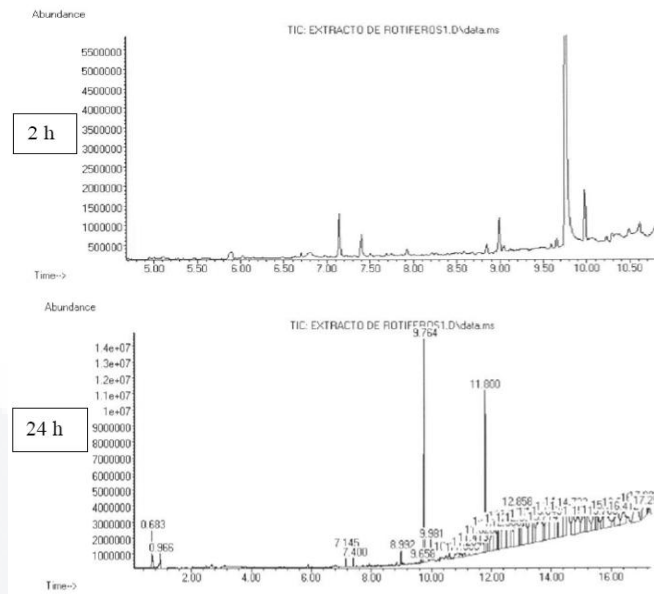


Figura 59. Cromatogramas correspondiente a la muestra de agua de rotíferos a las 2 horas y 24 horas de contacto con la fibra.

6.5.1 Competencia interespecífica en rotíferos.

Finalmente se realizó un experimento en dos especies de rotíferos, con la finalidad de analizar el efecto o la influencia en la reproducción de ambas especies de géneros distintos. Las dos especies de rotíferos crecen muy bien (Figuras 60a y b), *Lecane quadridentata* creció mejor que *Brachionus calyciflorus*, aunque *B. calyciflorus* produce quistes algo que *L. quadridentata* no lo hace en el experimento 10Bc y 10Lq, en este mismo experimento se logró observar machos de *L. quadridentata* algo que no sucedió en ningún experimento. Al juntar la dos especies de rotíferos en una proporción igual, es decir 5 y 5 hembras iniciales, *L. quadridentata* crece mejor nuevamente que *B. calyciflorus*, pero *B. calyciflorus* sigue teniendo producción de quistes a pesar de que disminuye su producción de hembras totales. En una proporción de 8 hembra de *B. calyciflorus* y 2 de *L. quadridentata* se observa como domina la especie *B. calyciflorus*, interesantemente la producción de quistes se incrementa más que en todos los experimentos, incluso *L. quadridentata* produce un quiste (Figura 60a). Y finalmente el experimento donde se colocó 8 hembra de *L. quadridentata* y 2 hembras de *B. calyciflorus*, claramente domina la especie *L. quadridentata* sobre la especie *B. calyciflorus*.

Competencia interespecífica en rotíferos: producción de quistes

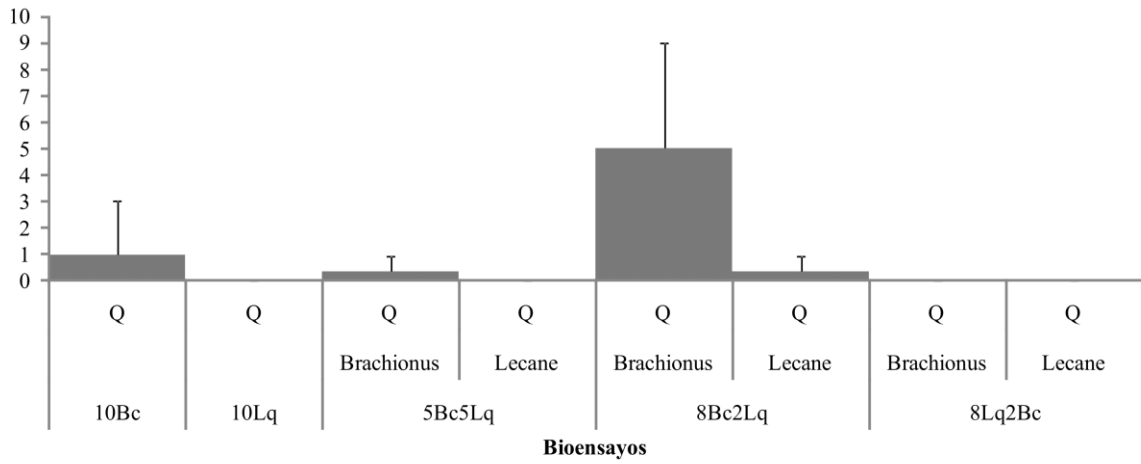


Figura 60a. Producción de quistes por competencia interespecífica entre *B. calyciflorus* (Bc) y *L. quadridentata* (Lq). Q = quistes. Valor promedio y una desviación estándar. N=3.

Competencia interespecífica en rotíferos: producción de hembras y machos

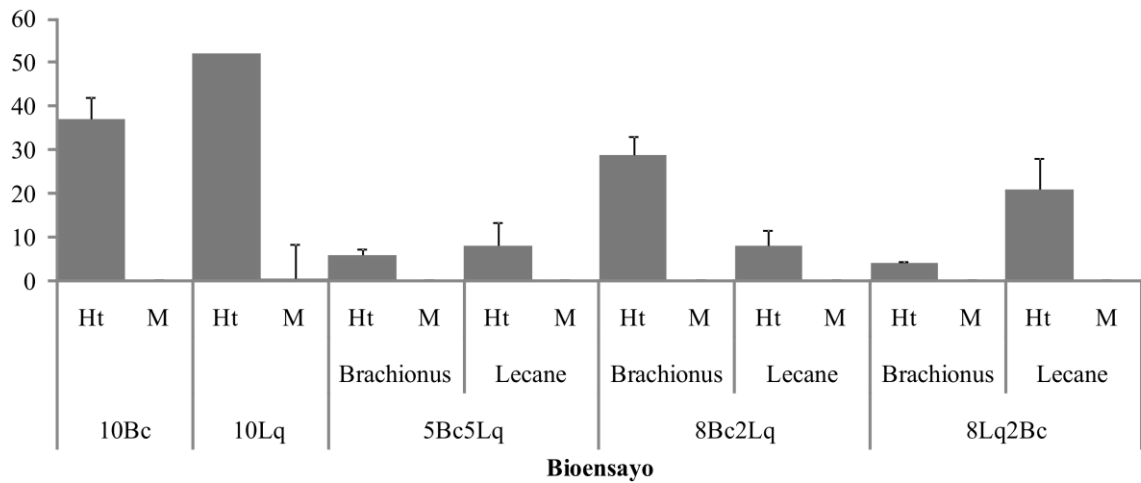


Figura 60b. Producción de hembras y machos por competencia interespecífica entre *B. calyciflorus* (Bc) y *L. quadridentata* (Lq). Ht = hembras totales, M = machos totales. Valor promedio y una desviación estándar. N=3.

7. Discusión.

7.1 Disrupción endocrina en el rotífero *Brachionus calyciflorus* por exposición crónica al plomo, zinc, arsénico, vinclozolin, hormona luteinizante y hormona folículo estimulante.

El ensayo reproductivo de 4 días es una prueba de toxicidad factible para analizar la disrupción endocrina en rotíferos, ya que se logró analizar conjuntamente el efecto adverso (para cada tóxico utilizado: plomo, zinc, arsénico, vinclozolin, hormona luteinizante y hormona folículo estimulante) en la reproducción asexual y sexual del rotífero dulceacuícola *Brachionus calyciflorus*. De tal manera que se logró evaluar bajo las mismas condiciones de exposición al tóxico en un periodo de tiempo determinado: la tasa de producción de hembras y machos, tasa de producción de huevos partenogenéticos, huevos sexuales no fecundados y huevos sexuales fecundados, así mismo la producción de hembras con huevos asexuales y sexuales. Cuyo propósito final fue establecer si el tóxico afectaba de igual manera cada variable o había una relación en las fluctuaciones de cada variable y coincidencias entre sí.

El plomo, zinc y arsénico son disruptores endocrinos en vertebrados e invertebrados (Iavicoli *et al.*, 2009), y sus efectos disruptores son claros sobre la reproducción asexual y sexual del rotífero *Brachionus calyciflorus*. El plomo y el zinc afectan drásticamente la tasa de producción de hembras de igual manera. Sin embargo en una dosis de exposición baja (0.1 mg/L Zn y de Pb), hay un incremento significativo de machos. En el plomo se observa este fenómeno muy marcado de inducción de machos en concentraciones de exposición de 0.5, 0.75 y 1.0 mg/L de Pb, caso contrario a lo que sucede con el Zn, porque solo se indujo la producción significativa de machos en una sola concentración. En cuanto a la producción de hembras que tienen huevos asexuales y sexuales y que son responsables de las tasas de producción de hembras y machos, se afectan por la exposición al plomo y zinc de una forma abrupta descendiendo a valores significativamente bajos, extremadamente bajos por exposición al zinc. En el plomo hay un valor favorable de producción de hembras con huevos sexuales no fecundados que originan machos, puesto que se incrementa

significativamente a una concentración de exposición de 1.0 mg/L Pb. Sin embargo, las tasas de producción de huevos asexuales bajan considerablemente conforme se incrementa la concentración de exposición de plomo y zinc. No así en la tasa de producción de huevos sexuales no fecundados que originan machos, cuantificados en exposición al plomo, ya que a pesar de tener grandes variaciones estas sobrepasan el valor promedio de producción del control siendo significativamente mayor la producción de huevos sexuales no fecundados que originan machos a una concentración de 1.0 mg/L de Pb. Caso contrario a una exposición de 0.75 mg/L de Zn, ya que hay un decremento significativo de producción de huevos sexuales no fecundados que originan machos. El plomo y zinc se comportan similares al afectar la producción de hembras, pero solo el plomo induce la producción de machos, y el zinc no. Lo que significa y así lo demuestran los resultados obtenidos, al comparar la producción de quistes en ambos tóxicos, que el plomo favorece la reproducción sexual, puesto que a partir de las concentraciones de exposición 0.5, 0.75 y 1.0 mg/L Pb, aparecen estos huevos de resistencia, y coinciden con la alta producción de machos y huevos que los originan, cabe destacar que la producción de hembras disminuye mucho y pese a todo logran dejar descendencia al existir fertilidad aun estando intoxicados con plomo. El zinc no induce la producción de quistes.

La inducción de la reproducción sexual se da por cambios de temperatura, fotoperiodos, calidad del alimento, hacinamiento y las condiciones desfavorables del medio ambientales (Gilbert y Schröder, 2004). En este contexto, entonces el plomo induce la reproducción sexual en *Brachionus calyciflorus*, actuando como un agente estresante para el rotífero quien responde rápidamente induciendo la reproducción sexual favoreciendo la cópula y fertilización para la formación de quistes (estructuras de resistencia). La tasa de producción de hembras partenogénicas se ve afectada o mejor dicho puede bajar hasta un 50% la producción total cuando se intoxican a una concentración de 0.92 mg/L con Zn y 0.68 mg/L con Pb. Los valores donde se muere el 50% de las hembras en un lapso de 24 horas son: CL50 = 4.0 mg/L Pb (Janssen *et al.*, 1994), y CL50 = 1.65 mg/L Zn (Nelson y Roline, 1998). Comparados, *B. calyciflorus* es más sensible al plomo cuando es una exposición crónica y cuando es aguda es más sensible al zinc. Sin embargo, los valores de toxicidad solo nos ofrecen un panorama de mortalidad, contrario a lo anteriormente

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mencionado, sobre los efectos del plomo y zinc en la reproducción sexual y asexual, y sus probables consecuencias en las poblaciones de esta especie, ya que la inducción de la reproducción sexual, aunque parezca favorable es un riesgo altamente peligroso por las consecuencias ecológicas y reproductivas que conlleva la inducción como: a) baja producción de quistes, b) bajo porcentaje de eclosión de huevos, c) incluso probables desapariciones de poblaciones de rotíferos en sitios con altos grados de contaminación de metales como plomo y zinc. Considerando que la concentración de zinc en las aguas superficiales es generalmente 0.05 mg/L, pero puede variar desde 0.002 hasta 50 mg/L (ATSDR, 2005). Y el plomo se encuentra con concentraciones que oscilan entre 1 a 60 µg/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). Es importante resaltar, se han reportado concentraciones de plomo de 0.0038 mg/L en la Presa el Niágara en Aguascalientes, México (Rubio-Franchini, 2009).

En cuanto al arsénico es un disruptor endócrino muy potente y más de un millón de personas están expuestas a concentraciones elevadas de arsénico, principalmente a través del agua potable (más de 50 mg/L) pero también por emisiones industriales, en México los niveles de arsénico en el agua potable son muy variados, y la mayor parte proviene de fuentes naturales, siendo los pozos profundos los más contaminados por estar en contacto directo con un suelo de origen volcánico (Vega-Loyo, 2009). En rotíferos no hay reportes de toxicidad que nos indiquen efectos de mortalidad aguda y crónica. Por lo cual los resultados obtenidos son los primeros en su tipo desde una perspectiva de disrupción endocrina.

El arsénico es un potente disruptor de la reproducción asexual y sexual en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. En un rango de exposición de 0.025 hasta 1.0 mg/L de arsénico solo se baja significativamente la producción de hembras a una concentración de 0.025 mg/L As, y en las demás concentraciones consideradas (0.05, 0.075, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/L As) no hay diferencias significativas respecto al control, al contrario en las mismas concentraciones de exposición del arsénico, hay un incremento significativo de producción de machos. Y conforme se incrementa la concentración de Arsénico se alcanza a una concentración de 1.5 mg/L de exposición un punto máximo de incremento de producción

de machos y hembras y posteriormente se inhibe la producción de machos con 7.0 mg/L de arsénico, de igual forma disminuye considerablemente la producción de hembras. Este fenómeno donde la misma concentración de exposición (1.5 mg/L As), induce la producción de hembras y machos se describe como una condición de respuesta adversa al tóxico afectando la reproducción sexual, al favorecer la probabilidad de encuentro entre hembras y machos, incrementando la producción de quistes. Este fenómeno se observa al analizar las tasas de producción de hembras con huevos asexuales y sexuales, los cuales responden de manera similar a lo anteriormente descrito para la producción de hembras y machos. Incluso y realmente interesante es la producción de huevos sexuales y asexuales, que como se muestran en la figura 19, tienen una respuesta coordinada y ambas variables (la producción de huevos partenogenéticos y huevos sexuales no fecundados que originan machos) se comportan de manera similar. En cuanto a la producción de quistes, es nula, solo existe una respuesta favorable pero incipiente, a una concentración de 1.0 mg/L de arsénico. Lo que sugiere que pese a tener grandes probabilidades de encuentro y una gran inducción de machos y hembras y su coordinación de ambas variables, no sirve de nada sin la producción de grandes cantidades de quistes, que son de gran importancia ecológica. Lo que se corrobora entonces es que existe un efecto directo del arsénico sobre la reproducción asexual y en mayor medida en la reproducción sexual, específicamente en la fertilización, cópula y producción de quistes.

El análisis toxicológico del disruptor endocrino vinclozolin, la hormona luteizante y la hormona folículo estimulante, son descritos a continuación.

El vinclozolin es un antagonista de la progesterona (Molina-Molina *et al.*, 2006), y el receptor de membrana para la progesterona ha sido descrito recientemente en rotíferos (Snell y DesRosiers, 2008). Por lo cual los efectos obtenidos en el presente trabajo probablemente estén ejerciendo un efecto adverso en este mecanismo de señalización hormonal del rotífero *Brachionus calyciflorus* ya que a progesterona es un esteroide que juega un papel clave en la reproducción de muchos vertebrados (Graham y Clarke, 1997). El receptor de la progesterona en rotíferos se localiza en: ovarios, vitelario, oviductos, los huevos partenogenéticos, la vesícula seminal, en el intestino, y gran parte de los conducto espermáticos (Stout *et al.*, 2010). El vinclozolin incrementa significativamente la

producción de hembras en un rango de exposición de 0.4 – 18 mg/L. a su vez este efecto de incremento significativo se observa en la producción de machos, pero solo en un rango de exposición de 0.4 – 2.8 mg/L formando una U invertida. Lo que se observa una sincronía o un traslape del efecto tóxico favoreciendo la reproducción asexual y sexual, sincronizando los incrementos de machos y hembras. Estos resultados de incremento poblacional en rotíferos se ha observado en otros estudios donde se han adicionado hormonas, por ejemplo la hormona GnRH incrementa el crecimiento poblacional en los rotíferos *B. calyciflorus* y *B. plicatilis* (Gallardo *et al.*, 1999). Aunque es importante resaltar que el mecanismo del vinclozolin es bloquear los receptores de la progesterona, y por consecuencia reducir el incremento de la tasa de producción de hembras y machos, todo indica que las concentraciones y el mecanismo de acción del tóxico no solo afecta directamente decrementos o incrementos de la reproducción asexual y sexual, sino que se necesitan más estudios a fondo con vinclozolin ya que puede producir metabolitos secundarios que son capaces de ser agonistas o antagonista de otros receptores importantes para la señalización endocrina. Nuestros resultados son inéditos en cuanto al gran incremento de la producción de hembras y machos, caso contrario a lo descrito por Yang y Snell (2010), respecto a una intoxicación crónica combinada de progesterona y estrógenos en el rotífero *B. calyciflorus*, ya que observaron una clara disminución en la producción de quistes, y no así Snell y DesRosier (2008), que reportan que la intoxicación con progesterona (sin la combinación de estrógenos) incrementa la producción de quistes, la eclosión de huevos sexuales y asexuales, así como la cópula. De hecho solo existe un reporte de toxicidad con exposición al vinclozolin de Zavala-Aguirre (2007), en *B. calyciflorus*, en el cual hace hincapié que existe un efecto de hormesis en un rango de exposición 0.185 – 3.0 mg/L de vinclozolin.

En este contexto de intoxicación con hormonas en rotíferos; nuestros resultados de caracterización toxicológica de las hormonas: luteinizante y la foliculo estimulante, son los primeros reportes en el rotífero *B. calyciflorus*. La hormona luteinizante al igual que el vinclozolin incrementa significativamente la producción de hembras y machos. Cabe mencionar que la hormona luteinizante desempeña un rol crítico para la inducción de la producción de machos, caso contrario a la hormona foliculo estimulante que no tiene un efecto claro en la inducción de machos y no tiene efectos significativos sobre la producción

de hembras. Es interesante analizar los resultados a fondo de la inducción de machos por la hormona luteinizante, puesto que en resultados anteriores, se lograron detectar esta hormonas en el rotífero dulceacuícola *B. calyciflorus*. Exclusivamente se observa una inmunodetección muy marcada en la corona de machos de la hormona luteinizante (Alvarado-Flores *et al.*, 2009).

En este punto del análisis es atractivo analizar que sucede con las fluctuaciones de producción de hembras con huevos asexuales y sexuales y producción de huevos asexuales y sexuales con estos tres tóxicos disruptores de la reproducción en el rotífero. Primeramente el vinclozolin como era de esperar basado en los resultados anteriores, indujo la producción de hembras con huevos partenogénéticos, con un incremento significativo solamente en las concentraciones de exposición de 2.8, 12.8 y 18 mg/L. La producción de hembras con huevos sexuales no fecundados que originan machos no tiene efectos significativos y estos resultados son lógicos, ya que hay una gran cantidad de machos eclosionados, existiendo una producción continua de machos. Por lo tanto, al existir una gran cantidad de hembras con huevos asexuales y sexuales (no fecundados que originan machos), hembras y machos, la cópula y fertilización se beneficia en la exposición crónica al vinclozolin, y se manifiesta como un incremento progresivo de la producción de hembras con quistes alcanzado el punto máximo de producción significativo a una concentración de exposición de 2.0 mg/L. De igual forma el vinclozolin induce el incremento significativo de la producción de quistes a una concentración de 2.0 mg/L.

Respecto a las hormonas luteinizante y folículo estimulante, no hay diferencias significativas, debido las altas variaciones que se obtuvieron en las pruebas de toxicidad, para la producción de hembras con huevos asexuales y sexuales. De igual manera sucedió en la producción de huevos asexuales y sexuales.

En el mismo contexto, en el rotífero *B. calyciflorus* se ha reportado que una exposición crónica al fenitrotión (disruptor endocrino: antagonista de los receptores de andrógenos competitiva), produce interrupciones en la reproducción: las mujeres tienen mayores períodos de reproducción y producen más descendencia que los controles, también se redujo el número de quistes producidos, y en bajas concentraciones de exposición al

fenitrotión hay un aumento en la duración del periodo juvenil (Lv *et al.*, 2010). Estos fenómenos, en el que se observa la estimulación por un agente tóxico en el extremo inferior de la curva de dosis-respuesta, se denomina hormesis, y se ha documentado ampliamente en estudios farmacológicos y toxicológicos (Stebbing, 1982). Los resultados obtenidos son los primeros en cuanto a una descripción y enfoque correlativo de variables asexuales versus sexuales. Existen estudios donde se han reportado efectos de disruptor endocrino en rotíferos: por ejemplo, el pentaclorofenol y clorpirifos reducen la reproducción sexual en el rotífero *Brachionus calyciflorus*; el diazinón, fenitron, isoprotilano y metopreno aumentan la producción de huevos sexuales; y finalmente el nolyphenol y precoceno inhibieron la fertilización en las mujeres (Zou, 2010).

7.2 Deformaciones ocasionadas por intoxicación crónica a vinclozolin, hormona luteinizante y la hormona folículo estimulante.

¿Los efectos de inducción son favorables en el rotífero *Brachionus calyciflorus* por exposición crónica al vinclozolin, la hormona luteinizante y la hormona folículo estimulante en la producción de hembras y machos? En el caso del vinclozolin y la hormona luteinizante no lo son, ya que en los experimentos con estos disruptores endocrinos se encontraron y se reportan por vez primera deformaciones en rotíferos inducidas por exposiciones crónicas. Además se analiza si estas deformaciones pueden ser replicadas y transmitidas a diferentes generaciones sin ser expuestas a los tóxicos, analizando novedosamente el efecto transgeneracional de tóxicos en rotíferos.

Se producen hembras deformes por exposición crónica al vinclozolin, hormona luteinizante y hormona folículo estimulante: las concentraciones umbrales y las frecuencias de aparición varían. En total, el vinclozolin logro inducir en un primer experimento con 6 réplicas un total de 10 organismos anormales. Para verificar si estos resultados son replicables, se hicieron 21 réplicas más y se lograron detectar un total de 18 hembras anormales. En el caso de la hormona luteinizante solo se observaron un total de 2 hembras deformes (6 réplicas). Y en la hormona folículo estimulante se encontraron 6 hembras anormales (6 réplicas). Los porcentajes de deformaciones para cada tóxico son diferentes:

el vinclozolin tiene un porcentaje de deformaciones de 0.66%, la hormona luteinizante 0.33% y la hormona folículo estimulante 1.09%.

La descripción y las características de las hembras deformes son muy similares: no logran moverse libremente, sus espinas y cutícula están amorfas, y no son capaces de reproducirse, excepto un solo individuo deforme producido por la hormona folículo estimulante en una concentración de exposición de 0.0001 mg/ml, su descendencia fue de igual manera fértil y sana, capaz de crecer por varios meses en condiciones de cultivo de laboratorio. Se presentó un único caso de una probable reproducción sexual por la observación de un reconocimiento con específico por parte de un macho a una hembra en un individuo producido por exposición crónica a vinclozolin en una concentración de 5.6 mg/L. Sin embargo no fue capaz de ser fértil ni copular de manera directa en la corona de la hembra (video de deformaciones por tóxicos).

También se observaron incrementos en el vitelario de hembras expuestas al vinclozolin con 1.2 mg/L, incluso un incremento significativo de la talla en machos en la misma concentración de exposición. La concentración de exposición de 1.2 mg/L de vinclozolin, resultó ser la más potente y con los efectos adversos más marcados de deformaciones, en hembras y machos.

El vinclozolin y sus deformaciones solo fueron observadas en hembras partenogenéticas, la alteración de la línea germinal entonces se expresa estrictamente en la fase 2n (diploide) del ciclo de vida, sin embargo, no descartamos la posibilidad de un efecto adverso en organismos haploides (1n). Las alteraciones histológicas son un eslabón entre un efecto bioquímico y molecular, y fenómenos similares de alteraciones han sido reportados en otros invertebrados expuestos al vinclozolin. Por ejemplo, en la *Daphnia magna* expuesta a 0.43 mg/L de vinclozolin se indujo una pequeña disminución en la longitud del cuerpo (Vandergehuchte *et al.*, 2010). En hembras de *Oryzias latipes* el vinclozolin disminuye la longitud total en una concentración de exposición de 5 mg/L, por el contrario los machos aumentan su longitud total (Kiparissis *et al.*, 2003).

Las deformaciones en los rotíferos por exposición a: vinclozolin, hormona luteinizante y hormona folículo estimulante, tienen repercusiones más allá de una

deformación en la población y un porcentaje de anormalidades. Incluso más peligrosos que la mortalidad. Es la infertilidad transgeneracional y los efectos epigenéticos ligados a la herencia del efecto adverso. Se hizo un análisis de 45 quistes producidos por exposición crónica de vinclozolin a una concentración de 1.2 mg/L, los resultados son alarmantes: a) principalmente hay un incremento en la eclosión de quiste producidos por exposición al vinclozolin igual a 64.52% contra un 60% de eclosión de quistes producidos sin exposición, que a su vez las hembras eclosionadas de quistes producidos por exposición al vinclozolin crecen ($r = 1.21 \pm 0.0063$: valor promedio más una desviación estándar) mejor que las hembras eclosionadas ($r = 0.90 \pm 0.064$: valor promedio más una desviación estándar) de quiste control, b) aparecen hembras deformes en los descendientes de las hembras expuestas, siendo que a sus rotíferos descendientes de la reproducción sexual no fueron expuestos a vinclozolin. De igual manera la tasa de producción de hembras con huevos partenogénicos y hembras con huevos sexuales no fecundados que originan machos son significativamente mayores a la cepa control, y también la tasa de producción de machos fue mejor en la cepa descendiente de rotíferos expuestos al vinclozolin, que en la cepa control. Por lo tanto los rotíferos descendientes de hembras expuestas al tóxico se reproducen mejor que sus parientes sin exposición, esto sugiere daños permanentes en el genoma que pueden ser heredados a sus descendientes. Lo cual podría ser el primer reporte de adaptación al vinclozolin en rotíferos, o de alguna manera existe una respuesta de los descendientes favorable ya que existe un incremento poblacional. En esta perspectiva, y por otro informe y el modo de acción del vinclozolin, probablemente en nuestros experimentos con rotíferos se modifica el epigenoma de la línea germinal de forma permanente por exposición crónica al vinclozolin, y entonces la enfermedad puede llegar a ser promovida transgeneracionalmente de progenie en progenie, porque el vinclozolin induce alteraciones transgeneracionales, debido a la herencia transgeneracional de la inducida por cambios epigenéticos (Skinner *et al.*, 2011).

De la misma manera se analizó el porcentaje de eclosión de quistes producidos de las hembras descendientes del único rotífero deforme del estudio capaz de reproducirse y tener reproducción partenogénica y sexual, dicho organismo deforme fue producido por exposición a la hormona folículo estimulante en una concentración igual a 0.4 mg/L. A los

15 días de cultivo en laboratorio en condiciones controladas, se lograron colectar un total de 105 quistes. El porcentaje de eclosión en este caso fue menor al porcentaje de eclosión de quistes de una cepa de un cultivo clonal normal de rotíferos. 58.10 % contra un 60.0% de eclosión de quistes producidos en cultivos normales. Más bajo incluso que el porcentaje de eclosión de quistes producidos con vinclozolin. Posteriormente, dicha cepa presentó una disminución en la producción total de hembras, esta disminución es significativa comparada con el control. No hubo diferencias significativas en la producción de hembras con huevos partenogénicos, y tampoco en la producción de huevos partenogénicos. La reproducción sexual fue nula, no existió producción de machos, tampoco hembras con huevos sexuales. Lo que se deduce, es que la hormona folículo estimulante en generaciones posteriores afectó drásticamente la reproducción asexual y sexual, incluso sin ser expuestas.

7.3 Detección de metalotioneínas en el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

Los rotíferos tienen metalotioneínas, y su mecanismo de acción es el control de metales que entran al organismo por diferentes vías de exposición. Nuestros resultados demuestran una evidente inmuno-expresión de metalotioneínas en órganos importantes para la reproducción, sistema digestivo, y músculo esquelético. Las metalotioneínas están altamente conservadas en los vertebrados e invertebrados (Klaassen *et al.*, 1999). En rotíferos no existe un reporte de la expresión en tejidos, y tampoco de su papel en el organismo. Las metalotioneínas se controlan por un mecanismo que involucra factores de transcripción; el mecanismo de accionamiento de las metalotioneínas por otros metales es indirecto, es decir, el metal inductor de la transcripción de metalotioneínas es el Zinc (Zn), y este mecanismo de acción consiste en la unión del Zn a un factor de transcripción específico para la MT conocido como: factor de transcripción de metalotioneínas (MTF-1)), el MTF-1 interactúa con el Zinc y forma un complejo MTF-1-Zn que penetra al interior del núcleo de la célula donde se une a elementos reguladores específicos para metales (MRE), localizados en el promotor del gen de MT, aumentando la síntesis y transcripción y expresión de las MTs (Klaassen *et al.*, 1999). En primera instancia se analizó (una vez que se sabía que los rotíferos poseen metalotioneínas) el efecto de bioacumulación del plomo como modelo de inducción de metalotioneínas, y su patrón de distribución en el rotífero,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con la ayuda de un colorante específico (Leadmium Green ®: ver anexo para análisis a fondo de los patrones de distribución del colorante en rotíferos). Los resultados de patrones de distribución son increíbles, puesto que se logró determinar en primera instancia el sitio donde se comienza a bioacumular el plomo en el rotífero, que es el estómago en un lapso no mayor a 18 horas. Y esta acumulación de tóxico se incrementa conforme se aumentan el tiempo de exposición y concentración al tóxico. También se analizó en extractos de proteínas el plomo acumulado en ellas, siendo que en un lapso corto de exposición a plomo con una concentración igual a 3 mg/L Pb, y con la ayuda del colorante Leadmium Green ®, se demostró que el plomo en extractos de proteínas de rotíferos intoxicados presenta mayor fluorescencia que los extractos de proteínas de rotíferos no intoxicados. Lo que sugiere que pueden estar involucradas las metalotioneínas, incluso otras proteínas del rotífero en atrapar a los metales y formar complejos proteína-metal. Por resultados reportados por Alvarado-Flores (2010), de acumulación de plomo en tejido, principalmente en vitelario y mástax. Nuestros resultados son lógicos, sin embargo, es importante analizar desde una perspectiva cuantitativa la acumulación de plomo. Por lo que se decidió analizar el comportamiento del plomo en un ensayo crónico de 4 días, con una concentración de exposición igual a 0.68 mg/L de Pb, usando el parámetro indicador Factor de Bioconcentración (FBC). Se obtuvieron los factores de bioconcentración de plomo en hembras y hembras con huevos a las 24, 48, 72 y 96 horas, observando que a las 48 horas es cuando se tiene un factor de bioconcentración mayor que los otros días (FBC = 394), en hembras con huevos y conforme pasan las horas de exposición y la población de rotíferos aumenta los FBC se disminuyen pero existe una tendencia clara, es decir, los FBC son más altas en hembras que tiene huevos que las hembras sin huevos, lo que sugiere que los huevos se llevan una gran cantidad de plomo, lógico a lo reportado en cuanto a bioacumulación de plomo en vitelario (Alvarado-Flores, 2010). Por lo tanto, el rotífero posee un mecanismo de control de metales y las metalotioneínas son un factor determinante en esta respuesta al estrés por plomo.

Finalmente se diseñaron unos oligonucleótidos específicos para el factor de transcripción de metalotioneínas (MTF-1), con la finalidad de obtener una secuencia, con la cual poder analizar en otros organismos su presencia o ausencia y corroborar si todos los rotíferos poseen estos mecanismos de acción de control de metalotioneínas. Los resultados

son prometedores, los oligonucleótidos son muy específicos, y se logro detectar en 8 especies de rotíferos correctamente: *Brachionus calyciflorus* Cepa UAA, *B. calyciflorus* cepa Gainesville, *B. araceliae*, *Filinia novaezealandiae*, *B. calyciflorus* cepa Isla San Marcos, *B. calyciflorus* cepa Parque México. Por lo anterior, las metalotioneínas están presentes en los rotíferos y desempeñan un rol importante en el control de metales que entran al rotífero. Es necesario ampliar el estudio de estas proteínas para esclarecer los mecanismos de acción e inducción con otros metales usando marcadores moleculares de expresión, en este caso el MTF-1 es un buen marcador para monitorearlo cuando se intoxican rotíferos por metales. Como se menciono anteriormente el plomo es un potente disruptor endocrino y esta respuesta puede estar ligada al control del tráfico de plomo intracelular y extracelular, en gran parte por las metalotioneínas. Incluso analizar la presencia de isoformas de MT en rotíferos, ya que con pequeñas diferencias en su estructura primaria, aunque suficientes para diferenciarlas en términos de carga total de proteína, es una indicación de polimorfismo genético (Kägi y Kojima, 1987). Hay estudios de biología molecular donde amplifican el gen que codifica para MT, y han confirmado que las funciones de las diferentes isoformas de las MT son diferentes, incluso algunas isoformas están involucradas en la homeostasis del metal y otras en la detoxificación de metales no esenciales, de hecho los genes que codifican para las MT han sido ya identificados en muchos crustáceos y moluscos (Amiard *et al.*, 2006).

7.4 La reproducción sexual como respuesta al estrés en el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

La inducción de la reproducción sexual es un parámetro indicador muy importante, ya que controla la supervivencia en la mayoría de los rotíferos, al producir quistes de resistencia, incrementar su flujo genético y favorecer la adaptación al medio ambiente. A lo largo de la discusión se analizó en gran medida los efectos sobre la reproducción del rotífero, siendo la reproducción sexual la más severamente afectada por los metales, el vinclozolin, y las hormonas luteinizante y folículo estimulante. Los principales efectos fueron incrementos en la producción de machos, seguido de un decremento en la producción de hembras, lo que imposibilita y disminuye la probabilidad de cópula y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fertilización, y por ende la producción de quistes, también decrece el porcentaje de eclosión de quistes. Se estudió en detalle el efecto del plomo sobre la cópula y fertilización, observándose que existe un claro decremento del porcentaje de cópula y producción de quistes cuando se intoxica el rotífero con plomo. La producción de quistes en el ensayo de fertilización es un parámetro indicador para evaluar el efecto sobre la reproducción sexual. Otros resultados indican que solo hay un incremento significativo con el metal Zn a una concentración de exposición de 0.1 mg/L de quistes. El plomo y el arsénico tienden a incrementar la producción de quistes en la prueba toxicológica de fertilización, sin embargo no es significativa por sus variaciones tan amplias. El disruptor endocrino vinclozolin y la hormona folículo estimulante no producen quistes mediante el ensayo de fertilización, y la hormona luteinizante produce muy pocos quistes. Observándose un efecto adverso potencialmente peligroso de estos tóxicos en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. Incluso el plomo puede llegar a disminuir significativamente el porcentaje de eclosión de huevos sexuales no fecundados que originan machos a una concentración de exposición de 3 mg/L de Pb (Alvarado-Flores, 2010). El estudio de la reproducción sexual en rotíferos necesita mayor atención y caracterización, en el presente trabajo se reportan datos de reproducción sexual interesantes, por ejemplo el comportamiento sexual de la *Cephalodella catellina* es realmente interesante porque se reporta por primera vez que una hembra de esta especie mata al macho al finalizar la cópula. Se analizó también la biología reproductiva del rotífero con distribución restringida *B. araceliae* donde se observa que a diferencia de otros machos de otras especies, el macho de esta especie permanece fijo al sustrato y la hembra es quien lo busca para la cópula, comportamiento inusual, puesto que en el rotífero *B. calyciflorus* el macho es quien busca a la hembra. Cabe señalar que los comportamientos de estas dos especies de rotíferos deben ser estudiados más a fondo para una caracterización reproductiva y una evaluación toxicológica.

La inducción de la reproducción sexual es una respuesta adaptativa al medio ambiente y la plasticidad fenotípica que poseen los rotíferos, les confiere una respuesta rápida de reacción cuando existe un factor estresante que altera su hábitat. En un experimento de competencia interespecífica entre *B. calyciflorus* (Bc) versus *Lecane quadridentata* (Lq) se obtuvieron resultados realmente interesantes: primeramente es claro

que existe una competencia entre estas dos especies, de hábitos diferentes y géneros distintos, *L. quadridenta* es epibentónica a diferencia de *Brachionus calyciflorus* que es planctónica, ambos son de distribución cosmopolita, aunque se conoce mejor sobre la reproducción sexual en *B. calyciflorus* que la de *L. quadridentata*. Interesantemente en este experimento en la proporción de 8Bc2Lq, se induce la producción de quistes en ambas especies, probablemente en respuesta a un estímulo común conservado en estos organismos, sin embargo aun falta por esclarecer este fenómeno de inducción de la reproducción sexual mediado por secreción de sustancias al medio. Aunque estos resultados nos indican que es probable que *B. calyciflorus* produjo un compuesto químico que logro inducir la producción de quistes en *L. quadridentata*. Algo que no sucedió en los demás experimentos de *L. quadridenta* incluso cuando no está en competencia con otra especie. O por el contrario *L. quadridentata* desencadeno algún mecanismo de señalización en *B. calyciflorus* con solo su presencia, en respuesta a la competencia interespecífica.

El sistema de secreción hormonal en rotíferos esta poco estudiado, y tampoco existe una hormona de rotíferos específica que coordine una acción específica de respuesta en el rotífero. Aunque los resultados obtenidos hasta el momento en rotíferos realizados principalmente por Gallardo *et al.*, (1999, 2000); Sugumar y Munuswamy (2006); Alvarado-Flores *et al.*,(2009); Stout *et al.*, (2010); y Yang y Snell (2010), indican que probablemente la secreción pulsátil de la hormonas como la liberadora de gonadotrofinas (GnRH) controla múltiples estímulos, que son captados por mecanorreceptores y quimiorreceptores presentes en el rotífero dispuestos por todo el cuerpo, por ejemplo las antenas dorso ventrales y laterales, el ojo cerebral conectado directamente al retro-cerebro, poros en la cutícula y un sistema de inervación en todo el cuerpo del rotífero por dentro de su cutícula que está en contacto directo con un sistema muscular que le permite controlar y coordinar cambios en el medio acuático, y así coordinar la secreción y expresión de hormonas para el control de la reproducción sexual y asexual. Finalmente, y en un intento por localizar alguna sustancia presente en el medio de cultivo de rotíferos, se realizó una detección de semioquímicos por microextracción en fase sólida (SPME), utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Los resultados no son alentadores pero si son una base para estudios posteriores ya que la técnica demuestra que

si se logrará estandarizar la extracción de sustancias químicas en rotíferos y utilizar fibras con afinidad a diferentes extractos de rotíferos y agua donde viven, se podría monitorear la secreción de sustancias apolares y polares involucradas en la señalización química de rotíferos.

8. Conclusión.

Los metales plomo, zinc y arsénico tiene efectos disruptores adversos en la reproducción asexual y sexual rotífero *Brachionus calyciflorus*. Uno de ellos, incluso el más peligroso es la inducción de machos; la inducción de machos es mayor por intoxicación por plomo, en menor medida por arsénico y zinc. Asimismo, se observó que los rotíferos coordinan la inducción de machos con la producción de hembras, y huevos sexuales, con el propósito de reproducirse sexualmente, cuya finalidad es la de producir quistes (los cuales son huevos de resistencia de gran relevancia ecológica), soportando entonces el estrés ocasionado por la intoxicación crónica a metales. Sin embargo, los metales afectan el porcentaje de fertilización y cópula. Y además el metal plomo afecta el porcentaje de eclosión de huevos sexuales. El rotífero *B. calyciflorus* posee una respuesta rápida al estrés por metales, que le ayuda a sostener por un periodo de exposición crónica, hembras, machos y huevos, con una baja capacidad reproductiva, pero suficiente para sostener una población y producir huevos de resistencia, pero solo por intoxicación con plomo y arsénico, con el zinc no. Existe una disminución en la reproducción asexual con los tres metales, lo que podría ser la consecuencia de la reproducción sexual tan activa.

Por otro lado el vinclozolin y la hormona luteinizante favorecen la reproducción asexual, y en gran medida la reproducción sexual. Estos tóxicos incrementan significativamente los machos, alcanzando valores muy altos de producción. Pero solo este efecto favorable de gran cantidad de machos y hembras, se ve reflejado en la exposición con vinclozolin al existir una producción significativa de quistes. Algo que no sucede con las hormonas.

Se presenta por primera vez una prueba toxicológica reproductiva crónica (4 días), donde se pueden obtener hembras deformes, por efecto del vinclozolin y las hormonas

(luteinizante y folículo estimulante). En el caso del vinclozolin se puede replicar el experimento, para estudios posteriores.

Por consecuencia, se reporta por primera vez en rotíferos efectos adversos de infertilidad transgeneracional por exposición al vinclozolin y la hormona luteinizante. Y en el caso de la exposición al vinclozolin alteraciones morfológicas capaces de ser heredadas a sus descendientes (herencia transgeneracional). Se describen las hembras deformes y se obtienen fotografías de microscopía electrónica de barrido de las principales alteraciones morfológicas como: a) espinas curvas y cuadradas, b) cutícula pliegues y abultamientos, c) tres dedos en el pie, d) pie fusionado a la antena dorsal de la corona, y e) enanismo y gigantismo del cuerpo del rotífero.

Se detecta la expresión de metalotioneínas en el rotífero *Brachionus calyciflorus*. En estructuras importantes para la reproducción y sistema digestivo. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para el factor de transcripción a metalotioneínas (MTF-1), y se logró amplificar en los rotíferos: *B. calyciflorus* Cepa UAA, *B. calyciflorus* cepa Gaisnville, *B. araceliae*, *Filinia novaezealandiae*, *B. calyciflorus* cepa Isla San Marcos, *B. calyciflorus* cepa Parque México. lo cual incluso para posteriores estudios de detección de metalotioneínas se podrían analizar la presencia de isoformas de MT en rotíferos, ya que con pequeñas diferencias en su estructura primaria, aunque suficientes para diferenciarlas en términos de carga total de proteína, serían una indicación de polimorfismo genético. Y una respuesta a las variaciones toxicológicas para el mismo metal en especies del mismo género y diferentes géneros.

El estudio de los FBC a plomo, y su distribución y patrones de distribución en el rotífero por análisis de fluorescencia. Indican que los FBC son más altos en etapas reproductivas y la principal vía de entrada de plomo al rotíferos es por medio de adsorción y absorción en el estómago del rotífero, y mástax. Dilucidando entonces que el plomo es controlado muy probablemente por las metalotioneínas y sus efectos adversos sobre la reproducción asexual y sexual son consecuencia de la bioacumulación específicamente de este tóxico en tejidos reproductivos y del metabolismo energético.

En el análisis de reproducción sexual de otras cepas potenciales para probar el ensayo reproductivo crónico (4 días), se logro observar y se reporta por primera vez, en un rotífero del genero *Cephalodella*, la hembra de *C. catellina* mata al macho al terminar de ser copulada, incluso se comporta agresivamente con otras hembras de su especie y con los huevos asexuales y sexuales. Por lo cual se sugiere ampliar el estudio de la reproducción sexual en otras especies de rotíferos potenciales para ensayos de toxicología.

Nuestro ensayo de reproducción crónico a 4 días es una herramienta para evaluar el efecto de disruptores endocrinos, siempre y cuando se consideren las variables de producción de hembras, machos, hembras con huevos asexuales y sexuales, así como producción de huevos asexuales y sexuales. También el modelo puede ser empleado para estudios histopatológicos, bioquímicos y genéticos en rotíferos para cada etapa del ciclo de vida asexual y sexual.

Se abre una línea de estudio en rotíferos relacionada con efectos endocrinos para evaluar fenómenos de infertilidad relacionada con herencia transgeneracional inducida por efectos epigenéticos por tóxicos como el vinclozolin, u otros disruptores endocrinos.

9. Bibliografía

- Alvarado-Flores, J. 2010. 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. Tesis. Maestría en Ciencias Área Toxicología. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.
- Alvarado-Flores, J., Montoya-García, M. Del R., Ventura Juárez, J., y 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.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., and Rainbow, P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers". *Aquatic Toxicology.* 76: 160-202.
- Anway, M.D., Memon M.A., Uzumcu, M., and Skinner, M.K. 2006. Transgenerational effect of the endocrine disruptor vinclozolin on male spermatogenesis. *J Androl.* 27: 868 - 79.
- APHA. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edn. Washington, DC.
- ATSDR, 2003. <http://www.atsdr.cdc.gov/cxcx3.html>.
- Babula, P., Adam, V., Opatrivola R., Zehnalek J., Havel, L., Kizek R. 2008. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: A review. *Environ. Chem. Lett.* 6: 189 - 213.
- Birky, C.W., and Gilbert J.J. 1971. Parthenogenesis in rotiferis: the control of sexual and asexual reproduction. *American Society of Zoologists.* 11: 245 – 266.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Bryan, G. W., Waldichuk, M., Penteach, R.J., and Darracott, A. 1979. Bioaccumulation of marine pollutants (and Discussion). Phil. Trans. R. Soc. Lond. 286: 483-505.
 - Carrasco-Troncoso, J. 2000. Regulación de las metalotioneínas durante el estrés y la inflamación, y su influencia durante la respuesta inflamatoria. Tesis. Universidad de Barcelona.
 - Clement, T.M., Savenkova, M., Settles, M., Lucker, B., and Skinner, M.K. 2010. Alterations in the developing testis transcriptome following embryonic vinclozolin exposure. Reproductive Toxicology. 30: 353-364.
 - Dahms, H. U., Hagiwara A., and Lee, J-S. 2011. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. Aquat. Toxicol. 1: 1-12.
 - Di Fiore, M.M., Perrone, L., D'Aniello, A. 1997. Presence of humanlike thyroid stimulating hormone (TSH) in *Ciona intestinalis*. Life Sci. 61:623-629.
 - Durham, T.R. and Snow E.T. 2006. Metal ions and carcinogenesis, Cancer: Birkhäuser Verlag/Switzerland. 97-130 pp.
 - Eriksen, K.K., Hauser F., Schiøtt M., Pederson K-M., Sondergaard L., Grimmelikhuijzen C.J.P. 2000. Molecular cloning, genomic organization, developmental regulation, and a knock-out mutant of a novel leu-rich repeats-containing G protein-coupled receptor (DLGR-2) from *Drosophila melanogaster*. Genome Res. 10:924-938.
 - Evans, T.J. 2007. Reproductive toxicity and endocrine disruption. In Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles (ed RC Gupta). Ed. New York: Elsevier: Academic Press. 206-244 pp.
 - Evans, T.J. 2011. Endocrine disruptors. Chapter 67. Reprod Dev Toxicol.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- 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.
 - 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.
 - Gallardo, G. W., A. Hagiwara., Y. Tomita., K. Soyano y W. T. Snell. 1997. Effect of some vertebrates and invertebrate hormones on the population growth, mictic female production, and body size of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* Müller. Hydrobiologia. 358: 113-120.
 - Gallardo, W.G., Hagiwara, A., Tomita, Y., y T. W Snell. 1999. Effect of growth hormone and gaba-aminobutyric acid on *Brachionus plicatilis* (Rotifera) reproduction at low food or high ammonia levels. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 240: 179-191.
 - Gallardo, W.G., Hagiwara, A., y T. W Snell. 2000. Effect of juvenile hormone and serotonin (5HT) on mixis induction of the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 252: 97-107.
 - Gallardo, W.G., Tomita, Y., Hagiwara, A., Soyano, K., y T. W. Snell. 1997. Effect of dimethylsulfoxide (DMSO), sodium hydroxide (NaOH), acetone, and ethanol on the population growth, mictic female production, and body size of the rotifer *Brachionus plicatilis* Müller. Bull.Fac.Fish.,Nagasaki University.15-22.
 - 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.
 - Garza-León, C.V. 2010. Evaluación de la presencia de medicamentos como contaminantes de agua. Tesis. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes. México.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Gilbert, J.J., and Schröder, T. 2004. Rotifers from diapausing, fertilized eggs: unique features and emergence. *Limnol. Oceanogr.* 49: 1341-1354.
 - 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.
 - Gómez-Gómez, A. 1996. Ecología genética y sistemas de reconocimiento de pareja en poblaciones simpátricas de rotíferos. Tesis. Universitat de València. 226 pp.
 - Graham, J.D., Clarke C.L. 1997. Physiological action of progesterone in target tissue. *Endocr Rev.*18: 502-519.
 - Gray, L., and Furr, J. 2008. Vinclozolin treatment induces reproductive malformations and infertility in male rats when administered during sexual but not gonadal differentiation; however, the effects are not transmitted to the subsequent generations. *Biology of Reproduction.* 735: 227 – 228.
 - Hauser, F., Nothacker H.P., Grimmelikhuijzen C.J. 1997. Molecular cloning, genomic organization, and developmental regulation of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to members of the thyroid stimulating hormone, folliclestimulating hormone, luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor family from mammals. *J Biol Chem.* 272:1002-1010.
 - He, L., Poblenz, A.T., 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.
 - Heinz-R, K., and Triebkorn, R. 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the populations level and beyond? Review. *Science.* 341: 759-765.
 - Heyland, A., Hodin, J., and Reitzel, A.M. 2004. Hormone signaling in evolution and development: a non-model system approach. *BioEssays.* 27:64-75.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Hutchinson, T. H. 2007. Smalls useful in endocrine disrupter assessment- four key recommendations for aquatic invertebrates research. *Ecotoxicology*. 16: 231-238.
 - Iavicoli, I., Fontana, L., and Bergamaschi, A. 2009. The effects of metals as endocrine disruptors. *Journal of toxicology and environmental health, Part B: critical reviews*. 12: 206-223.
 - Janssen, C.R., Ferrando M.D., Persoone, G. 1994. Ecotoxicological studies with the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* IV. Rotifer behavior as a sensitive and rapid sublethal test criterion. *Ecotoxicol Environ Saf* 28:244-255.
 - Kägi, J.H.R., and Kojima, Y. 1987. Chemistry and Biochemistry of metallothionein. *Metallothionein II*. Birkhäuser Verlag, Basel.
 - Kawauchi, H., and Sower S.A. 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *General and Comparative Endocrinology*. 148: 3-14.
 - Kiparissis, Y., Metcalfe T.L., Balch G.C., Metcalfe C.D. 2003. Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol*. 63: 391-403.
 - Klaassen, C.D., Liu, J., and Choudhuri, S. 1999. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 39: 267-294.
 - Kotikova, E. A., O. I., Raikova, M. Reuter and M. K. S. Gustafsson. 2005. Rotifer nervous system visualized by FMRF amide and %-HT immunocytochemistry and confocal laser scanning microscopy. *Hydrobiologia* 546: 239-248.
 - Kotikova, E.A. 1995. Localization and neuroanatomy of catecholaminergic neurons in some rotifers species. *Hydrobiologia* 313/314. 123-127.
 - Kotikova, E.A. 1998. Catecholaminergic and neuroanatomy of rotifers. *Hydrobiologia*. 387/388: 135-140.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- 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 Zoológica*. 82: 1-9.
 - Kudo, M., Chen T., Nakabayashi K., Hsu S.Y., Hsueh A.J. 2000. The nematode leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptor (LGR) protein homologous to vertebrate gonadotropin and thyrotropin receptors is constitutively active in mammalian cells. *Mol Endocrinol*. 14:272-284.
 - Leonard, S.S., Bower J.J, and Shi X. 2004. Metal induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 255: 3-10.
 - Liu, B., Wakuri, H., and Mutoh, K. 1995. Immunocytochemical evidence for the presence of prolactin in the plerocercoid of *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea). *Okajimas folia Anat. Jpn*. 72: 277-283.
 - Lv, L., Snell T.W., Yang J., Li S., Zhu W. 2010. Effect of fenitrothion on life history parameters of the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *J Freshwater Ecol*.25: 589-598.
 - Mesa-Cornejo, V.M., Barros-Nuñez P., y Medina-Lozano C. 2006. Metilación del ADN: marcador diagnostico y pronostico de cáncer. *Gac. Méd. Méx*. 142: 81-82.
 - Min Choi, S., Dong Yoo, S., and Mu Lee, B. 2010. Toxicological characteristics of endocrine-disrupting chemical: developmental, toxicity, carcinogenicity, and mutagenicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*. 7: 1-23.
 - Molina-Molina J.M., Hillenweck A., Jouanin I., Zalko D., Cravedi J-P., Fernández M-F., Pillon A., Nicolas J-C., Olea N., Balaguer P. 2006. Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Tox Appl Pharma*. 216: 44-54.
 - Nelson, S.M., Roline, R.A. 1998. Evaluation of the sensitivity of rapid toxicity tests relative to Daphnid acute lethality tests. *Bull Environ Contam Toxicol* 60:292-299.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Nichols, H.W. 1973. Growth media-freshwater. In J. R. Stein (ed.), —Handbook of physiological methods. Cambridge University Press. 7-24.
 - Nogrady, T. and Alai, M. 1983. Cholinergic neurotransmission in rotifers. *Hidrobiología* 104: 149-153.
 - O'Neil, M.J., Smith A., and Heckelman P.E. 2001. In: Merck index tenth ed. N. J. Merck & Co., Inc., Rahway.
 - Oehlmann, J., and Schulte-Oehlmann, U. 2003. Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl. Chem.* 75: 2207-2218.
 - 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.
 - Pérez-Legaspi, I. A., M. R. Montoya-García, J. L. Quintanar, E. Salinas, and Rico-Martínez R. 2008. Identification of exocytotic membrane proteins in three rotifer species. *Hydrobiologia* 600: 147-154.
 - Pérez-Legaspi, I.A., and Rico-Martínez R. 1998. Effect of temperature and food concentration in two species of littoral rotifers. *Hydrobiologia*. 387/388: 341-348.
 - Pinder, L.C.V., T.G. Pottinger, Z. Billinghamurst & M.H. Depledge. 1999. R&D Technical Report E67. Endocrine function in aquatic invertebrates and evidence for disruption by environmental pollutants. Environment Agency Rio House. Bristol, United Kingdom.
 - Pineda, Rosas. A., Santos-Medrano, G.E., Zavala-Reynoso, M.F., and Rico-Martínez, R. 2005. Identification of acetylcholinesterase receptors in Rotifera. *Hidrobiologia*. 546: 249-253.
 - Pourriot, R., y W. T. Snell. 1983. Resting eggs in rotifers. *Hidrobiología* 104: 213-224.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Pray, F.A. 1965. Studies of the early development of the rotifer *Monostyla cornuta* Müller. Transaction of the American Microscopical Society 84: 210-216.
 - Preston, B. L., Snell, T. W., Robertson, T. L., and Dingmann, B.J. 2000. Use of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* in screening assay for potential endocrine disruptors. Environmental toxicology and chemistry. 19: 2923-2928.
 - Quintanar, J,L, Salinas, E., and González, R. 2007. Expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in cerebral cortical neurons of embryos and adult rats. Neurosci Lett 411: 22-25.
 - Quintanar, J.L., and Salinas, E. 2002. Effect of hypothyroidism on synaptosomal-associated protein of 25 kDa and syntaxin-1 expression in adenohypophyses of rat. Journal Endocrinology Investigation. 25: 754-758.
 - Raineri, M. 1984. Histochemical investigation of Rotifera Bdelloidea. I. Localization of cholinesterase activity. The Histochemical Journal 16: 601-616.
 - Rico-Martínez, R., and Snell, T.W. 1997. Mating behavior in eighth rotifer species: using cross-mating test to study species boundaries. Hidrobiologia 1997; 356: 165-173.
 - Rico-Martínez, R., Perez-Legaspi, I.A., Arias-Almeida J.C., and Santos Medrano G.E. 2011. Rotifers in ecotoxicology. En Blaisse y Ferrad. Encyclopedia of Aquatic Toxicology.
 - Rubio, I.F. 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.
 - Sanin, L.H., y González-Cossio, T. 1998. Acumulación de Plomo en Hueso y sus Efectos en la Salud. Boletín de Salud Pública 40:359-368.

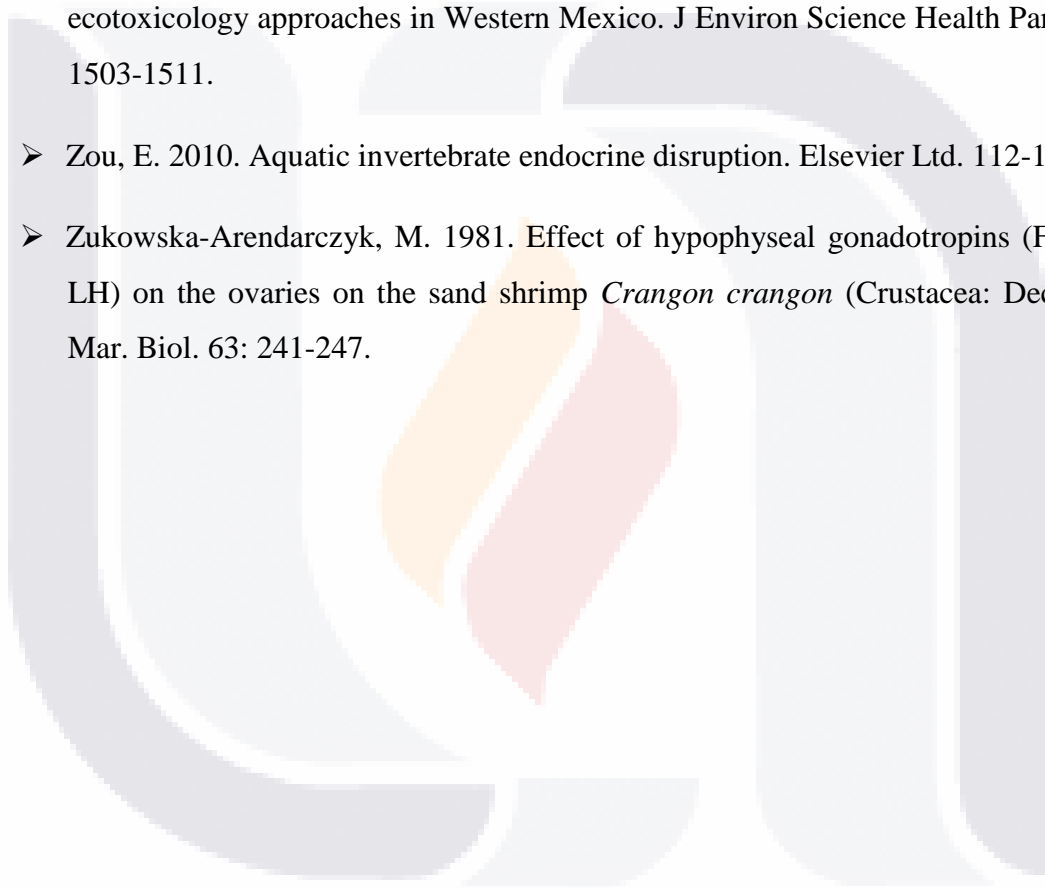
- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Santos, García, A., Abad Hernandez, M.M., Fonseca Sanchez, E., Cruz Hernandez, J.J., y Sopelana, A.B. 2005. Expresión proteica de p53 y proliferación celular en leucoplasias orales. *Med Oral Patol Cir Bucal*. 10: 1-8.
 - Schmid, K.P., Maier, V., Haug, C., PfeiVer, E.F., 1990. Ultrastructural localization of prolactin-like antigenic determinants in neurosecretory cells in the brain of the honeybee (*Apis mellica*). *Hormone and Metabolism Research* 22, 413–417.
 - Schneider, S., Kaufmann, W., Buesen, R.V., and Ravenzwaay, B. 2008. Vinclozolin-the lack of a transgenerational effect after oral maternal exposure during organogenesis. *Reproductive Toxicology*. 25: 352-360.
 - Simkiss, K. 1998. Mechanisms of metal uptake. In: *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Langston, W.J. y M. J Bebianno. (Ed). Chapman & Hall, London.
 - Skinner, M.K., Manikkam, M., and Guerrero-Bosagna, C. 2011. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reprod Toxicol*. 31: 337-343.
 - Snell, T. W., and Joaquim-Justo, C. 2007. Workshop on rotifers in ecotoxicology. *Hydrobiologia*. 593:227-232.
 - Snell, T.W., and Moffat, B.D. 1992. A 2-d life cycle test with the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Environ Toxicol Chem*. 11:1249-1557.
 - Snell, T.W., y N. J. D. DesRosiers. 2008. Effect of progesterone on sexual reproduction of *Brachionus manjavacas* (Rotifera). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*. 363: 104-109.
 - Stebbing, A.R.D. 1982. Hormesis: the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci Total Environ*. 22: 213-234.
 - Stout, E.P., La Clair, J.J., Snell, T.W., Shearer, T.L., and Kubanek, J. 2010. Conservation of progesterone hormone function in invertebrate reproduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107: 11859-64.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Stout, E.P., La Clair, J.J., Snell, T.W., Shearer, T.L., Kubanek, J. 2010. Conservation of progesterone hormone function in invertebrate reproduction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 107(26): 11859-64.
 - Strozynska, 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.
 - Sugumar, V., and Munuswamy, N. 2006. Induction of population growth, mictic female production and resting eggs formation by treatment of GnRh analogue in the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. Aquaculture. 258: 529 – 534.
 - Swinnen, K., Broeck, J.V., Verhaert, P., and De Loof, A. 1990. Immunocytochemical localization of human growth and prolactin-like antigenic determinants in the insects, *Locusta migratoria* and *Sarcophaga bullata*. Comp. Biochem. Physiol. 95: 373-378.
 - Swinnen, K., Broeck, J.V., Verhaert, P., De Loof, A., 1990. Immunocytochemical localization of human growth and prolactin-like antigenic determinants in the insects, *Locusta migratoria* and *Sarcophaga bullata*. Comparative Biochemistry and Physiology. 95: 373–378.
 - Tensen, C.P., Van Kasteren, E.R., Planta, R.J., Cox, K.J., Burke, J.F., Heerikhuizen, H.V., and Vreugdenhil, E.1994. A G protein-coupled receptor with low density lipoprotein-binding motifs suggests a role for lipoproteins in G-linked signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A 91:4816-4820.
 - Terakado, K., M. Ogawa, K. Inoue, K. Yamamoto, and S. Kikuyama. 1997. Prolactin-like immunoreactivity in the granules of neural complex cells in the ascidian *Halocynthia roretzy*. Cell tissue Research 289: 63-71.
 - Ureña-Robles, R. 2007. Metalotioneinas en peces y gasterópodos: su aplicación en la evaluación de la contaminación. Tesis. Universitat de Valencia.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- USEPA, 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.
 - USEPA, 2000. Reregistration Eligibility Decision for Vinclozolin. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, USA.
 - USEPA, 2003. Vinclozolin: notice of filing a pesticide petition to establish a tolerance for a certain pesticide chemical in or on food. Fed Regis. 68:14628-14635.
 - USEPA, 2011. The Incorporation of In Silico Models and In Vitro High Throughput Assays in the Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) for Prioritization and Screening.
 - Vandergehuchte, M.B., Lemière, F., Vanhaecke, L., Berghe, W.V., and Janssen, C.R. 2010. Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemical with a known effect on DNA methylation. *Com Biochem Physiol, Part C*. 151: 218-285.
 - Vega-Loyo, L. 2009. Mecanismos moleculares de los efectos biológicos del arsénico. *Mensaje Bioquímico*. 33: 49-60.
 - Vijayan, E. 1985. Role of neurotransmitter and neuropeptides in the control of gonadotropin release: A review. *Biosciences Journal* 2: 207-213.
 - Wheeler, E.D., and Nijhout, H.F. 2003. A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system. *BioEssays* 25: 994-1001.
 - Wigham, T., Ball, J.N., and Ingleton, P.M. 1975. Secretion of prolactin and growth hormone by teleost pituitaries in vitro. *J. Comp. Physiol*. 104: 87-96.
 - Wigham, T., J.N. Ball & P.M. Ingleton. 1975. Secretion of prolactin and growth hormone by teleost pituitaries in vitro. *J. Comp. Physiol*. 104: 87-96.
 - Wilhelm, M., A. Koza, P. Engelmann, P. Németh & Csoknya M. 2006. Evidence for the presence of thyroid-stimulating hormone, thyroglobulin and their receptors in

Eisenia fetida: a multilevel hormonal interface between the nervous system and the peripheral tissues. Cell. Tissue. Res. 324: 535-546.

- Yang, J., and T. W. Snell. 2010. Effects of progesterone, testosterone and estrogen on sexual reproduction of the rotifer *Brachionus calyciflorus*. Internat. Rev. Hydrobiol. 95: 441-449.
- Zavala-Aguirre, J.L., Torres-Bugarin, O., and Zamora-Perez, A.L. 2007. Aquatic ecotoxicology approaches in Western Mexico. J Environ Science Health Part A. 42: 1503-1511.
- Zou, E. 2010. Aquatic invertebrate endocrine disruption. Elsevier Ltd. 112-123 pp.
- Zukowska-Arendarczyk, M. 1981. Effect of hypophyseal gonadotropins (FSH and LH) on the ovaries on the sand shrimp *Crangon crangon* (Crustacea: Decapoda). Mar. Biol. 63: 241-247.



10. ANEXO.

1. Publicación de un artículo derivado del trabajo de tesis.

2. Fotografías de fluorescencia al plomo.



1. Publicación de un artículo derivado del trabajo de tesis.

Artículo y Carta de Aceptación.

Aquatic Toxicology 109 (2012) 127–132



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox



Bioconcentration and localization of lead in the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas 1677 (Rotifera: Monogononta)

Jesús Alvarado-Flores^{a,*}, Roberto Rico-Martínez^a, Javier Ventura-Juárez^b, Marcelo Silva-Briano^c, Isidoro Rubio-Franchini^d

^a Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Química, Avenida Universidad 940, Aguascalientes, Ags., CP-20131, Mexico

^b Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Morfología, Avenida Universidad 940, Aguascalientes, Ags., CP-20131, Mexico

^c Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Biología, Avenida Universidad 940, Aguascalientes, Ags., CP-20131, Mexico

^d Instituto de Servicios de Salud del Estado de Aguascalientes, Laboratorio Estatal de Salud Pública, Av. Siglo XXI #105, Ciudad Satélite Morelos, C.P. 20270, Aguascalientes, Ags., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2011

Received in revised form 7 December 2011

Accepted 8 December 2011

Keywords:

Metal accumulation

Bioconcentration factor

Energy-dispersive X-ray microanalysis

Invertebrate toxicity

ABSTRACT

We studied how lead is bioconcentrated and distributed in the rotifer *Brachionus calyciflorus* using metal histochemistry to locate lead granules, Leadmium Green[®] analysis to establish the route of uptake, atomic absorption to determined the bioconcentration factor (BCF), and detected the presence of microelements in the cuticle by X-ray microanalysis with scanning electron microscopy. Our results indicate: (a) the digestive system is the main route of lead uptake in the rotifer *B. calyciflorus*, (b) after 24-h lead is deposited in granules in the mastax and vitellarium, (c) our energy-dispersive X-ray microanalysis indicates decalcification taking place in the cuticle of the rotifer after a 24-h lead exposure, and (d) we determined a BCF= 115 for lead after a 24 h exposure. However, the route of mobilization and storage of intracellular lead are still not fully understood in *B. calyciflorus*.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rotifers are one of the most important components of freshwater biota and play an important role in aquatic ecosystems. They are widely distributed, commonly occurring in densities up to 1000 individuals per liter, and are important filter-feeders on algae and bacteria. Their ubiquity and abundance explain their standing as one of the three main groups of freshwater zooplankton in limnological studies, together with the Cladocera (Anomopoda) and Copepoda. Rotifers are used in aquaculture (Segers, 2008) and as model organisms to assess toxicity showing reproducible biological responses (Dhams et al., 2011).

Lead is a nonessential metal, ubiquitous and detectable in all compartments of the environment, and has been listed by the U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) as one of the 129 priority contaminants; number two in the 2003 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) top 20 hazardous substances list (ATSDR, 2005). Lead occurs in the environment as a consequence of both natural and anthropogenic processes with mining and smelting, coal burning, cement manufacture, and use

in gasoline contributing most to lead contamination of aquatic environments. Reports of lead toxicity evaluated by mortality are plentiful, but there are few reports on physiological and biochemical chronic effects, especially in freshwater invertebrates (Grosell et al., 2006). The mechanism of lead toxicity is by replacing polyvalent cations (Ca and Zn) within cells. This replacement allows interactions with the compounds that coordinate binding of multivalent cations affecting survivorship, growth, learning, reproduction, development, and metabolism (Irwin et al., 1997; Garza et al., 2005).

Rubio-Franchini and Rico-Martínez (2011) confirmed that lead can be biomagnified when the top predators are invertebrates. They found that the rotifer *Asplanchna brightwellii* that feeding on lead exposed *Moina* had 13.31 times more lead than *Asplanchna* just exposed 48 h to lead in water; the initial bioconcentration factor (BCF) was 490. Only three other reports about BCF in rotifers exist: (a) in *B. calyciflorus* for selenium (Dobbs et al., 1996), (b) in the same species for polychlorinated biphenyls (PCBs) (Joaquim-Justo et al., 1995), and (c) in *B. plicatilis* for mono-, di- and tributyltin (Hong-Wen et al., 2001).

Bioaccumulation in aquatic biota is typically expressed by the ratios of chemical concentrations in body tissue in relation to exposure concentration of the chemical. These bioconcentration factors (BCF) are often highly variable in among organisms (De Forest et al., 2007). The degree of bioaccumulation of a metal is the result of balance between input rate and the rate of elimination. Bioaccumulation occurs primarily due to the inability to excrete necessary

* Corresponding author. Tel.: +52 4491788987.

E-mail addresses: jalvallo@hotmail.com (J. Alvarado-Flores), rrico@correo.uaa.mx (R. Rico-Martínez), jventura@correo.uaa.mx (J. Ventura-Juárez), msilva@correo.uaa.mx (M. Silva-Briano), rubio_reyes@hotmail.com (I. Rubio-Franchini).

Editor Decision - Accept with minor revision.

24/11/2011

Ron Tjeerdema

Ms. Ref. No.: AQTOX-D-11-00447R2

Title: Bioconcentration and localization of lead in the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas 1677 (Rotifera: Monogononta)

Aquatic Toxicology

Dear Mr Alvarado-Flores,

I am pleased to inform you that your paper "Bioconcentration and localization of lead in the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas 1677 (Rotifera: Monogononta)" can be accepted for publication in *Aquatic Toxicology* pending minor revision.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Please proceed to the following link to update your personal classifications and keywords, if necessary:

<http://ees.elsevier.com/aqtox/1.asp?i=29466&l=XW9DDC28>

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Ron Tjeerdema

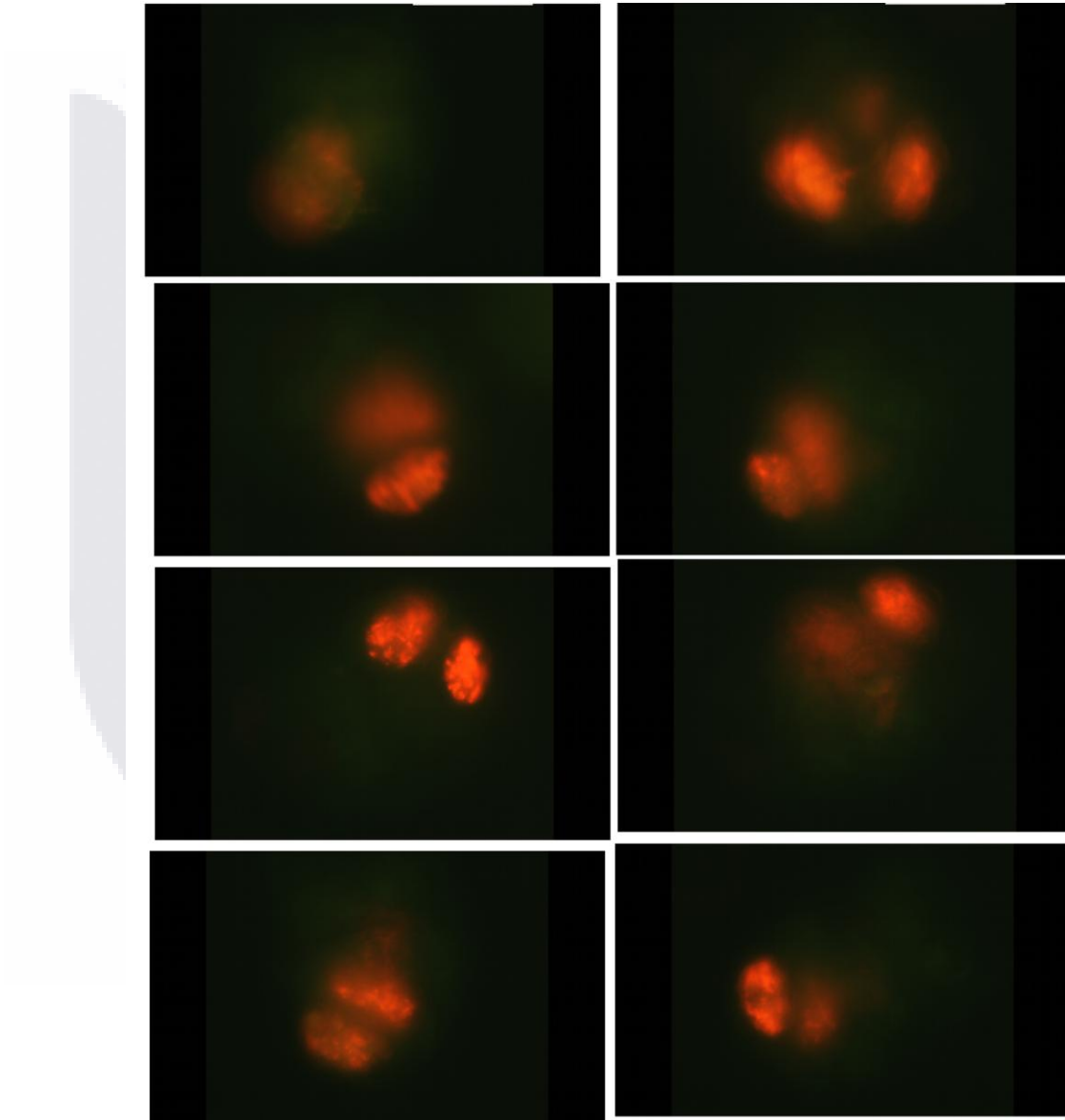
Co Editor-in-Chief

Aquatic Toxicology

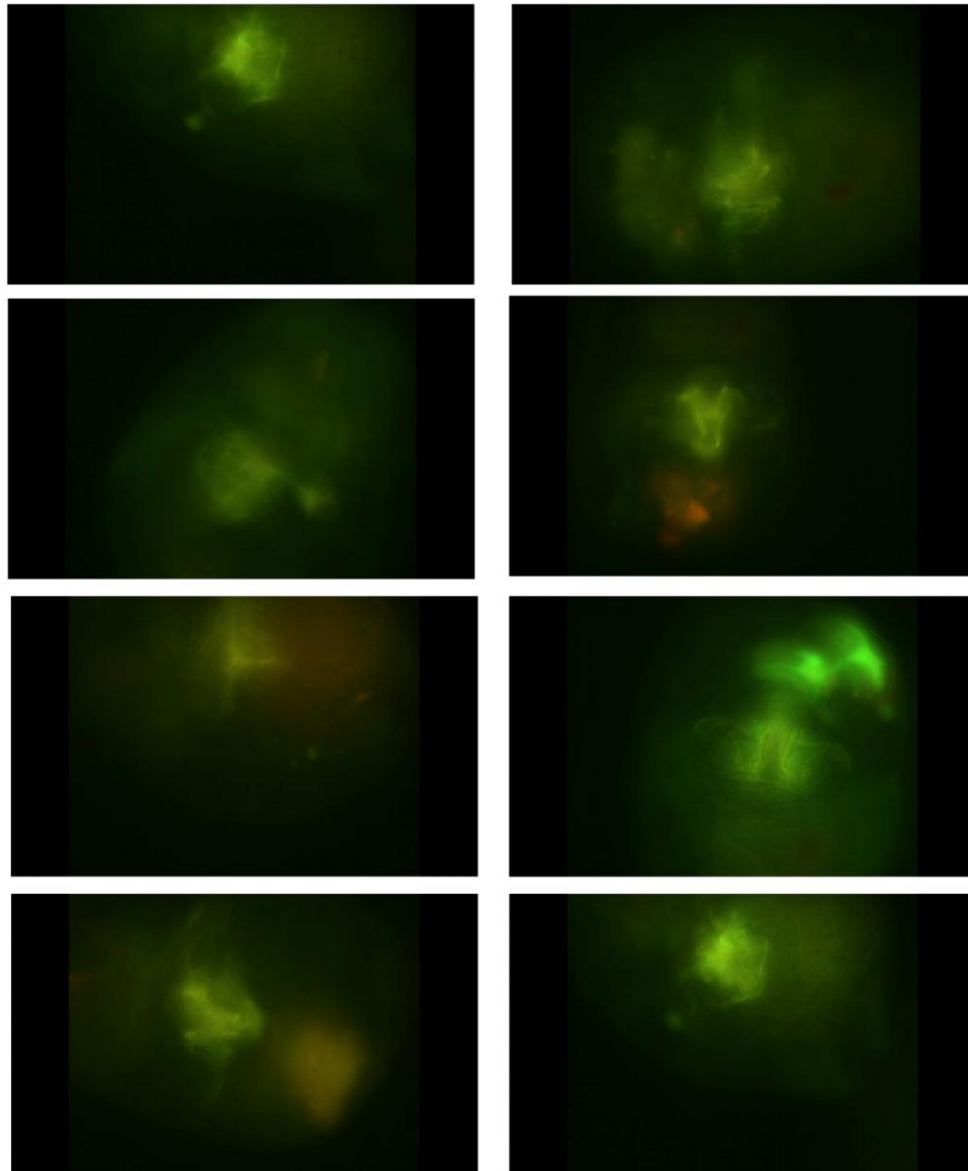
2. Fotografías de fluorescencia al plomo.

Fotografías obtenidas para el análisis de patrón de fluorescencia al plomo, en el rotífero *Brachionus calyciflorus*.

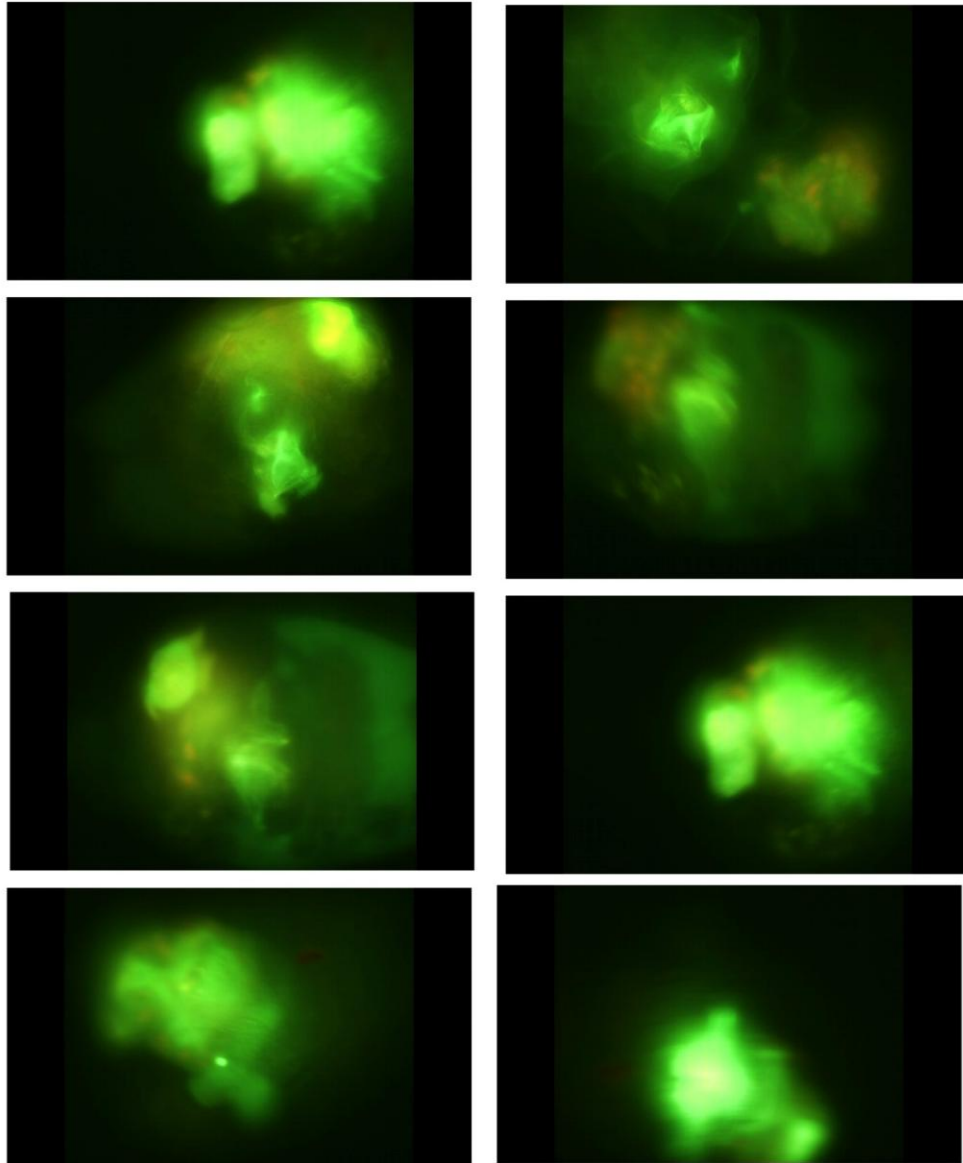
- 1) Fotografías control de neonatos <12 horas de nacidos.



- 2) Fotografías tomadas a las 2 horas de exposición con plomo (1.0 mg/L) con el microscopio de fluorescencia.



- 3) Fotografías tomadas a las 12 horas de exposición con plomo (1.0 mg/L) con el microscopio de fluorescencia.



- 4) Fotografías tomadas a las 18 horas de exposición con plomo (1.0 mg/L) con el microscopio de fluorescencia.

