



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efecto de dialil trisulfuro sobre alteraciones del
desarrollo poblacional y expresión genética inducidas
por UVB en *Daphnia magna*

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO (A) EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Sofia Angélica García Vargas

DIRECTOR DE TESIS: Dra. Laura Morales Lara

CO-DIRECTOR DE TESIS: Dr. Vladimir Serkin

Febrero 2020



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me han brindado su ayuda, conocimientos, paciencia y apoyo. Quiero agradecerles a todos ellos cuanto han hecho por mí, para que este trabajo saliera adelante.

Quedo especialmente agradecida con mis dos directores de tesis. Gracias a la Dra. Laura Morales Lara quien me ha ayudado y apoyado en todo momento, ha corregido minuciosamente este trabajo y me ha dado la posibilidad de mejorarlo, tengo que agradecerle sus comentarios, direcciones, sugerencias y correcciones. A el Dr. Vladimir Serkin, por su gran calidad científica y humana, abriéndome las puertas de este maravilloso equipo de trabajo.

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Ricardo Darío Peña Moreno por contestar todas mi dudas y cuestiones a través de sus comentarios científicos, así como el ofrecerme su apoyo en todo momento. Las conversaciones que he mantenido con él han sido de gran ayuda en todo mi trabajo. Así mismo quiero agradecer al Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes por su tiempo, paciencia y contribuciones muy valiosas para este trabajo.

Les agradezco sinceramente a todos por su confianza, consejos y ayuda, gracias a ellos he participado en congresos, cursos y capítulos de libros. Agradezco a mis compañeros de laboratorio Viridiana Josefina, Yessica Alejandra y a Gustavo Garita por su compañía incondicional y amistad.

También quiero expresar mis agradecimientos a toda mi familia en especial a mi madre Evelyn Vargas Vizuet a mis tíos Luis Vargas Vizuet y Noe Julio Vargas Vizuet; así mismo también quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi novio Luis Javier Acuña Guzmán el cual me alentó a seguir trabajando y a no desanimarme ante una situación complicada.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mi madre Evelyn Vargas Vizuet ya que sin su amor, dedicación y comprensión definitivamente no estaría aquí, así mismo como el apoyo de mis tíos y también padres Noe Julio Vargas Vizuet y Luis Vargas Vizuet quienes siempre me apoyaron tanto sentimental como financieramente

INDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Daños de la radiación UV en ecosistemas acuáticos.....	3
2.2 DATS: Compuesto organosulfurado de origen fitoquímico.....	4
2.2.1. Efectos de DATS en modelos de estudio.....	4
2.3 <i>D. magna</i>: modelo ecotoxicológico de estudios de impacto ambiental	6
2.4 Efectos de UVB en <i>D. magna</i>.....	7
2.5 Expresión genética en <i>D. magna</i> incidida con UVB	7
2.6 Modelo de Gompertz.....	8
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
4. JUSTIFICACIÓN.....	9
5. OBJETIVOS.....	10
5.1 Objetivo General.....	10
5.2 Objetivos específicos	10
6. MARCO CONCEPTUAL.....	10
6.1 <i>D. magna</i> como modelo de estudio de dinámica poblacional.....	10
6.2 Letalidad de UVB en <i>D. magna</i>.....	11
6.3 Evaluación de DATS en el modelo ecotoxicológico <i>Danio rerio</i>.....	11
6.4 Papel que desempeña proteína de choque térmico de 70 kDa en el daño ocasionado por ROS.....	12
6.5 Función de superóxido dismutasa en la detoxificación celular	12
7. HIPÓTESIS.....	13
8. DIAGRAMA DE TRABAJO	13
9. DISEÑO METODOLÓGICO Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN	13

9.1 Desarrollo de cultivos de organismos de <i>D. magna</i>	14
9.2 Desarrollo de los grupos experimentales	14
9.3 Evaluación de la dinámica poblacional	15
9.3.1 Construcción del modelo matemático	15
9.4 Evaluación de la expresión genética	15
9.4.1 Extracción de RNA	16
9.4.2 Obtención de cDNA.....	16
9.4.3 Diseño de oligonucleótidos	16
9.4.4 PCR punto final	17
9.4.5 PCR tiempo real.....	17
9.5. Correlación de datos	18
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	18
10.1 Evaluación del efecto de DATS en <i>D. magna</i> ante la exposición UVB.....	18
10.1.1 Susceptibilidad de <i>D. magna</i> a DATS.....	18
10.1.2 Efectos tóxicos inducidos en <i>D. magna</i> por radiación UV-B	20
10.2 Radiación UVB en Puebla verano 2019	20
10.3 Evaluación de los efectos del tratamiento de DATS sobre una población de <i>D. magna</i> incidida con radiación UVB.....	22
10.4. Modelo matemático del desarrollo poblacional en <i>D. magna</i> para la evaluación de los efectos de DATS sobre una población irradiada con UVB.....	29
10.5. Expresión aguda de <i>SOD</i> y <i>HSP70</i> inducida por el efecto de DATS sobre <i>D. magna</i> incidida con UVB	33
11.CONCLUSIONES	38
12. BIBLIOGRAFÍA.....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de síntesis de compuestos organosulfurados (COS) en vegetales <i>Allium</i>	5
Figura 2. Diagrama de trabajo para el desarrollo de la investigación.....	13
Figura 3. Curva de supervivencia de dafnidos adultos expuestos a DATS	19
Figura 4 Curva dosis-respuesta de dafnidos expuestos a DATS a las 48 h	19
Figura 5. Radiación UVB más elevada registrada en la Ciudad de Puebla en verano 2019	21
Figura 6 Efecto de DATS en <i>D. magna</i> incidida con UVB, sobre el primer día de reproducción	24
Figura 7. Efecto de DATS en <i>D. magna</i> incidida con UVB, sobre la reproducción total de neonatos	25
Figura 8. Efecto de DATS en <i>D. magna</i> incidida con UVB, sobre la fertilidad Promedio de neonatos expulsados por adulto fértil, durante el estudio de evaluación del desarrollo poblacional	25
Figura 9. Efecto de DATS en <i>D. magna</i> incidida con UVB sobre la natalidad	26
Figura 10. Efecto de DATS en <i>D. magna</i> incidida con UVB, sobre la tasa bruta de natalidad y mortalidad	27
Figura 11. Efecto de DATS en <i>D. magna</i> incidida con UVB sobre la esperanza de vida.....	28
Figura 12. Efecto de DATS en <i>D. magna</i> incidida con UVB sobre la distribución de las poblaciones	30
Figura 13. Diagrama conceptual de las pruebas realizadas con radiación UVB y/o DATS en <i>D. magna</i>	31
Figura 14. Simulación matemática de una población <i>D. magna</i> tratada con DATS posterior a su irradiación en presencia de UVB	31
Figura 15. Efecto de DATS en <i>D. magna</i> incidida con UVB sobre la expresión aguda de <i>HSP70</i> y <i>SOD</i>	35
Figura 16. Expresión relativa de <i>HSP70</i> y <i>SOD</i> en una población de <i>D. magna</i> irradiada con UVB, previo al tratamiento con DATS	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Síntesis de cDNA del mRNA de <i>D. magna</i>	16
Tabla 2. Secuencia nucleotídica de los cebadores a utilizar en la técnica de PCR tiempo real.	17
Tabla 3 Ciclos de temperatura en el termociclador	17
Tabla 4. Efecto de DATS en parámetros de historia de vida en una población de <i>D. magna</i> expuesta a radiación UVB.....	24
Tabla 5. Asociación entre parámetro de historia de vida y perfil de expresión genética de <i>SOD</i> y <i>HSP70</i> en <i>D. magna</i>	36

RESUMEN

En aguas dulces, la radiación UVB es un estresor importante que afecta negativamente a diversas especies acuáticas como fitoplancton, zooplancton, macroalgas y vertebrados, alterando su reproducción, desarrollo, tasa de fertilidad y supervivencia. En el presente trabajo estos parámetros fueron evaluados en el modelo ecotoxicológico *D. magna*, expuesto a radiación UVB de intensidad eritemática relevante con respecto a la incidencia en la Ciudad de Puebla, y post-tratamiento con el fitoquímico DATS, cuyos efectos benéficos han sido evidenciados en modelos eucariontes vertebrados sometidos a radiación UVB. Los efectos de ambos factores fisicoquímicos sobre el desarrollo poblacional monitoreado durante 25 días fueron simulados mediante un modelado matemático. Debido a la importancia de la expresión de los genes *HSP70*, *SOD* y *CAT* en la detoxificación celular, los efectos agudos del tratamiento de la población en presencia del fitoquímico fueron explorados a las 12 h de exposición. Los resultados mostraron que la radiación UVB provocó retraso para alcanzar la madurez sexual y disminución severa en el número total de neonatos, fertilidad y esperanza de vida (3 días, 50% neonatos, 34% neonatos por adultos y 50% días) respectivamente. Estos parámetros fueron aún más reducidos a la exposición de ambos factores fisicoquímicos, sin embargo, la simulación del desarrollo poblacional a través del modelo matemático mostró una recuperación lenta en *Daphnia magna* a 15 μM de DATS y radiación UVB (no así para la concentración 10 μM y 20 μM). La evaluación aguda de la expresión de *HSP70*, *SOD* y *CAT* mostró valores elevados a la concentración de 10 μM (6, 8 y 2 veces respectivamente) y 15 μM (11, 18 y 4 veces respectivamente) de DATS, aún más que en individuos únicamente expuestos a radiación UVB o UVB / post tratamiento DATS 20 μM . De acuerdo con los resultados, el tratamiento con DATS en dafnidos irradiados con UVB conducen a la población a una respuesta aguda relacionada con la detoxificación celular, con efectos crónicos sobre el desarrollo poblacional, promoviendo una disminución de la supervivencia, sin embargo, fue de gran interés identificar que aquellos que lograron sobrevivir mostraron un aumento en su reproducción, lo que influyó positivamente en su recuperación a nivel poblacional.

1. INTRODUCCIÓN

La radiación ultra-violeta UVB (315-280 nm) que incide en nuestro ecosistema presenta mayor intensidad en los últimos años, debido a la reducción del ozono estratosférico (Sander et al., 2004), afectando tanto a organismos terrestres como acuáticos. En aguas dulces, la radiación UVB es un estresor importante que afecta negativamente a diversas especies acuáticas como fitoplancton, zooplancton, macroalgas y vertebrados, alterando su productividad, reproducción, desarrollo, tasa de mutación, comportamiento y supervivencia (Kim et al., 2009). El efecto de UVB en organismos terrestres ha sido ampliamente documentado, destaca su papel en la carcinogénesis, así como en el desarrollo de procesos inflamatorios, apoptosis celular, oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos y daño al DNA, procesos relacionados con el desequilibrio del estado redox comúnmente conocido como estrés oxidativo (Bender et al., 2013).

Entre los agentes fitoquímicos organosulfurados destaca el dialiltrisulfuro (DATS), componente oleoso producido por el ajo, que ha mostrado gran capacidad para modificar directamente el estado redox de biomoléculas, generando múltiples efectos benéficos anticancerígenos, anti-proliferativos, anti-microbianos, anti-oxidantes, anti-inflamatorios y quimopreventivos mediante diversos mecanismos (Zhao y Wang, 2012; Ramírez et al., 2016), entre los que destacan la activación de la respuesta antioxidante celular, mediante cambios en la expresión genética de enzimas clave antioxidantes como superóxido dismutasa (*sod*) y la proteína de choque térmico (*hsp70*) (Filomeni et al., 2008). Estos hallazgos han sido investigados en modelos de estudio como líneas celulares y vertebrados terrestres por ejemplo el modelo murino, en los que se inducen procesos cancerosos por factores abióticos como la radiación UVB. Estos estudios han demostrado que DATS disminuye efectos dañinos inducidos por este agente físico dañino. Sin embargo, se desconoce su efecto en invertebrados acuáticos como *Daphnia magna*, organismo empleado como modelo en estudios ecotoxicológicos de impacto ambiental, gracias a su alta sensibilidad a agentes estresores químicos y/o físicos del medio ambiente, y características particulares de su estilo de vida, como su periodo de vida corto, fácil cultivo en laboratorio, naturaleza transparente y su característica reproducción partenogenética (Altshuler et al., 2011), lo que permite

evaluar cambios en características de su historia de vida a lo largo de su desarrollo poblacional, como mortalidad, supervivencia, tasas reproductivas, etc. Además, *D. magna* es un eslabón importante en la cadena alimenticia por ser un consumidor primario en agua dulce, por lo tanto, efectos perjudiciales en su desarrollo poblacional pueden alterar la integridad y calidad de la cadena trófica (Oexle et al., 2016).

Debido a que no hay evidencia documentada acerca de los beneficios del fitoquímico DATS en cladóceros, es importante identificar los efectos de este compuesto de origen natural en el desarrollo poblacional y en la expresión de genes relacionados con el daño generado por la radiación UVB en el modelo de estudio *D. magna*, invertebrado acuático sensible a este estresor físico del medio ambiente.

2. ANTECEDENTES

2.1 Daños de la radiación UV en ecosistemas acuáticos

Los ecosistemas acuáticos desempeñan un papel fundamental en el control de la estratificación térmica, la distribución vertical del plancton, gases respiratorios y nutrientes; también proporcionan servicios, que incluyen el transporte de personas y de bienes, recreación, purificación de aguas residuales municipales e industriales, generación de energía y hábitat para plantas y animales acuáticos, además de ser una fuente de alimento tanto humana como animal (Begon et al., 1990). Sin embargo, el cambio climático, el ozono y la radiación ultravioleta (UV) están alterando a estos ecosistemas. Investigaciones recientes indican que la alta intensidad de la radiación solar es perjudicial para los organismos acuáticos.

En los ecosistemas acuáticos, los productores primarios conformados por el fitoplancton presente en ecosistemas de agua dulce y marinos constituyen las bases de las intrincadas redes alimenticias, pues proveen energía a los consumidores primarios y secundarios y por lo tanto son contribuidores importantes para la producción de la dieta básica humana en forma de crustáceos, peces y mamíferos. Así, los cladóceros como *D. magna* tienen una posición clave en las cadenas alimenticias acuáticas por lo que su papel en la transmisión de energía es fundamental, una reducción significativa tanto en el fitoplancton como en el zooplancton por una mayor exposición a los rayos UV, a

consecuencia de la disminución de la capa de ozono, puede alterar directamente a la fuente de alimento humana y animal, al afectarse la producción de alimento para consumidores secundarios y terciarios (Dodson, 1995).

Dada la importancia de los ecosistemas acuáticos y su impacto en otros ecosistemas, ha sido de gran interés estudiar los efectos nocivos que puedan ser inducidos por la radiación solar ultravioleta sobre la biota acuática como resultado de sus longitudes de onda cortas y altamente energéticas, así como la capacidad de respuesta del organismo ante compuestos de origen natural que contribuyan a su recuperación.

2.2 DATS: Compuesto organosulfurado de origen fitoquímico

El ajo (*Allium sativum*) contiene una mezcla de agua, fibra, carbohidratos, proteínas y grasas, así como más de 20 vitaminas y minerales al menos 33 compuestos que contienen azufre (Olmedo, 2010). De los componentes oleosos presentes en el ajo, destacan los compuestos organosulfurados como el sulfato de alilo, el ajoeno y la cisteína S-alililo (SAC). Los compuestos más abundantes en el aceite de ajo son los sulfatos de alilo, que incluyen al sulfuro de dialilo (DAS), disulfuro de dialilo (DADS) y dialil trisulfuro (DATS), en 4.7-8%, 21.9–40% y 39–41.5% de abundancia, respectivamente (Wang et al., 2012). Todos estos compuestos organosulfurados tienen como precursor gamma-glutamil cisteína, que es hidrolizado y oxidado en aliina; la liberación mecánica de la enzima aliinasa contenida en las vacuolas del ajo convierte a la aliina en alicina que se descompone rápidamente en DAS, DADS y DATS (Fig. 1), con rendimientos de 30–100, 530–610 y 900-1100 µg/g, respectivamente (Puccinelli et al., 2017).

2.2.1. Efectos de DATS en modelos de estudio

Dialil trisulfuro (DATS) es uno de los componentes más abundantes del aceite de ajo, sus efectos benéficos son muy amplios, entre los que destacan su acción quimiopreventiva en la carcinogénesis debido a que induce la expresión de enzimas de fase II, las cuales son clave en la desintoxicación, entre estas se encuentran glutatión S-transferasas (GST), quinona reductasa, epóxido hidrolasa, glucuronosil-transferasa,

superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), que inactivan sustancias tóxicas y facilitan su excreción (Thomson y Ali, 2003; Perchellet et al., 1990).

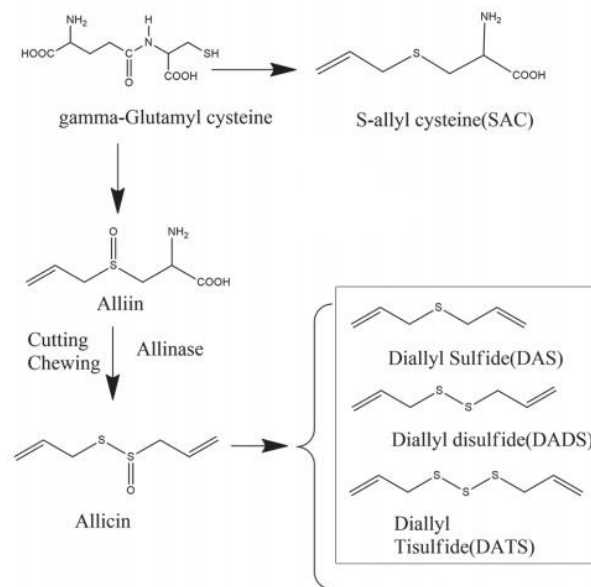


Figura 1. Vía de síntesis de compuestos organosulfurados (COS) en vegetales *Allium*. Tomado de Wang et al., 2012.

En el año 2008, Shankar et al., investigaron los efectos quimiopreventivos de dialil trisulfuro en cáncer de próstata y en metástasis pulmonar en ratones. Más adelante, en el 2010, Shrotriya et al., demostraron que en cáncer de piel inducido en modelo murino mediante tratamiento con el promotor de tumor 12-O-tetradecanoilforbol-13acetato (TPA), DATS es un potente compuesto el cual induce la expresión de la enzima de fase II, COX-2 y el factor de transcripción AP-1, involucrados en la expresión de genes de respuesta antioxidante celular.

Los efectos de DATS se han reportado en diferentes tipos de cáncer estudiados tanto en modelos murinos como en líneas celulares, así se ha evaluado sus efectos en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de vejiga, líneas celulares de glioblastoma humano (tumores astrocíticos malignos), células de cáncer de próstata humano. En estas investigaciones, se han reportados diferentes efectos tras la incubación de estas células cancerosas con DATS, destaca la activación del camino apoptótico intrínseco, por medio de la regulación de la proteína c-Jun cinasa N-terminal (Chen et al., 2004, Xiao et al., 2004, Na et al., 2012, Wu et al., 2009, Shin et al., 2014). Esta respuesta se

encuentra relacionada con la generación de especies reactivas de oxígeno, a consecuencia del estímulo pro-oxidante inducido por este fitoquímico (Filomeni et al., 2008; Puccinelli et al., 2017).

Entre otros efectos inducidos por DATS destacan la inhibición de la proliferación tumoral en cáncer de colon, disminución de la migración e invasión en cáncer de mama, inhibición del crecimiento del tumor e inducción del arresto celular tumorales en cáncer gástrico, pulmonar y glioblastoma (Navarro et al., 2007).

La química redox del dialil trisulfuro contribuye al establecimiento de condiciones pro-oxidantes en diferentes maneras que traen como consecuencia la tiolación de proteínas, disminución de los niveles de glutatión reducido (GSH) y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Adicionalmente, productos liberados por la ruptura homolítica de DATS, producen radicales tiil y pertiil, altamente reactivos, que afectan también la concentración de GSH, ya que al reaccionar con este se forman radicales aniones disulfuro y trisulfuro, respectivamente. El potencial redox elevado de estas especies permite la reducción directa del O_2 a anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y subsecuentemente peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Así también, la forma pertiil del DATS puede reaccionar con proteínas unidas a oxígeno (por ejemplo, oxi-hemoglobina), produciendo aún más ROS y radicales pertiil. Este estado pro-oxidante activa a enzimas antioxidantes como la superoxido dismutasa y catalasa. Este fenómeno permite que DATS induzca una actividad pro-oxidante poderosa que pre-acondiciona a la célula estimulándola a iniciar una fuerte respuesta antioxidante y detoxificante (Filomeni et al., 2008, Cerella et al., 2011).

2.3 D. magna: modelo ecotoxicológico de estudios de impacto ambiental

D. magna es un componente clave en la red alimenticia acuática, transfiere energía de los productores primarios, como las algas a consumidores secundarios como peces. Además, controla la abundancia de algas y calidad general del agua, por lo tanto, también es esencial para mantener las poblaciones de peces (Al-Aidaroos et al., 2015). Este cladócero ha sido ampliamente estudiado y utilizado como organismo de prueba en estudios de toxicología acuática, así como modelo en hidrobiología y ecología acuática (Asaeda & Acharya, 2000) debido a que representa de manera ideal al

zooplancton en estudios ecotoxicológicos (Dodson & Hanazato, 1995). Al ser utilizada ampliamente como un bioindicador ambiental permite determinar concentraciones letales de agentes físicos y/o químicos contaminantes del medio ambiente (Garcés, 2013, Bownik, 2019).

2.4 Efectos de UVB en *D. magna*

La radiación UVB actúa como un factor de estrés considerable que conduce a la disminución de la supervivencia de *D. magna*, así como de su capacidad de reproducción, alterando la dinámica de su población y sus interacciones con otras especies afectando, por lo tanto, la composición de la comunidad y la dinámica de su ecosistema (Fernández y Rejas, 2017). Por otro lado, los daños sub-letales de este tipo de radiación de alta intensidad, son probablemente más importantes que los efectos letales, al afectar al zooplancton de maneras más sutiles, reduciendo su condición física calidad de los huevos, la supervivencia de los individuos, mortalidad elevada y cambios de comportamiento (Al-Aidaroos et al., 2015).

2.5 Expresión genética en *D. magna* incidida con UVB

Aunque la radiación UVB representa solo un pequeño porcentaje de la radiación solar total, su alto contenido energético puede alterar directamente a diferentes biomoléculas e inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la célula. Para contrarrestar los efectos dañinos de las ROS, *D. magna* expresa varias enzimas eliminadoras de radicales libres de bajo peso molecular como: la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión. peroxidasa (Gpx). Estas enzimas funcionan en la defensa celular contra el estrés oxidativo inducido por UVB y son usadas como biomarcadores de este mismo y la modulación de su expresión varía de acuerdo a diversos factores que influyen en el efecto de la UVB incidida, entre ellos están la intensidad de la irradiación, tiempo de exposición, así como especie, edad, sexo del cladócero, incluso composición del agua donde se encuentren, oxigenación y temperatura de la misma, por mencionar algunos factores (Williamson et al., 2019).

La variación de diversos factores, por ejemplo, el aumento de la temperatura y la presencia de contaminantes puede modificar ampliamente las condiciones estresoras

inducidas por UVB en *D. magna*, promoviendo la formación de ROS, así como la expresión de proteínas de choque térmico (heat shock protein, *HSP*), estas familias de proteínas están involucradas en el plegamiento/replegamiento de proteínas, y se ha reconocido su papel como sensoras del estrés celular en diferentes organismos. Sin embargo, se conoce poco acerca de los mecanismos, niveles de umbral y tiempos de expresión de los genes *HSP* a consecuencia de la exposición a UVB en especies acuáticas (Dahms et al., 2010).

2.6 Modelo de Gompertz

El modelo de Gompertz es uno de los modelos sigmoideos utilizados con mayor frecuencia después del modelo logístico (también llamado modelo Verhulst), el cual ha sido adaptados a datos de crecimiento y otros más. El modelo de Gompertz, fue sugerido y aplicado por primera vez por Benjamin Gompertz en 1825 para describir el aumento de la tasa de mortalidad con respecto a la edad usado en industria de seguros para proyectar el riesgo de muerte. Wright en 1926 fue el primero en proponer el modelo de Gompertz para el crecimiento biológico, y el primero en aplicarlo a los datos biológicos fue probablemente Davidson en 1928 para describir el crecimiento de masa corporal en el ganado. Pronto, los investigadores comenzaron a adaptarlo para describir el crecimiento de las plantas, aves, peces y otros animales, e incluso el crecimiento tumoral y bacteriano (Tjørve y Tjørve, 2017).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La reducción en la capa de ozono ha desencadenado un incremento del 10-20 % por década en la incidencia de luz UVB sobre la superficie de la tierra, realizar estudios de su impacto en organismos acuáticos es de gran importancia debido a que evidencian el daño que genera en la dinámica poblacional de estos organismos, así como de las afectaciones potenciales en las cadenas tróficas no sólo de ecosistemas acuáticos sino también de terrestres. Por lo que es importante conocer el impacto ambiental de estos efectos perjudiciales en organismos sensibles como el modelo ecotoxicológico *D. magna*, así como identificar si moléculas de origen fitoquímico como DATS conocido por su potencial benéfico sobre el daño causado por UVB en animales terrestres,

también pudiera presentar capacidad para resarcir o atenuar el daño ocasionado sobre una población de dafnidos irradiados a una intensidad UVB similar a la incidida en la Ciudad de Puebla.

4. JUSTIFICACIÓN

La reducción en la capa de ozono ha desencadenado un incremento del 10-20 % por década en la incidencia de luz UVB sobre la superficie de la tierra, estudios de su impacto en organismos acuáticos es de gran importancia debido a que evidencian el daño que genera en la dinámica poblacional de estos organismos, así como de las afectaciones potenciales en las cadenas tróficas no sólo de ecosistemas acuáticos sino también de terrestres. Por lo que es importante estudiar el impacto ambiental de estos efectos perjudiciales en organismos sensibles como el cladócono *D. magna*, modelo ecotoxicológico, así como evaluar si un compuesto de origen natural cuyos efectos benéficos en la disminución del daño generado por UVB ampliamente documentados en modelos animales vertebrados terrestres, pueden resarcir o atenuar el daño ocasionado sobre una población de dafnidos irradiados a una intensidad de alto riesgo similar a la incidida en la Ciudad de Puebla.

La evaluación del impacto del estresor en el modelo de estudio ecotoxicológico a diferentes niveles de organización, tanto a nivel molecular mediante la evaluación de la expresión genética de proteínas de respuesta al estrés oxidante, así como en los cambios fisiológicos reproductivos y en su dinámica poblacional, en conjunto con la construcción de un modelo matemático proporcionarán un panorama para la evaluación del daño y el potencial benéfico del compuesto fitoquímico DATS. Estas investigaciones contribuirán a dimensionar el daño de este estresor en nuestros ecosistemas de agua dulce y el papel que compuestos de origen natural como DATS pueden desarrollar como agentes precondicionante.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar los efectos benéficos del fitoquímico dialil trisulfuro ante el daño ocasionado en el desarrollo poblacional y expresión genética del modelo ecotoxicológico *Daphnia magna*, por radiación UVB de intensidad similar a la incidida en la Cd. de Puebla.

5.2 Objetivos específicos

- Estimar la concentración de DATS que permita evaluar su impacto en el desarrollo poblacional de *D. magna* en presencia de radiación UV-B.
- Evaluar los efectos inducidos en características de la historia de vida en grupos irradiados con UVB, irradiados con UVB y tratados posteriormente con DATS a diferente concentración, así como los grupos control (no irradiados, y otro en presencia del vehículo DMSO), en el modelo ecotoxicológico estudiado.
- Establecer el modelo matemático del desarrollo poblacional registrado en los diferentes grupos de estudio.
- Evaluar la expresión de los genes *SOD* y *HSP70* mediante qPCR, a los 10 días del desarrollo poblacional.
- Establecer una correlación entre la historia de vida y su expresión genética

6. MARCO CONCEPTUAL

6.1 *D. magna* como modelo de estudio de dinámica poblacional

La ecotoxicología tiene por objetivo evaluar la respuesta de los individuos ante un riesgo ecológico. Para analizar el impacto de algún estresor de tipo físico o químico se cuantifica a través de la supervivencia, la reproducción, edad de madurez y tasa de crecimiento de la población en modelos de estudio como *D. magna*. La división de la población de este organismo en clases facilita la interpretación de estos, en particular para resaltar las aquellas críticas en la dinámica de la población (Asaeda y Acharya, 2000). El modelo de dinámica poblacional es un modelo estructurado por etapas que predice las tres etapas principales de la vida *D. magna* (neonatos, jóvenes y adultos) y

su fracción de la población total permitiendo examinar la respuesta del organismo ante el estresor ecológico. El diseño de estos modelos para la predicción del crecimiento y características de la historia de vida en cladóceros es importante debido a que nos permitirá extrapolar estos mismos a otras especies de igual o mayor relevancia (Billoir et al., 2007).

6.2 Letalidad de UVB en *D. magna*

La luz UVB como ya se ha mencionado afecta a muchas especies acuáticas; la exposición a longitudes de onda más cortas da como resultado un mayor grado de daño al DNA, niveles más altos de estrés oxidativo y alteraciones en la expresión de genes del ciclo celular, lo que promueve la apoptosis (Häder et al., 2011). De acuerdo con Vega del año 2000, la tasa de mortalidad de *D. magna* se ve incrementada en función de la intensidad de la luz UVB, demostrando su efecto letal en dafnias expuestas durante 2 h a irradiación, donde el 80% de los individuos murió, en cambio, ante la exposición a la luz UVA se reportó solo 20% de mortalidad.

6.3 Evaluación de DATS en el modelo ecotoxicológico *Danio rerio*

La mayoría de los estudios sobre los beneficios de DATS en animales han sido realizados en roedores y en líneas celulares, y de acuerdo a nuestra investigación, se ha explorado apenas en un solo modelo animal acuático *Danio rerio*, gracias a los estudios de Liu et al., del 2015; quienes reportaron el efecto dosis respuesta de DATS evaluando diferentes concentraciones (2.5, 5, 10 y 20 μM) usando como vehículo DMSO al 1%, sobre células tumorales de cáncer de mama de la línea MDA-MB-231. Los resultados demostraron que DATS redujo la actividad de las células cancerosas, así como suprimió la metástasis mediante la disminución de la expresión de genes como ERK/NF-kB, metaloproteínas de matriz-2 (MMP-2) y MMP-9, involucradas en el proceso de proliferación de las células tumorales. Las concentraciones de DATS reportadas por Liu et al., del 2015, se tomaron como referencia para ser evaluadas en *D. magna*.

6.4 Papel que desempeña proteína de choque térmico de 70 kDa en el daño ocasionado por ROS

Aunque las proteínas de choque térmico fueron descubiertas en *Drosophila busckii* en 1962 no fue hasta 1999 donde se describió por primera vez en *Daphnia spp.* Dichos estudios destacan la importancia de esta proteína de choque térmico de 70 kDa debido a su función como chaperona en el plegamiento de las proteínas que en cooperatividad con otras permite mantener a la célula en homeostasis ayudando a la degradación de péptidos (Mikulski et al., 2011).

Cuando existe un estresor de tipo abiótico como radiación UVB o un compuesto altamente oxidante se producen moléculas reactivas de oxígeno (ROS); esto lleva a una desregulación de la expresión de la proteína *hsp70* cuya función es ayudar al replegamiento y degradación de las proteínas que fueron dañadas por estas moléculas. Ante un daño epidérmico causado por UVB esta proteína le confiere protección a la célula, debido a que inhibe a Nf-kappa B, interleucina-1 β e interleucina-6 mediante el incremento de *IkB- α* (Matsuda et al., 2010). En otros estudios se ha demostrado su función como estimulador de la endonucleasa AP y la DNA polimerasa β (Bases, 2006). Por lo tanto, sus propiedades antiapoptóticas, citoprotectoras y anti-inflamatorias de *HSP70* la hacen un importante biomarcador.

6.5 Función de superóxido dismutasa en la detoxificación celular

La familia superóxido dismutasa es la encargada de convertir los superóxidos a oxígeno y peróxido de hidrógeno; esta se clasifica en tres grupos: Cu/Zn-SOD (importante en este estudio), Fe-SOD y Mn-SOD. Debido a su papel celular es uno de los biomarcadores más utilizados en la evaluación de estrés oxidativo (Lyu et al., 2013).

La proteína Cu/Zn-SOD puede encontrarse en el citoplasma o núcleo de *D. magna*, dentro de su secuencia aminoacídica en las regiones altamente conservadas encontramos residuos de cisteínas y argininas, los cuales ayudan al mantenimiento de la estructura y funcionalidad de SOD. Esta proteína juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario en etapas tempranas, su fusión con vitelogenina permite proteger a los ovocitos y células embrionarias contra la toxicidad del oxígeno detoxificando de forma inmediata los superóxidos que se forman por el metabolismo de

vitelogenina durante el crecimiento de los ovocitos y la embriogénesis (Kato et al., 2004).

7. HIPÓTESIS

El tratamiento de una población de *D. magna* con el fitoquímico dialil trisulfuro disminuye el daño ocasionado sobre el desarrollo poblacional y expresión genética de proteínas de respuesta al estrés, inducido por la radiación UVB de intensidad similar a la ocurrida en el periodo de verano en la Ciudad de Puebla.

8. DIAGRAMA DE TRABAJO

Para cumplir con el objetivo del estudio se desarrolló el siguiente esquema de trabajo.

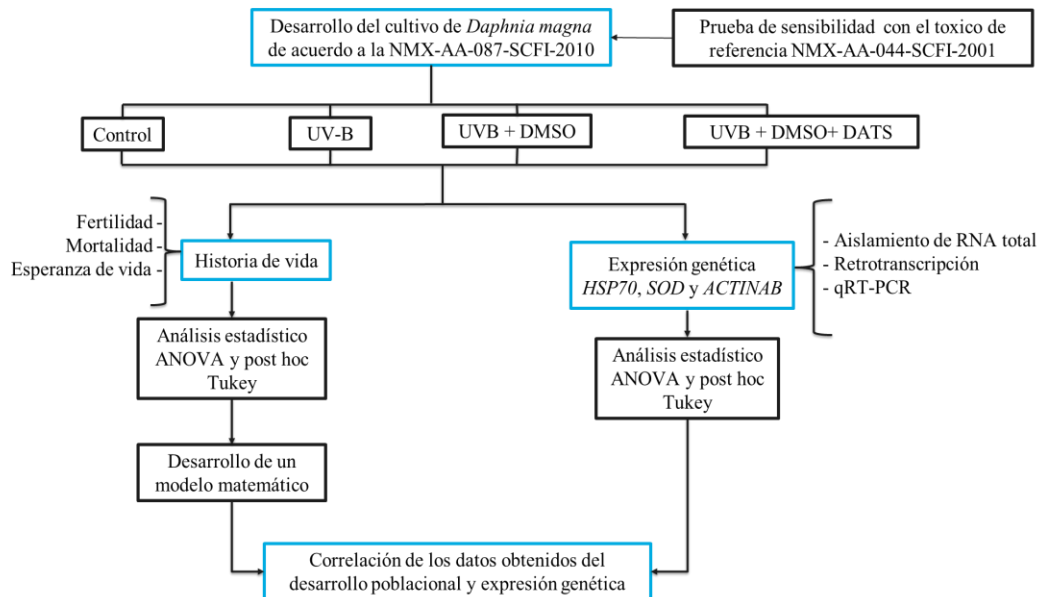


Figura 2. Diagrama de trabajo para el desarrollo de la investigación.

9. DISEÑO METODOLÓGICO Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN

Existen cuatro tipos de investigación: exploratorias, descriptivas, correlacionales y explicativas (Hernandez y Baptista 2014); sin embargo, para fines de este trabajo solo se hará uso de las investigaciones de tipo exploratoria y correlacional. De tipo exploratoria, debido a que la investigación documental no refiere literatura acerca del uso de dialil trisulfuro como agente capaz de influir en la recuperación del organismo

modelo *D. magna* irradiado con luz UVB. Así también, la investigación también es correlacional debido a que se estudiará la dinámica del desarrollo poblacional bajo la influencia de radiación UVB, de lo que resultará un modelo matemático que relacione las variables.

9.1 Desarrollo de cultivos de organismos de *D. magna*

Los organismos se cultivaron en agua dura reconstituida conteniendo $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , KCl cuya dureza deberá ser $250 \text{ mg/L} \pm 25 \text{ mg/L}$ y el pH de 8.0 ± 0.2 , con recambio de medios y alimentación a base de *Spirulina* a una concentración de 250,000 células/ml, cada tercer día, con fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad con luz blanca y fría con luminosidad 1000 lx, de acuerdo a la NMX-AA-087-SCFI-2010.

9.2 Desarrollo de los grupos experimentales

Para evaluar el efecto de DATS sobre los dafnidos irradiados con UVB, se realizaron 6 pruebas cuya población inicial fue de 20 neonatos procedentes de la tercera generación de un lote control por triplicado para todos los casos en un volumen de 120 mL de medio de cultivo.

El grupo control no fue sometido a radiación UVB ni a tratamiento con DATS. La primera prueba consistió en irradiar a dafnidos de 7 días de edad a una dosis de 75.6 J/m^2 de UVB, la cual es similar a la incidida en el periodo de verano 2019 en la Cd. de Puebla, de acuerdo con mediciones obtenidas por el Servicio Meteorológico Nacional. Se evaluaron los efectos de 3 concentraciones del fitoquímico DATS (10, 15 y $20 \mu\text{M}$) (Liu et al., 2015), mediante incubación durante 12 h posterior a la irradiación, finalmente los dafnidos fueron dispuestos en su medio de cultivo, y se evaluó su desarrollo poblacional hasta la edad de 25 días.

El compuesto oleoso DATS fue resuspendido en el vehículo DMSO al 0.07 % (Bownik, 2019). Para descartar el efecto del vehículo, se evaluó un grupo de dafnidos irradiado con luz UVB y tratados sólo en presencia de DMSO.

9.3 Evaluación de la dinámica poblacional

La evaluación de la toxicidad de DATS y UVB en la dinámica poblacional, se realizó mediante el monitoreo de las variaciones de parámetros sensibles en *D. magna* como la fertilidad, el número total de neonatos, tasa de natalidad, fertilidad, tasa bruta de mortandad y esperanza de vida de todos los grupos, los cuales fueron monitoreados durante 25 días.

9.3.1 Construcción del modelo matemático

La elaboración del modelo matemático se realizó a partir de los datos recolectados durante 25 días mediante monitoreo de las poblaciones atendiendo a las alteraciones en el ciclo de vida de los organismos, calculando las probabilidades de supervivencia y transición. Las probabilidades obtenidas se adecuaron en forma matricial para describir el comportamiento poblacional en cada uno de los grupos. Para la proyección a través del tiempo se utilizó la ecuación de Gompertz (Ec. 1) con una capacidad de carga específica.

$$K e^{-B} e^{-Ct}$$

(1)

Donde $G(t_i)$ es el tamaño de la población en el día t_i , K es la capacidad de carga de sistema, B es el día de máximo crecimiento y C es la tasa máxima de crecimiento.

9.4 Evaluación de la expresión genética

La expresión genética se determinó mediante la técnica de PCR en tiempo real de los genes *SOD*, y *HSP70*. Los grupos consistieron en un control en ausencia de irradiación y fitoquímico, un grupo expuesto a UVB y otro más al vehículo DMSO y radiación UVB; así como a tres concentraciones de DATS 10 μ M, 15 μ M y 20 μ M para el cual se utilizó el vehículo DMSO estos individuos expuesto al fitoquímico fueron previamente irradiados con UVB. La evaluación del ARNm de los genes de interés se realizó en 20 individuos de 10 días de edad.

9.4.1 Extracción de RNA

La extracción de RNA total del organismo se realizó mediante el protocolo de TRI Reagent® de Sigma-Aldrich a 4 °C. El RNA se reconstituyó en agua inyectable estéril, se determinó su concentración a la absorbancia de 260 nm, y su pureza con la relación 260/280 en un nanofotómetro Implen NanoPhotometer UV-Vis Spectrophotometers, su integridad se evaluó en electroforesis en gel de agarosa al 2%.

9.4.2 Obtención de cDNA

Una vez removido en su totalidad el DNA genómico mediante el kit DNasa I, libre de ARNasa (suministrada con $MnCl_2$) (1 U / μL) de ThermoFisher se procederá a la síntesis del cDNA empleando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis, de la misma marca cuyo protocolo se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Síntesis de cDNA del mRNA de *D.magna*

Retrotranscripción	
Reactivos	Cantidad
Templado RNA	12.5 μL c/u
Oligo dT	1 μL
Buffer 5X	4 μL
10 mM dNTP mix	2 μL
Revert Aid	0.5 μL
Vf	20 μL c/u
Concentración final	442.5 ng
ng/ μL	22. 125 ng/ μL cDNA

9.4.3 Diseño de oligonucleótidos

Los genes blanco de estudio son *HSP70* y *SOD*. Los oligonucleótidos se diseñaron considerando un largo de 17-23 pb con un porcentaje de GC del 50%, la temperatura de fusión no varió más de 3 °C entre cada oligonucleótido (Sánchez et al., 2014). Las plataformas PerlPrimer y OligoAnalizer (IDT) se emplearon en el diseño considerando el marco de lectura abierto. Las secuencias de cada oligonucleótido se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia nucleotídica de los cebadores a utilizar en la técnica de PCR tiempo real.

Gen	Simbolo	GeneBank ID	Primers 5'-3'		Eficiencia (%)	Amplicon (pb)	Referencia
Actina subunidad β	<i>ACTB</i>	AJ292554.1	Forward	CCCACTGTCCCCATTTATGAAG	98	71	Kim et al., 2011
			Reverse	CGCGACCAGCCAAATCC			
Proteína de choque térmico 70	<i>HSP70</i>	EU514494.1	Forward	CAAGAATGCCCTGGAATCGT	100	101	Este estudio
			Reverse	CCAATACCGTTGTCTGTCTG			
Cobre/zinc superóxido dismutasa	<i>SOD</i>	KF005233.1	Forward	GTCCGAGCTGACTATGTAAAG	99	179	Este estudio
			Reverse	GACTGGACATACACCCATTG			
			Reverse	AAAGTGTGCGATCCGTAACC			

9.4.4 PCR punto final

Los programas de amplificación se estandarizaron para asegurar la obtención de una sola banda, siguiendo las indicaciones del kit comercial DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific), amplificando con las características que se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 Ciclos de temperatura en el termociclador

Paso	Temperatura	Tiempo	Numero de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	20 s	1
Desnaturalización	95 °C	5 s	40
Alineamiento	58 °C	30 s	
Extensión	72 °C	60 s	
Extensión final	72 °C	300 s	1

9.4.5 PCR tiempo real

La expresión de los genes *D. magna* en respuesta a UVB y DATS se realizó en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, utilizado como sonda EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal de la marca Invitrogen. El volumen final de la reacción fue de 10 μ L utilizando ROX control interno.

Los niveles relativos de los RNAm de los genes *HSP70* y *SOD* se normalizaron con el gen constitutivo *ACTINAB*. Se utilizó el método comparativo C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). Los experimentos se validaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied

Biosystems), para confirmar que las eficiencias de las amplificaciones del control endógeno (*ACTINAB*) y objetivo sean aproximadamente iguales. La especificidad de la reacción se determinó para cada reacción con una curva de disociación del producto de PCR. Esta curva de disociación se obtuvo siguiendo el nivel de fluorescencia de SYBR Green de los productos de PCR de 60 a 95 ° C. Los datos obtenidos de qPCR se analizaron por ANOVA utilizaron los valores $\Delta\Delta C_T$ para cada gen en todos los tratamientos.

9.5. Correlación de datos

La correlación de los datos se realizó mediante el coeficiente de spearman cuyo valor de ρ (rho) nos proporcionara la magnitud de la relación entre las variables.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

10.1 Evaluación del efecto de DATS en *D. magna* ante la exposición UVB

10.1.1 Susceptibilidad de *D. magna* a DATS

Si bien, el efecto del fitoquímico DATS ha sido explorado ampliamente en el modelo murino y recientemente en un estudio realizado en un modelo de agua dulce como es *Danio rerio* (Liu et al., 2015), su potencial benéfico ante el daño originado por diversos estresores como UVB, siguen identificándose. Hasta la fecha, no se ha reportado su efecto en el modelo ecotoxicológico *D. magna*, por lo que exploramos las concentraciones a las cuales el organismo fuera susceptible, evaluando inicialmente la toxicidad aguda del fitoquímico a las 48 h en individuos adultos (10 días), cuya capacidad de adaptación es mayor, a diferencia de los neonatos que son más susceptibles (Sarma et al., 2007; Stuhlbacher et al., 1993).

De este modo, se exploró el porcentaje de supervivencia de los dafnidos a diferentes concentraciones (10, 15 y 20 μM), como se muestra en la Fig. 3, donde se observa que, a mayor concentración del fitoquímico, el porcentaje de sobrevivientes disminuye. Estos resultados fueron empleados para evaluar la CE_{50} mediante el método Probit, obteniendo la pendiente y el intercepto en la ordenada, como se muestra en la curva

dosis-respuesta de la Fig. 4. El valor muestra que la exposición de los individuos adultos a 12.5 μM (equivalente a 2,229.25 g/L, log 3.36 g/L) de DATS durante 48 h provoca la muerte de la mitad de la población.

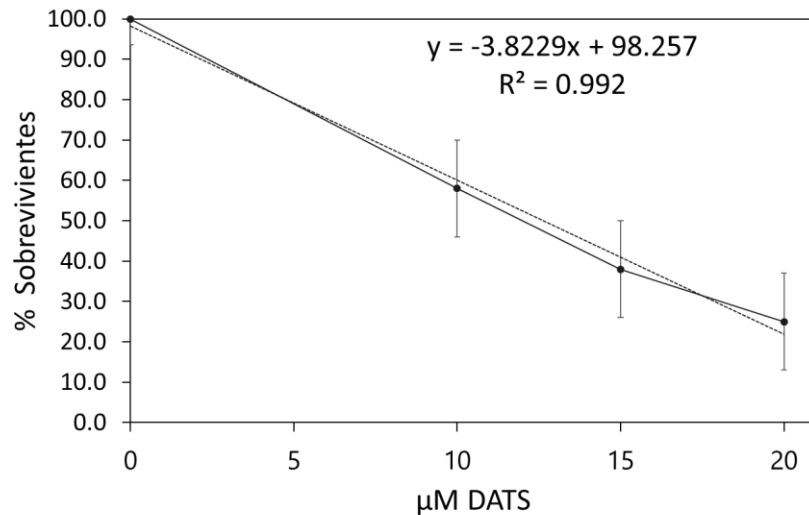


Figura 3. Curva de supervivencia de dafnidos adultos expuestos a DATS. Los dafnidos se expusieron a 10, 15 y 20 μM , durante 48 h. Los experimentos se realizaron por triplicado.

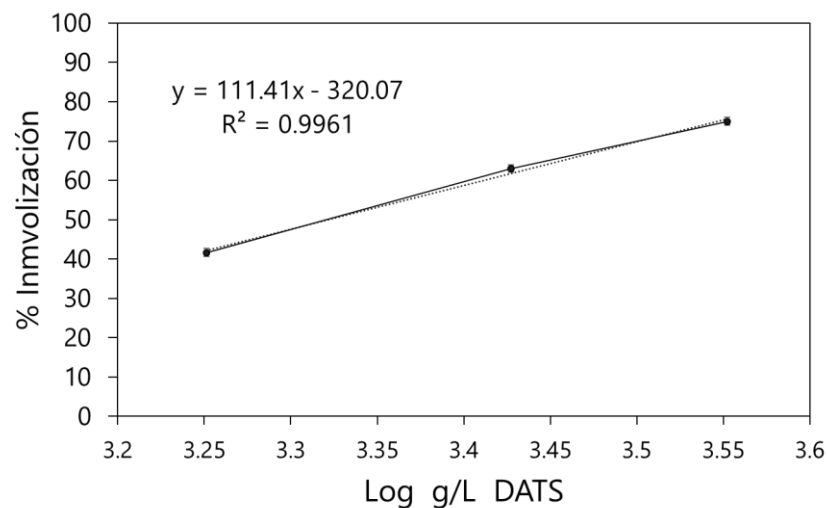


Figura 4. Curva dosis-respuesta de dafnidos expuestos a DATS a las 48 h. Regresión lineal correspondiente a la exposición aguda de adultos a DATS durante 48 h. CE_{50} evaluada con el método Probit.

De acuerdo con el valor correspondiente a la concentración media letal (CE_{50}) en adultos, consideramos estudiar los efectos de DATS sobre las alteraciones del desarrollo poblacional a concentraciones de 10, 15 y 20 μM de DATS. Con el objetivo

de realizar el estudio de desarrollo poblacional bajo el efecto de DATS, y tomando en cuenta que este compuesto es fotosensible, así como su vehículo (DMSO), la exposición se realizó por 12 h, en el periodo de oscuridad de su ciclo circadiano.

10.1.2 Efectos tóxicos inducidos en *D. magna* por radiación UV-B

La dosis subletal de radiación UVB a la que se evaluaron los efectos dañinos sobre características de la historia de vida como, mortandad, desplazamiento del primer día de puesta de crías, número total de neonatos, fue evaluada previamente por nuestro grupo de trabajo (Linares et al., 2020). En este trabajo se evaluaron las condiciones de tratamiento: La irradiación fue de 75.6 J/m^2 , dosis que fue calculada con la ecuación (2), la fuente de irradiación se colocó a 20 cm del contenedor de los dafnidos, el tiempo de irradiación fue 10 minutos en individuos de 7 días.

$$E_{\text{eritema}} (\text{J/m}^2) = I (\text{W/m}^2) \times \varepsilon \times t (\text{s}) \quad (2)$$

Donde:

E_{eritema} : irradiación eritemática

Irradiación espectral de la fuente en W/m^2

ε : coeficiente de acción eritemática a 313 nm (0.063)

t: tiempo en segundos.

El valor de intensidad de la radiación UVB (313 nm) identificada (75.6 J/m^2) equivale a 0.75 SED. Esta equivalencia se refiere a la dosis estándar eritematosa (SED), término establecido por Comisión Internacional sobre Iluminación (CIE). El valor de 1SED se refiere a la respuesta biológica específica desarrollada al exponerse durante 10 min, a una radiación de 100 J/m^2 .

10.2 Radiación UVB en Puebla verano 2019

Una vez evaluada la intensidad subletal de radiación UVB en condiciones de laboratorio a las que se evaluarían sus efectos negativos sobre el desarrollo poblacional durante 25

días, se identificó la relación de este valor con la intensidad de radiación UVB incidida en el periodo verano en la Ciudad de Puebla, en 2019.

De acuerdo con los valores registrados por la Estación Meteorológica de Puebla, durante el verano 2019, la intensidad más alta se registra en el mes de junio, como se observa en la Fig. 5, donde se grafican algunos de los valores más altos de este periodo el cual fue de 100 W/m^2 , en un horario de 11:00 a.m.-13:00 p.m., y persistió la mayoría de los días del mes de junio.

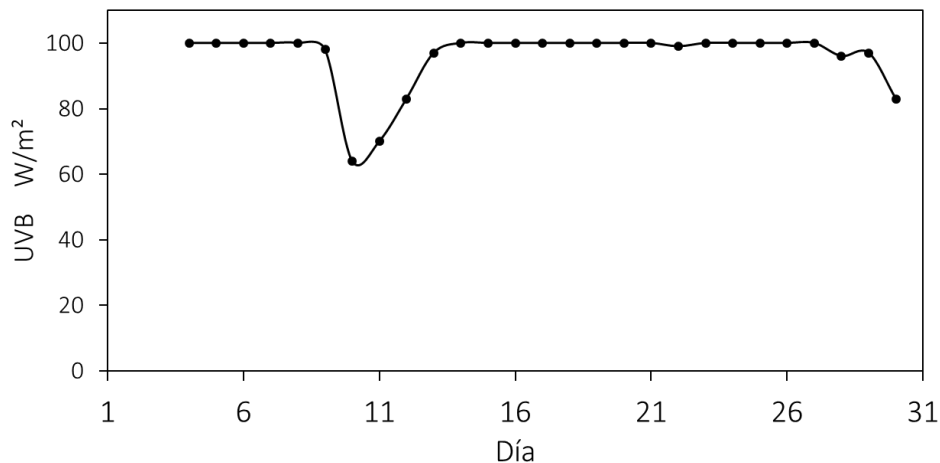


Figura 5. Radiación UVB más elevada registrada en la Ciudad de Puebla en verano 2019. Junio, horario 1:00-12:00 a.m. Tomado del Servicio Meteorológico Nacional.

El valor de 100 W/m^2 , de acuerdo con la dosis estándar eritematosa (SED) equivale a 40 SED, este valor es alto considerando que la CIE determina que sujetos de piel clara pueden someterse como máximo a exposiciones radiantes efectivas de 1.5 SED y aquellos con un tono más oscuro a 6 SED UV (Diffey et al., 1997), arriba de estos valores se eleva el riesgo de sufrir un daño eritemático.

Bajo las condiciones experimentales que manejamos, la irradiación de 75.6 J/m^2 equivale a 0.75 SED, valor que es menor al registrado en este periodo. Cabe señalar que en abril se registró radiación de 19 W/m^2 , equivalente a 7 SED, si bien este valor es mayor al que evaluamos en este trabajo, es importante considerar que la radiación de la energía solar del medio ambiente presenta una composición diferente a la emitida por una lámpara UVB, ya que la radiación solar comprende diferentes longitudes de onda que pueden influir de manera diferente sobre los efectos generados en los organismos,

siendo la radiación incida por una longitud de onda específica como la emitida por una lámpara UVB, puede presentar efectos más severos (Diffey, 2002).

10.3 Evaluación de los efectos del tratamiento de DATS sobre una población de *D. magna* incida con radiación UVB

Como segundo objetivo se evaluaron los daños producidos en los parámetros de historia de vida de *D. magna* ante la radiación UVB, así como el efecto de la exposición a DATS sobre las alteraciones inducidas por la radiación. Los valores registrados en relación con el primer día de fertilidad, número total de tasa de neonatos, fertilidad y esperanza de vida se evaluaron en 6 grupos de estudio, los resultados se muestran en la Tabla 4.

Uno de los primeros efectos identificados fue el retraso en el primer día de fertilidad, los resultados mostraron que individuos tratados únicamente con UVB mostraron un retardo de 48 h con respecto al control, sin embargo, el grupo que fue irradiado y expuesto posteriormente a DATS se retrasan aún más, como los grupos expuestos a 15 y 20 μM , el primero tuvo retraso de 6 días para presentar su primera reproducción, y el expuesto a mayor concentración de DATS no presentó reproducción durante el monitoreo (25 días) sino hasta el día 27 (Fig. 6 y Tabla 4). Este efecto puede estar relacionado con los procesos de maduración de ovocitos y células embrionarias, en los que la proteína vitelogenina presenta actividad importante que genera como subproductos especies reactivas de oxígeno debido a las necesidades energéticas que estos procesos demandan, lo que implica el desarrollo de procesos catabólicos, bajo estas condiciones, un estímulo adicional para el desarrollo de una condición que incremente el estrés oxidativo de la célula como la exposición de los dáfidos a luz UVB, incrementaría la activación de una respuesta que contrarreste el estado de estrés (Al-Aidaroos et al., 2015), priorizando esta respuesta sobre la fertilidad, así, la alteración en la homeostasis de los individuos expuestos a factores que inducen estrés oxidativo como UVB y DATS (Williamson et al., 2019; Filomeni et al., 2008), podría relacionarse con el retraso en su primer día de fertilidad, la cual se inicia cuando la homeostasis del

organismo se ha recuperado y pueden orientar sus recursos energéticos para alcanzar la madurez sexual e iniciar la producción de neonatos (De Meester et al., 1999).

Estos desplazamientos tuvieron un impacto negativo en el número total de neonatos (Fig. 7 y Tabla 4). El efecto del fitoquímico DATS en una población incidida con radiación UVB provocó una disminución severa en el número de neonatos, en comparación con el grupo control, y los grupos irradiados, así como los sometidos exclusivamente al vehículo.

No obstante, a pesar de que la fertilidad (número de neonatos/adulto) en los grupos tratados con DATS sobre poblaciones irradiadas (10, 15 y 20 μM) disminuyó de manera importante con respecto al grupo control y a los grupos que solamente fueron sometidos a irradiación, y a DMSO (Fig. 8); destaca que el grupo tratado con DATS 15 μM presentó un mayor número de neonatos/adulto que el grupo expuesto a DATS 10 μM , lo que sugiere que la concentración 10 μM posiblemente aumentó la severidad del estado estresante previamente ya inducido por la exposición a UVB (Al-Aidaros et al., 2015), por lo que disminuyó su fertilidad. Sin embargo, a la concentración 15 μM las señales inducidas en el organismo permitieron que el estado pre-acondicionante no sobrepasara la capacidad de amortiguamiento del daño, logrando responder positivamente al incrementar el número de neonatos por hembra grávida (Fig. 9), a pesar de que la población presentó una severa disminución en el número de neonatos total registrados durante el desarrollo poblacional (Fig. 7), las hembras sobrevivientes fueron capaces de expulsar un mayor número de neonatos, lo que favorecería la recuperación de su población. Si bien, a concentración 10 μM de DATS este efecto no fue inducido, la concentración 15 μM del fitoquímico sí logró este efecto benéfico o favorecedor para la continuidad del desarrollo poblacional. En cambio, la concentración 20 μM de DATS sobrepasó la capacidad de pre-acondicionamiento del organismo para estimular la respuesta clásica antioxidante que ha sido atribuida a los efectos benéficos de DATS (Filomeni et al., 2008, Seki et al., 2008), afectando la supervivencia celular y activando la apoptosis, como se ha reportado (Cleuvers et al., 1997), en este trabajo, estos efectos podrían estar relacionados con los parámetros de historia de vida registrados como primer día de reproducción, fertilidad y natalidad (Fig. 7, 8 y 9).

Tabla 4. Efecto de DATS en parámetros de historia de vida en una población de *D. magna* expuesta a radiación UVB.

Parámetro evaluado	Poblaciones experimentales					
	Control	UVB	UVB + DMSO 0.07%	UVB + DMSO + 10 μ M DATS	UVB + DMSO + 15 μ M DATS	UVB + DMSO + 20 μ M DATS
Primera reproducción (días)	9 $\pm$ 0.7 ^a	11 $\pm$ 0 ^b	11 $\pm$ 0.7 ^b	9 $\pm$ 0.7 ^a	15 $\pm$ 0.71 ^c	27 $\pm$ 0.71 ^d
Reproducción total	513 $\pm$ 3.5 ^d	238 $\pm$ 0.7 ^c	271 $\pm$ 4.24 ^c	15 $\pm$ 2.1 ^b	11 $\pm$ 1.41 ^{ab}	0 $\pm$ 0 ^a
Neonatos por hembra	6.8 $\pm$ 0.42 ^e	4.95 $\pm$ 0.13 ^d	4.8 $\pm$ 0.02 ^d	1.95 $\pm$ 0.27 ^c	4.13 $\pm$ 0.4 ^b	0 $\pm$ 0 ^a
Esperanza de vida (días)	45 $\pm$ 0.64 ^d	22 $\pm$ 0.53 ^c	27 $\pm$ 0.18 ^c	5 $\pm$ 0.07 ^a	7 $\pm$ 0.14 ^{ab}	4 $\pm$ 0.39 ^b

Los valores son medias $\pm$ desviación estándar. El análisis estadístico por ANOVA nos mostró una diferencia significativa ($P < 0.05$) indicado en letras.

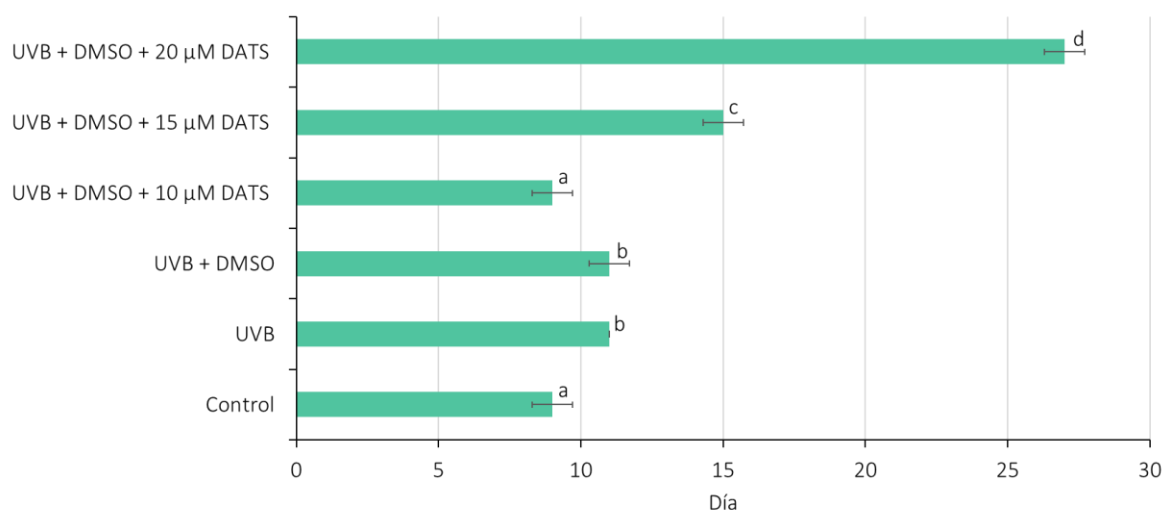


Figura 6 Efecto de DATS en *D. magna* incidida con UVB, sobre el primer día de reproducción. Característica distintiva de que se ha alcanzado la madurez sexual. Las letras expresan una diferencia significativa ($P < 0.05$) por ANOVA.

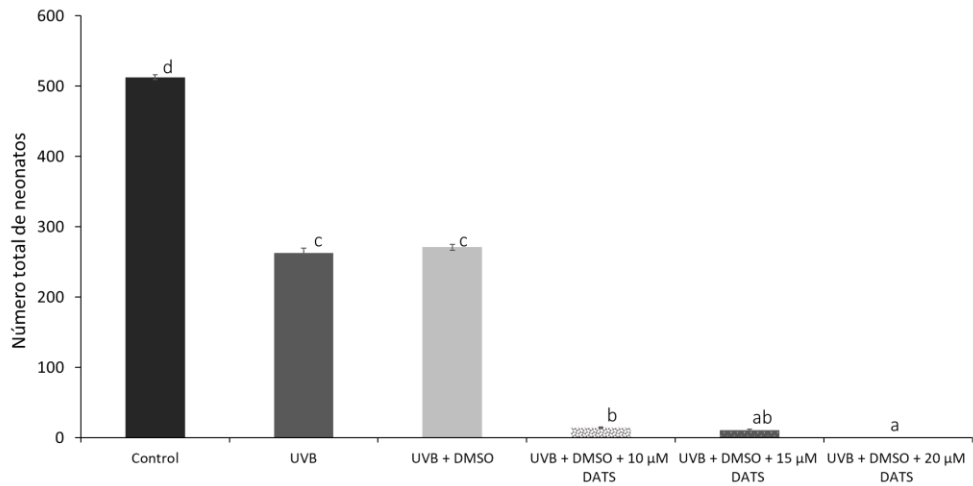


Figura 7. Efecto de DATS en *D. magna* incidida con UVB, sobre la reproducción total de neonatos. Número de neonatos registrados durante el estudio de la evaluación del desarrollo poblacional. Diferencias significativas señaladas con letras, ($P < 0.05$), análisis ANOVA.

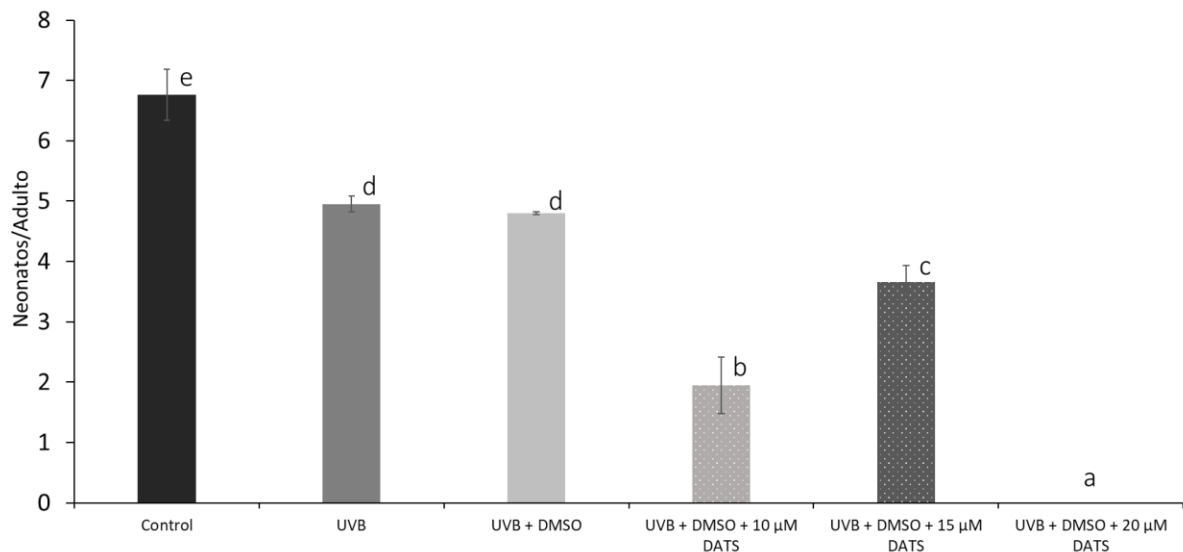


Figura 8. Efecto de DATS en *D. magna* incidida con UVB, sobre la fertilidad Promedio de neonatos expulsados por adulto fértil, durante el estudio de evaluación del desarrollo poblacional. Las letras indican una diferencia significativa ($P < 0.05$), mediante análisis estadístico ANOVA.

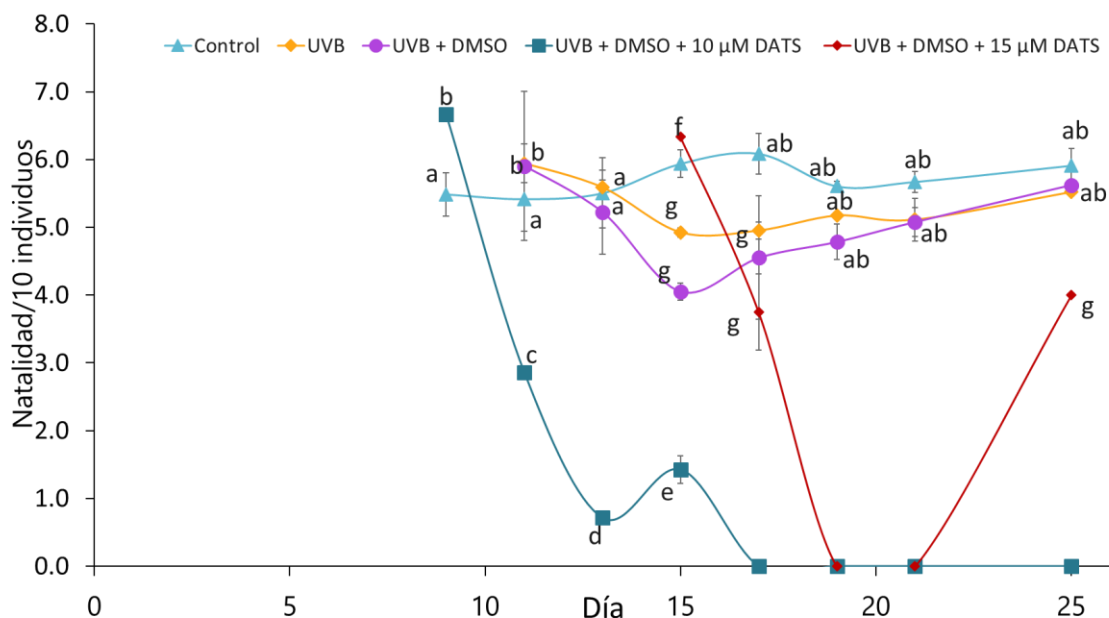


Figura 9. Efecto de DATS en *D. magna* incidida con UVB sobre la natalidad. La natalidad es el número promedio de nacimientos por cada 10 hembras. Las letras señalan diferencias significativas ($P < 0.05$), análisis ANOVA.

La natalidad disminuye en los grupos irradiados con respecto al grupo control (Fig. 9), este efecto similar en el grupo expuesto al vehículo, sin embargo, estos tres grupos presentan un patrón similar al mantener el número promedio de nacimientos por cada 10 hembras. Sin embargo, en los grupos irradiados y posteriormente tratados con DATS 10 y 15 μM la natalidad se vio disminuida después de su primer día de reproducción. Fue interesante identificar que en dafnidos expuestos a 15 μM de DATS hubo un incremento de la natalidad al día 21, a diferencia del grupo expuesto con la menor concentración, lo que sugiere que la concentración 15 μM de DATS podría promover una recuperación del desarrollo poblacional, lo cual no se observa a la concentración más alta evaluada (20 μM), cuyo efecto posterior a su exposición anuló la natalidad en el periodo evaluado (25 días).

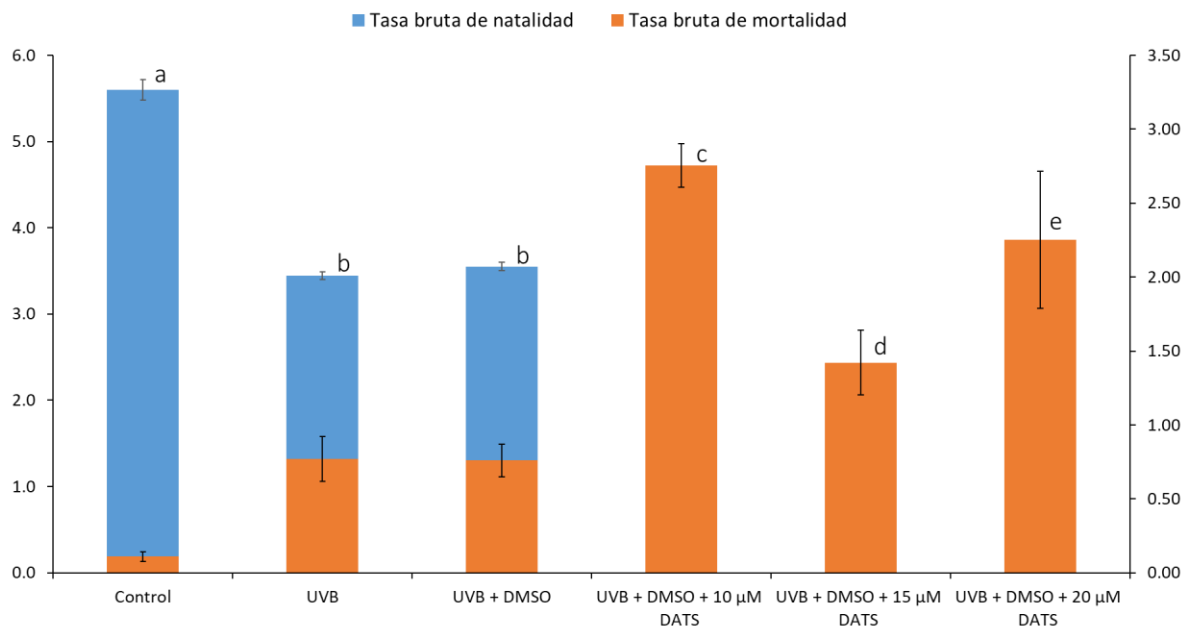


Figura 10. Efecto de DATS en *D. magna* incidiada con UVB, sobre la tasa bruta de natalidad y mortalidad. Las tasas brutas de natalidad y mortalidad corresponden al número de nacimientos o muertes promedio, por cada 10 individuos. Las letras expresan diferencias significativas ($P < 0.05$) mediante análisis ANOVA.

Para contar con un panorama más claro acerca de la contribución de los nacimientos con respecto al total de la población se calculó la tasa bruta de natalidad, así como la de mortalidad con la finalidad de conocer la proporción de muertes para cada grupo estudiado Fig. 10.

El valor de la tasa de mortandad en el grupo control fue el más bajo de todos los grupos evaluados, y se elevó ligeramente tanto en los grupos irradiados como irradiado en presencia del vehículo, cabe señalar que estos dos últimos grupos mostraron valores muy similares en diferentes parámetros evaluados de la historia de vida (estos grupos no presentaron diferencia significativa). En cambio, en los grupos expuestos a UVB y posteriormente a DATS, la tasa de mortandad fue mucho mayor que los anteriormente mencionados, sin embargo, destaca que este efecto fue marcadamente menos severo en el grupo expuesto a 15 µM de DATS (Fig. 10).

La sensibilidad del organismo con respecto a los tratamientos de 10 µM, 15 µM y 20 µM de DATS está directamente relacionado con el eventos previo de radiación UVB; por lo que la mortalidad es más significativa ($P < 0.05$) que los grupos únicamente irradiados,

debido al estado celular de *D.magna*, DATS podría estar actuando como un agente oxidativo agravado aún más el estado del individuo (Filomeni et al., 2008, Seki et al., 2008).

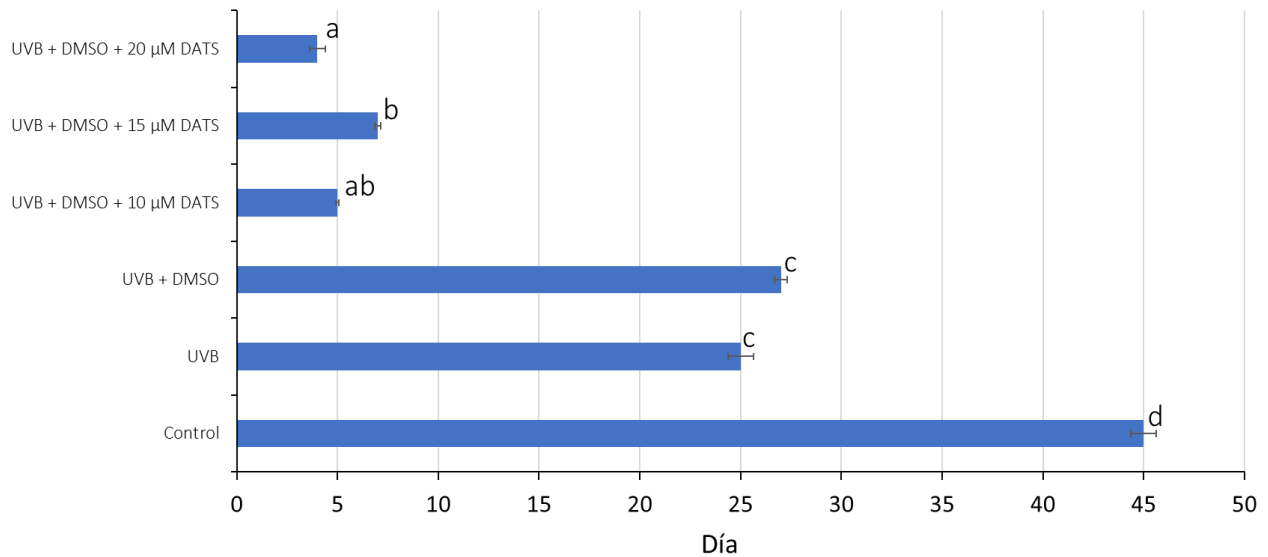


Figura 11. Efecto de DATS en *D. magna* incidida con UVB sobre la esperanza de vida. Se evaluó el tiempo de vida promedio que alcanzarían los individuos bajo las condiciones determinadas en el experimento. El análisis ANOVA mostró diferencias significativas señaladas con letras.

La esperanza de vida es un parámetro que indica el tiempo promedio de vida que alcanzarían los individuos. La figura 11 muestra que los individuos del grupo control presentan un valor de esperanza de vida de 45 días, lo que está relacionado con su ciclo normal de vida (Hebert, 1978). Este valor disminuye en los grupos irradiado, y el irradiado en presencia de DMSO (25 y 27 días respectivamente, sin diferencia significativa entre estos 2 grupos, Fig. 10). En cambio, los grupos irradiados y expuestos a DATS 10, 15 y 20 µM disminuyeron su expectativa de vida 91, 84 y 89 %, respectivamente. Es decir, de estos tres grupos, el expuesto a 15 µM de DATS fue el que mostró mayor esperanza de vida, lo que se puede relacionar con su mejor capacidad de fertilidad (Fig. 8) y natalidad (Fig. 9), a pesar de la elevada tasa bruta de mortalidad que presentaron (Fig. 10), los sobrevivientes mostraron capacidad para promover la recuperación de la población al presentarse las condiciones adecuadas.

Los organismos respondieron a los factores estresantes, siendo este un estímulo para adaptarse a las condiciones del medio de manera prioritaria, a pesar de la elevada

mortalidad, los escasos sobrevivientes mostraron capacidad para reestablecer sus capacidades reproductivas, a un tiempo y condiciones específicas y adecuadas.

10.4. Modelo matemático del desarrollo poblacional en *D. magna* para la evaluación de los efectos de DATS sobre una población irradiada con UVB

Como tercer objetivo del estudio se realizó un modelo matemático el cual permitió la predicción a nivel poblacional del organismo *D. magna*. En el desarrollo del modelo se contemplaron parámetros de historia de vida como fertilidad, primer día de reproducción, natalidad y estructura poblacional (Fig. 6, 8, 9 y 12 respectivamente).

La población de *D. magna* fue dividida en tres clases: neonatos, jóvenes y adultos (Fig.3), esta clasificación permitió el análisis de la dinámica de población (Billoir et al., 2007), en donde se observó que, en condiciones óptimas, su estructura poblacional está constituida en mayor parte por neonatos (LeBlanc,1982) esta proporción se ve afectada por estresores como radiación UVB el cual ocasiono un desplazamiento en su primer día de reproducción (Fig.6) así como la disminución en su fertilidad por adulto (Fig. 8) y en consecuencia una menor cantidad de neonatos expulsados (Fig.7). En lo que respecta a los individuos expuestos a DATS y previamente irradiados, se tuvo que los neonatos fueron la clase más afecta en las tres concentraciones (10 μ M, 15 μ M y 20 μ M), siendo que en estos tres grupos la cantidad de adultos siempre supero a la de neonatos y jóvenes; esta desproporción fue mayor en la prueba con 20 μ M de DATS debido a que no hubo registró de neonatos (Fig. 8), aunque en 10 μ M y 15 μ M si se registraron nacimientos (Fig.9), no fueron suficientes como para restablecer la estructura de una población control.

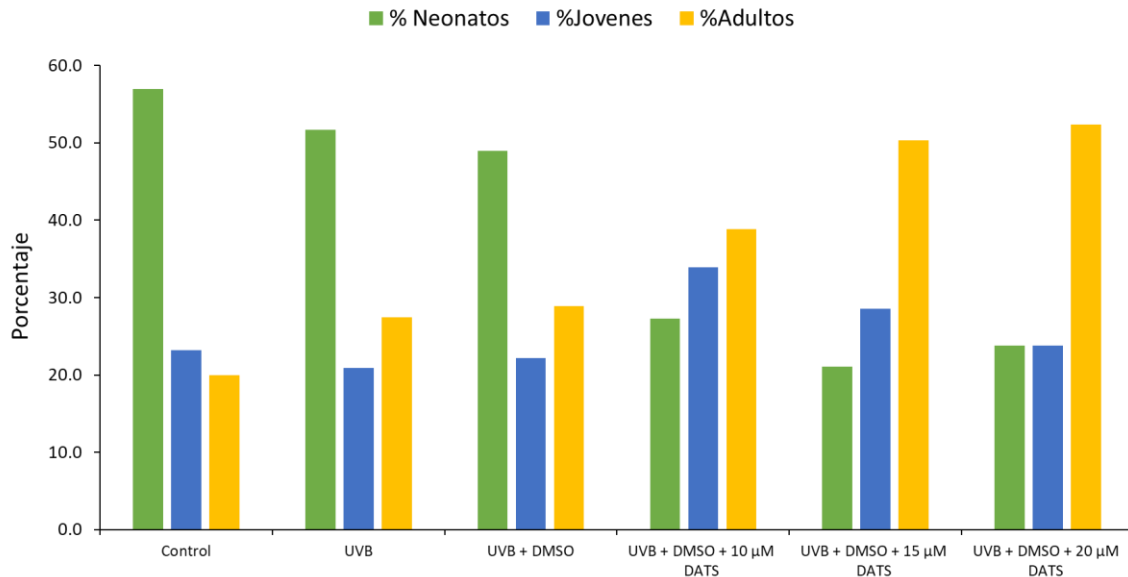


Figura 12. Efecto de DATS en *D. magna* incida con UVB sobre la distribución de las poblaciones. La población fue clasificada por su edad en neonatos, jóvenes y adultos.

La división de la población por clases permitió determinar las probabilidades de supervivencia de neonatos, jóvenes y adultos, de la misma forma fueron calculadas las probabilidades de transición para cada etapa, obtenidas de los datos experimentales del desarrollo poblacional de individuos irradiados a una dosis eritemática relevante de UVB y de aquellos expuestos posteriormente al compuesto DATS los cuales fueron ingresados en el simulador de acuerdo al diagrama conceptual de la Fig.14. Un crecimiento de tipo logístico fue el resultado del uso de la ecuación de Gompertz (Ec. 1), para el cual se estableció una capacidad de carga (K) de 185 individuos (neonatos, jóvenes y adultos) así como su primer día de reproducción (Fig. 6). El tiempo considerado de cada periodo en la proyección población fue de 48 h.

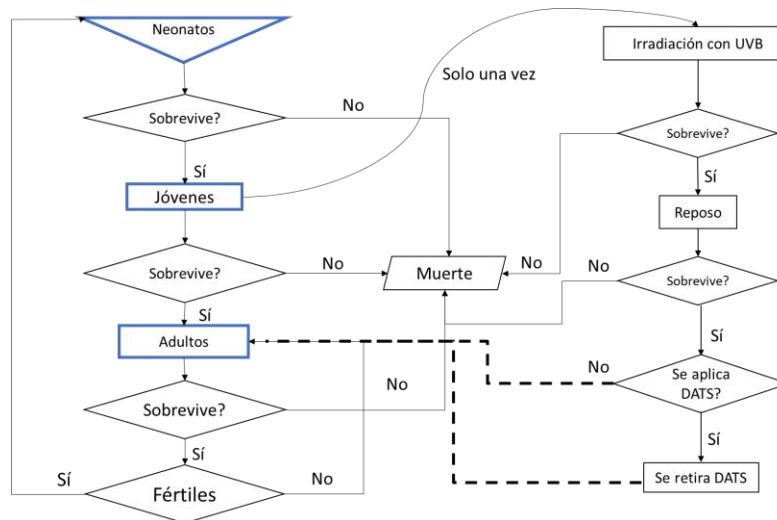
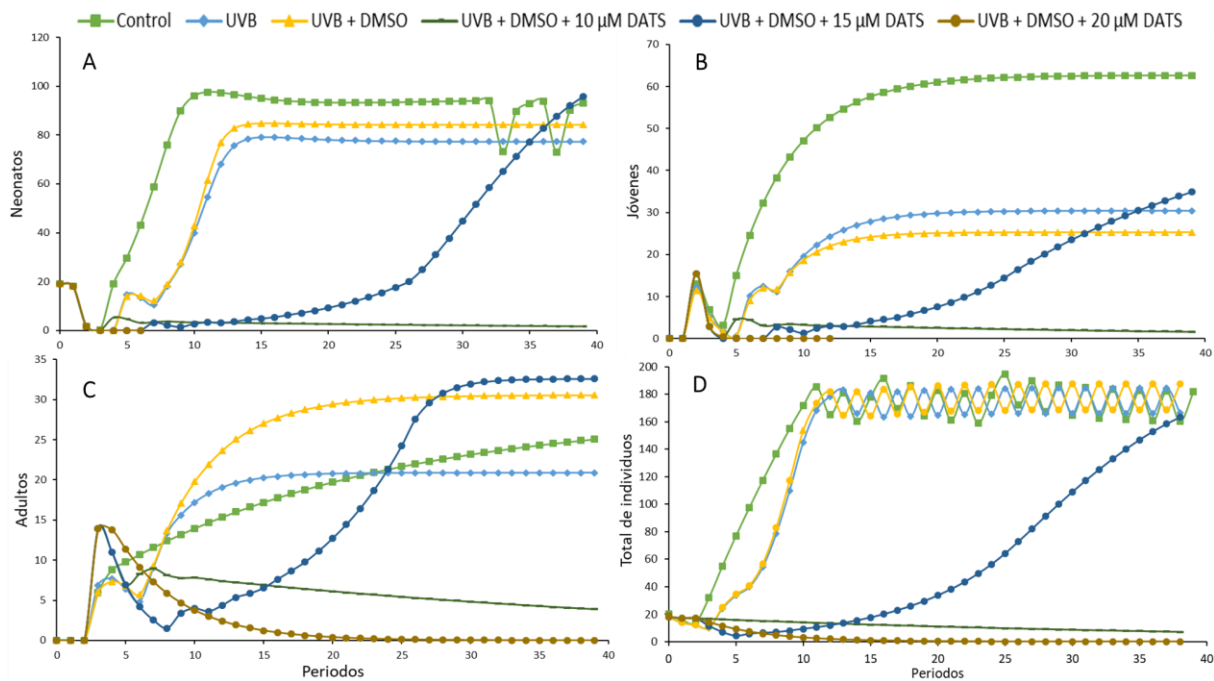


Figura 13. Diagrama conceptual de las pruebas realizadas con radiación UVB y/o DATS en *D. magna*. Los rectángulos indican procesos del crecimiento del organismo, los rombos la toma de decisión, las líneas solidas indican el flujo del ciclo de vida del cladócero y las discontinuas la incorporación de los individuos a este mismo. La programación se realizó en el compilador Visual estudio 2019 en lenguaje C++.

La estructura poblacional (Fig.12) permitió realizar una predicción de 40 periodos para cada uno de los grupos evaluados experimentalmente (Fig.14).



* $P > 0.05$ con respecto a los datos experimentales

Figura 14. Simulación matemática de una población *D. magna* tratada con DATS posterior a su irradiación en presencia de UVB. A. Población de neonatos. **B.** Población de jóvenes. **C.** Población de adultos. **D.** Simulación del total de la población. La proyección se realizó para 40 periodos con la ecuación de Gompertz.

El grupo control de la simulación poblacional de neonatos (Fig.14. A.), se encuentra por encima de los dafnidos tratados con radiación UVB y el vehículo DMSO y aun más de aquellos expuestos a DATS y UVB en particular de las concentraciones 10 μM y 20 μM en las cuales no se observó una recuperación en dicha proyección, sin embargo, esto no sucedió para el grupo tratado con 15 μM del fitoquímico el cual logro tener la misma cantidad de neonatos que el grupo control al periodo 40. La siguiente clase modelada fue la de jóvenes (Fig.14. B.) cuya tendencia es similar a la de neonatos (Fig.14. A.). En las poblaciones irradiadas con luz UVB y UVB/DMSO, presentaron una cantidad similar de jóvenes en el modelo, para el mismo caso en la población estimulada con 15 μM de DATS presentó un aumento gradual en individuos jóvenes, no obstante, para las otras dos concentraciones 10 μM y 20 μM del fitoquímico no hubo ninguna recuperación. En lo que respecta a los adultos (Fig.14. C.) la proyección poblacional de los dafnidos expuestos a luz UVB, así como los irradiados y en presencia de DMSO tuvo una tendencia similar, en cambio de los tres grupos tratados con DATS el expuesto a 15 μM del fitoquímico presento una recuperación lo que podría indicar una adaptación fisiológica de *D. magna* que le permitió sobrevivir ante las condiciones estresoras, pero no letales (LeBlanc, 1982). Los adultos que se adaptaron lograron reproducirse partenogenéticamente (Cleuvers et al., 1997) conduciendo a la recuperación de la población mediante el incremento paulatino de neonatos (Fig.14.A) alcanzando su capacidad de carga después de varios ciclos (Fig.14.D). El aumento de la probabilidad de supervivencia de los neonatos pertenecientes a la prueba con 15 μM DATS permitió que estos pudieran pasar a la siguiente etapa juvenil (Fig.14.B).

Los gráficos de la proyección matemática presentan una estructura poblacional similar a la observada experimentalmente (Fig.12) siendo esto reafirmando mediante un análisis estadístico por ANOVA en el cual no se vio una diferencia significativa ($P > 0.05$), por lo tanto, la simulación matemática pronostico satisfactoriamente el ciclo de *D. magna*, así como su dinámica poblacional en los 6 grupos.

10.5. Expresión aguda de *SOD* y *HSP70* inducida por el efecto de DATS sobre *D. magna* incidida con UVB

Para cumplir el cuarto objetivo, se evaluó mediante qPCR la expresión de los genes *SOD* y *HSP70* ante una exposición aguda inducida en una población de *D. magna* irradiada con UVB sometida a post-tratamiento con DATS. La expresión aguda de estos genes se analizó en dáfidos de 10 días de edad, los cuales previamente habían sido irradiados a los 7 días de edad y tratados 24 h después con el fitoquímico DATS; 24 h más tarde los efectos inducidos mediante este tratamiento fueron evaluados. Los resultados mostraron que la expresión de *HSP70* se incrementó 3 veces en la población irradiada con UVB con respecto al grupo control (Fig. 15 A), resultado esperado, debido a que los efectos conocidos de este factor físico estresante están relacionados con la producción de una serie de modificaciones a biomacromoléculas importantes, destacando la oxidación de DNA, proteínas y lípidos, lo cual se ha descrito que genera estrés oxidativo promoviendo que la célula responda mediante la activación de una respuesta anti-oxidante compleja, en la que destaca la expresión de proteínas como *HSP70*, implicada en evitar plegamiento y/o acumulación no deseada de proteínas (Matsuda et al., 2010).

Destaca que el patrón de expresión que mostró el grupo irradiado con UVB en presencia del vehículo DMSO fue similar al grupo que solamente fue irradiado, en cambio, la expresión tanto de *HSP70* como de *SOD* fue severamente modificada en los grupos tratados con DATS (10, 15 y 20 μ M) (Fig. 15 A y B). Este comportamiento fue característico también en la mayoría de los resultados obtenidos al evaluar parámetros de historia de vida, lo que sugiere que el vehículo no influyó severamente en la mayoría de las características analizadas del desarrollo poblacional, lo cual podría atribuirse a que la concentración de DMSO empleada para solubilizar al compuesto oleoso DATS, fue mucho menor a la concentración que puede desarrollar alteraciones en parámetros fisiológicos y bioquímicos, como lo demostraron Bownik, et al., en 2019, mediante la exposición de dáfidos a cultivos conteniendo concentraciones al 0.1% y 1% de DMSO, en cambio, en este trabajo, al resuspenderlo en el medio de cultivo la concentración fue 0.07% de mucho menor.

Fue de gran interés identificar que la exposición a 10 y 15 μM de DATS de poblaciones previamente irradiadas con UVB, sobre expresaron de manera importante el gen *HSP70* (6 y 11 veces, respectivamente) y de *SOD* (8 y 18 veces, respectivamente) respecto al control, estos resultados no han sido descritos hasta la fecha en la bibliografía consultada, su importancia radica en que se muestra por primera vez que en este modelo ecotoxicológico de estudio, la presencia de DATS podría ser capaz de desarrollar un estado pro-oxidante importante que estimula intensamente a la célula a desplegar una respuesta anti-oxidante, mediante la expresión de *HSP70* y *SOD* (Fig. 15), que puede ser requerida para contrarrestar el daño causado por UVB y el estímulo del fitoquímico, conocido por inducir un estado pre-acondicionante y pro-oxidante (Filomeni et al., 2008, Ariga y Seki, 2006), a consecuencia de modificar el estado redox celular mediante la producción de ROS generadas por la ruptura homolítica de su puente disulfuro y su capacidad para tiolar proteínas que presentan cisteínas reactivas, así como modificar el estado redox de glutatión (Filomeni et al., 2008; Seki et al., 2008). Esta respuesta celular puede sobrepasar su propia capacidad de amortiguamiento del estrés oxidativo, y al no sobreponerse al daño, muere (Filomeni et al., 2008), lo que podría estar relacionado con la elevada tasa de mortalidad de estos grupos (Fig. 10) y la disminución en la fertilidad y natalidad (Fig. 8 y 9). Aún bajo estas condiciones, el grupo de dáfidos sometidos a postratamiento con DATS a concentración 15 μM presentaron la facultad de incrementar la expresión de *HSP70* y *SOD* (11 y 18 veces, respectivamente, respecto al grupo control, lo cual podría ser importante para desarrollar una respuesta que permitió la recuperación de la población, posiblemente influyendo en el incremento de su fertilidad y esperanza de vida (Fig. 8 y 11), así como, en la recuperación a largo plazo identificada en la proyección realizada con el modelo de Gompertz (Fig. 14).

Destacó que la expresión de *SOD* en el grupo de dáfidos sometidos a postratamiento con DATS a concentración 15 μM fue 1.4 veces mayor que la expresión de *HSP70*, lo que podría atribuirse a que *SOD* es conocido por su papel en la degradación del superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno (Lyu et al., 2013), así como, se ha señalado su posible papel en la protección de los ovocitos y células embrionarias ante las moléculas reactivas de oxígeno que resultan del metabolismo de vitelogenina,

particularmente, Kato et al., en el 2004 identificaron mediante secuenciación de la proteína, que vitelogenina se encuentra fusionada a un dominio superóxido dismutasa en específico de la familia Cu/Zn, el gen correspondiente a esta SOD fue blanco para el diseño de los iniciadores que se emplearon en el este trabajo.

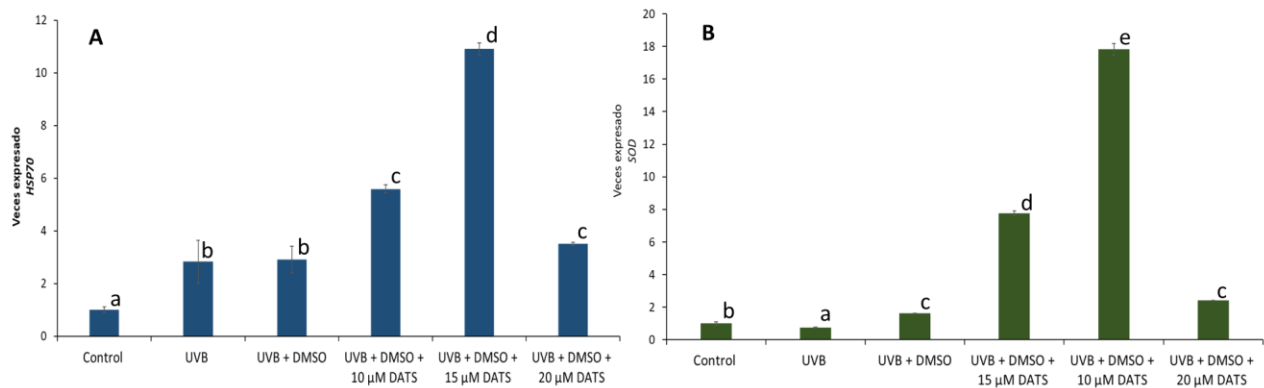


Figura 15. Efecto de DATS en *D. magna* incida con UVB sobre la expresión aguda de *HSP70* y *SOD*. A. Expresión genética relativa de *HSP70* evaluada 24 h postratamiento con DATS. B. Expresión genética relativa de *SOD* evaluada 24 h postratamiento con DATS. Los genes fueron normalizados con el gen constitutivo *ACTINAB*. Las letras indican diferencias significativas $P < 0.005$

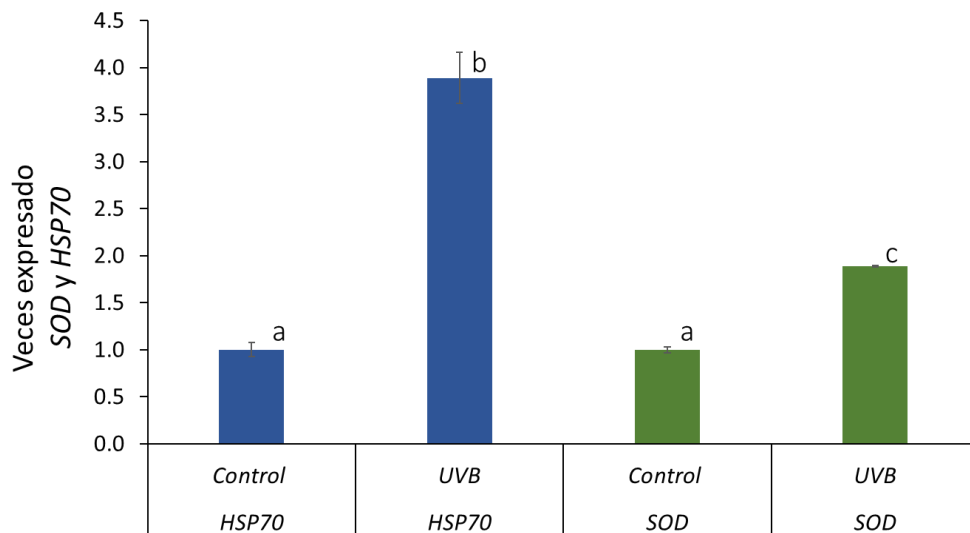


Figura 16. Expresión relativa de *HSP70* y *SOD* en una población de *D. magna* irradiada con UVB, previo al tratamiento con DATS. Después de exponer a la población a irradiación UVB, la expresión relativa se evaluó a las 24 h. Los genes fueron normalizados con *ACTINAB*. Las letras indican diferencias significativas $P < 0.005$.

Además de identificar la evaluación de la expresión relativa de *HSP70* y *SOD* inducida ante el tratamiento de DATS en una población irradiada por UVB (Fig. 16), se identificó la expresión relativa de la población, previa al tratamiento con el fitoquímico, identificándose que previo al tratamiento de DATS, y de manera aguda (24 h post irradiación), la expresión de ambos genes se induce (*HSP70*: 4 veces, *SOD*: 2 veces), este resultado sugiere la activación de la respuesta anti-oxidante celular ante el efecto de la radiación UVB, de acuerdo a diversos reportes en donde se les ha identificado, principalmente a *SOD* como biomarcador del estrés oxidativo (Lyu et al., 2013).

No obstante, la inducción de ésta respuesta en presencia del tratamiento con DATS (Fig. 15), poderoso activador de la respuesta antioxidante, mediante la inducción de un estado celular pro-oxidante, el cual ha sido demostrado en modelos de líneas celulares cancerosas y murinos en los que se induce física y químicamente el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, este fitoquímico fue capaz de activar la apoptosis de las células cancerosas, consiguiendo que las células con mejor capacidad de respuesta ante el fuerte estímulo pro-oxidante sobrevivan, de ahí que se le han atribuido propiedades anticancerígenas. Si bien, en este trabajo se empleó como modelo de estudio a *D. magna*, cladóceros en el cual se desconocen estos procesos, fue interesante establecer la correlación entre la esperanza de vida y su respuesta genética del efecto de DATS sobre una población previamente expuesta a irradiación UVB como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Asociación entre parámetro de historia de vida y perfil de expresión genética de *SOD* y *HSP70* en *D. magna*.

Correlación	Control	UVB+DMSO + 10 μ M DATS	UVB+DMSO + 15 μ M DATS	UVB+DMSO + 20 μ M DATS
Esperanza de vida VS Expresión relativa <i>HSP70</i>	0.5	-0.8	-0.6	-0.8
Esperanza de vida VS Expresión relativa <i>SOD</i>	0.5	-0.6	-0.6	-0.8

Correlación de spearman en el corte de 10 días de edad.

La asociación entre la expresión de los genes *HSP70* y *SOD* con respecto a la esperanza de vida a los 10 días de edad en los grupos sometidos a 10 μ M, 15 μ M y 20 μ M del fitoquímico DATS previamente irradiados con UVB se estableció mediante el método de spearman con un ρ (rho) negativo a comparación del grupo control. El valor más alto obtenido en la correlación de *HSP70* y esperanza de vida corresponde a los grupos expuestos a 10 μ M y 20 μ M de DATS el cual fue de -0.8 al día 10 de su desarrollo población lo que advierte de una correlación altamente negativa; es decir que un aumento en la expresión de *HSP70* está asociado a una disminución en la esperanza de vida a ese corte de tiempo, no así para el grupo correspondiente a 15 μ M de DATS cuyo valor ρ (-0.6) a pesar de ser negativo, manteniendo la misma dirección de la relación la cual disminuye en comparación a los otros dos grupos.

De igual forma, para el caso de los grupos expuestos a 10 μ M y 15 μ M de DATS la correlación entre la esperanza de vida y el perfil de expresión de *SOD* resultó de ρ (-0.6), mostrando un grado de correlación no tan elevado, pese a ello es posible advertir a ese corte de tiempo, un aumento en la expresión de *SOD* conlleva una disminución en la espera de vida, manteniendo el mismo perfil de dirección para la correlación que fue observado en la expresión de *HSP70*. El mismo comportamiento puede ser detectado en la asociación para la expresión de *SOD* con la esperanza de vida para el grupo de 20 μ M (ρ = -0.8); sin embargo, es de destacarse que dicha correlación es más fuerte en comparación a los otros dos tratamientos.

11.CONCLUSIÓN

Los efectos del fitoquímico DATS en *D. magna* incidida con radiación UVB alteraron negativamente parámetros de historia de vida como primer día de reproducción, fertilidad y esperanza de vida, este efecto fue más severo que el inducido en poblaciones irradiadas con UVB. Sin embargo, destacó que la población irradiada con UVB y tratada posteriormente con el fitoquímico a una concentración 15 μ M, presentó un incremento en el número de neonatos por hembra grávida, que se reflejó en una mayor esperanza de vida, característica importante que podría influir en la recuperación del desarrollo poblacional a largo plazo, como se identificó mediante la simulación matemática desarrollada mediante la ecuación de Gompertz. Además, este grupo de estudio presentó los valores más altos de inducción de la expresión aguda de los genes HSP70 y SOD, lo cual destaca la importancia de identificar la concentración a la cual el fitoquímico puede ser un excelente promotor de la expresión de genes relacionados con una respuesta celular efectiva ante una condición estresante a la que se sometió el modelo de estudio, como la radiación UVB y posterior tratamiento con DATS (15 μ M) lo que podría tener especial repercusión en el desarrollo de mejores capacidades de recuperación de la población.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Aidaros, A. M., El-Sherbiny, M. M., Satheesh, S., Mantha, G., Agustí, S., Carreja, B., & Duarte, C. M. (2015). Strong sensitivity of Red Sea zooplankton to UV-B radiation. *Estuaries and coasts*, 38(3), 846-853.
- Altshuler, I., Demiri, B., Xu, S., Constantin, A., Yan, N. D., & Cristescu, M. E. (2011). An integrated multi-disciplinary approach for studying multiple stressors in freshwater ecosystems: *Daphnia* as a model organism.
- Asaeda, T., & Acharya, K. (2000). Application of individual growth and population models of *Daphnia pulex* to *Daphnia magna*, *Daphnia galeata* and *Bosmina longirostris*. *Hydrobiologia*, 421(1), 141-155.
- Ariga, T., & Seki, T. (2006). Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: A review. *Biofactors*, 26(2), 93-103.
- Bases, R. (2006). Heat shock protein 70 enhanced deoxyribonucleic acid base excision repair in human leukemic cells after ionizing radiation. *Cell stress & chaperones*, 11(3), 240.
- Begon, M., & BEGON, I. E. (1990). Ecology: Individuals, populations, and communities. POR UNA EDUCACION POPULAR.
- Bender-Bojalil, D., & Bárcenas-Pozos, M. E. (2013). El ajo y sus aplicaciones en la conservación de los alimentos. *Revista Temas Selectos Ingeniera en Alimentos*, 7(1), 25-36.
- Billoir, E., Péry, A. R., & Charles, S. (2007). Integrating the lethal and sublethal effects of toxic compounds into the population dynamics of *Daphnia magna*: a combination of the DEBtox and matrix population models. *Ecological Modelling*, 203(3-4), 204-214.
- Borgeraas, J., & Hessen, D. O. (2000). UV-B induced mortality and antioxidant enzyme activities in *Daphnia magna* at different oxygen concentrations and temperatures. *Journal of Plankton Research*, 22(6), 1167-1183.
- Bownik, A. (2019). Effects of ectoine on behavioral, physiological and biochemical parameters of *Daphnia magna* exposed to dimethyl sulfoxide. *Science of The Total Environment*, 683, 193-201.
- Cerella, C.etal, (2011).Chemical properties and mechanisms determining the anti-canceraction of garlic-derived organic sulfur compounds. *Anticancer Agents Med. Chem.* 11: 267– 271
- Chen, C., Pung, D., Leong, V., Hebbar, V., Shen, G., Nair, S., ... & Kong, A. N. T. (2004). Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: effect of chemical structure and stress signals. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(10), 1578-1590.
- Cleuvers, M., Goser, B., & Ratte, H. T. (1997). Life-strategy shift by intraspecific interaction in *Daphnia magna*: change in reproduction from quantity to quality. *Oecologia*, 110(3), 337-345.
- Connelly, S. J., Moeller, R. E., Sanchez, G., & Mitchell, D. L. (2009). Temperature effects on survival and DNA repair in four freshwater cladoceran *Daphnia* species exposed to UV radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 85(1), 144-152.

- Dahms, HU, y Lee, JS (2010). Radiación UV en ectotermos marinos: efectos moleculares y respuestas. *Toxicología acuática*, 97 (1), 3-14.
- De Meester, L., Boersma, M., & Spaak, P. (1999). Environmental stress and local adaptation in *Daphnia magna*. *Limnology and Oceanography*, 44(2), 393-402.
- Diffey, B. L., Jansen, C. T., Urbach, F., & Wulf, H. C. (1997). The standard erythema dose: a new photobiological concept. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 13(1-2), 64-66.
- Diffey, B. L. (2002). Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*, 28(1), 4-13.
- Dodson S. & T. Hanazato. 1995. Commentary on effects of anthropogenic and natural organic chemicals on development, swimming behavior, and reproduction of *Daphnia*, a key member of aquatic ecosystems. *Environ. Health. Perspect.* 103 (Suppl 4):7-11.
- Fernández, C. E., & Rejas, D. (2017). Effects of UVB radiation on grazing of two cladocerans from high-altitude Andean lakes. *PloS one*, 12(4), e0174334.
- Filomeni, G., Rotilio, G., & Ciriolo, M. R. (2008). Molecular transduction mechanisms of the redox network underlying the antiproliferative effects of allyl compounds from garlic. *The Journal of nutrition*, 138(11), 2053-2057.
- Garcés Veloz, R. J. (2013). Implementación de una técnica biológica para determinar niveles de toxicidad aplicando *Daphnia magna* (Crustácea: Cladóceras) en el agua de vertiente utilizada en el sector de huachi la libertad (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Bioquímica).
- Häder, DP, Helbling, EW, Williamson, CE, y Worrest, RC (2011). Efectos de la radiación UV en los ecosistemas acuáticos e interacciones con el cambio climático. *Ciencias fotoquímicas y fotobiológicas*, 10 (2), 242-260.
- Hebert, P. D. (1978). The population biology of *Daphnia* (Crustacea, Daphnidae). *Biological Reviews*, 53(3), 387-426.
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2014). Selección de la muestra. *Metodología de la Investigación* (6ª ed., pp. 170-191). México: McGraw-Hill.
- Hernando MD, Fernández-Alba AR, Tauler R, Barcelo ´ D (2005) Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65:358–366. doi:10.1016/j.talanta.2004.07.012
- Kato, Y., Tokishita, S. I., Ohta, T., & Yamagata, H. (2004). A vitellogenin chain containing a superoxide dismutase-like domain is the major component of yolk proteins in cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Gene*, 334, 157-165.
- Khurana, N., & Sikka, S. C. (2018). Targeting crosstalk between Nrf-2, NF-κB and androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancers*, 10(10), 352.
- Kim, J., Park, Y., & Choi, K. (2009). Phototoxicity and oxidative stress responses in *Daphnia magna* under exposure to sulfathiazole and environmental level ultraviolet B irradiation. *Aquatic toxicology*, 91(1), 87-94.
- Lai KC, Kuo CL, Ho HC, Yang JS, Ma CY, Lu HF et al, (2012) Diallyl sulfide, diallyl disulfide and diallyl trisulfide affect drug resistant gene expression in colon 205 human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Phytochemistry*; 19(7): 625-30.

- Liu, Y., Zhu, P., Wang, Y., Wei, Z., Tao, L., Zhu, Z., ... & Cao, Y. (2015). Antimetastatic therapies of the polysulfide diallyl trisulfide against triple-negative breast cancer (TNBC) via suppressing MMP2/9 by blocking NF- κ B and ERK/MAPK signaling pathways. *PloS one*, 10(4), e0123781.
- Lyu, K., Zhu, X., Wang, Q., Chen, Y., & Yang, Z. (2013). Copper/zinc superoxide dismutase from the cladoceran *Daphnia magna*: Molecular cloning and expression in response to different acute environmental stressors. *Environmental science & technology*, 47(15), 8887-8893.
- Matsuda, M., Hoshino, T., Yamashita, Y., Tanaka, K. I., Maji, D., Sato, K., ... & Mizushima, T. (2010). Prevention of UVB radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *Journal of Biological Chemistry*, 285(8), 5848-5858.
- Mikulski, A., Bernatowicz, P., Grzesiuk, M., Kloc, M., & Pijanowska, J. (2011). Differential levels of stress proteins (HSPs) in male and female *Daphnia magna* in response to thermal stress: a consequence of sex-related behavioral differences?. *Journal of chemical ecology*, 37(7), 670-676.
- Na, H. K., Kim, E. H., Choi, M. A., Park, J. M., Kim, D. H., & Surh, Y. J. (2012). Diallyl trisulfide induces apoptosis in human breast cancer cells through ROS-mediated activation of JNK and AP-1. *Biochemical pharmacology*, 84(10), 1241-1250.
- Navarro C. Posibilidades terapéuticas del bulbo de ajo (*Allium sativum*), (2007); *Rev. fitoter.* 7(2): 132-35.
- Oexle, S., Jansen, M., Pauwels, K., Sommaruga, R., De Meester, L., & Stoks, R. (2016). Rapid evolution of antioxidant defence in a natural population of *Daphnia magna*. *Journal of evolutionary biology*, 29(7), 1328-1337.
- Olmedo P (2010) Estudio de diferentes fracciones y extractos de *Allium sativum* sobre la reactividad vascular, niveles de colesterol y cultivos celulares. *Revista Eureka*; 1(1): 08-14.
- Perchellet, J. P., Perchellet, E. M., & Belman, S. (1990). Inhibition of DMBA-induced mouse skin tumorigenesis by garlic oil and inhibition of two tumor-promotion stages by garlic and onion oils.
- Puccinelli, M. T., & Stan, S. D. (2017). Dietary bioactive diallyl trisulfide in cancer prevention and treatment. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1645.
- Ramírez-Concepción, H. R., Castro-Velasco, L. N., & Martínez-Santiago, E. (2016). Efectos Terapéuticos del Ajo (*Allium Sativum*). *Revista Salud y Administración*, 3(8), 39-47.
- Sánchez, A. M. B., Rojas, A. D. V., & Lugo, P. J. G. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en biomedicina*, 3(1), 25-33.
- Sander, C. S., Chang, H., Hamm, F., Elsner, P., & Thiele, J. J. (2004). Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *International journal of dermatology*, 43(5), 326-335.
- Sarma, S. S. S., Peredo-Alvarez, V. M., & Nandini, S. (2007). Comparative study of the sensitivities of neonates and adults of selected cladoceran (Cladocera:

- Crustacea) species to acute toxicity stress. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 42(10), 1449-1452.
- Seki, T., Hosono, T., Hosono-Fukao, T., Inada, K., Tanaka, R., Ogihara, J., & Ariga, T. (2008). Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17.
 - Shankar, S., Chen, Q., Ganapathy, S., Singh, K. P., & Srivastava, R. K. (2008). Diallyl trisulfide increases the effectiveness of TRAIL and inhibits prostate cancer growth in an orthotopic model: molecular mechanisms. *Molecular cancer therapeutics*, 7(8), 2328-2338.
 - Shin, D. Y., Kim, G. Y., Hwang, H. J., Kim, W. J., & Choi, Y. H. (2014). Diallyl trisulfide-induced apoptosis of bladder cancer cells is caspase-dependent and regulated by PI3K/Akt and JNK pathways. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(1), 74-83.
 - Shrotriya, S., Kundu, J. K., Na, H. K., & Surh, Y. J. (2010). Diallyl Trisulfide Inhibits Phorbol Ester-Induced Tumor Promotion, Activation of AP-1, and Expression of COX-2 in Mouse Skin by Blocking JNK and Akt Signaling. *Cancer research*, 70(5), 1932-1940.
 - Shukla, Y.; Kalra, N, (2007) Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. *Cancer Lett.*, 247,167–181.
 - Stuhlbacher, A., Bradley, M. C., Naylor, C., & Calow, P. (1993). Variation in the development of cadmium resistance in *Daphnia magna* Straus; effect of temperature, nutrition, age and genotype. *Environmental Pollution*, 80(2), 153-158.
 - Thomson, M., y Ali, M. (2003). Ajo [*Allium sativum*]: una revisión de su uso potencial como agente contra el cáncer. *Los objetivos actuales de los fármacos contra el cáncer*, 3 (1), 67-81.
 - Wang, H. C., Pao, J., Lin, S. Y., & Sheen, L. Y. (2012). Molecular mechanisms of garlic-derived allyl sulfides in the inhibition of skin cancer progression. *Annals of the New York academy of sciences*, 1271(1), 44-52.
 - Williamson, CE, Neale, PJ, Hylander, S., Rose, KC, Figueroa, FL, Robinson, SA, y Worrest, RC (2019). Los efectos interactivos del agotamiento del ozono estratosférico, la radiación UV y el cambio climático en los ecosistemas acuáticos. *Ciencias fotoquímicas y fotobiológicas*, 18 (3), 717-746.
 - Wu, X. J., Hu, Y., Lamy, E., & Mersch-Sundermann, V. (2009). Apoptosis induction in human lung adenocarcinoma cells by oil-soluble allyl sulfides: Triggers, pathways, and modulators. *Environmental and molecular mutagenesis*, 50(3), 266-275.
 - Xiao, D., Choi, S., Johnson, D. E., Vogel, V. G., Johnson, C. S., Trump, D. L., ... & Singh, S. V. (2004). Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2. *Oncogene*, 23(33), 5594.
 - Zhao, CM, y Wang, WX (2012). Importancia de los recubrimientos superficiales y la plata soluble en nanopartículas de plata. *Toxicidad para Daphnia magna*. *Nanotoxicología* 6 (4), 361-370