



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”*

Descripción del comportamiento poblacional de *Daphnia magna* en presencia de los factores estresantes oxitetraciclina y radiación UV-B mediante modelado matemático.

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**YESSICA ALEJANDRA LINAREZ GONZÁLEZ**

Director de tesis:

Dr. Ricardo Darío Peña Moreno

Diciembre 2019



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”*

Descripción del comportamiento poblacional de *Daphnia magna* en presencia de los factores estresantes oxitetraciclina y radicación UV-B mediante modelado matemático.

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**YESSICA ALEJANDRA LINAREZ GONZÁLEZ**

Comité tutorial:

Director	Dr. Ricardo Darío Peña Moreno
Co-directora	Dra. Laura Morales Lara
Tutora	Dra. Elsa Iracena Castañeda Roldán
Integrante Comité Tutorial	Dra. Gladys Linares Fleites
Integrante Comité Tutorial	Dr. José Luis Garate Morales

Diciembre 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)*

*Por concederme la beca para la realización de mis estudios de Maestría.*

*Al Dr. Ricardo Darío Peña Moreno y Dra. Laura Morales Lara por su orientación y apoyo durante la realización de este trabajo de investigación y por contribuir de sobremanera a mi crecimiento profesional.*

*A los integrantes del Comité Tutorial, por sus valiosas aportaciones en la realización del presente trabajo de tesis.*

*Dra. Gladys Linares Fleites*

*Dr. José Luis Gárate Morales*

*Dra. Elsa Iracena Castañeda Roldán.*

*Al posgrado en Ciencias Ambientales y a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por aceptarme y por todas las facilidades otorgadas que permitieron mi formación académica en Ciencias Ambientales. De igual forma, agradezco a los profesores del posgrado por compartir sus conocimientos conmigo, apoyarme y exhortarme a la superación profesional, sus palabras me dieron la fuerza para continuar.*

## ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	4
II. JUSTIFICACIÓN .....	6
III. MARCO DE REFERENCIA .....	7
<b>3.1 Aspectos generales de la OTC.....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.1 Usos más comunes de la OTC.....</b>	<b>8</b>
<b>3.1.2 Consumo de OTC a nivel mundial.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Incidencia de OTC en el ambiente .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2.1 Presencia de OTC en agua dulce .....</b>	<b>11</b>
<b>3.3 Fotosensibilidad de OTC.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3.1 Radiación solar ultravioleta B (UV-B) .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3.2 Productos de degradación de OTC.....</b>	<b>13</b>
<b>3.4 Organismo modelo empleado para evaluar la sensibilidad a OTC.....</b>	<b>14</b>
<b>3.4.1 Características de <i>Daphnia magna</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>3.4.2 Historia de vida de <i>Daphnia magna</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4.3 Ciclo reproductor.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4.4 Genómica ecológica y <i>Daphnia magna</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>3.5 Modelación matemática.....</b>	<b>18</b>
<b>3.6 Marco Conceptual .....</b>	<b>20</b>
<b>3.6.1. Tipo de Investigación .....</b>	<b>20</b>
<b>3.6.2 Paradigma .....</b>	<b>21</b>
<b>3.6.3 Enfoque Epistemológico.....</b>	<b>21</b>
<b>3.6.4 Teorías que soportan la investigación.....</b>	<b>22</b>
<b>3.7 Marco Legal .....</b>	<b>22</b>
<b>3.7.1 Ley de Aguas Nacionales.....</b>	<b>22</b>
<b>3.7.2 Normas Mexicanas .....</b>	<b>23</b>
IV. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	24
<b>4.1 Pregunta de investigación.....</b>	<b>24</b>
V. HIPÓTESIS.....	24
<b>5.1 Hipótesis general .....</b>	<b>24</b>
VI. OBJETIVOS.....	24

6.1 Objetivo general .....	24
6.2 Objetivos específicos .....	24
VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....	25
7.1 Diagrama de trabajo.....	25
7.2 Estandarización de las condiciones de cultivo para <i>Daphnia magna</i> ...	25
7.3 Evaluación de los efectos de la OTC y radiación UV-B .....	26
7.3.1 Cálculo de dosis subletal de OTC .....	26
7.3.2 Cálculo de dosis para UV-B .....	27
7.3.3 Ensayo crónico .....	27
7.3.4 Análisis de expresión genética.....	28
7.3.4.1 Conservación y mantenimiento de las muestras.....	28
7.3.4.2 Extracción de ARN.....	28
7.3.4.3 Síntesis de ADNc .....	29
7.3.4.4 Amplificación de ADNc .....	29
7.3.4.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	29
7.6 Análisis estadístico.....	30
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
8.1 Identificación del desarrollo poblacional a concentraciones subletales de OTC .....	31
8.2 Toxicidad en <i>Daphnia magna</i> inducida por radiación UV-B.....	33
8.3 Cinética de fotodegradación de OTC .....	36
8.4 Caracterización de los efectos inducidos por los factores estresantes OTC y radiación UV-B en la población de <i>Daphnia magna</i> .....	39
8.5 Descripción del comportamiento poblacional de <i>Daphnia magna</i> mediante modelo matemático.....	45
8.6 Cambios en los perfiles de expresión genética de vitelogenina en <i>Daphnia magna</i> inducidos por la exposición a OTC y radiación UV-B .....	48
8.7 Descripción matemática del desarrollo poblacional de <i>Daphnia magna</i> a partir de cambios en los perfiles de expresión genética.....	51
IX CONCLUSIONES .....	54
XI LITERATURA CITADA.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de la OTC y sitios de quelación.....	7
<b>Figura 2.</b> Países en los que se ha detectado la presencia de antimicrobianos en aguas superficiales. .....	12
<b>Figura 3.</b> Estructura de la OTC y sus productos de degradación 4-epi-OTC (EOTC), $\alpha$ -Apo-OTC ( $\alpha$ -Apo-OTC) y $\beta$ -Apo-OTC ( $\beta$ -Apo-OTC).....	16
<b>Figura 4.</b> Ciclo reproductor del género <i>Daphnia</i> . ....	17
<b>Figura 5.</b> Tasa finita de crecimiento poblacional de <i>Daphnia magna</i> dependiente de la concentración después de una exposición de 28 días a OTC.....	32
<b>Figura 6.</b> Distribución de las poblaciones de <i>Daphnia magna</i> en tres clases (estructura poblacional) después de una exposición de 28 días a OTC.....	33
<b>Figura 7.</b> Prueba de toxicidad con <i>Daphnia magna</i> ante radiación UV-B a diferentes tiempos y alturas de exposición.....	35
<b>Figura 8.</b> Cinética de primer orden de fotodegradación OTC 0.025 mg/L en cuatro diferentes condiciones.....	37
<b>Figura 9.</b> Cinética de degradación de OTC en cuatro diferentes condiciones .....	38
<b>Figura 10.</b> Número de días transcurrido hasta la primera puesta .....	41
<b>Figura 11.</b> Reproducción total al finalizar los experimentos.....	42
<b>Figura 12.</b> Promedio de neonatos por hembra (fecundidad).....	42
<b>Figura 13.</b> Número total de mudas al final del experimento .....	44
<b>Figura 14.</b> Distribución de las poblaciones de <i>Daphnia magna</i> en tres clases (estructura poblacional) al finalizar el periodo de experimentos.....	44
<b>Figura 15.</b> Representación gráfica del ciclo de vida de <i>Daphnia magna</i> .....	45
<b>Figura 16.</b> Simulación de la estructura y crecimiento poblacional de <i>Daphnia magna</i> en condiciones de control.....	46
<b>Figura 17.</b> Simulación de la estructura y crecimiento poblacional de <i>Daphnia magna</i> con una población expuesta a radiación UV-B y OTC.....	47
<b>Figura 18.</b> Simulación de la dinámica poblacional de <i>Daphnia magna</i> para el grupo control y para el grupo sometido OTC y UV-B.....	48
<b>Figura 19.</b> Comparativo de los cambios en la expresión del gen de vitelogenina para los tres tratamientos y el grupo control en cuatro cortes de tiempo .....	50
<b>Figura 20.</b> Comparativo de los cambios en la expresión del gen de vitelogenina y el número de mudas para el grupo sometido a OTC y radiación UV-B en cuatro cortes de tiempo.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Agentes antimicrobianos usados en animales por países miembros de la OIE durante el periodo de 2010-2015 .....	9
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos para expresión en <i>Daphnia magna</i> .....	29
<b>Tabla 3.</b> Reproducción y supervivencia de <i>Daphnia magna</i> después de una exposición de OTC durante 28 días.....	31
<b>Tabla 4.</b> Cinética de fotodegradación de OTC en cuatro diferentes condiciones.....	37
<b>Tabla 5.</b> Reproducción y supervivencia de <i>Daphnia magna</i> después de 21 días de ensayo .....	40

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, uno de los problemas más significativos en la protección del medio ambiente es la contaminación de cuerpos de agua que origina un desequilibrio en dichos ecosistemas al alterar parámetros de calidad como el pH, temperatura, oxígeno disuelto, entre otros. Aunado a ello está el aumento en los niveles de radiación ultravioleta debido al agotamiento del ozono estratosférico, especialmente la región UV-B (320 – 280 nm) del espectro electromagnético que puede penetrar a una profundidad de hasta 33 metros en aguas dulces (Rhode *et al.*, 2001) y, como se ha demostrado, existe una gran variedad de contaminantes químicos que se tornan más tóxicos en presencia de dicha radiación deteriorando las condiciones adecuadas para la sobrevivencia de plantas y animales acuáticos, provocando cambios en su reproducción, desarrollo, comportamiento y supervivencia (Kim *et al.*, 2009).

Entre los contaminantes comúnmente descargados a los cuerpos de agua que generan gran preocupación dado los efectos adversos que ocasionan tanto a ecosistemas acuáticos como terrestres incluyendo al humano, se encuentran los antibióticos como oxitetraciclina (OTC), antibiótico de amplio espectro que pertenece a la familia de las tetraciclinas cuyo uso destaca en la acuicultura y ganadería, en donde comúnmente se emplea como promotor del crecimiento y profiláctico. El vasto uso de este antibiótico contribuye a su liberación en el medio acuícola ya sea a través del excremento u orina de los animales que los consumen, o vertido directamente al medio como ocurre en el caso de las actividades acuícolas (Tasho y Cho 2016).

Una vez en el agua, la OTC sufre fotodegradación por efecto de la luz solar generando una disminución en su capacidad antimicrobiana; sin embargo, la toxicidad persiste aún sin el compuesto original. De ahí que en los últimos años se haya incrementado el interés en la identificación de los efectos adversos que la presencia de estos compuestos, en interacción con factores ambientales, puede generar en los organismos y su ecosistema (Loke *et al.*, 2003).

Diversos estudios relacionados con la evaluación de efectos adversos de contaminantes en sistemas acuáticos se han realizado en organismos modelo como el cladóceros *Daphnia magna* (*D. magna*), especie ampliamente reconocida por su papel en estudios de la calidad del agua. Se ha considerado su importancia en ecosistemas de agua dulce debido a que es miembro clave de la cadena trófica y consumidor selectivo de algas. Este modelo animal tiene diversas características de historia de vida que pueden ser registradas con cierta facilidad como su tamaño corporal, ciclo de vida corto, alta fecundidad, y quizás lo más destacable por ser una respuesta clara ante condiciones adversas es su reproducción por partenogénesis cíclica (Eads *et al.*, 2008).

Por lo que es importante estudiar los efectos dañinos que generan compuestos químicos fotosensibles en bioindicadores como son los organismos modelo que permiten medir las respuestas fisiológicas, bioquímicas y de expresión genética que se presentan a nivel celular, individual y/o poblacional (Hyne *et al.*, 2003), los cuales bajo condiciones controladas generan resultados que pueden ser modelados matemáticamente, para explicar la dinámica poblacional del modelo de estudio, en relación con factores estresantes que generan fluctuaciones en la capacidad de carga de su entorno permitiendo describir la evolución temporal de la población como parámetro de alerta (Nevesa *et al.*, 2015). La construcción de modelos matemáticos tiene como objetivo predecir los efectos biológicos ocasionados por las descargas de estos contaminantes ante la exposición UV-B. El desarrollo de estas herramientas tiene utilidad en el planteamiento de estrategias que anticipen posibles daños ecológicos, estableciendo medidas eficientes y rápidas de evaluación y protección de los sistemas ecológicos ante estresores ambientales.

## II. JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado de contaminantes químicos como los antibióticos del tipo de las tetraciclinas en específico la OTC ha generado su detección en cuerpos de agua en diversos lugares del mundo, por lo que ha llamado la atención evaluar su impacto en estos ecosistemas, así como los efectos que pudiera generar la radiación solar principalmente la región del UV-B en organismos modelo acuáticos como *Daphnia magna*, importante elemento que conforma las bases de la cadena alimenticia y cuyo papel como bioindicador en la calidad de cuerpos de agua dulce ha sido ampliamente reconocido. Más allá de desarrollar estudios que evalúen cuantitativamente diferentes aspectos de los efectos dañinos ocasionados por diversos factores que alteran el equilibrio del medio ambiente en modelos animales, es de gran importancia considerar el efecto de contaminantes químicos como OTC y de factores abióticos como la radiación UV-B en el desarrollo poblacional de estos indicadores mediante modelado matemático a fin de predecir el comportamiento poblacional y, por tanto, anticipar posibles riesgos que promuevan la afectación de ecosistemas acuáticos.

### III. MARCO DE REFERENCIA

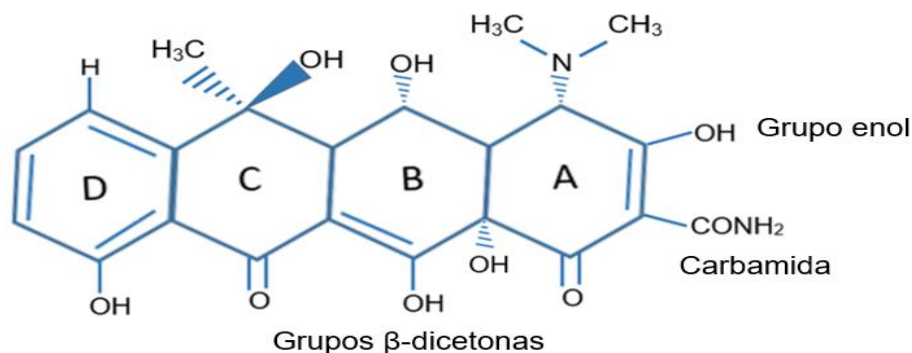
#### 3.1 Aspectos generales de la OTC

Las tetraciclinas (TC) fueron descubiertas en la década de 1940 como resultado de la necesidad de nuevos y potentes fármacos, son una familia de antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas y son agentes de amplio espectro que muestran actividad contra diversidad de bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, clamidias, micoplasmas y rickettsias, y parásitos protozoarios (Chopra y Roberts, 2001).

En 1948 surge el primer miembro de la familia de las tetraciclinas, la Clortetraciclina, dos años más tarde aparece la OTC obtenida a partir de *Streptomyces rimosus* presentes en muestras de suelos de diferentes partes del mundo (Rodríguez *et al*, 1998).

La OTC es soluble en agua (100 g/L) a 20 °C, y se disuelve en soluciones ácidas y básicas. Su punto de fusión es 180 °C, temperatura por encima de la cual se degrada. Posee tres constantes de disociación relacionadas con los grupos funcionales que se muestran en la figura 1. Su característico color amarillo está basado en el anillo cromóforo BCD que absorbe a una longitud de onda de 365 nm y uno más en el anillo A que absorbe a 260 nm (González, 2016).

Por otro lado, las tetraciclinas son fuertes agentes quelantes gracias a los grupos funcionales que se encuentran unidos al anillo A, *Figura 1*, esta propiedad influye en su actividad antimicrobiana y farmacocinética (Chopra y Roberts, 2001).



**Figura 1.** Estructura química de la OTC (OTC) y sitios de quelación.

### 3.1.1 Usos más comunes de la OTC

Actualmente la OTC es uno de los antibióticos más utilizado alrededor del mundo por ser económico, de amplio espectro y fácil de manejar (Gallina *et al.*, 2008). Así, este fármaco puede ser empleado tanto en medicina humana y veterinaria, en agricultura para el control del “fuego bacteriano” en manzanos, perales y árboles ornamentales (González, 2016) y en acuicultura con el propósito de prevenir o tratar infecciones microbianas.

En medicina humana, la OTC se emplea para combatir infecciones del tracto respiratorio originadas por cepas sensibles de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otros microorganismos (Mensa *et al.*, 2008).

También es un antibiótico recurrente en tratamiento de infecciones bacterianas externas del ojo tales como orzuelos, conjuntivitis y blefaritis, de igual forma en la profilaxis de la conjuntivitis neonatal por *Neisseria gonorrhoeae* o *Chlamydia trachomatis* (Asociación Española de Pediatría [AEP], 2015).

Por otro lado, la OTC se comercializa en distintas presentaciones que van desde alimentos premezclados hasta inyectables, tabletas y polvos solubles principalmente para uso veterinario (Food and Agriculture Organization [FAO], 2002) dado que permite combatir organismos causantes de infecciones, como *Mycoplasma pneumoniae*, *Pasteurella pestis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* y *Diplococcus pneumoniae*. Por el contrario, también es promotor del crecimiento animal mejorando la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia (Mendoza *et al.*, 2008).

De igual forma, entre las drogas más utilizadas para la prevención y control de enfermedades en peces destaca la OTC utilizada para tratar la septicemia hemorrágica bacteriana, úlceras, forunculosis y enfermedades causadas por *Pseudomonas* en salmónidos, bagre y langostas (Dang *et al.*, 2007).

### 3.1.2 Consumo de OTC a nivel mundial

Debido a sus múltiples usos la OTC se ha convertido en un compuesto de amplio consumo para la industria ganadera y el sector acuícola. De hecho, cada año, la producción mundial de tetraciclinas, entre las que se encuentra la OTC, se estima en miles de toneladas ocupando el segundo lugar en producción y consumo (Daghrir y Drogui, 2013).

Durante el periodo de 2010 a 2015 la FAO publicó un reporte con estadísticas obtenidas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) acerca del consumo de tetraciclinas en el mundo, que permite obtener un panorama acerca del uso de OTC, como miembro importante del grupo de las tetraciclinas. En la *Tabla 1* se puede observar el porcentaje de uso de diferentes agentes microbianos usados en animales, que reportan países de los distintos continentes miembros de la FAO. Así, el informe concluye que de un total 130 países miembros, 89 reportaron el uso de antibióticos en animales, siendo el grupo de las tetraciclinas el más utilizado en países de América (43%), África (63%) y Europa (34%) en comparación con antibióticos como penicilinas, macrólidos, sulfonamidas, polipéptidos y fluoroquinolonas (OIE, 2016).

*Tabla 1. Agentes antimicrobianos usados en animales por países miembros de la OIE 2010-2015*

	Número de países miembros	Tetraciclinas (%)	Penicilina (%)	Macrólidos (%)	Sulfonamidas (%)	Polipéptidos (%)	Fluoroquinolonas (%)	Otros (%)
<b>América</b>	9	43	7	19	6	5	2	18
<b>Asia</b>	17	17	8	5	32	5	7	26
<b>África</b>	27	63	3	17	2	4	6	5
<b>Europa</b>	34	34	25	7	14	6	2	12

Adaptado del *Annual report on the use of antimicrobial agents in animals*. OIE, 2016.

Es importante señalar que en África el 63% de los antibióticos usados en animales pertenecen al grupo de las TC, en contraste con el 17% reportado en Asia, lo cual podría atribuirse al establecimiento de una nueva generación de normas que permiten un mayor control en el uso de antibióticos, sin embargo, también es

necesario considerar que de los 62 de países que se encuentran en el continente asiático, sólo 17 son miembros de la OIE (OIE, 2016).

Análogamente, en Europa antibióticos del grupo de las TC son de los más empleados para uso animal, con respecto a otros antibióticos, y se reporta que más de 2,500 toneladas de tetraciclinas son consumidas anualmente con fines veterinarios (Daghrir y Drogui, 2013).

De manera similar, en América, las TC son los antibióticos que más se usan, así como en Europa y África, sin embargo, este reporte aún puede ser subestimado debido a que sólo considera el reporte de 9 países miembros de la OIE, entre ellos México, sin consideran a los 21 países restantes, por lo que el 43% registrado podría ser aún mayor. Este alto consumo de TC en los 9 países americanos podría estar relacionado con varios factores, como el bajo costo de estos antibióticos aunado a los presupuestos de salud limitados y los escasos recursos económicos de la población, situación que comúnmente se presenta en países en vías de desarrollo (Daghrir y Drogui, 2013). Otra de las razones podría situarse en la flexibilidad en las políticas de monitoreo en el uso de medicamentos veterinarios (OIE, 2016).

De esta manera, los datos reportados por instituciones internacionales demuestran el elevado consumo de las tetraciclinas a nivel mundial en comparación con otros agentes antimicrobianos, tan sólo en animales. Este consumo elevado tiene repercusiones importantes y graves en el ambiente, debido a que las descargas de aguas residuales contaminan y afectan tanto a ecosistemas acuáticos, como a las cadenas alimenticias que derivan de ellos. Lo que hace necesario encaminar esfuerzos en el estudio de las consecuencias que desencadena la presencia de los miembros de este grupo de antibióticos como lo es la OTC, así como considerar efectos adversos por las interacciones del medio ambiente como luz UV en estos compuestos fotosensibles (Avisar *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009)

### **3.2 Incidencia de OTC en el ambiente**

En las últimas décadas, el uso indiscriminado de OTC ha promovido su presencia en diferentes estratos del medio ambiente. Recientemente, se ha reportado su

liberación de forma activa al medio a través de las excreciones humanas y animales (Tasho y Cho, 2015). Así, los antibióticos utilizados en la agricultura animal pueden ingresar al medio ambiente a través de varias rutas, en el caso de suelos destaca la aplicación de estiércol como abono lo cual favorece la absorción de las tetraciclinas en las arcillas del suelo encontrándose concentraciones de OTC de hasta 1691  $\mu\text{g} / \text{kg}$  de suelo (Chee-Sanford *et al.*, 2009).

En aguas este antibiótico se encuentra entre los llamados "microcontaminantes emergentes" y su presencia en lagos, ríos y aguas subterráneas es innegable (Avisar *et al.*, 2009).

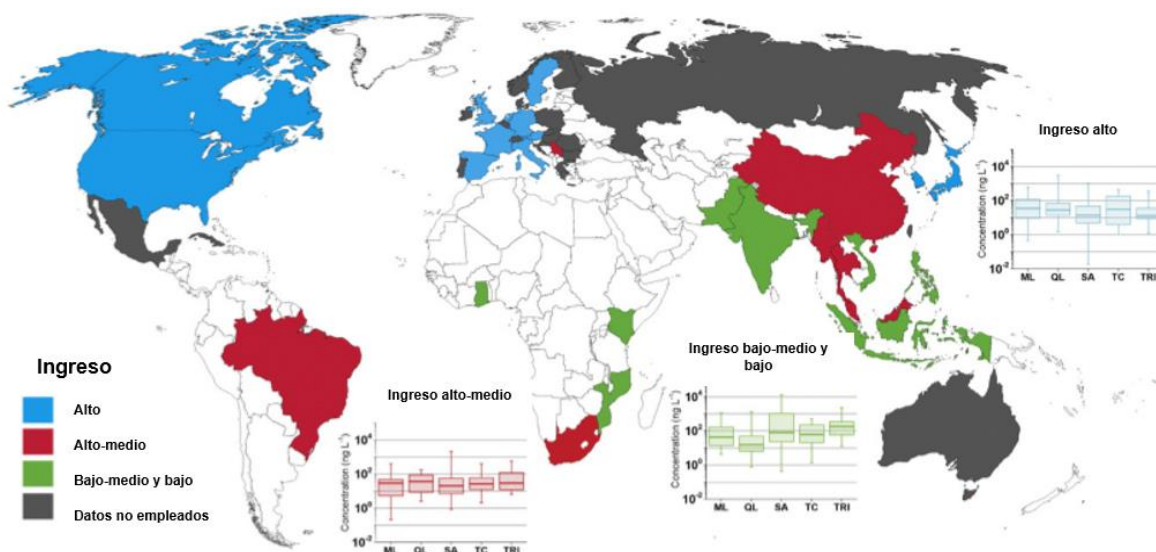
### **3.2.1 Presencia de OTC en agua dulce**

La introducción de antibióticos en el agua dulce puede tener lugar por diferentes rutas; sin embargo, las principales se dan a través de los efluentes provenientes de las plantas tratadoras, las operaciones de alimentación animal confinadas y la escorrentía en los vertederos (Avisar, *et al.*, 2009).

Una vez que la OTC ha sido administrada, una fracción de este antibiótico se metaboliza en compuestos inactivos, no obstante, una proporción puede ser excretada ya sea en su forma original o como metabolitos activos, que varía dependiendo del organismo administrado. Así, una parte importante de OTC puede ser liberada a través de la orina, heces y/o estiércol de humanos y animales, actualmente se ha reportado que del 25 al 90% de la tetraciclina administrada a animales se excreta y libera en forma activa al medio ambiente a través de orina y heces (Jemba, 2006).

Por otro lado, los ambientes acuáticos también son contaminados debido a las prácticas comunes en la producción de peces, en donde el uso de sistemas de recirculación facilita la acumulación de OTC en sedimentos formando quelatos con cationes divalentes presentes en arenas de biofiltros así como en los mismos sedimentos, que a su vez contienen heces de pescado y alimento no consumido, lo que contribuye a la presencia de OTC en las descargas, reportándose cantidades de hasta 2.2 g por día (Bebak-Williamsa *et al.*, 2002).

No obstante, la presencia de OTC no sólo se ha detectado en sedimentos de ecosistemas acuáticos, estudios recientes han reportado la presencia de tetraciclinas y otros antibióticos en aguas superficiales contaminadas. Así, como se muestra en la *Figura 2*, en países con ingresos bajo-medio y bajo, la concentración promedio de antibióticos en estos compartimentos ambientales es de 3.2 hasta 39.2 veces superior a la identificada en países con ingresos económicos elevados. En cambio, en poblaciones con ingreso medio-alto la concentración promedio de estos contaminantes es 1 a 14.9 veces mayor, lo que pone de manifiesto la estrecha relación entre la economía de los países y el consumo desmedido de antibióticos ya que países con menores recursos económicos tienden a emplear a los antimicrobianos con mayor frecuencia e intensidad lo que genera aumentos en las concentraciones de estos contaminantes en las aguas (Segura *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Países en los que se ha detectado la presencia de antimicrobianos en aguas superficiales. La línea central de los diagramas de caja muestra la concentración promedio de macrólidos = ML, quinolonas = QL, sulfonamidas =SA, tetraciclina = TC y trimetoprima = TRI. Tomado de Segura, *et al.* (2015).

Si bien estos reportes comprueban que las descargas de antibióticos en ambientes acuáticos son alarmantes, otras investigaciones se han dirigido a la identificación

de la variedad de efectos adversos, tanto agudos como crónicos en los ecosistemas acuáticos.

### **3.3 Fotosensibilidad de OTC**

#### **3.3.1 Radiación solar ultravioleta B (UV-B)**

En los últimos años un número creciente de estaciones y redes de monitoreo ambiental han reportado un aumento en la incidencia de la radiación UV-B solar en la superficie terrestre debido al agotamiento del ozono estratosférico. A su vez, estudios comparativos indican que tal incremento está relacionado con cambios estacionales y diferencias geográficas.

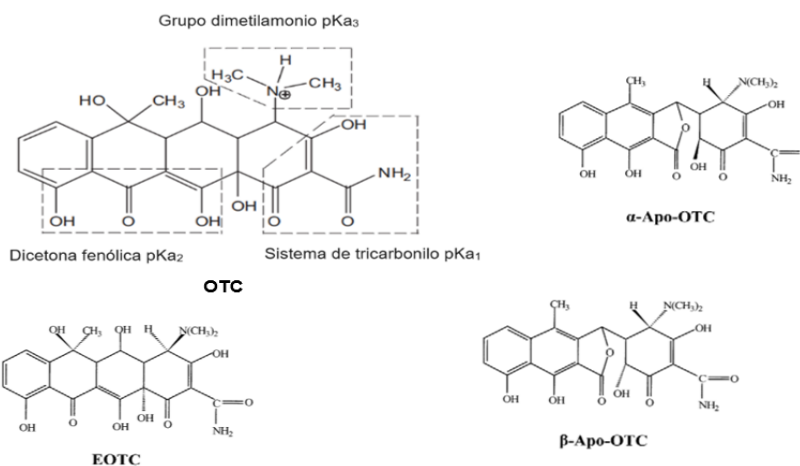
Para los ecosistemas de agua dulce la transmisión de la radiación UV solar estará en función de sus propiedades ópticas; sin embargo, se sabe que la radiación UV-B llega a penetrar a una profundidad de entre 0.6 a 14 m afectando negativamente a los organismos acuáticos al disminuir su productividad, reproducción, desarrollo y aumentando la tasa de mutación para especies como el fitoplancton, el zooplancton, las macroalgas, los huevos de peces y larvas (Hader *et al.*, 2007).

Aunado a ello están las inminentes interacciones entre los contaminantes presentes en este tipo de ecosistemas y la radiación solar acrecentando la respuesta tóxica del contaminante, tal es el caso de la OTC cuya estructura cíclica le confiere capacidad para absorber fotones de radiación ultravioleta (Bonet *et al.*, 2011) con la consecuente generación de productos de degradación ocasionados por cambios en su estructura (Fatta-Kassinos *et al.*, 2011).

#### **3.3.2 Productos de degradación de OTC**

La OTC, como se muestra en la *Figura 3*, tiene tres valores de pKa correspondientes a 3.57 en el sistema de tricarbonilo ionizado, 7.49 en el grupo dicetona fenólica y 9.88 en el grupo dimetilamonio, lo que puede conducir a diferentes resultados en su descomposición cuando se encuentra en solución acuosa a diferentes valores de pH (Liu *et al.*, 2015).

Lo anterior ha sido demostrado recientemente por medio de fotólisis y degradación fotocatalítica con luz solar, la cual mejoró ligeramente con el aumento del pH (Liu *et al.*, 2015). Los productos de degradación resultantes son: 4-epi-OTC,  $\alpha$ -Apo-OTC y  $\beta$ -Apo-OTC los cuales tienen un mayor grado de toxicidad en comparación con el compuesto original (Nguyen *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Estructura de la OTC (OTC) y sus productos de degradación 4-epi-OTC (EOTC),  $\alpha$ -Apo-OTC ( $\alpha$ -Apo-OTC) y  $\beta$ -Apo-OTC ( $\beta$ -Apo-OTC). Adaptado de Liu, *et al.* (2015) y Loke, *et al.* (2003).

### 3.4 Organismo modelo empleado para evaluar la sensibilidad a OTC

Como resultado de la creciente incidencia de contaminantes en los ecosistemas acuáticos se han desarrollado técnicas de monitoreo para mejorar la capacidad en la detección de contaminantes en menos tiempo y en concentraciones más bajas. El monitoreo biológico o biomonitoreo es una valiosa herramienta de evaluación en la calidad del agua que considera los cambios del entorno en función de las respuestas biológicas de ciertos organismos modelo, los cuales muestran características especiales que los hacen ideales para el biomonitoreo de la contaminación en ecosistema en comparación con los demás organismos del mismo hábitat (Le *et al.*, 2016).

Esta herramienta considera los cambios bioquímicos, genéticos, morfológicos y fisiológicos en las especies indicadoras como resultado de su interacción con factores ambientales estresantes particulares. *Daphnia magna*, un crustáceo de

agua dulce, ha sido ampliamente utilizado como un organismo modelo para las pruebas de toxicidad y sus reacciones toxicológicas a los contaminantes ambientales como las TC (Le *et al.*, 2016).

De hecho, estudios recientes han determinado los efectos de la OTC en la mortalidad de los daphnidos calculando la  $CE_{50}$  (313 mg/L) a las 48 horas (Kolar *et al.*, 2014). De igual manera se ha determinado la toxicidad aguda y crónica de la OTC en *D. magna* donde se ha observado el efecto tóxico en su reproducción a concentraciones por debajo de los niveles tóxicos agudos (Wollenberger *et al.*, 2000).

Por otro lado, también se han estudiado los efectos de la exposición de *Daphnia magna* a tetraciclina, monitoreando parámetros de supervivencia, reproducción y crecimiento. En este estudio se demostró que la tetraciclina puede inducir respuestas generales sobre la reproducción y el crecimiento somático de *D. magna*. Además, el valor de la tasa de crecimiento poblacional se redujo en subsecuentes generaciones lo que advierte de riesgos en la existencia a largo plazo (Kim *et al.*, 2009).

#### **3.4.1 Características de *Daphnia magna***

*Daphnia magna* pertenece al grupo arthropoda, branchiopoda y a la familia *daphniidae*, incluida en la clase Crustacea. Son organismos propios de ambientes dulceacuícolas y se localizan en las capas superficiales de agua dulce, así como en hábitats efímeros, principalmente estanques con una versatilidad espacial y temporal en relación con los factores abióticos (Nevesa *et al.*, 2015).

Con respecto a su anatomía, presenta una forma similar a la de un riñón y posee un solo ojo compuesto que se encuentra dentro de la región de la cabeza en el caparazón transparente (Antunes y Castro 2017). Cuenta con dos antenas doblemente ramificadas localizadas a la mitad del cuerpo las cuales usa para nadar. Sus extremidades aplanadas dentro del caparazón (piernas torácicas) son utilizadas para generar una corriente de agua que transporta comida y oxígeno a la boca y

branquias (Gorokhova *et al.*, 2015). Su cuerpo está segmentado en tres regiones (céfalon, péreion y pleon). Desde el tagma cefálico se extiende un caparazón que cubre el resto del cuerpo, por debajo de éste, las hembras tienen la cámara dorsal de incubación donde se producen los huevos que son incubados hasta eclosionar como individuos (neonatos) que después de ser liberados de la cámara, mudan y lucen como adultos en miniatura (Mittmann *et al.*, 2014).

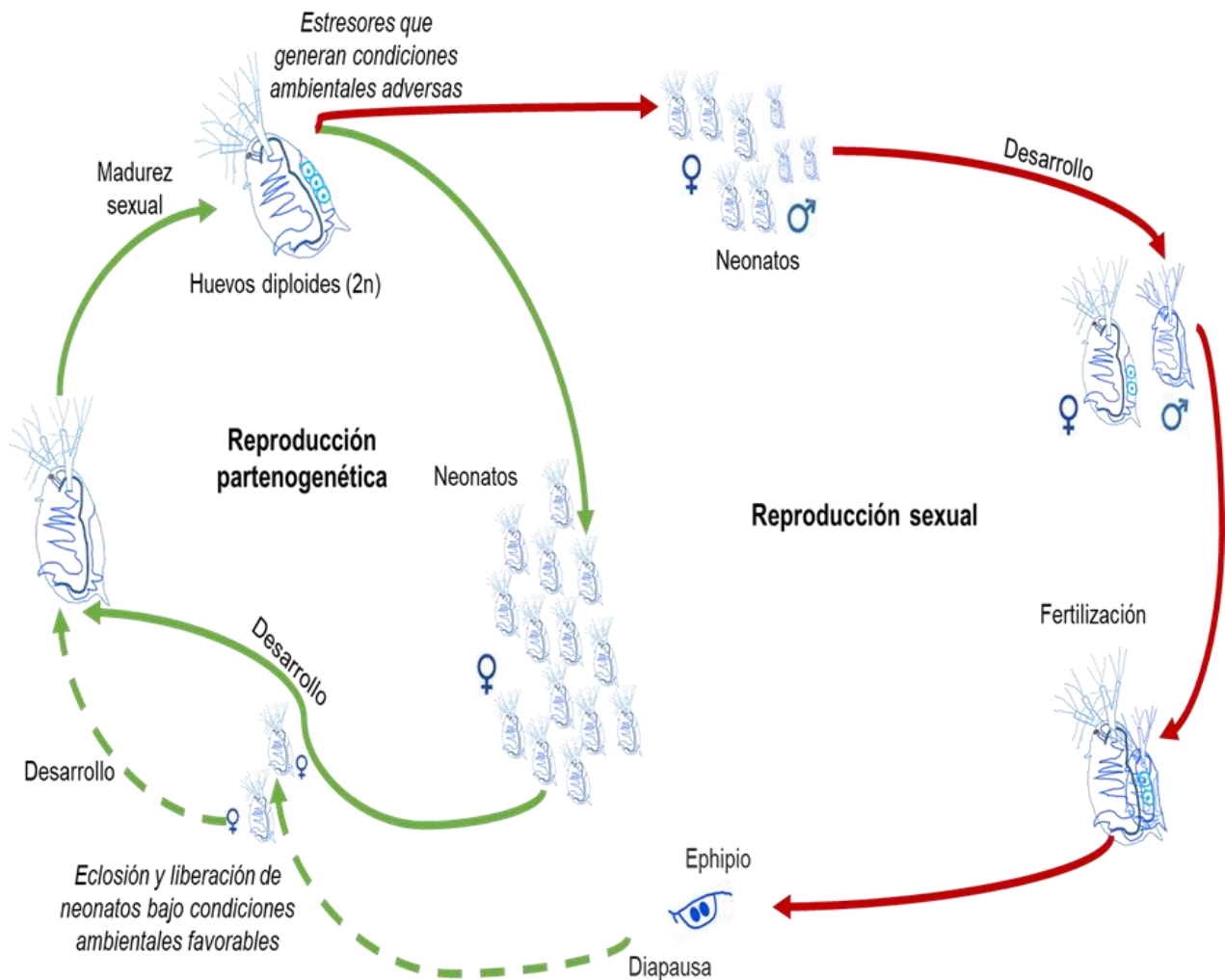
### **3.4.2 Historia de vida de *Daphnia magna***

La historia de vida es el patrón de los sucesos de supervivencia y reproducción típicos de una especie. Para el particular caso de *D. magna*, esta historia queda sujeta, en gran parte, a su morfología y comportamiento puesto que algunas características como el tamaño corporal, tiempo en alcanzar la madurez sexual, tasa de crecimiento poblacional y reproducción partenogenética la hacen un miembro clave en los ecosistemas de agua dulce ocupando una posición central en la cadena alimentaria (Dodson *et al.*, 1995).

Cualquier cambio en dichas características reflejará los daños tóxicos que presenta el ecosistema acuático. Por ejemplo, variaciones en el tamaño corporal ocasionarían una disminución en la tasa alimentaria, convirtiéndolos en consumidores menos eficientes y por tanto una reducción en la calidad del agua por abundancia de algas (Antunes y Castro 2017).

### **3.4.3 Ciclo reproductor**

La mayoría de las especies de *Daphnia* tienen una estrategia reproductiva conocida como partenogénesis facultativa. Tal como se aprecia en la *Figura 4*, el ciclo partenogenético ocurre cuando las hembras se reproducen clónicamente bajo condiciones favorables, o bien durante la temporada de crecimiento del verano (Decaestecker *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Ciclo reproductor del género *Daphnia*. Reproducción partenogenética en verde y reproducción sexual en rojo.

Sin embargo, ante condiciones ambientales desfavorables, éstas cambian a un modo de reproducción sexual, favoreciendo la producción de machos y huevos haploides denominados ehipium, los cuales serán fecundados y permanecerán envueltos por un ensanchamiento del caparazón. Después de ser liberados los ehipios pueden subsistir en largos periodos de diapausa soportando condiciones ambientales severas y solamente eclosionarán cuando dichas condiciones vuelvan a ser favorables. Es importante mencionar que la eclosión resultará en la liberación

de hembras capaces de reproducirse mediante partenogénesis (Decaestecker *et al.*, 2011).

De esta forma, el ciclo reproductivo previamente descrito, aunado a un corto ciclo de vida facilita el desarrollo de experimentos evaluando el efecto de contaminantes a largo plazo y en diferentes generaciones disminuyendo la variabilidad de resultados.

#### **3.4.4 Genómica ecológica y *Daphnia magna***

En la actualidad, la ecotoxicología muestran a los perfiles de expresión genética como una herramienta sensible y específica para el monitoreo ambiental, de ello deriva la genómica ecológica que corresponde al estudio de la adaptación de las poblaciones a su entorno incluyendo los procesos a nivel de organismo y de población por medio de la organización y función del genoma. Estos estudios se realizan en organismos cuya ecología y ciclo de vida han sido bien estudiados y comprendidos, tal es el caso de *Daphnia magna* que recientemente ha destacado como modelo genómico. En este sentido, *D. magna* es indispensable para explicar los cambios en los perfiles de expresión genética en relación a los factores estresantes propios de las perturbaciones ambientales (Eads *et al.*, 2008). Algunas de estas expresiones y su relación con los factores estresantes han sido estudiadas por diversos autores. Así, se reportan resultados para el gen de  $\beta$ -actina que codifica una de las seis proteínas de actina diferentes, la cual es un componente importante del aparato contráctil y del citoesqueleto que se expresan de forma ubicua (Druga *et al.*, 2016) y el gen de vitelogenina asociado a la reproducción y el crecimiento corporal de los daphnidos (Soetaert *et al.*, 2007).

### **3.5 Modelación matemática**

La modelación matemática es una metodología sistemática de éxito comprobado en el descubrimiento y entendimiento de los procesos y efectos subyacentes en la naturaleza basada en sus partes observables y sus relaciones. En los últimos años,

esta herramienta ha sido utilizada de forma habitual en diversas disciplinas que buscan explicar o reproducir los fenómenos estudiados (Bustos, 2004).

Sobre la misma línea, la modelación de procesos ambientales ha tomado un auge pues permite determinar los resultados o predecir lo que podría ocurrir en un sistema a partir de un conjunto de datos de entrada recolectados mediante la experimentación (Bustos, 2004).

De manera particular la modelación basada en datos recolectados mediante biomonitoreo muestran ser una herramienta confiable que permite la simulación del posible estado del ecosistema en un tiempo dado según el comportamiento actual del organismo o población bioindicadora.

Uno de los modelos matemáticos no lineales y más utilizados para describir la evolución temporal de una sola población en un entorno constante es la función logística en donde la tasa de crecimiento promedio es una función lineal de la densidad, la cual se muestra a continuación:

$$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) \frac{K - N(t)}{K + crN(t)}$$

En donde  $r$  representa la tasa intrínseca de crecimiento poblacional,  $K$  la capacidad de carga y  $N$  el cambio poblacional con respecto del tiempo (Ibarra *et al.*, 2010).

Sin embargo, actualmente se sabe de las complejas interacciones entre el medio ambiente y los organismos que tienen como resultado funciones fisiológicas observables en los individuos (Buldú *et al.*, 2007). Bajo este supuesto es posible explicar, mediante modelos matemáticos, la dinámica de una población sometida a factores ambientales estresantes considerando el ciclo de vida de los organismos mediante el uso de técnicas de álgebra matricial para proyectar la dinámica de la población en el tiempo.

Estos modelos reconocen la existencia de un ciclo de vida en los individuos, combinan información sobre la supervivencia y la fertilidad de una población

estructurada y sirven también para examinar la dinámica de la población a lo largo del tiempo, es decir, para proyectar la evolución de la estructura de la población en el futuro, considerando los siguientes parámetros: reproducción, probabilidad de supervivencia y probabilidad de transición que son calculados a partir de combinaciones entre la tasa de supervivencia, la tasa de fertilidad y la tasa de crecimiento (transición de fase).

### **3.6 Marco Conceptual**

#### **3.6.1. Tipo de Investigación**

La investigación es la base del conocimiento científico, por lo cual es necesario que el proceso se realice de forma sistemática, con unos objetivos claros a fin de lograr resultados comprobables y que parte de aspectos que puedan ser comprobables y replicados. En general, existen cuatro tipos de investigación: exploratorias, descriptivas, correlacionales y explicativas (Sampieri, 2014) que permiten determinar los pasos a seguir a lo largo del estudio, de esta manera los tipos de investigación en los que se basa el presente trabajo son de tipo exploratoria, explicativa y correlacional.

Es exploratoria en tanto que la indagación documental nos refiere a estudios con ciertas vertientes que aún no han sido del todo exploradas, pues si bien existe una amplia variedad de estudios ecotoxicológicos con *Daphnia magna* en ninguno de ellos se estudia el posible sinergismo de los factores estresantes: OTC y radiación UV-B.

Se trata también de una investigación del tipo explicativa pues el estudio concluye con la propuesta de un modelo matemático que explique la tendencia en el desarrollo poblacional de los daphnidos a fin de anticipar daños a los ecosistemas acuáticos sometidos a tales condiciones ambientales y antropogénicas.

Por último, la investigación de tipo correlacional aborda el grado de correlación entre las variables poblacionales predichas mediante el modelado matemático con las

alteraciones identificadas en la expresión genética desarrollada por *D. magna* en estas condiciones ambientales.

### **3.6.2 Paradigma**

Un paradigma es el conjunto de conceptos, valores, hipótesis y procedimientos que conforman una unidad o una disciplina científica, o bien, el conjunto de creencias o visiones del mundo alrededor de las cuales se organiza la realidad. Para una investigación en particular, el paradigma suele definirse especificando su ontología, su epistemología y su metodología (Moreno, *et al.*, 2001). Así, bajo lo descrito con anterioridad, se obtiene, para la presente investigación, un paradigma del tipo constructivista sostenido por una ontología relativista pues al tratarse de un bioensayo, las condiciones serán establecidas y, en consecuencia, la veracidad quedará sujeta a su validez subjetiva y relativa a los diferentes marcos de referencia y en una fase de campo. De esta forma, la epistemología es subjetivista dado que los resultados serán obtenidos a partir del proceso de interacción entre el investigador y lo investigado, formando una entidad única. Por último, la metodología es tipo hermenéutica y dialéctica dado que será necesario la interpretación, contrastación y explicación de resultados que darán paso a la elaboración de un modelo matemático.

### **3.6.3 Enfoque Epistemológico**

Para la sistematización de los enfoques epistemológicos se utilizan dos variables: una es de tipo gnoseológico, referente a las evidencias acerca de la fuente del conocimiento (empirismo / racionalismo). La otra es de tipo ontológico, que tiene que ver con las relaciones del sujeto con la realidad (idealismo / realismo). De esta manera, la combinación de variables arroja cuatro Enfoques Epistemológicos: el enfoque empirista-realista, el enfoque empirista-idealista, el enfoque racionalista-

realista y el enfoque racionalista-idealista, teniendo como variable gnoseológica el racionalismo y como variable ontológica el realismo (Padrón, 2007).

Así, el presente trabajo estará sujeto al enfoque Racionalista-Realista al basarse en abstracciones, sistemas lógico-matemáticos y deducciones controladas expresando lo anterior en un modelo matemático.

### **3.6.4 Teorías que soportan la investigación**

La teoría de sistemas consiste en un enfoque interdisciplinario, es una propuesta para el estudio de sistemas complejos. Básicamente es una metodología de trabajo interdisciplinario con un marco conceptual que fundamenta, sobre bases epistemológicas, el trabajo multidisciplinario (García, 2006). En esta investigación en particular, cabe destacar que la mayoría de los estudios ecotoxicológicos son interdisciplinarios debido a las interacciones del sistema que generan múltiples variables que no pueden explicarse a partir de las propiedades de un solo componente. La finalidad es poder anticipar de qué manera los compuestos con capacidad tóxica pueden desarrollar un impacto en un ecosistema, en este caso se analiza a la OTC como tóxico y a *Daphnia magna* como bioindicador cuya respuesta permita hacer predicciones.

### **3.7 Marco Legal**

A continuación, se presenta una visión general de la Ley de Aguas Nacionales y de las Normas Mexicanas NMX-AA-087-SCFI-2010 y NMX-AA-044-SCFI-2014 con el fin de encuadrar el marco legal que compete a la presente investigación.

#### **3.7.1 Ley de Aguas Nacionales**

La Ley de Aguas nacionales en su Título Sexto, capítulo IV, artículo 82 establece la previa concesión otorgada por “la Autoridad del Agua”, en los términos de la presente Ley y sus reglamentos para la explotación, uso o aprovechamiento de las

aguas nacionales en actividades industriales, de acuacultura, turismo y otras actividades productivas.

Por otro lado, en su Título Séptimo, capítulo I, artículo 85 establece la promoción y ejecución de las medidas y acciones necesarias para proteger y conservar la calidad del agua mediante la prevención y control de la contaminación, así como responsabilidad por el daño ambiental. Por ello las personas físicas o morales, deberán realizar las medidas necesarias para prevenir o reintegrar las aguas a condiciones adecuadas, además de mantener el equilibrio de los ecosistemas a fin de permitir su explotación, uso o aprovechamiento posterior.

### **3.7.2 Normas Mexicanas**

#### **NMX-AA-087-SCFI-2010**

ANÁLISIS DE AGUA - EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladocera) - MÉTODO DE PRUEBA.

En esta norma mexicana se establece el método para la medición de la toxicidad aguda, utilizando al organismo dulceacuícola *Daphnia magna*. Este método es aplicable para la evaluación de toxicidad aguda en aguas y en sustancias solubles en agua, incluyendo cuerpos de agua dulce, aguas residuales industriales y municipales, efluentes agrícolas y sustancias puras o combinadas disolubles o lixiviados y la fracción solubilizable en suelos y sedimentos.

## **IV. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

### **4.1 Pregunta de investigación**

¿Cómo influye la presencia de los factores estresantes OTC y radiación UV-B en el comportamiento poblacional del organismo modelo *Daphnia magna*?

## **V. HIPÓTESIS**

### **5.1 Hipótesis general**

La presencia de los factores estresantes OTC y radiación UV-B alteran características relacionadas con la historia de vida y con los perfiles de expresión genética asociados al estrés en *Daphnia magna* modificando su comportamiento poblacional.

## **VI. OBJETIVOS**

### **6.1 Objetivo general**

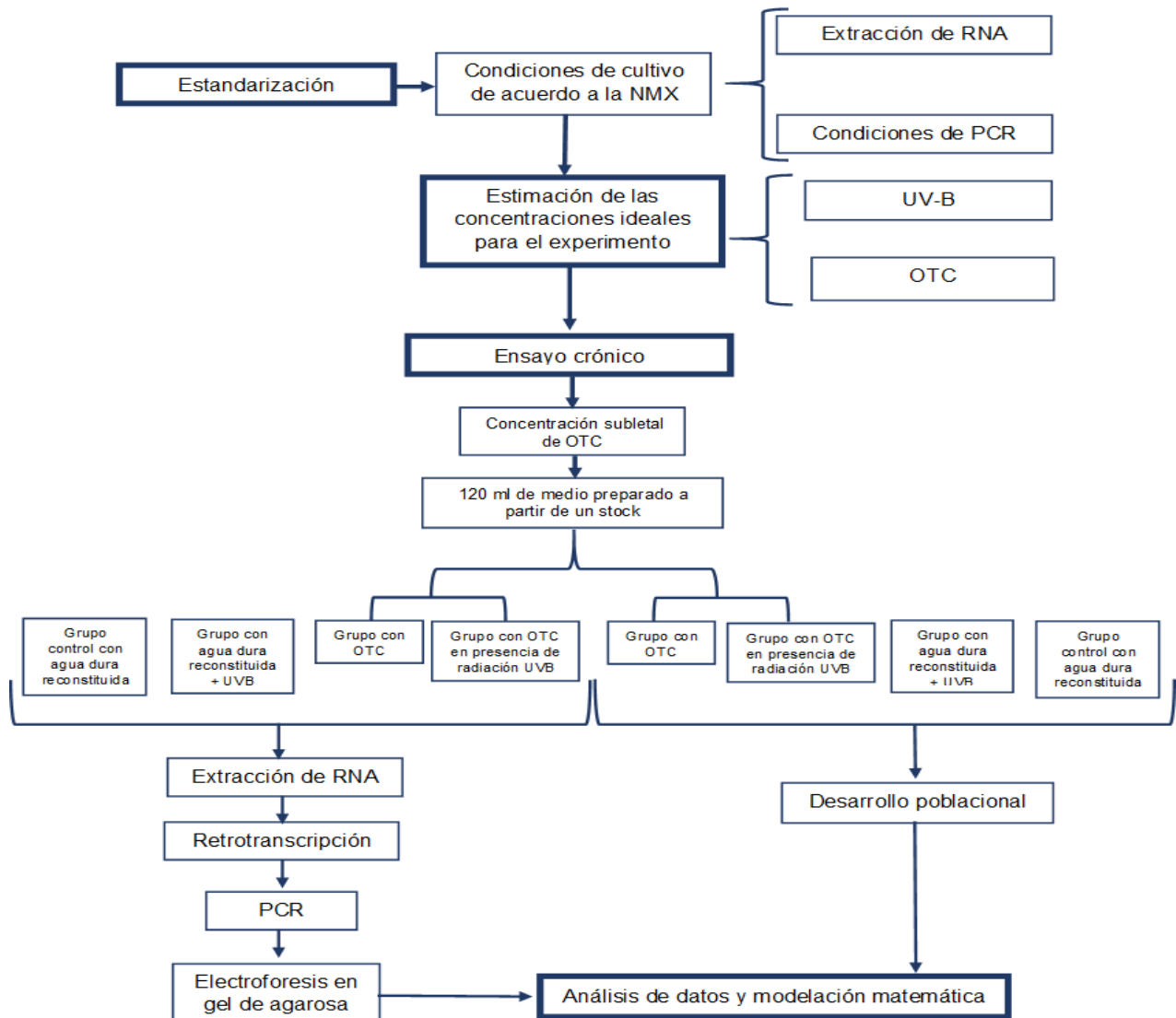
Desarrollar un modelo matemático para describir el comportamiento poblacional de *Daphnia magna* en presencia de los factores estresantes OTC y radiación UV-B.

### **6.2 Objetivos específicos**

1. Estimar la concentración de OTC ideal para la identificación de su impacto en el desarrollo poblacional de *Daphnia magna* en presencia de radiación UV-B.
2. Caracterizar los efectos inducidos por OTC y radiación UV-B en el modelo animal, relacionados con características de su historia de vida como su capacidad reproductiva, tasa intrínseca de incremento natural y tasa de crecimiento poblacional.
3. Describir los cambios en los perfiles de expresión genética de vitelogenina en *Daphnia magna* inducidos por la exposición a los factores estresantes OTC y radiación UV-B.

4. Relacionar los cambios poblacionales predichos mediante el modelado matemático con las alteraciones identificadas en la expresión genética desarrollada por *Daphnia magna*.

## VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN



### 7.1 Diagrama de trabajo

### 7.2 Estandarización de las condiciones de cultivo para *Daphnia magna*

Los organismos de prueba fueron obtenidos del Laboratorio de Ecología y Restauración de Sistemas de Acuáticos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la

BUAP. Los cultivos se iniciaron con 10 neonatos hembras de un lote de reproductores de edad conocida. Se mantuvieron grupos de 20 daphnidos en 1 L de agua dura reconstituida (con una dureza total de 250 mg/L de CaCO<sub>3</sub>) con un pH de 7- 9, el medio fue renovado dos veces por semana. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente con un fotoperiodo de 16:8 (luz: oscuridad) y alimentación a base Spirulina y una mezcla de levadura, TetraVeggie™ en una concentración de 250,000 células/mL, cada tercer día (Kim *et al.*, 2009). Para propósitos de este estudio se implementó un total de 9 de estas unidades de producción asexual de crías que fueron empleadas en pruebas subsecuentes. Todos los aspectos referentes al mantenimiento, calidad y control del cultivo se efectuaron de acuerdo con lo establecido en la NMX-AA-087-SCFI-2010.

### **7.3 Evaluación de los efectos de la OTC y radiación UV-B**

#### **7.3.1 Cálculo de dosis subletal de OTC**

Las pruebas de toxicidad miden el porcentaje de organismos afectados por su exposición a concentraciones específicas de ciertas sustancias durante un período de tiempo. Para *Daphnia magna* esta prueba se llevó a cabo siguiendo las condiciones establecidas en la NMX-AA-087-SCFI-2010.

Para este estudio la OTC se obtuvo como solución inyectable (C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>) de NorVet (SAGARPA Q-7827-047, lote: 174140). Los organismos utilizados fueron neonatos menores a 24 horas de nacidos. Veinte de ellos fueron colocados en cada uno de los recipientes de prueba a tres concentraciones diferentes del antibiótico correspondientes a 0.004 mg/mL, 0.010 mg/mL y 0.025 mg/mL en un volumen total de 120 mL al igual que un control negativo a fin de evidenciar la precisión en el análisis y respaldar la confianza analítica de la medición (Gallina *et al.*, 2008). Cada tratamiento se realizó por triplicado y monitoreado diariamente por conteo manual a fin de caracterizar los efectos y realizar la selección de la concentración adecuada.

### 7.3.2 Cálculo de dosis para UV-B

Durante esta etapa se evaluó la mortalidad en función de la dosis de radiación UV-B en *Daphnia magna*. Esto se consiguió al someter a los organismos a una fuente de radiación UV-B (modelo UVB-313, INSTRULAMP) determinando la mortalidad a diferentes alturas y tiempos de exposición (Azevedo *et al.*, 2015).

Las mediciones de intensidad UV-B se realizaron utilizando un radiodispositivo específico que proporciona información sobre la energía en  $W/m^2$ , para lograr una dosis biológicamente relevante de radiación UV-B, se utilizó un factor de ponderación de acuerdo con el espectro de acción de referencia de la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) para el eritema en la piel humana (Azevedo *et al.*, 2015).

### 7.3.3 Ensayo crónico

La concentración de OTC fue seleccionada a partir de los resultados de un estudio preliminar de toxicidad aguda basado en lo reportado por Gallina *et al.* (2008) y bajo las condiciones descritas en la norma NMX-AA-087-SCFI-2010, a fin de definir la dosis empleada durante el ensayo crónico.

Posteriormente la población fue expuesta a una concentración subletal de OTC de la siguiente manera: 20 neonatos del cultivo original menores a 24 horas fueron dispuestos en recipientes cilíndricos con capacidad de 150 mL con 120 mL de medio preparado a partir de un stock inicial que garantice la dosis subletal de OTC. De igual manera, otro grupo con el mismo número de daphnidos y la misma concentración de OTC fue expuesto a radiación UV-B. Para garantizar la veracidad de los resultados se estableció un grupo con agua dura reconstituida en presencia de radiación UV-B y uno más a manera de control únicamente con agua dura reconstituida. Cada tratamiento fue triplicado y monitoreado a las 8, a los 10, 15, 20 y 25 días, para recolectar a los individuos originales en 120  $\mu$ L RNAlater (Thermo Fisher) a fin de conservarlos en condiciones adecuadas hasta el momento de las extracciones de ARN.

De forma paralela se efectuó un ensayo más bajo las mismas condiciones antes mencionadas omitiendo la extracción de ARN y que sirvió para monitorear el comportamiento poblacional evaluando los parámetros de capacidad de reproducción, tasa intrínseca de incremento natural y tasa de crecimiento poblacional como parámetros de la historia de vida de *Daphnia magna* (Heckmann *et al.*, 2007).

### **7.3.4 Análisis de expresión genética**

#### **7.3.4.1 Conservación y mantenimiento de las muestras**

Los individuos sobrevivientes a cada tipo de tratamiento fueron recolectados para su conservación de acuerdo con el calendario de monitoreo que incluía observaciones a los 8, 10, 15 y 20 días. Para garantizar la preservación del ARN en óptimas condiciones hasta el día de su extracción, los individuos fueron almacenadas en RNAlater® (SIGMA-ALDRICH®) siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### **7.3.4.2 Extracción de ARN**

La extracción del ARN total se efectuó por el método de extracción fenólica con Tri Reagent (Sigma-Aldrich), el cual se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para conseguir la lisis celular y la separación de la muestra en una fase acuosa y una orgánica, seguidas de la extracción a base de cloroformo y precipitación con isopropanol, a partir de la fase acuosa. (Dom *et al.*, 2011). El *pellet* de ARN se disolvió en 30 – 50 µL de agua inyectable estéril y fue almacenado a -20 °C. Para verificar la concentración y calidad del ARN total se tomó una alícuota para las lecturas de la absorbancia a 230, 260 y 280 nm mediante espectrometría UV-vis atendiendo a la relación  $A_{260nm}/A_{280nm} > 1.8$  (Sandoval *et al.*, 2011), de igual forma la integridad fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X (Schwarzenberger *et al.*, 2009).

### 7.3.4.3 Síntesis de ADNc

Por cada muestra, 1 µg de ARN total fue tratado con RiboLock RNase Inhibitory RevertAid H Minus M-MuLV RT (Fermentas). El ADNc fue sintetizado a partir del ARN tratado con DNase empleando un kit de transcripción inversa (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific), atendiendo las instrucciones del fabricante.

### 7.3.4.4 Amplificación de ADNc

La amplificación del ADNc con los genes de interés (*Tabla 2*) se llevó a cabo mediante PCR punto final utilizando DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoScientific) considerando 200 ng de ADNc por reacción, en un equipo de PCR (miniPCR™). Todas las muestras se realizaron por duplicado con un volumen final de reacción de 25 µL. A la par se trabajaron los controles negativos cuya mezcla incluía 12.5 µL de Master Mix, 200 ng de ADNc y 12.5 µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones usadas para el ciclo de amplificación fueron: 95°C por 20 segundos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 5 segundos; 58°C por 30 segundos; 72°C por 60 segundos y una extensión final de 72°C durante 300 segundos (Kim *et al.*, 2009).

*Tabla 2. Oligonucleótidos para expresión en Daphnia magna.*

Nombre del gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	pb	Referencia
<b>Vitelogenina</b>	5'-AGCGAATCCTACACCG-3'	5'-CGCACAGACCACAGAG-3'	329	Heckeman et al., 2007. Druga et al., 2016.
<b>β-actina</b>	5'-CCACACTGTCCCCATTTATGAA-3'	5'-CGCGACCAGCCAAATCC-3'	71	Druga et al., 2016.

Nota: elaboración propia.

### 7.3.4.5 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, el corrimiento electroforético se realizó a 90 V durante 40 minutos en una cámara con sistema de visualización integrado

(miniPCR™). La longitud de los amplicones fue corroborada con ayuda del marcador de 50 pb DNA Ladder, ThermoScientific.

## **7.6 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad fueron sometidos a un análisis de varianza tipo 1 y 2 (ANOVA) para detectar diferencias significativas entre los parámetros de supervivencia, reproducción, crecimiento y tasa intrínseca de incremento natural obtenidos para el grupo control en relación con los grupos tratados. Posteriormente, se efectuó la prueba Tukey para determinar entre qué grupos se encuentran las diferencias más significativas detectadas con el análisis de la varianza.

Los niveles de expresión de cada gen fueron divididos por la cantidad de ADNc en cada muestra para normalizar el contenido, estos niveles de expresión se compararon con el grupo control y el de las pruebas. Las diferencias significativas se establecieron mediante la prueba Tukey (Poynton *et al.*, 2011).

## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Identificación del desarrollo poblacional a concentraciones subletales de OTC

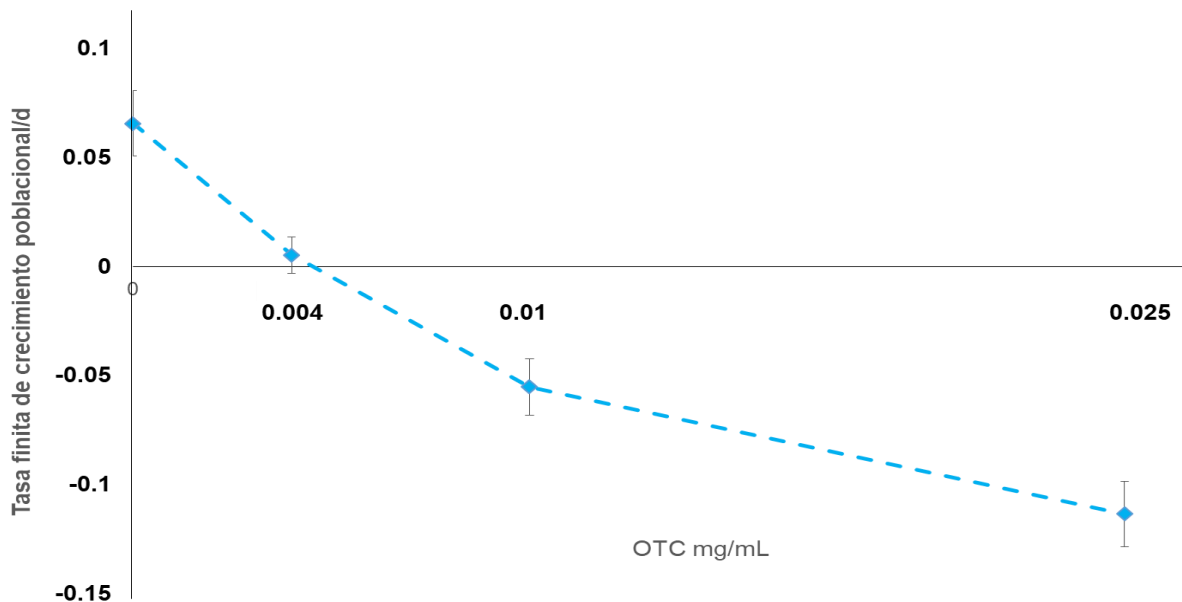
El primer objetivo específico contempla la estimación de la concentración de OTC ideal para la identificación de su impacto en el desarrollo poblacional de *Daphnia magna*, así gracias a las pruebas de toxicidad fue posible establecer dicha concentración partiendo del valor de la  $CE_{50}$  (0.2 mg/mL) reportado por Gallina *et al.* (2008) para OTC. Sabiendo que la presencia de este antibiótico en aguas dulces es del orden de nanogramos fueron probadas tres concentraciones de OTC atendiendo a ambas consideraciones las cuales se enlistan a continuación: 0.025 mg/mL, 0.010 mg/mL y 0.004 mg/mL.

De esta forma, los efectos más importantes registrados durante el ensayo fueron en la reproducción puesto que en los tres grupos expuestos a OTC el tiempo en alcanzar la madurez sexual, que se traduce en el día de la primera reproducción, se retrasó respecto al control ( $P < 0.05$ ); sin embargo, la diferencia más significativa es observable en el grupo sometido a una concentración de 0.025 mg/mL ( $P = 0.016$ ). A la par se identificó disminución en el número de neonatos liberados por hembra. Estos resultados se muestran en la *Tabla 3*, donde es posible visualizar que la OTC generó una respuesta negativa observable en la dinámica de la población a las 3 concentraciones analizadas lo cual se reflejó en una disminución significativa en la tasa finita de crecimiento poblacional debido a la falta de reproducción. Las fallas reproductivas repercutieron en la supervivencia, teniendo que a mayor concentración menor es la tasa de crecimiento. Este efecto puede ser apreciado en la *Figura 5*.

*Tabla 3. Reproducción y supervivencia de Daphnia magna después de una exposición de 28 días a OTC.*

	0.025 mg OTC/mL	0.01 mg OTC/MI	0.004 mg OTC/mL	0 mg OTC/mL (Control)
Tiempo en alcanzar la madurez sexual (d)	12.6 ± 0.57 <sup>c</sup>	10.6 ± 0.57 <sup>b</sup>	9.6 ± 0.50 <sup>ab</sup>	8.6 ± 0.57 <sup>a</sup>
No. Hembras (Adultos)	103.0 ± 1.52 <sup>c</sup>	93.0 ± 8.80 <sup>bc</sup>	85.0 ± 5.00 <sup>a</sup>	70.0 ± 2.83 <sup>b</sup>
No. Neonatos	190.0 ± 2.12 <sup>a</sup>	225.0 ± 2.10 <sup>a</sup>	286.0 ± 1.41 <sup>b</sup>	347.0 ± 4.24 <sup>c</sup>
No. Jóvenes	136.0 ± 2.83 <sup>a</sup>	142.0 ± 1.41 <sup>b</sup>	192.0 ± 2.12 <sup>c</sup>	202.0 ± 0.73 <sup>d</sup>
No. Muertos	16.5 ± 0.73 <sup>b</sup>	12.5 ± 0.70 <sup>a</sup>	13.0 ± 1.41 <sup>a</sup>	14.0 ± 1.41 <sup>a</sup>

Los valores son medias ± desviación estándar. Las diferentes letras indican una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).



**Figura 5.** Tasa finita de crecimiento poblacional de *Daphnia magna* dependiente de la concentración después de una exposición de 28 días a OTC.

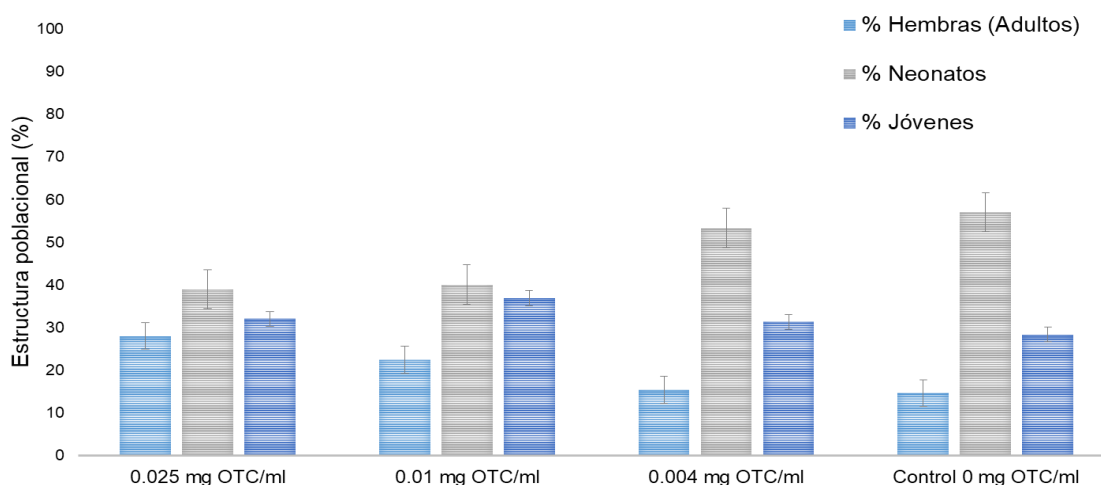
La tasa finita de crecimiento poblacional fue calculada a partir de la siguiente fórmula:

$$PGR = \ln \frac{N_t/N_0}{t}$$

Donde  $N_0$  es el número inicial de individuos y  $N_t$  es el número final de individuos en el tiempo  $t$ . Los valores positivos de PGR indican una población en crecimiento, un valor de 0 indica una población estable y los valores de PGR negativos indican una población en declive y dirigida hacia una posible extinción (Heckmann *et al.*, 2007).

Por otro lado, los individuos se clasificaron en tres clases correspondientes a neonatos, jóvenes y adultos, de acuerdo a su ciclo de vida (Mittmann *et al.*, 2014) para evaluar los efectos de la OTC en la estructura poblacional. Así, tal como se muestra en la *Figura 6*, OTC afectó principalmente a los grupos sometidos a las concentraciones de 0.025 mg/mL y 0.01 mg/mL respectivamente, cuyas poblaciones al final del experimento estuvieron compuestas en su mayoría por adultos. El porcentaje de adultos en el grupo de 0.025 mg/mL aumentó casi en un

50% con respecto al grupo control, mientras que en el grupo de 0.001 mg/mL el aumento fue de un 35% generando un desequilibrio en la estructura poblacional dado el declive en la fecundidad que omite el reemplazo generacional.



**Figura 6.** Distribución de las poblaciones de *Daphnia magna* en tres clases (estructura poblacional) después de una exposición de 28 días a OTC.

De esta manera, los resultados mostraron que la concentración subletal adecuada para evaluar el desarrollo poblacional de *D. magna*, corresponde a 0.025 mg/mL la cual resulta mayor en comparación a la reportada en ambientes naturales que oscila entre los 270 y 480 ng/L (Danner *et al.*, 2019); sin embargo, se sabe que en algunos sistemas, como lagunas porcinas, las concentraciones de OTC pueden llegar a ser hasta de 0.001 mg/mL (Mackie *et al.*, 2006).

## 8.2 Toxicidad en *Daphnia magna* inducida por radiación UV-B

El segundo objetivo específico de esta tesis considera caracterizar el efecto a largo plazo de los factores físico-químicos estresantes OTC y radiación UV-B a través de ensayos de toxicidad crónica sobre la capacidad de reproducción, tasa intrínseca de incremento natural y tasa de crecimiento poblacional como parámetros de la

historia de vida de *Daphnia magna*. Para ello se procedió a estimar un tiempo adecuado de radiación que permitiera la supervivencia de la población a fin de monitorear a largo plazo los parámetros antes mencionados.

Todos los experimentos se llevaron a cabo con una lámpara UV-B (lámpara UV, modelo UVB-313, INSTRULAMP). Los recipientes que contenían 10 individuos de distintas edades (48 horas, 4 días y 7 días) en 120 mL de agua dura reconstituida (por triplicado) se colocaron a dos alturas diferentes de 10 y 20 cm respectivamente bajo la lámpara UV-B. Las exposiciones se registraron a diversos periodos que incluían un tiempo de irradiación (en minutos) seguido de un tiempo de 24 y 48 horas de monitoreo hasta producir la inmovilización de menos del 50% de los organismos a fin de permitir su posterior seguimiento ya que en la actualidad se sabe que la radiación ultravioleta puede afectar de diversas maneras a las poblaciones acuáticas sin limitarse únicamente a los estudios que evidencian los índices de mortalidad (Helbling *et al.*, 2003). Las mediciones de intensidad UV se realizaron durante el periodo de exposición, utilizando un radiodispositivo específico colocado bajo la lámpara, ello permitió obtener información sobre la intensidad proporcionada en  $W/m^2$ .

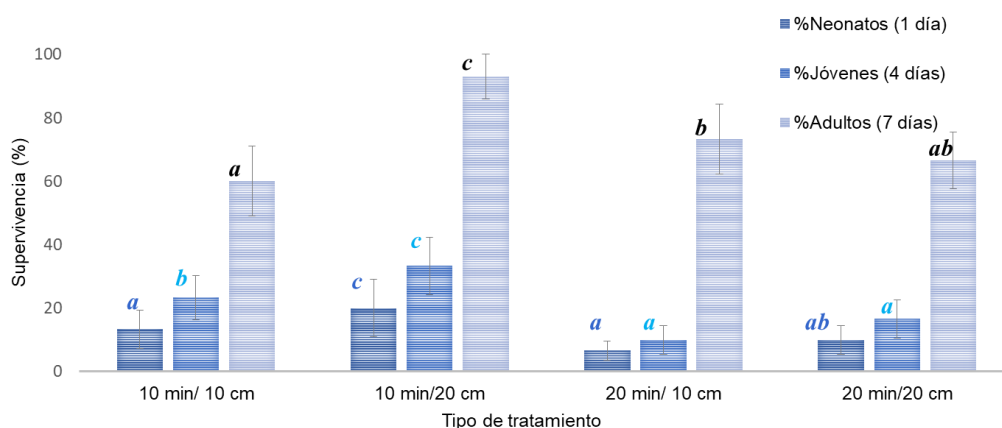
Por otro lado, a fin de lograr una dosis biológicamente relevante de radiación UV, se utilizó un factor de ponderación de acuerdo con el espectro de acción de referencia de la Comisión Internacional sobre Iluminación (CIE) para el eritema en la piel humana utilizando la siguiente formula:

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

Donde:

$E_{eritema}$  es la irradiación eritemática,  $I$  es la radiación espectral de la fuente (lámpara UV, modelo UVB-313 INSTRULAMP) en  $W/m^2$ ;  $\varepsilon$  es el coeficiente de acción eritemática y  $t$  es el tiempo en segundos.

Con esta ecuación se determinó una dosis efectiva de  $75.57 \text{ J/m}^2$ . De esta manera cuando se hace uso del espectro de acción eritemática del CIE, la dosis efectiva puede expresarse también como la dosis eritemal estándar (SED) con un valor numérico de  $100 \text{ J/m}^2$ . Para este trabajo se utilizaron  $0.75 \text{ SED}$ , así los efectos de los experimentos bajo las condiciones mencionadas se aprecian en la *Figura 7*.



**Figura 7.** Prueba de toxicidad con *Daphnia magna* ante radiación UV-B a diferentes tiempos y alturas de exposición. Las barras representan el porcentaje de supervivencia para cada grupo de edades diferentes según las condiciones a las que fueron sometidos.

Los resultados que aparecen en la *Figura 7* corresponden a las variaciones de distancia y tiempo de exposición (tipo de tratamiento) a los que fueron sometidos los individuos de diferentes edades manteniendo constante la intensidad antes determinada. Se registraron elevadas tasas de mortalidad, mayores al 65%, en los grupos de menor edad, neonatos y jóvenes, ( $P < 0.05$ ). Estudios similares han revelado la estrecha relación existente entre la edad y la supervivencia posterior a una exposición de radiación UV-B en *Daphnia magna*, donde únicamente el 10% de los individuos menores a 2 días sobrevivieron (Rautio *et al.*, 2010). La explicación a tal suceso podría estar en los compuestos fotoprotectores que tienden a ser más elevados entre los adultos, encontrándose concentraciones muy altas de compuestos absorbentes de radiación UV en especies de zooplankton.

Por otro lado, el análisis estadístico permitió descartar la influencia del tipo de tratamiento en la supervivencia; no obstante, dado los datos obtenidos se eligió el

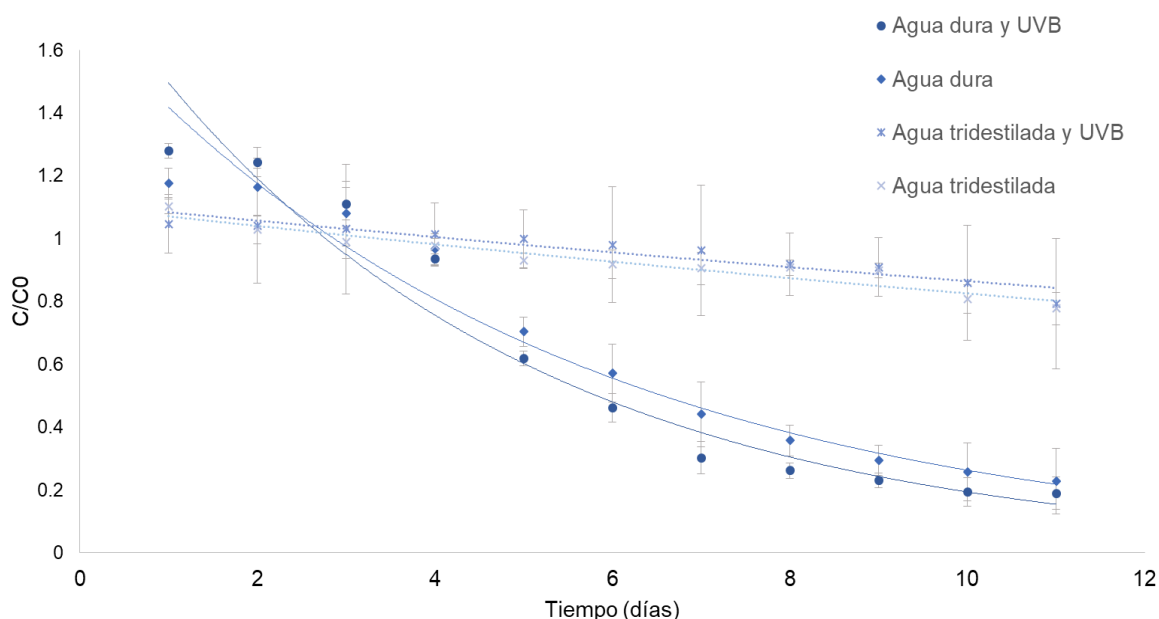
tratamiento correspondiente a 20 cm (distancia de separación entre los recipientes y la lámpara) por un periodo de irradiación de 10 minutos puesto que, a pesar de no registrarse diferencias significativas ( $P = 0.06$ ), los resultados de la *Figura 7* evidencian que el mayores porcentajes de supervivencia se registraron a tales condiciones.

### 8.3 Cinética de fotodegradación de OTC

Una vez identificada la concentración subletal de OTC a evaluar en este estudio, fue necesario asegurar que ésta se mantuviera sin cambios a lo largo del periodo del experimento (0.025 mg/mL de OTC) debido a la fotosensibilidad del antibiótico, que genera productos de degradación (Liu *et al.*, 2015). La cinética de degradación de la OTC en soluciones de agua dura reconstituida y agua tridestilada con y sin exposición a radiación UV-B (2.2 W/m<sup>2</sup>) permitió calcular la constante de degradación para dichas condiciones. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se cuantificaron mediante espectrometría UV-vis a 365 nm durante un periodo de 11 días, en el que fueron mantenidas las condiciones de iluminación constante a 800 lx (Mittmann *et al.*, 2014). Las concentraciones se determinaron mediante curvas de calibración identificando una cinética de primer orden en todas las muestras tal y como se percibe en la *Figura 8*. Los valores de las constantes de velocidad fueron obtenidas por ajuste a la curva no lineal a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{C}{C_0} = e^{-kt}$$

Donde  $k$  es la constante de velocidad de degradación de primer orden,  $t$  es el tiempo (días),  $C_0$  y  $C$  son las concentraciones de OTC inicial y final, respectivamente. El resumen de los resultados se aprecia en la *Tabla 4*.



**Figura 8.** Cinética de primer orden de fotodegradación OTC 0.025 mg/L en cuatro diferentes condiciones.

*Tabla 4. Resultados de la cinética de fotodegradación de OTC en cuatro diferentes condiciones*

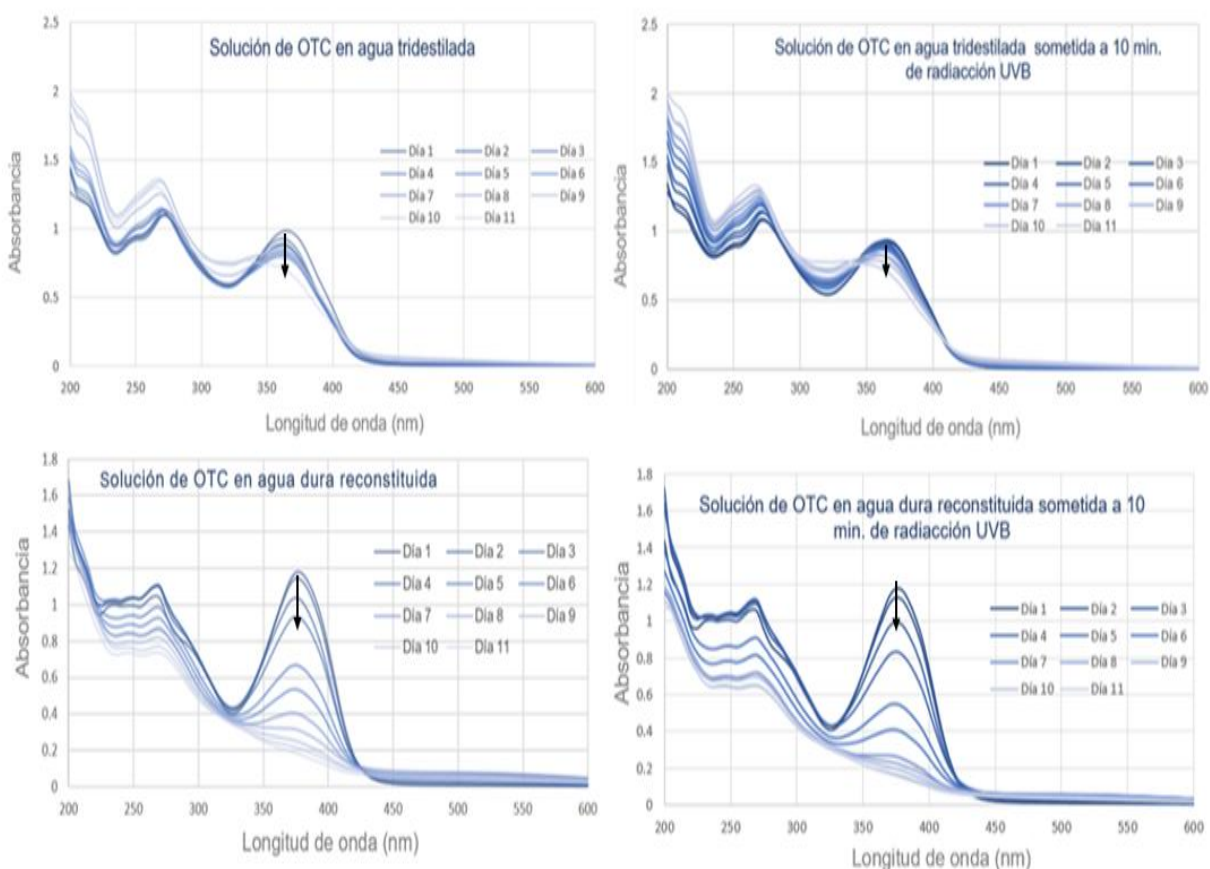
Condición	N	k (día <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Solución de agua dura y OTC sometida a 10 minutos de radiación UVB	3	0.2272 ± 0.0007	0.95
Solución de agua dura y OTC	3	0.1871 ± 0.0007	0.97
Solución de agua destilada y OTC sometida a 10 minutos de radiación UVB	3	0.0252 ± 0.0007	0.91
Solución de agua destilada	3	0.0230 ± 0.0007	0.91

N es el número de experimentos, k es la constante de velocidad de primer orden (media ± desviación estándar) y R<sup>2</sup> es el coeficiente de determinación.

Las constantes de velocidad de degradación de OTC mostraron que el tipo de medio de cultivo y la radiación UV-B influyen de manera significativa ( $P < 0.05$ ) en el valor de la constante de velocidad. Los valores más elevados se obtuvieron cuando la solución es sometida a radiación UV-B.

Por otro lado, el tipo de medio de cultivo resultó ser un factor importante en la cinética de degradación ( $P < 0.05$ ), siendo que las soluciones preparadas con agua dura (rica en sales) registraron los valores más altos en la constante de velocidad de degradación.

Estos resultados pueden deberse a la presencia de sales en el medio, ya que según lo reportado la presencia de sales favorezca un aumento en la carga de la molécula provocando una mayor circulación de electrones en la estructura y un cambio de la longitud de onda de absorción (Leal *et al.*, 2016). En efecto, los espectros UV-vis de OTC en agua con sales presentan un comportamiento relativamente diferente acompañado de un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores en comparación con los espectros OTC en una solución sin sales, tal como se distingue la *Figura 9*. De igual forma en la *Figura 8* y la *Tabla 4* es posible apreciar que la presencia de sales aumenta la constante de velocidad de degradación cinética en comparación con la solución sin sales (Leal *et al.*, 2016). De este modo, al día 11, en soluciones salinas se registró una degradación del 84% de OTC, teniendo una concentración final correspondiente a 0.004 mg/mL, y una degradación del 20 % en agua tridestilada llegando a una concentración final de 0.02 mg/mL.



**Figura 9.** Cinética de degradación de OTC en cuatro diferentes condiciones.

Considerando la cinética de degradación, durante el desarrollo de los experimentos, se propuso realizar recambios del medio de cultivo cada tercer día, de esta manera la disminución de la concentración de OTC fue mínima (8%), dada su baja fotosensibilidad. Estos recambios, también se realizaron con el objetivo de mantener los cultivos limpios, y las condiciones de alimentación, oxígeno disuelto y dureza constantes.

#### **8.4 Caracterización de los efectos inducidos por los factores estresantes OTC y radiación UV-B en la población de *Daphnia magna***

El segundo objetivo específico comprende la caracterización de los efectos inducidos por los factores estresantes OTC y radiación UV-B en *Daphnia magna*, relacionados con características de su historia de vida como su capacidad reproductiva, tasa intrínseca de incremento natural y tasa de crecimiento poblacional, lo cual se consiguió a partir del cálculo de la concentración ideal de OTC y de las condiciones adecuadas de irradiación UV-B que permitieron llevar a cabo los ensayos crónicos en el laboratorio a lo largo de 21 días, periodo durante el cual se registró el número de organismos vivos y muertos, el número de mudas y el número de neonatos generados en cada tratamiento y control.

El estudio consideró cuatro grupos por triplicado cada uno con veinte individuos neonatos en 120 mL de medio sometidos a diferentes condiciones: un grupo sujeto a una concentración constante de 0.025 mg/mL de OTC; uno más a radiación UV-B ( $2.2 \text{ W/m}^2$ , equivalente a una dosis efectiva eritemática de  $75.57 \text{ J/m}^2$ ), para ello se esperó a que los daphnidos cumplieran el séptimo día dado que pruebas anteriores permitieron establecer la edad a la que los organismos debían ser irradiados a fin de asegurar la mayor supervivencia, los recipientes fueron colocados a 20 centímetros de la lámpara (UVB-313 INSTRULAMP) por 10 minutos, posteriormente se mantuvieron bajo lámparas (WCAM 207229) para brindarles un fotoperiodo normal de iluminación (NMX-AA-087-SCFI-2010) dándoles seguimiento hasta completar los 21 días; estas mismas condiciones se adoptaron para el grupo que

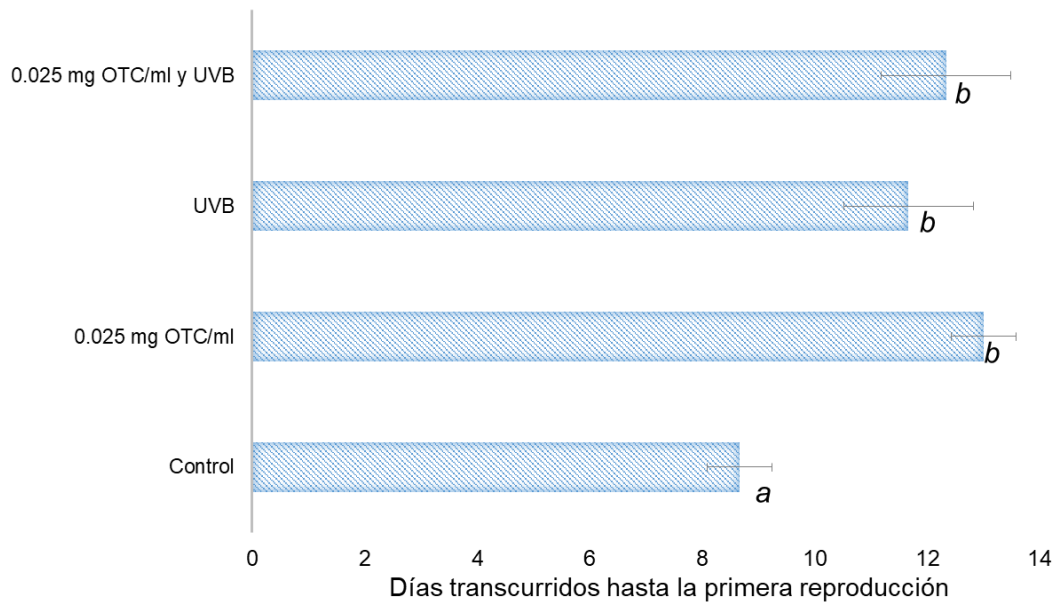
considera la interacción entre la radiación UV-B y la OTC. El último grupo es el control bajo condiciones estándar descritas en la NMX-AA-087-SCFI-2010.

Tabla 5. Reproducción y supervivencia de *Daphnia magna* después de 21 días de ensayo.

Parámetro evaluado	Condiciones del experimento			
	Control	0.025 mg OTC/mL	UV-B	0.025 mg OTC/mL y UV-B
Tiempo de primera reproducción (d)	8.60 ± 0.57 <sup>a</sup>	13 ± 0 <sup>b</sup>	11.60 ± 1.15 <sup>b</sup>	12.30 ± 1.15 <sup>b</sup>
Reproducción total (No. total de neonatos)	380.60 ± 46.90 <sup>a</sup>	105 ± 19.92 <sup>b</sup>	285.31 ± 10.01 <sup>c</sup>	179.60 ± 18.14 <sup>d</sup>
Neonatos por hembra	5.60 ± 0.57 <sup>c</sup>	3.14 ± 0.16 <sup>ab</sup>	4 ± 0.14 <sup>bc</sup>	2.80 ± 0.25 <sup>a</sup>
Número de mudas	266.30 ± 4.72 <sup>c</sup>	169 ± 9.84 <sup>a</sup>	193.60 ± 9.45 <sup>b</sup>	181 ± 10.14 <sup>ab</sup>

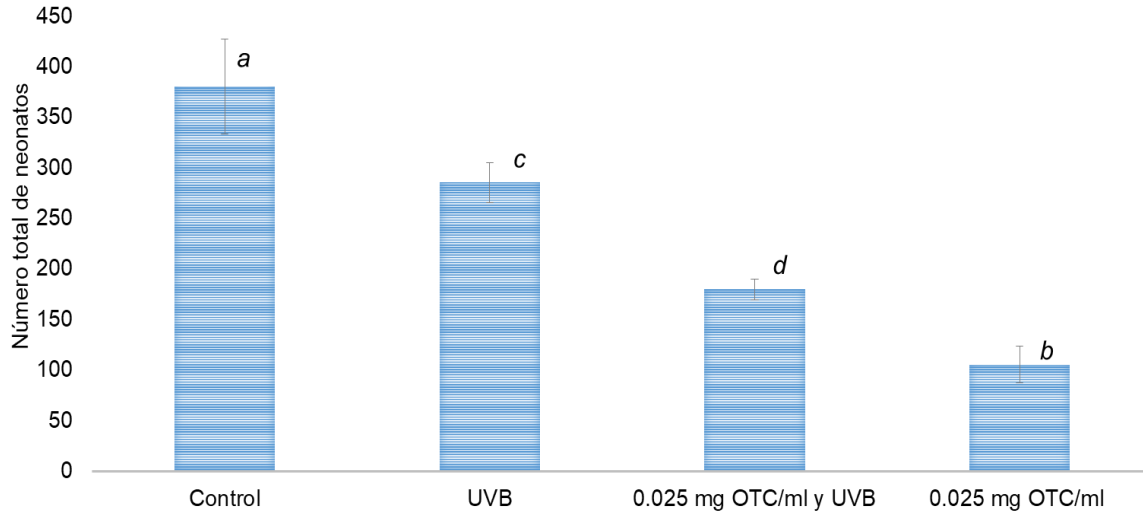
Los valores son medias ± desviación estándar. Las diferentes letras indican una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

La *Tabla 5* evidencia los impactos de ambos estresores sobre las poblaciones monitoreadas, en el caso de la reproducción uno de los efectos más significativos fue el retraso de la primera puesta ( $P < 0.05$ ) para los tres tratamientos respecto al control; sin embargo, el retraso resulta más evidente en los grupos sometidos a OTC ( $P = 0.0012$ ) y a ambos estresores ( $P = 0.0037$ ), aunque para este parámetro el retraso no depende de la interacción entre el antibiótico y la irradiación UVB, de hecho el día de la primera reproducción ocurrió primero (día 12) en el tratamiento que incluye la presencia de OTC y radiación UV-B en comparación con el grupo de OTC (día 13), ver *Figura 10*. Este aumento en el número de días transcurrido hasta la primera puesta ha sido constantemente reportado en diversos estudios ecotoxicológicos al exponer a *Daphnia magna* a concentraciones de diversos fármacos poniendo de manifiesto la elevada toxicidad de dichos contaminantes sobre *D. magna* (Narvaez *et al.*, 2012) al impedir el adecuado desarrollo de los organismos dado que OTC podría modificar cuantitativa y cualitativamente la microbiota intestinal de los daphnidos al alterar la digestión y aprovechamiento de los nutrientes con la consecuente reducción del crecimiento, fecundidad y supervivencia (Sison-Mangus *et al.*, 2014).



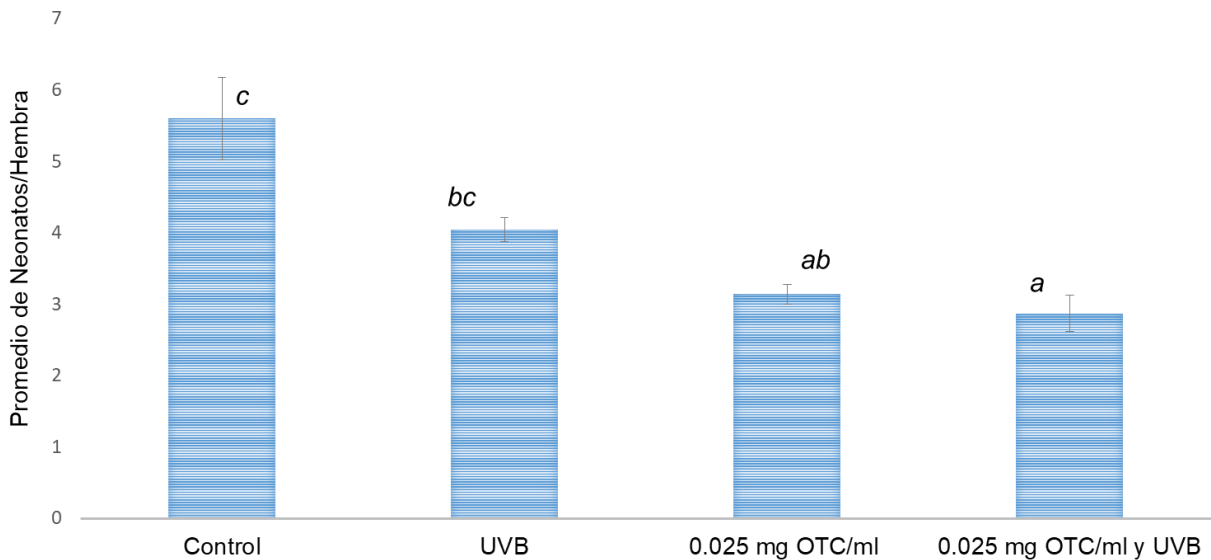
**Figura 10.** Número de días transcurrido hasta la primera puesta. Las letras expresan una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

Continuando con las alteraciones reproductivas se evaluó también la reproducción total, es decir el número total de nacimientos a lo largo de 21 días observándose una relación negativa dependiente del tipo de tratamiento ( $\beta < 0$ ) indicando una disminución en el número de neonatos para cada grupo según el tipo de estresor, *Figura 11*, de igual forma al compararlos con el control se detectan diferencias significativas en todos los tratamientos ( $P < 0.05$ ); sin embargo, nuevamente el mayor impacto se aprecia en el grupo sometido a concentración constante de OTC (0.025 mg/mL) donde el número total de neonatos es 70% menor respecto control. Así, pese a lo reportado por otros autores acerca de un aumento en la fototoxicidad de este antibiótico bajo la exposición a UV-B (Jiao *et al.*, 2008), los resultados de este experimento descartan que la posible interacción entre OTC y radiación UV-B promueva un mayor daño en la producción de neonatos.



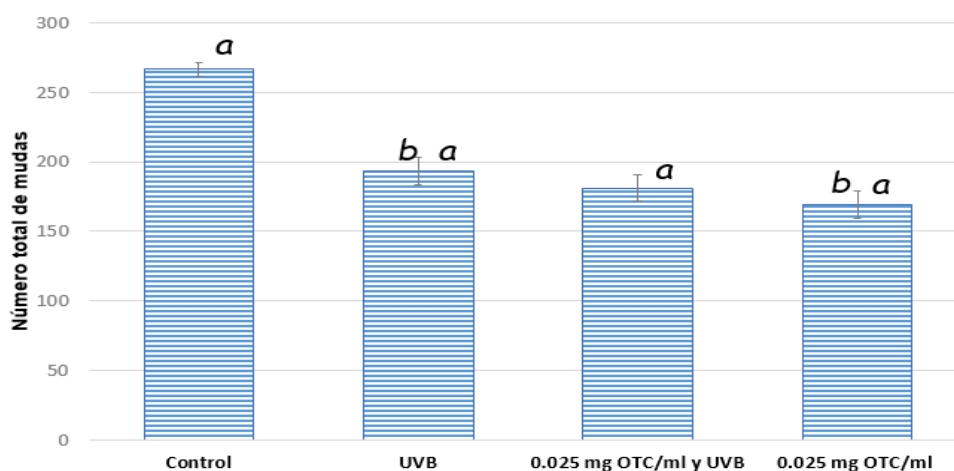
**Figura 11.** Reproducción total al finalizar los experimentos. Las letras expresan una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

Lo explicado anteriormente concuerda con la disminución de la fecundidad observada en los ensayos, es decir que el promedio de neonatos por hembra se vio disminuido significativamente en todos los tratamientos respecto al control ( $P < 0.05$ ), estas diferencias se aprecian en la *Figura 12*.



**Figura 12.** Promedio de neonatos por hembra (fecundidad). Las letras expresan una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

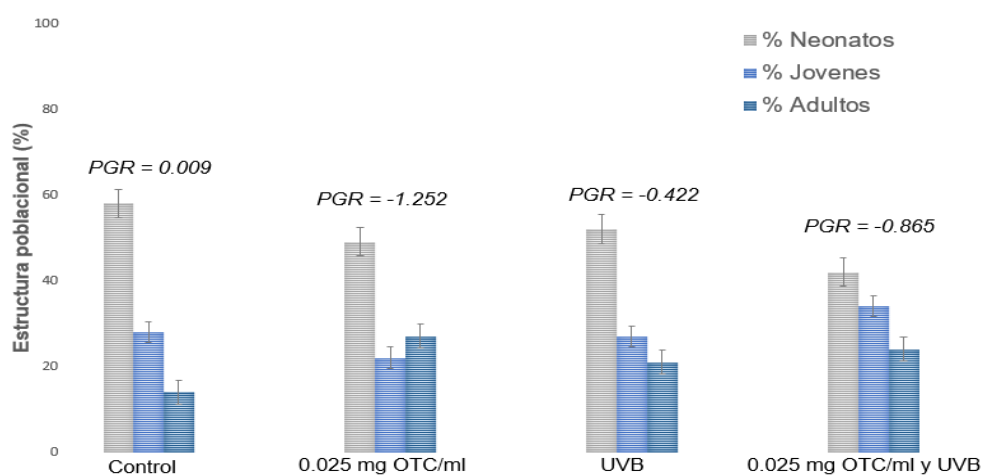
El número de mudas es indicador de un crecimiento relativo de la población, para este estudio en específico se observó una disminución en el número de mudas en todos los tratamientos respecto al control ( $P < 0.05$ ), coincidiendo con otros estudios que han demostrado que el organismo ante situaciones de estrés es capaz de modificar el uso de la energía metabólica, destinándola prioritariamente al desarrollo de respuestas protectoras minimizando el consumo de energía destinada al crecimiento y reproducción, lo que resulta en la alteración de estos procesos, los cuales pueden verse reflejados por ejemplo en la frecuencia de mudas de los daphnidos (Soetaert *et al.*, 2006). En este ensayo se observó un descenso en el número total de mudas aún más evidente en el grupo de OTC respecto al grupo con radiación UV-B como estresor ( $P < 0.05$ ), *Figura 13*, de manera contraria no se encontraron diferencias significativas al realizar la comparación con el grupo de OTC-UV-B. De esta manera, la afectación en el proceso de muda inducido por los estresores OTC y UV-B en la población podría ser una consecuencia de alteraciones en cambios en la reproducción y crecimiento, así como en el destino del uso de la energía metabólica, por lo que será de gran interés que en estudios posteriores se continúe analizando los cambios de uso de energía con estos parámetros.



**Figura 13.** Número total de mudas al final del experimento. Las letras expresan una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

Cabe destacar que no se observó un efecto sinérgico entre los estresores evaluados, debido a que el efecto de UV-B se ve enmascarado por la presencia de OTC, tóxico que presenta 4 anillos fusionados capaces de absorber en la región UV, además, al mantener la concentración de OTC constante gracias a los recambios del cultivo, se minimizó la presencia de productos de degradación por acción de la radiación UV-B los cuales se conoce que presentan elevada toxicidad (Liu *et al.*, 2015). Así, el tratamiento UVB-OTC generó menor daño en el desarrollo poblacional en comparación con el efecto de ambos estresores aplicados de manera individual.

De igual forma, se calculó la tasa finita de crecimiento poblacional (PGR) a fin de evidenciar los impactos en la estructura poblacional como consecuencia de la falta de reproducción y una disminución de la supervivencia. En este caso, se obtuvieron valores negativos de PGR para todos los tratamientos excepto para el control indicando un declive poblacional (Heckmann *et al.*, 2007) debido la limitada capacidad reproductiva que se ve reflejada en una deficiente estructura poblacional, *Figura 14*. De hecho, para todos los tratamientos se registraron porcentajes de adultos elevados respecto al control, principalmente el grupo de OTC-UV-B lo cual, aunado a una disminución en la fecundidad, ponen en riesgo la prevalencia de la población a lo largo del tiempo, al mantener una población con adultos que están sobreviviendo, pero no reproduciéndose.

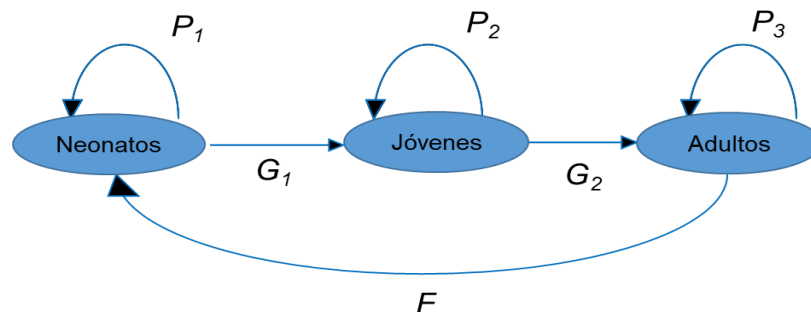


**Figura 14.** Distribución de las poblaciones de *Daphnia magna* en tres clases (estructura poblacional) al finalizar el periodo de experimentos.

## 8.5 Descripción del comportamiento poblacional de *Daphnia magna* mediante modelo matemático

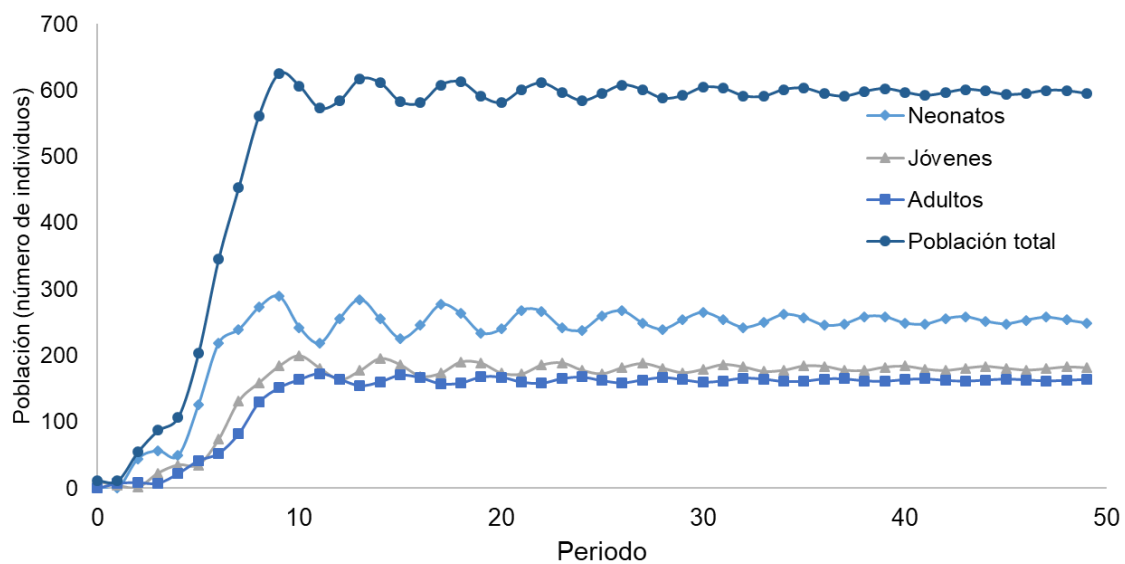
El principal objetivo de este trabajo de investigación fue desarrollar un modelo matemático para describir el comportamiento poblacional de *Daphnia magna* en presencia de OTC y radiaciones UV-B como factores ambientales estresantes. Así, una vez realizados los ensayos crónicos se procedió a la construcción del modelo partiendo de los modelos matriciales que facilitan la descripción de la dinámica de poblaciones y la proyección a futuro en términos de las tasas vitales.

A partir de lo anterior y con base en las observaciones, los organismos fueron clasificados en tres etapas de vida correspondientes a neonatos, jóvenes y adultos (Floyd y Ranker, 1998). El esquema que aparece en la *Figura 15* fue construido a partir de las etapas antes mencionadas permitiendo el procesamiento y cálculo de las variables adecuadas para la elaboración de la matriz de proyección la cual está compuesta por 3 columnas y 3 filas en términos de las tasas de reproducción y de supervivencia de cada una de las etapas de vida (Tokachi *et al.*, 2019); además se incluye la capacidad de carga ( $K$ ) como un parámetro que define la reproducción. La simulación y manipulación del modelo matemático se realizó con un programa computacional diseñado con el compilador Visual Studio (2017) en lenguaje C++.



**Figura 15.** Representación gráfica del ciclo de vida de *Daphnia magna* donde la población fue clasificada en tres etapas: neonatos, jóvenes y adultos.  $P_i$  es la probabilidad de sobrevivir y permanecer en la misma etapa,  $G_i$  es la probabilidad de sobrevivir y crecer en la siguiente etapa, y  $F$ , es la fertilidad calculada por periodo de observación.

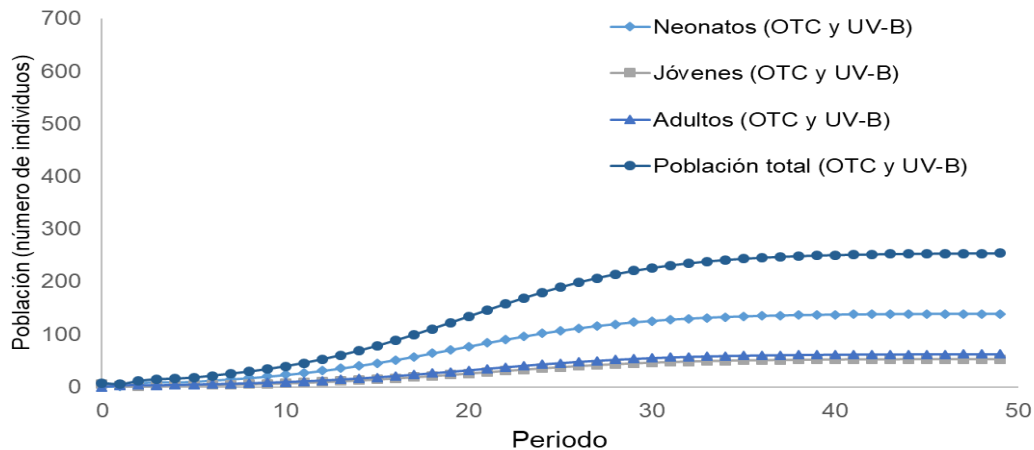
La *Figura 16* muestra la proyección del desarrollo poblacional para *D. magna* en condiciones de control resultante de las simulaciones, considerando una capacidad de carga de 600 individuos, indica un crecimiento mensual promedio del 13% y una mortalidad de 3.5% (Meyer *et al.*, 1986) con una tasa reproductiva neta ( $R_0$ ) de 6.2. De igual forma, la estructura poblacional (o la clasificación de los individuos por etapas de vida) a lo largo de los días se asemeja a los resultados experimentales obtenidos en los grupos control, con una población estable compuesta en su mayoría por neonatos y jóvenes.



**Figura 16.** Simulación de la estructura y crecimiento poblacional de *Daphnia magna* en condiciones de control.

De forma análoga, el pronóstico poblacional para los organismos sometidos a OTC y UV-B, conservando el mismo valor de 600 individuos para la capacidad de carga, presenta un crecimiento mensual promedio del 7.3% y una mortalidad de 4.5%. La  $R_0$  fue de 2.8, es decir que el número promedio de neonatos por hembra grávida se vio disminuido en un 54% respecto al control, lo que alteró la estructura poblacional y generó un aumento en el número de adultos con la consecuente disminución en el número de jóvenes y neonatos (*Figura 17*). De igual forma, es importante advertir que la población hasta el día 50 no llega a estabilizarse en términos reproductivos,

por lo que no es posible hablar de un aumento poblacional, por el contrario, el comportamiento de su curva habla de una población en declive y dirigida hacia una posible extinción (Heckmann *et al.*, 2007).

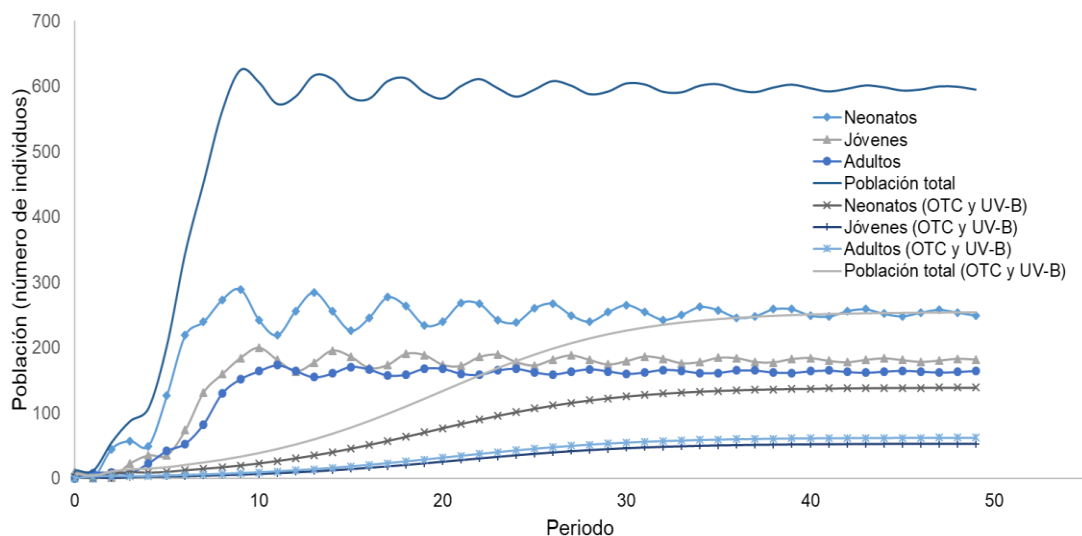


**Figura 17.** Simulación de la estructura y crecimiento poblacional de *Daphnia magna* con una población expuesta a radiación UV-B y OTC.

Sobre la misma línea, la *Figura 18* muestra un comparativo de ambas proyecciones para las dos poblaciones en estudio, de ello es importante destacar los cambios en la estructura poblacional ocasionados por la presencia de UV-B y OTC relacionados con una reproducción tardía y la reducción en el número de neonatos y jóvenes por hembra generando un declive en la población (Heckmann *et al.*, 2007).

Por otro lado, las observaciones a lo largo de la parte experimental admiten la incorporación de la capacidad de carga como un parámetro que define la fertilidad al controlar incorporación de neonatos a la población (Coll *et al.*, 2019). De esta manera, se logran simulaciones más realistas en comparación con aquellos modelos que se construyen únicamente atendiendo a las tasas vitales de cada etapa de vida tal como lo demostraron Lo *et al.*, (1995), al incorporar al modelo matricial variaciones de la duración somática a fin de lograr proyecciones más realistas que aquellos modelos que suponen una duración de etapa de crecimiento fijo. De ahí la importancia de agregar variables de conveniencia a los modelos matriciales a fin de conseguir una mayor explicación del fenómeno, como ocurrió en

este trabajo, dado que las simulaciones de ambos grupos muestran un crecimiento exponencial que tiende a estabilizarse; sin embargo, para el grupo de OTC en interacción con UV-B dicha estabilización ocurre de forma abrupta aún sin alcanzar el valor esperado para la capacidad de carga debido a fallas en los eventos reproductivos que dan como resultado valor de 2.8 para la tasa reproductiva, disminuyendo hasta en un 54% el número total de neonatos respecto al control sin lograr aproximarse al índice de mortalidad ocasionando una desestabilización en la estructura poblacional.



**Figura 18.** Simulación de la dinámica poblacional de *Daphnia magna* para el grupo control y para el grupo sometido OTC y UV-B.

### 8.6 Cambios en los perfiles de expresión genética de vitelogenina en *Daphnia magna* inducidos por la exposición a OTC y radiación UV-B

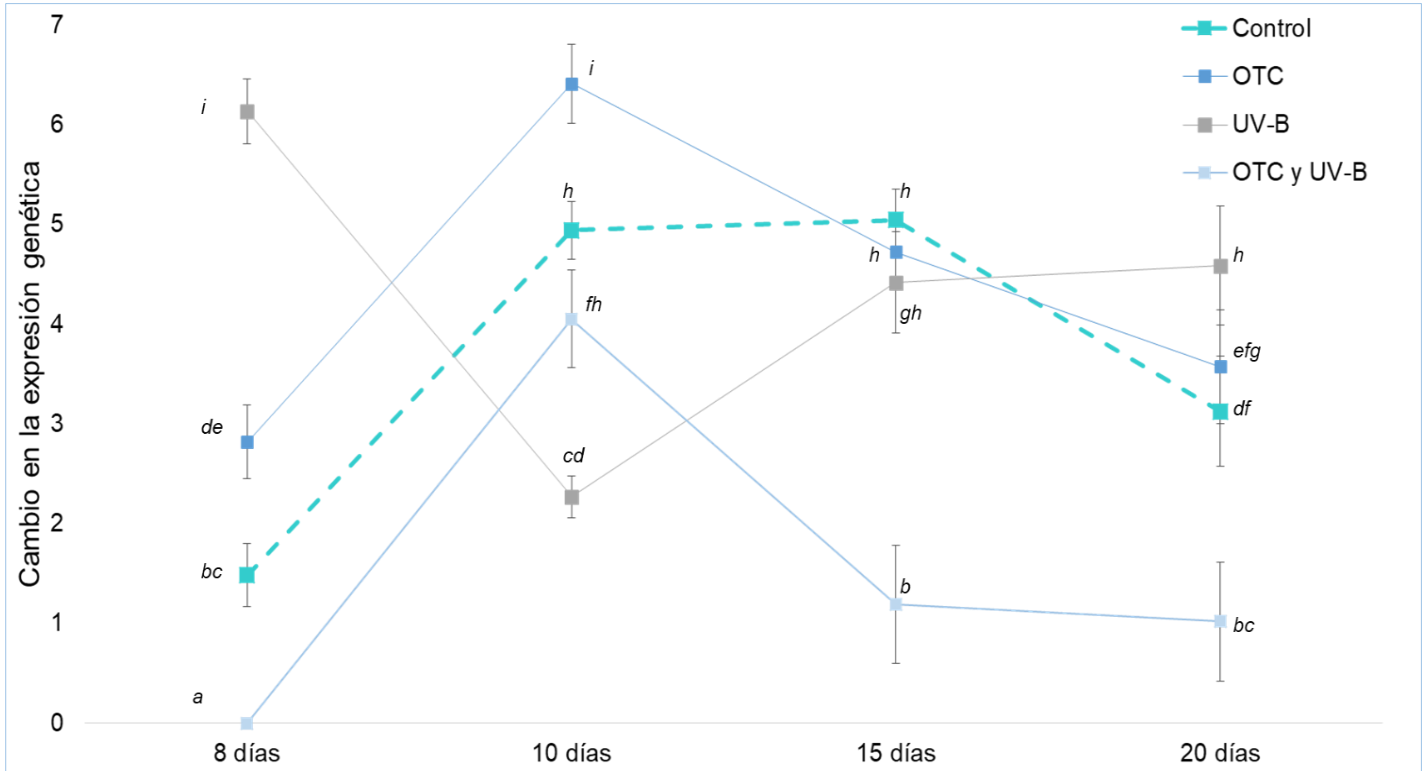
El tercer objetivo específico se basa en la descripción de los cambios en los perfiles de expresión genética de vitelogenina en *Daphnia magna* inducidos por la exposición a OTC y radiación UV-B como factores estresantes, para ello fue necesario efectuar extracciones de RNA total de los tres grupos experimentales y el grupo control, todos por duplicado, para posteriormente efectuar una transcripción inversa para la síntesis de ADNc que fue amplificado para el gen de vitelogenina y

$\beta$ -actina mediante PCR punto final, por último, los productos fueron observados en geles de agarosa al 2% permitiendo el análisis de las imágenes por densitometría haciendo uso de un programa computacional que designa un valor numérico para la intensidad de las bandas por medio del cual fue posible determinar la expresión relativa del gen de vitelogenina a partir de su normalización con respecto al gen constitutivo  $\beta$ -actina.

La selección del gen de vitelogenina para este trabajo se basó en el destacado papel que la misma juega dentro del proceso reproductivo de los crustáceos (Jayasankar *et al.*, 2002), principalmente en la vitelogénesis o síntesis de vitelogenina para su posterior liberación en la hemolinfa a través de la cual es transportada hasta el ovario, y su incorporación al ovocito como vitelina (Arukwe y Goksøyr, 2003). Lo anterior hace a este gen un destacado marcador de toxicidad en los ensayos crónicos basados en alteraciones de parámetros reproductivos.

Así, los resultados mostraron que la expresión relativa del gen para el grupo correspondiente a OTC presentó diferencias significativas en los días 8 y 10 respecto al control, al grupo de UV-B y OTC UV-B ( $P < 0.05$ ); no obstante, en la *Figura 19* puede distinguirse que en los días 15 y 20 el cambio de expresión es mínimo. En el grupo de individuos sometidos a radiación UV-B el cambio en la expresión de vitelogenina resulta significativo en los días 8, 10 y 20 respecto a los demás grupos, *Figura 19*. Finalmente, en el grupo sometido a OTC y UV-B, puede vislumbrarse la existencia de diferencias significativas en la expresión del gen en todos los cortes de tiempo respecto a los demás tratamientos ( $P < 0.05$ ). Estos aumentos en la expresión relativa de vitelogenina respecto al grupo control denotan alteraciones reproductivas que dan como resultado una disminución en el número de neonatos que se integran a la población lo cual concuerda con resultados previamente reportados por Jayasankar *et al.* (2002) quienes concluyen que el patrón general de expresión de ARNm de vitelogenina tiende a ser elevado en las etapas intermedias de la vitelogénesis decreciendo en la etapa final de la misma. De esta manera, en el grupo control es posible apreciar un comportamiento habitual en la síntesis de vitelogenina que coincide con el patrón reproductivo al observar niveles bajos en la expresión relativa del gen al día 8, registro de la primera puesta,

para incrementar al día 10 como sinónimo de un estado de gravidez en las hembras cuya demanda energética le apremia un mayor consumo de vitelina al habitual.



**Figura 19.** Cambios en la expresión del gen de vitelogenina para los tres tratamientos y el grupo control en cuatro cortes de tiempo.

Por otro lado, para los grupos de OTC y OTC-UV-B, se aprecia que el inicio en la síntesis de vitelogenina es en el día 8 para alcanzar un máximo en el día 10, inicio de gravidez en las hembras de la población, para descender en los días consecutivos, periodo correspondiente a la primera puesta. Lo anterior advierte de un desplazamiento en el tiempo en alcanzar la madurez sexual y en los consecutivos periodos reproductivos, lo cual es comparable a lo registrado durante el monitoreo manual a lo largo del experimento.

Análogamente, el grupo sometido a radiación UV-B, alcanzó un máximo en la expresión relativa al día 8, sin registro de hembras grávidas durante el monitoreo manual lo cual, de acuerdo a Gro *et al.* (2003), puede deberse a que la vitelogenina

también desempeña una función inmune y de longevidad según los requerimientos energéticos. Este efecto en la población se respalda en el "principio de asignación" según el cual la energía que obtiene un individuo es repartida entre los requerimientos derivados de su mantenimiento, crecimiento y reproducción. La energía extra que se canalice hacia cualquiera de estas actividades resultará en menos energía disponible para las restantes. Por lo tanto, en el grupo sometido a radiación UV-B, un aumento en la síntesis de vitelogenina acompañado de una ausencia de neonatos evidencia el estado de estrés de los organismos que los obliga a disminuir la energía destinada a la reproducción para invertirla en el mantenimiento y supervivencia.

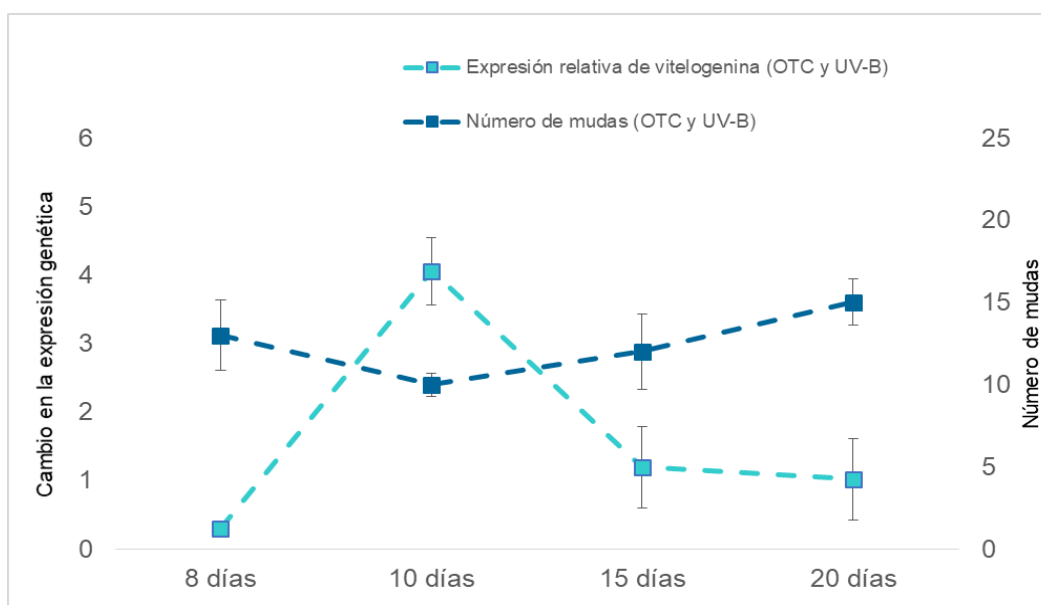
### **8.7 Descripción matemática del desarrollo poblacional de *Daphnia magna* a partir de cambios en los perfiles de expresión genética**

Finalmente, el cuarto objetivo específico engloba relacionar los cambios poblacionales predichos por el modelado matemático con las alteraciones identificadas en la expresión genética desarrolladas por *D. magna* en presencia de radiación UV-B y OTC. Dicha relación se estableció a partir del cálculo de la expresión relativa para gen de vitelogenina que permitió estimar un nuevo dato de fertilidad ( $R_0$ ) a fin de realizar una nueva simulación matemática para el grupo sometido a ambos factores estresantes.

La estimación de  $R_0$  fue posible gracias a la estrecha relación que existe entre el ciclo reproductivo y de muda en *Daphnia* con la producción de vitelogenina. Se sabe que el desarrollo embrionario de los daphnidos ha concluido cuando los neonatos abandonan la cámara dorsal de incubación acompañados del desprendimiento de una muda y que por tanto ambos procesos, muda y reproducción, son regulados por los ecdisteroides y la hormona hiperglucémica de los crustáceos (Jayasankar *et al.*, 2002).

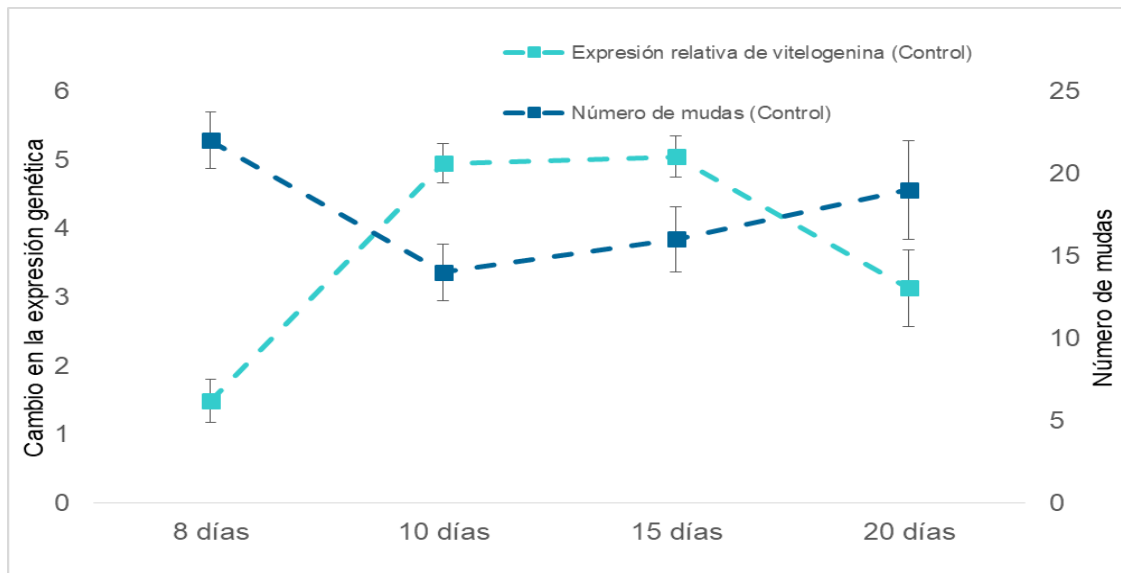
Jayasankar *et al.* (2002) encontraron una relación directa entre los cambios en los niveles de ARNm de vitelogenina con la etapa de premuda y la ecdisis. De igual

forma, los resultados de este trabajo muestran que los máximos y mínimos en la expresión relativa del gen de vitelogenina se asocian de manera directa con el aumento o disminución en el número de mudas. En la *Figura 20* es posible vislumbrar que los máximos en la expresión relativa corresponden a valores mínimos en el número de mudas y que la disminución en la expresión corresponde a un aumento en el total de mudas dado que, al parecer, la síntesis de vitelogenina empieza durante la etapa de intermuda, con tasas de procesamiento que aumentan y alcanzan un máximo en la premuda, con una disminución de la síntesis antes de la ecdisis (Augustine Arukwe y Anders Goksøyr, 2003).



**Figura 20.** Cambios en la expresión del gen de vitelogenina y el número de mudas para el grupo sometido a OTC y radiación UV-B en cuatro cortes de tiempo.

De igual forma, el grupo control presentó un comportamiento similar al descrito con anterioridad; sin embargo, debido a la ausencia de estresores el proceso de muda no se vio alterado y, por tanto, se registró una mayor producción de mudas en comparación al grupo con OTC y UV-B, *Figura 21*.



**Figura 21.** Cambios en la expresión del gen de vitelogenina y el número de mudas para el grupo control en cuatro cortes de tiempo.

De esta manera, la proyección del desarrollo poblacional para *D. magna* con el nuevo valor de  $R_0$ , correspondiente a 2.97, para el grupo sometido a OTC y UV-B considerando una capacidad de carga de 600 individuos indica un crecimiento mensual promedio del 7.74% y una mortalidad de 4.77% (Meyer *et al.*, 1986), valores que no presentan diferencias significativas respecto a las primeras simulaciones que consideran una  $R_0$  de 2.8 obtenida a partir del monitoreo manual ( $P > 0.05$ ), lo que evidencia las alteraciones reproductivas inducidas por ambos estresores no solo a nivel poblacional, medible con ayuda de las proyecciones, sino también a nivel molecular coincidiendo con los cambios medibles en la expresión génica.

## IX CONCLUSIONES

1. La definición de la fertilidad en términos de la capacidad de carga permitió simulaciones más realistas que advierten de fallas en los eventos reproductivos en una población de *Daphnia magna* dando como resultado una disminución en la tasa reproductiva y desestabilizando la estructura poblacional. Sin embargo, en futuras investigaciones será necesario el desarrollo de estudios crónicos que permitan la evaluación de la dinámica poblacional, considerando cambios en las variables propias de los ecosistemas acuáticos como el pH, dureza, temperatura, oxígeno disuelto entre otras, las cuales pueden agravar la toxicidad crónica inducida por factores fisicoquímicos estresantes como OTC y UVB. De igual manera, será de vital importancia intensificar la búsqueda de modelos matemáticos que permitan la incorporación de estas variables a fin de conseguir una mayor comprensión y evaluación del riesgo ambiental de estos contaminantes

2. Los estudios de toxicidad crónica sirvieron para estimar la concentración de OTC ideal para la identificación de su impacto en el desarrollo poblacional de *Daphnia magna* en presencia de radiación UV-B demostrado que no solo la mortalidad es un parámetro de alerta cuando se habla de bioindicadores, por el contrario, es de vital importancia considerar el monitoreo en la dinámica poblacional de los individuos.

3. La caracterización de los efectos inducidos por los factores físico-químicos estresantes OTC y radiación UV-B demostraron que la tasa finita de crecimiento poblacional es un buen indicador de alteraciones en el desarrollo poblacional ante una posible contaminación por OTC en *D. magna* al revelar el efecto de este antibiótico en la supervivencia y la reproducción.

4. La descripción de los cambios en los perfiles de expresión genética de vitelogenina en *Daphnia magna* constataron las alteraciones reproductivas en los daphnidos no solo a nivel físico sino también a nivel molecular coincidiendo con los cambios medibles en la expresión génica, lo que hace del gen de vitelogenina un adecuado biomarcador de respuesta para el proceso reproductivo de *D. magna* mediante su asociación directa con el ciclo de muda.

5. Por último, la hipótesis que se planteó al iniciar esta investigación fue que la presencia de los factores fisicoquímicos estresantes OTC y radiación UV-B alteran características relacionadas con la historia de vida y con los perfiles de expresión genética asociados al estrés en *Daphnia magna* modificando su comportamiento poblacional, la cual ha sido aceptada. Los resultados que se obtuvieron reconocieron al organismo modelo *D. magna* como una especie sensible a las alteraciones físicas o químicas ocasionadas por la presencia de OTC y radiación UV-B como contaminantes en aguas dulces generando retrasos en la madurez sexual de los daphnidos, así como una reducción en las tasas de natalidad lo cual disminuye el número de neonatos que se integran a la población y alterando la dinámica poblacional. De igual forma, los resultados para la expresión relativa del gen de vitelogenina respaldaron las alteraciones reproductivas al observarse aumentos en la expresión relativa que coinciden con los desplazamientos en los eventos reproductivos y la disminución en el número de mudas. Este escenario fue comprobado a partir de las simulaciones abordadas mediante modelación matemática mostrando a que, tanto la OTC como la radiación UV-B, son factores limitantes del crecimiento poblacional que reducen la supervivencia y modifican el ciclo reproductivo de los organismo.

## XI LITERATURA CITADA

- AEP (2015). OTC. Madrid, España: Pediamécum. Recuperado de <http://pediamecum.es>.
- Aitio, A., Anderson, D., Blain, P., Bond, J., Buratti, M., Calder, I., Chahoud, I., Fowle, J.R., Gerhardsson, L., Henderson, R., Koëter, H.B.W.M., Nishikawa, A., Thompson, C.L., Zenick, H. (1993). Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *EHC*, 155.
- Antunes, S.C., Castro, B.B. (2017). Pulgas-de-água (*Daphnia* spp.). *Ciência Elem*, 5(4), 1-5.
- Arukwe A, Goksøyr A. (2003). Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp Hepatol*, 2(1), 4.
- Avisar, D., Levin, G., Gozlan, I. (2009). The processes affecting oxytetracycline contamination of groundwater in a phreatic aquifer underlying industrial fish ponds in Israel. *Environ Earth Sci.*, 59, 939–945.
- Azevedo, S.L., Ribeiro, F., Jurkschat, K., Soares, A.M., Loureiro, S. (2016): Co-exposure of ZnO nanoparticles and UV radiation to *Daphnia magna* and *Danio rerio*: Combined effects rather than protection. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(2), 458-67.
- Bebak-Williams, J., Graham, B., Carson, C. (2002). Oxytetracycline residues in a freshwater recirculating system. *Aquaculture*, 205 (3–4), 221-230.
- Bonet, R., Garrote, A. (2011). Farmacoterapia y exposición solar. *Ambito Farmacéutico*, 30(4), 40-47.

- Buldú, J.M., Wagemakers, A., Sanjuán, M.A.F., Coloma, A., de Luís, O. (2007). Redes genéticas sintéticas: de lo simple a lo complejo. *Revista española de física*, 21(3), 10-6.
- Bustos, C. (2004). Aplicación de Modelos de Dispersión Atmosférica en la Evaluación de Impacto Ambiental: Análisis del Proceso (Tesis de maestría). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Chee-Sanford, J.C., Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I.G., Lin, Y.F., Yannarell, A.C., Maxwell, S., Aminov, R.I. (2009). Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J Environ Qual.* 38(3), 1086-1108.
- Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *American Society for Microbiology*, 65(2), 232-260.
- Coll, C., Sánchez, E. (2019): Parameter identification and estimation for stage-structured population models. *International Journal of Applied Mathematics and Computer*, 29(2): 327–336.
- Daghri, R., Drogui, P. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environ Chem Lett*, 11, 209–227.
- Danner, M.C., Robertson, A., Behrends, V., Reiss, J. (2019). Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. *Science of The Total Environment*, 664, 793-804.
- Dang, H., Zhang, X., Song, L., Chang, Y. Yang, G. (2007). Molecular determination of oxytetracycline-resistant bacteria and their resistance genes from mariculture environments of China. *Journal of Applied Microbiology*, 103 (2007) 2580–2592.

- Dodson, S., Hanazato, T. (1995). Commentary on Effects of Anthropogenic and Natural Organic Chemicals on Development, Swimming Behavior, and Reproduction of *Daphnia*, a Key Member of Aquatic Ecosystems. *Environmental Health Perspectives*, 103(4), 7-11.
- Decaestecker, E., Labbé, P., Ellegaard, K., Allen, J.E., Little, T.J. (2011). Candidate innate immune system gene expression in the ecological model *Daphnia*. *Developmental and Comparative Immunology* 35: 1066–1075.
- Dom, N., Vergauwen, L., Vandebrouck, T., Jansen, M., Blust, R., Knapen, D. (2011). Physiological and Molecular Effect Assessment versus Physico-Chemistry Based Mode of Action Schemes: *Daphnia magna* Exposed to Narcotics and Polar Narcotics. *Environ. Sci. Technol*, 46, 10–18.
- Druga, B., Turko, P., Spaak, P., Pomati, F. (2016). Cyanobacteria Affect Fitness and Genetic Structure of Experimental *Daphnia* Populations. *Environ. Sci. Technol*, 50, 3416–3424
- Eads, B., Andrews, J., Colbourne, J. (2008). Ecological genomics in *Daphnia*: stress responses and environmental sex determination. *Heredity*, 100, 184–190.
- Fatta-Kassinos, D., Meric, S., Nikolaou, A. (2011). Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (1), 251–275
- Floyd, S. K., Ranker, T. (1998). Analysis of a Transition Matrix Model for *Gaura neomexicana* Ssp. *coloradensis* (Onagraceae) Reveals Spatial and Temporal Demographic Variability. *International Journal of Plant Sciences*. 159(5), 853-863.

- Gallina, G., Poltronieri, C., Merlanti, R., De Liguoro, M. (2008). Acute toxicity evaluation of four antibacterials with *Daphnia magna*. *Vet Res Commun*, 32 (1), 287–290.
- García, R. (2006). *Sistemas complejos Conceptos, método y fundamentación epistemológica de la investigación interdisciplinaria*. Barcelona, España: Editorial Gedisa, S.A.
- Gopalsamy, K., Kulenović, M.R., Ladas, G. (1990). Environmental periodicity and time delays in a “food-limited” population model. *Journal of Mathematical Analysis and Applications*, 147(2), 545-555.
- González, J.F. Y Navarro, A. A. (2016). Valoración de efectos ecotoxicológicos de OTC en organismos terrestres y acuáticos mediante el empleo de sistemas multi-especie en suelo (MS3). (Tesis doctoral). UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Madrid.
- Gorokhova, E., Rivetti C., Furuhaugen, S., Edlund, A., Ek, K., Breitholtz, M. (2015). Bacteria-Mediated Effects of Antibiotics on *Daphnia* Nutrition. *Environ. Sci. Technol*, 49(9), 5779-5787.
- Groenendae, J., de Kroon, H., Caswell, H. (1988). Projection matrices in population biology. *TREE*, 3(10), 264-269.
- Hader, D. P., Kumar, H. D., Smithc, R.C., Worrest, R.C. (2007). Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007(6), 267–285.
- Heckmann, L.H., Callaghan, A., Hooper. H.L., Connon, R., Hutchinson, T.H., Maund, S.J., Sibly, R.M. (2007): Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters*, 172(3), 137–145.

- Helbling, E.W., Gao, K. Gonçalves, R.J., Wu, H., Villafaña, V.E. (2003). Utilization of solar UV radiation by coastal phytoplankton assemblages off SE China when exposed to fast mixing. *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES*, 259, 59–66.
- Hyne, R.V y Maher, W.A. (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 366–374.
- Ibarra, U., Trinidad, J., Rodríguez C. J.A. (2010). El modelo logístico: Una alternativa para el estudio del crecimiento poblacional de organismos. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 11(3).
- Jayasankar, V., Tsutsui, N., Jasmani, S., Saido-Sakanaka, H., Yang, W.J., Okuno, A., Tran, T.T., Aida, K., Wilder, M.N. (2002). Dynamics of vitellogenin mRNA expression and changes in hemolymph vitellogenin levels during ovarian maturation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J Exp Zool*, 293(7), 675-82.
- Jiao, S., Zheng, S., Yin, D., Wang, L., Chen, L. (2008). Aqueous oxytetracycline degradation and the toxicity change of degradation compounds in photoirradiation process. *J. Environ. Sci.*, 20 (2008), 806-813.
- Jemba, P.K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 63(1), 113-30.
- Kim, J., Lee, M., Oh, S.R., Ku, J., & Kim, K., Choi, K. (2009). Acclimation to ultraviolet irradiation affects UV-B sensitivity of *Daphnia magna* to several environmental toxicants. *Chemosphere*, 77. 1600-8.
- Kolar, B., Arnuš, L., Jeretin, B., Gutmaher, A., Drobne, D. y Durjava, M. (2014). The toxic effect of oxytetracycline and trimethoprim in the aquatic environment. *Chemosphere*, 115 (2014), 75-80.

- Le, Q.A.V., Sekhon, S.S., Lee, L., Ko, J.H., Min, J. (2016). Daphnia in water quality biomonitoring - “omic” approaches. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, 8(1), 1–6.
- Leal, J.F., Esteves, V.I., Santos, E.B.H. (2016). Use of sunlight to degrade oxytetracycline in marine aquaculture's waters. *Environmental Pollution*, 213 (2016) 932-939.
- Liu, Y, Xuexiang, H., Xiaodi, D., Yongsheng, F., Dionysios, D., (2015). Photochemical degradation of oxytetracycline: Influence of pH and role of carbonate radical. *Chemical Engineering Journal*, 276, 113-121.
- Lo, N., Smith, P., Butler, J. (1995). Population growth of northern anchovy and Pacific sardine using stage-specific matrix models. *Mar Ecol Prog Ser.* 127(1), 15-26.
- Loke, M.L., Jespersen, S., Vreeken, R., Halling-Sørensen, B., Tjørnelund, J. (2003). Determination of oxytetracycline and its degradation products by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in manure-containing anaerobic test systems. *Journal of Chromatography B*, 783 (2003), 11–23.
- Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I., Chee-Sanford, J., Maxwell, S. Aminov, R.I. (2006). Tetracycline Residues and Tetracycline Resistance Genes in Groundwater Impacted by Swine Production Facilities. *Animal Biotechnology*, 17, 157–176.
- Mendoza, P. N., Campos, S. A. (2008). Tetraciclina. *Rev Fac Med UNAM*, 51(1). 29-32.
- Mensa, J., Gatell, J.M., Corachan, M., Escofet, M. C., Martinez, J. A., Zamora, L. (2008). *Guía de terapéutica antimicrobiana*. Barcelona: Salvat Editores.

- Meyer, J.S., Ingersoll, C.G., McDonald, L.L., Boyce, M.S. (1986). Estimating Uncertainty in Population Growth Rates: Jackknife vs. Bootstrap Techniques. *Ecology*, 67(5), 1156-1166.
- Mittmann, B., Ungerer, P., Klann, M., Stollewerk, A., Wolff, C. (2014). Development and staging of the water flea *Daphnia magna* (Straus, 1820; Cladocera, Daphniidae) based on morphological landmarks. *EvoDevo*, 5(12), 2-19.
- Moreno, J.J.M., Aguarón, J.J., Escobar, U.M.T. (2001). Metodología científica en valoración y selección ambiental. *Pesquisa Operacional*, 21(1), 1-16.
- Narvaez, J.F., Jiménez, C. (2012). Pharmaceutical products in the environment: sources, effects and risks. *Vitae*, 19(1), 93-108.
- Nevesa, M., Castroa, B.B., Vidala, T.T., Marques, J.C., Coutinho, J.A.P., Goncalves, F., Goncalves, A.M.M. (2015): Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecological Indicators*, 53: 220–230.
- Nguyen, V., Nguyen, V., Li, C., Zhou, G. (2015). The degradation of oxytetracycline during thermal treatments of chicken and pig meat and the toxic effects of degradation products of oxytetracycline on rats. *J Food Sci Technol*, 52(5), 2842–2850.
- NMX-AA-087-SCFI-2010ANALISIS DE AGUA-EVALUACION DE TOXICIDAD AGUDA CON *Daphnia magna*, Straus (Crustacea-Cladocera)-METODO DE PRUEBA. Diario Oficial de la Federación. México 3 de marzo de 2011.

- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2016). OIE Annual report on the use of antimicrobial agents in animals. Londres.
- Padrón, J. (2007). Tendencias Epistemológicas de la Investigación Científica en el Siglo XXI. *Cinta de Moebio. Revista de Epistemología de Ciencias Sociales*, (28).
- Poynton, H. C., Lazorchak, J.M., Impellitter, C.A., Smith, M. E., Rogers, K. Patra, M., Hammer, K., Allen, J., Vulpe, C. (2011). Differential Gene Expression in *Daphnia magna* Suggests Distinct Modes of Action and Bioavailability for ZnO nanoparticles and Zn ions. *Environ. Sci. Technol*, 45, 762–768.
- Rautio, M., Tartarotti, B. (2010). UV radiation and freshwater zooplankton: damage, protection and recovery. *Freshw Rev*, 3(2), 105–131.
- Rhode, S., Pawlowski, M. & Tollrian, R. (2001). The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Letters to nature*, 412, 69-72.
- Rodríguez, M.A., Gundián, J., Barreto. J., Alonso, N., Areu, A., Pardo, A. (1998). Tetraciclinas. *Acta Medica*, 8(1), 75-79.
- Sandoval, V. A., Hernández, R. J., Medrano, G.B., Cervantes, F.R., González, S. A. (2011). Análisis de expresión genética por pcr (polymerase chain reaction) en embriones de pez cebra (organismo blanco) para identificar efectos tóxicos por compuestos orgánicos emergentes y detección de enterobacterias: un enfoque potencial para evaluar el efecto de contaminantes en tiempos menores de las metodologías convencionales. IMTA, 2011, Año del Turismo en México.
- Sampieri, H. R., Collado, C.F., Baptista. L. M. (2014). Metodología de la investigación. México D.F., México. McGRAW-HILL.

- Schmidt, L.J., Gaikowski, M.P., Gingerich, W.H., Dawson, V.K., Schreier, T. (2007). An Environmental Assessment of the Proposed Use of Oxytetracycline-Medicated Feed in Freshwater Aquaculture. Center for Veterinary Medicine: La Crosse, Wisconsin.
- Schwarzenberger, A., Courts, C., von Elert, E. (2009). Target gene approaches: Gene expression in *Daphnia magna* exposed to predator-borne kairomones or to microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa*. *BMC Genomics*, 10, 527.
- Segura P. A., Takada H., Correa J. A., El Saadi K., Koike T., Onwona-Agyeman S., Ofusu-Anim J., Sabi E. B., Wasonga O. V., Mghalu J. M., dos Santos Junior A. M., Newman B., Weerts S., Yargeau V. Global occurrence of anti-infectives in contaminated surface waters: impact of the income inequality between countries. (2015). *Environment International*, 80 (2015), 89-97.
- Sison-Mangus, M.P., Mushegian, A.A., Ebert, D. (2014). Water fleas require microbiota for survival, growth and reproduction. *ISME J* 9, 59–67.
- Smith, C., Kenneth & Macagno, E. (1990). UV photoreceptors in the compound eye of *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda). A fourth spectral class in single ommatidia. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, 166, 597-606.
- Soetaert, A., Van der Ven, K., Moens, L., Vandenbrouck, T., Remortel, P., De Coen, W. (2007). *Daphnia magna* and ecotoxicogenomics: Gene expression profiles of the anti-ecdysteroidal fungicide fenarimol using energy-, molting- and life stage-related cDNA libraries. *Chemosphere* 67, 60–71.

- Tasho, R.P., Cho, J.Y. (2016). Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review. *Science of the Total Environment*, 563–564 (2016), 366–376.
- Tokachil, M.N., Yahya, A. (2019): The Lefkovitch Matrix of *Aedes Aegypti* with Rainfall Dependent Model for Eggs Hatching. *Journal of Physics*, 1366, 1-8.
- Vandenbrouck, T., Soetaert, A., Van der Ven, K., Blust, R., De Coen, W. (2009). Nickel and binary metal mixture responses in *Daphnia magna*: Molecular fingerprints and (sub)organismal effects. *Aquatic Toxicology*, 92 (2009), 18–29
- Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., Kusk, K.O. (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 40(7), 723-30.