



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**“EVALUACIÓN DEL IMPACTO ECOTOXICOLÓGICO DE DISTINTAS  
FORMULACIONES COMERCIALES DEL FENOXI-HERBICIDA  
ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO EN EL MODELO DE AGUA  
DULCE *Daphnia magna*”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA:  
PALOMA MONTSERRAT ROSAS LICONA**

**DIRECTORA:  
DRA. LAURA MORALES LARA**

**CODIRECTOR:  
DR. VICTORINO GILBERTO SERAFÍN ALATRISTE BUENO**



Octubre 2023

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores la Dra. Laura Morales Lara, el Dr. Victorino Gilberto Serafín Alatraste Bueno y al Dr. Ricardo Darío Peña Moreno.

A la comisión revisora de este trabajo, la Dra. Laura Morales Lara, la Dra. Lorena Milflores Flores y la Dra. Rocío Pérez y Terrón.

Al Dr. Vladimir Serkin y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por otorgarme el apoyo económico para ayudante de investigador nivel III o emérito del SNI.

A la Facultad de Ciencias Químicas-BUAP por proporcionarme el espacio, equipo y material necesario para trabajar.

A los miembros que constituyen al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas-BUAP, sobre todo a: Sofía Angélica García Vargas, por enseñarme técnicas experimentales y guiarme durante mi estancia en el laboratorio. Jessica Alejandra Linares González, por la revisión en la redacción de este escrito y por proporcionarme el material biológico necesario. Adrián Gustavo Badillo Morales, quien me apoyó con el procesamiento de datos, realización de cultivos biológicos y la resolución de dudas respecto a cuestiones químicas. También a José Francisco Martínez Miguel, Karla Del Razo López, Teresa de Jesús Larios Pachuca y Manuel Antonio Ramos Del Carmen.

A los miembros que constituyen al laboratorio de Neuroendocrinología de la Facultad de Ciencias Químicas-BUAP, destacando a: Cintia Abigail Zeron Alvarado, Dan González Ibarra y Jesús Mirón por su guía para realizar las pruebas histológicas.

A Samantha Santiago, Fernanda Guzmán, José Martínez, Estefanía Vázquez y María Del Carmen Serrano, ya que durante mi transcurso académico fueron un soporte fundamental, sobre todo en el trabajo en equipo. Además, agradezco su amistad incondicional.

A Abigail Sánchez, Daniel Reyes, Verónica Quiros, Maritza Abascal, Joaquín Sánchez, Valeria Lozano, Verónica López, Jorge García, Regino Menchaca, Moisés Ugarte, Lizeth Reyes, Susan Álvarez, Armando Olarte y Cindy Maceda, por todos los momentos increíbles que hemos vivido durante mi vida académica.

A María Luisa Licon, Rubí Licon, Ana Delia Licon, Jorge Reyes, Aurelio Galeote, Ana Rubí Huerta, Mariana Galeote, Daniela Galeote y Jorge Reyes Licon. Siempre han estado para mí, los quiero mucho.

## DEDICATORIA

*A mi mamá María Luisa Roxana Liconá Ibarra, por su apoyo incondicional y cariño, ella me enseñó a nunca rendirme y ser constante en la vida.*

*A mi abuela María Luisa Ibarra Miranda †*

*A Salvador Antonio Rosas Castilla †*

*A Lorena Liconá Ibarra †*

*A mi familia, pero sobre todo a Ana Rubí Cherizar Huerta Liconá y Mariana Galeote Liconá, por los sustos que me metieron durante la elaboración de este escrito, agradezco que estén sanas y se encuentren bien.*

*A F.R.*

## CONTENIDO

I. ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
II. ÍNDICE DE TABLAS .....	7
III. RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. ANTECEDENTES.....	10
3. MARCO TEÓRICO .....	11
3.1 Aspectos generales del 2,4-D .....	11
3.1.1 Antecedentes del 2,4-D.....	11
3.1.2 Características fisicoquímicas del 2,4-D .....	12
3.2 Distribución del 2,4-D en diferentes compartimentos ambientales.....	14
3.3 Impacto ambiental que genera la aplicación indiscriminada de 2,4-D en cultivos.....	15
3.4 Estudios relacionados con la ecotoxicidad inducida por 2,4-D en organismos no blanco.....	16
3.4.1 Evaluación histológica .....	19
3.4.2 Cambios en el comportamiento y dinámica poblacional .....	19
3.5 <i>Daphnia magna</i> como biomodelo para estudios de ecotoxicidad.....	20
3.5.1 Estudios de ecotoxicidad del 2,4-D en <i>Daphnia magna</i> .....	22
4. JUSTIFICACIÓN .....	24
5. OBJETIVOS .....	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos particulares .....	25
6. DIAGRAMA DE TRABAJO .....	26
7. METODOLOGÍA.....	26
7.1 Estandarización para el desarrollo del cultivo para <i>Daphnia magna</i> .....	26
7.2 Elección de las formulaciones comerciales del herbicida 2,4-D .....	26
7.3 Tratamiento de los grupos experimentales.....	27
7.4 Evaluación de parámetros de historia de vida de <i>Daphnia magna</i> .....	28
7.4.1 Dinámica poblacional .....	28
7.4.2 Parámetros fisiológicos.....	28
7.4.3 Comportamiento natatorio .....	28
7.5 Identificación de perfiles proteicos .....	29
7.5.1 Obtención de proteínas .....	29
7.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-	

PAGE) .....	30
_7.5.3 Búsqueda de información de posibles proteínas expresadas.....	30
_7.6 Histología .....	31
_7.7 Análisis estadístico.....	31
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	32
_8.1 Identificación de formulaciones comerciales del herbicida 2,4-D más utilizadas.....	32
_8.2 Evaluación de los efectos inducidos por las presentaciones comerciales del herbicida 2,4-D sobre la estructura poblacional de <i>Daphnia magna</i> .....	36
_8.3 Modelación matemática del comportamiento poblacional de <i>Daphnia magna</i> en presencia de 2,4-D como factor estresante .....	43
_8.4 Evaluación de parámetros fisiológicos asociados a actividad de las extremidades torácicas y frecuencia cardiaca .....	47
_8.5 Evaluación del comportamiento natatorio .....	52
_8.6 Identificación de posibles perfiles proteicos asociados al estrés inducido por toxicidad aguda y crónica del 2,4-D .....	60
_8.7 Análisis histológico .....	68
_8.7.1 Sistema digestivo.....	68
_8.7.2 Aparato reproductor .....	76
9. CONCLUSIONES .....	79
10. BIBLIOGRAFÍA .....	81
11. ANEXOS.....	88

## I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ácido 2,4-Diclorofenoxiacético. ....	12
Figura 2. Estructura química del éster isobutílico ácido 2,4-Diclorofenoxiacético .....	13
Figura 3. Estructura química de la sal de dimetilamina ácido 2,4-Diclorofenoxiacético	14
Figura 4. Esquema general sobre la distribución del 2,4-D en diferentes compartimentos ambientes. ....	15
Figura 5. Morfología de <i>D. magna</i> .....	21
Figura 6. Ciclo partenogenético y ciclo sexual de <i>D. magna</i> . ....	22
Figura 7. Principales herbicidas empleados en la zona de estudio. ....	33
Figura 8. Formulaciones de 2,4-D seleccionadas.....	34
Figura 9. Principales herbicidas comerciales del 2,4-D empleadas por los agricultores. .....	35
Figura 10. Eficacia en el control de maleza de las principales marcas comerciales del 2,4-D de acuerdo con los agricultores encuestados. ....	35
Figura 11. Distribución de las poblaciones de <i>D. magna</i> a 21 días de exposición.....	37
Figura 12. Expulsiones tempranas del embrión en <i>D. magna</i> ocasionadas por la sal de dimetilamina 2,4-D. ....	41
Figura 13 Tasa bruta de natalidad. ....	42
Figura 14 Tasa bruta de mortalidad. ....	42
Figura 15. Modelado matemático de la estructura y crecimiento poblacional de <i>D.</i> <i>magna</i> en condiciones de control.....	44
Figura 16. Modelado matemático de la estructura y crecimiento poblacional de <i>D.</i> <i>magna</i> expuesta a éster isobutílico 2,4-D. ....	44
Figura 17. Modelado matemático de la estructura y decaimiento poblacional de <i>D.</i> <i>magna</i> expuesta a sal de dimetilamina 2,4-D.....	47
Figura 18. Evaluación crónica de la frecuencia torácica (total de movimientos torácicos por minuto) en <i>D. magna</i> expuesta a dos presentaciones comerciales de 2,4-D. ....	50
Figura 19. Evaluación crónica de la frecuencia cardíaca (total de latidos cardíacos por minuto) en <i>D. magna</i> expuesta a dos presentaciones comerciales de 2,4-D. ....	52
Figura 20. Evaluación crónica de la frecuencia salto (total de saltos por minuto) en <i>D.</i> <i>magna</i> expuesta a dos presentaciones comerciales de 2,4-D.....	54
Figura 21. Evaluación del desplazamiento (m) realizado por <i>D. magna</i> durante un minuto expuesta a dos presentaciones comerciales de 2,4-D.....	57
Figura 22. Evaluación crónica de la velocidad media de nado (m/s) en <i>D. magna</i> expuesta a dos presentaciones comerciales de 2,4-D. ....	59
Figura 23. Corrimiento electroforético de proteínas totales de <i>D. magna</i> expuesta a toxicidad aguda y crónica de éster isobutílico 2,4-D.....	65
Figura 24. Corrimiento electroforético de proteínas totales de <i>D. magna</i> expuesta a toxicidad aguda y crónica de sal de dimetilamina 2,4-D.....	65
Figura 25. Corte histológico en plano sagital de <i>D. magna</i> control.....	68
Figura 26. Cambios histológicos en el grosor del intestino medio de <i>D. magna</i> inducidos por las presentaciones comerciales de 2,4-D.....	70
Figura 27. Medidas que corresponden al grosor ( $\mu\text{m}$ ) del intestino medio de <i>D. magna</i> expuesta a toxicidad aguda y crónica de las presentaciones comerciales de 2,4-D....	71
Figura 28. Medidas que corresponden al grosor ( $\mu\text{m}$ ) de pared intestinal de <i>D. magna</i> expuesta a toxicidad aguda y crónica de las presentaciones comerciales de 2,4-D....	71

Figura 29. Cambios histológicos en el intestino medio de <i>D. magna</i> inducidos por las presentaciones comerciales de 2,4-D. ....	73
Figura 30. Medidas que corresponden a la longitud ( $\mu\text{m}$ ) de las microvellosidades en el intestino medio de <i>D. magna</i> expuesta a toxicidad aguda y crónica de las presentaciones comerciales de 2,4-D. ....	73
Figura 31. Cambios histológicos en el ovario de <i>D. magna</i> inducidos por las presentaciones comerciales de 2,4-D. ....	77
Figura 32. Número de oocitos presentes en el ovario <i>D. magna</i> expuesta a toxicidad aguda y crónica de las presentaciones comerciales de 2,4-D. ....	78
Figura 33. Estructura de la encuesta realizada. ....	86

## II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos biológicos inducidos por el 2,4-D en organismos no blanco de acuerdo con la información recopilada por Islam <i>et al.</i> (2018). ....	17
Tabla 2. Ejemplos de biomarcadores que permiten evaluar las alteraciones inducidas por el 2,4-D en distintos organismos. ....	18
Tabla 3. Estructura poblacional de <i>D. magna</i> durante 21 días de exposición. ....	36
Tabla 4. Parámetros de historia de vida de <i>D. magna</i> tratada con 2,4-D. ....	39
Tabla 5. Parámetros asociados a los abortos inducidos por la sal de dimetilamina 2,4-D en <i>D. magna</i> . ....	41
Tabla 6. Posibles proteínas expresadas en <i>D. magna</i> ante la exposición aguda y crónica con éster isobutílico 2,4-D. ....	66
Tabla 7. Posibles proteínas expresadas en <i>D. magna</i> ante la exposición aguda y crónica con sal de dimetilamina 2,4-D. ....	67

### III. RESUMEN

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es uno de los herbicidas más utilizados en la agricultura por su alta efectividad y bajo costo; no obstante, el uso indiscriminado de las diferentes presentaciones comerciales ha facilitado su dispersión a otros compartimientos ambientales convirtiéndolo en un contaminante químico para especies que habitan ecosistemas acuáticos. En este trabajo se estudiaron los efectos ecotoxicológicos de dos presentaciones comerciales de este herbicida, el éster isobutílico 2,4-D y la sal de dimetilamina 2,4-D, en el modelo de agua dulce *Daphnia magna*, mediante la evaluación de parámetros relacionados con características de historia de vida de los organismos, lo que permitió medir las respuestas inducidas por el 2,4-D a nivel poblacional. Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante modelado matemático a fin de explicar las afecciones en la dinámica poblacional del modelo de estudio. Paralelamente, se llevó a cabo la valoración de los efectos inducidos por ambos herbicidas sobre parámetros fisiológicos y comportamiento natatorio, seguido de la identificación de posibles perfiles proteicos asociados al estrés producido por toxicidad aguda y crónica. Finalmente, la descripción de los cambios histológicos, destacaron afectaciones morfológicas severas en el sistema digestivo de los organismos con la consecuente limitación nutricional de los individuos.



## 1. INTRODUCCIÓN

El combate de maleza en los cultivos ha ocasionado la generación de una amplia gama de herbicidas, entre los cuales destacan aquellos cuya formulación contienen ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Los herbicidas derivados del 2,4-D han sido catalogados dentro de los más utilizados en el mundo por su alta efectividad y bajo costo; sin embargo, el 2,4-D produce efectos tóxicos inespecíficos en organismos no blanco. Debido a esta problemática, y para poder identificar los efectos asociados a factores químicos estresantes como el 2,4-D, resulta necesario abordar estudios ecotoxicológicos con biomodelos acuáticos sensibles, como en el caso del cladóceros *Daphnia magna*.

Así, el objetivo de esta investigación consistió en evaluar el impacto ecotoxicológico de distintas formulaciones comerciales del fenoxi-herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético en el modelo de agua dulce *D. magna*. Para ello, se determinaron los efectos inducidos por dos formulaciones comerciales de 2,4-D (éster isobutílico 2,4-D y sal de dimetilamina 2,4-D) en el modelo de estudio relacionados con características de su historia de vida, parámetros fisiológicos (frecuencia torácica y cardíaca) y comportamiento natatorio (frecuencia de salto, desplazamiento y velocidad media de nado).

Ahora bien, los resultados concernientes a historia de vida fueron abordados mediante modelo matemático, lo que facilitó la predicción de los posibles riesgos ambientales promovidos por el 2,4-D. Análogamente se identificaron los posibles perfiles proteicos en *D. magna* asociados al estrés producido por el 2,4-D.

Finalmente se describieron los cambios histológicos en tejido intestinal y ovárico de *D. magna* tras una exposición aguda y crónica del 2,4-D. Los resultados de este trabajo permiten suponer que la exposición a ambas formulaciones comerciales conduce a una limitación nutricional en los organismos cuya mayor consecuencia es la disminución en el aprovechamiento de los recursos energéticos disponibles para llevar a cabo procesos biológicos asociados a la reproducción, maduración del embrión y movimiento natatorio.

## 2. ANTECEDENTES

Por medio de la base de datos Scopus se efectuó un análisis bibliográfico referente a literatura asociada a la evaluación del impacto ecotoxicológico del ácido 2,4-diclorofenoxiacético en *Daphnia magna*. Los resultados mostraron un total de 8 artículos con investigaciones elaboradas en países como Estados Unidos, Polonia, Brasil, Camerún, India, España y Eslovaquia a lo largo de 1982 al 2023.

De lo anterior, los artículos comprendidos entre 1980 a 2005 destacan las afectaciones inducidas por el 2,4-D en *D. magna*. Se reportan alteraciones asociadas a fisiología digestiva, bioenergética, parámetros fisiológicos como tasa de crecimiento y determinación de sexo, establecimiento de la dosis efectiva y letal media e impacto en la reducción de su diversidad (De Coen & Janssen, 1998; Alexander *et al.*, 1985; Fargašová, 1994; Ranke-Rybicka *et al.*, 1995; Kashian & Dodson, 2002; Relyea, 2005).

Las investigaciones más recientes constituyen a Fai *et al.* (2015) quienes compararon la sensibilidad de bioensayos para determinación de la dosis efectiva media (CE<sub>50</sub>) y dosis letal media (CL<sub>50</sub>) en *D. magna* y *Oreochromis niloticus*, expuestas a dos herbicidas cuyo principio activo es el glifosato y el 2,4-D. Los autores de este trabajo obtuvieron que la CE<sub>50</sub> del herbicida que contiene 2,4-D resulta tener un valor de 5.55 mg/l para *D. magna*, mientras que la CL<sub>50</sub> para *O. niloticus* resulta ser de 11.30 mg/l. Además, Moreira *et al.* (2022) determinaron mediante ensayos de toxicidad crónica, parámetros poblacionales asociados a la supervivencia materna y fecundidad en *D. magna* expuesta a 2,4-D.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Aspectos generales del 2,4-D

##### 3.1.1 Antecedentes del 2,4-D

El herbicida 2,4-D se formuló por primera vez en la década de los 40's (da Silva Pinto *et al.*, 2021). Durante la Segunda Guerra Mundial, científicos aliados de Estados Unidos y Reino Unido realizaron una investigación para identificar posibles armas biológicas capaces de destruir los cultivos alemanes, conduciendo al desarrollo del 2,4-D (Haggblade *et al.*, 2017).

Posteriormente, a partir de 1950 las empresas agroquímicas empezaron la comercialización de este herbicida, dirigiéndose especialmente al combate de herbáceas de hoja ancha para favorecer a cultivos de arroz y trigo (Haggblade *et al.*, 2017). Más tarde, en el contexto de la Guerra Fría, se emplearon compuestos químicos como armas militares (Doose, 2021). Durante la Guerra de Vietnam, la Fuerza Aérea de los Estados Unidos utilizó el 2,4-D en conjunto con otros compuestos como el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) para crear el Agente Naranja, una sustancia que se produjo en masa con el objetivo de defoliar bosques enteros, y así detectar con mayor facilidad los escondites de los soldados contrarios (Stellman & Stellman, 2018). La contaminación provocada por el Agente Naranja se debió principalmente a la acción de dioxinas (sustancias responsables de generar defectos fisiológicos en mamíferos y mayores tasas de cáncer) provenientes del 2,4-D y el 2,4,5-T, es por ello que, en la actualidad el 2,4-D se fabrica con un proceso que eviten la producción de dioxinas (Jote, 2019).

Pese a su osco desarrollo, actualmente, el 2,4-D es uno de los herbicidas más utilizados en todo el mundo a consecuencia de su bajo costo, selectividad, eficacia y amplio espectro de control (Palma-Bautista *et al.*, 2020). Aunado a ello, destaca la solubilidad en agua de las distintas formulaciones comerciales lo que da como resultado una rápida penetración a través de las hojas y raíces (Islam

*et al.*, 2018).

### 3.1.2 Características fisicoquímicas del 2,4-D

El ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) o  $C_8H_6Cl_2O_3$  en su estructura química (Figura 1) es un ingrediente activo clasificado como perteneciente a los grupos de los fenoxi-herbicidas, siendo un compuesto que busca imitar los efectos de las auxinas vegetales en las plantas (Binh & Nguyen, 2020). El 2,4-D está conformado por 2 grupos funcionales: a) un anillo aromático (grupo fenoxi) que contiene dos átomos de cloro en la posición 2 y 4, y b) un ácido carboxílico. Esta molécula tiene un peso molecular de 221.04 g/mol, su punto de fusión es de 140.5 °C y su punto de ebullición es de 130 °C (Magnoli *et al.*, 2020). La vida media de este compuesto varía aproximadamente de 20 a 312 días según las condiciones medioambientales (Dolatabadi *et al.*, 2021). Su presión de vapor es de  $8.25 \times 10^{-8}$  mm Hg a 20 °C, y presenta una constante de la Ley de Henry de  $8.6 \times 10^{-6}$  atm.m<sup>3</sup>/mol a 20 °C (INECC, s.f.). Su densidad es de 1.42 g/ml a 25 °C, y al calentarse puede emitir cloruro de hidrógeno y monóxido de carbono (NCBI, 2022). Además, este compuesto (dependiendo de su vehículo) puede solubilizarse en: Agua, Acetona, Etanol al 50% y 95%, Diesel, Isopropanol, Tolueno y Benceno (INECC, s.f.).

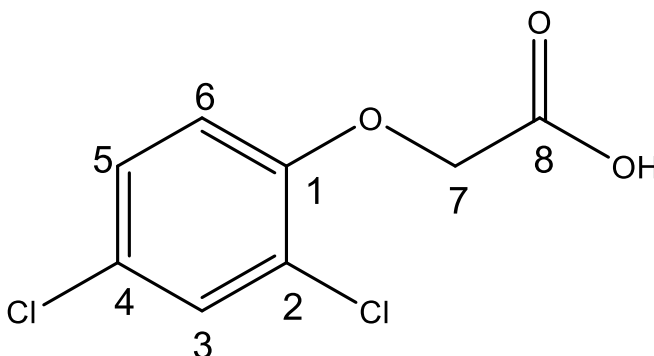


Figura 1. Estructura química del ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.

### 3.1.3 Formulaciones comerciales del 2,4-D

Para la aplicación en campo, generalmente el 2,4-D se adquiere en forma de polvo o líquido (NCBI, 2022). Las formulaciones más populares en el mercado

usualmente se acompañan de los siguientes vehículos: éster butílico (Figura 2) en forma de emulsión, sales como isopropilamina, triisopropanolamina, y dietanolamina, pero destaca particularmente la sal dimetilamina 2,4-D (Figura 3), entre otros como sal de colina y ácido (Juan, *et al.*, 2021; Serbent *et al.*, 2019). Las formulaciones con sal de dimetilamina 2,4-D y éster representan aproximadamente del 90 al 95 % del uso total en todo el mundo (Islam *et al.*, 2018).

Cuando el 2,4-D reacciona con un alcohol se forma un grupo éster, y los ésteres hechos a partir de alcoholes que poseen una cadena de alquilo con cuatro carbonos o menos poseen la característica de que son altamente volátiles, este grupo incluye los ésteres de metilo, isopropilo y butilo (Peterson *et al.*, 2016). Específicamente el éster butílico 2,4-D (o también encontrado como isobutílico) posee las siguientes propiedades: tiene un peso molecular de 277.15 g/mol, una presión de vapor de  $5.29 \times 10^{-2}$  a  $8.2 \times 10^{-3}$  Pa, y su constante de Ley de Henry es  $4,88 \times 10^{-7}$  atm.m<sup>3</sup>/mol (Qurratu & Reehan, 2016). En general, los ésteres son solubles en aceites, pero insolubles en agua, por esta razón se formulan como concentrados emulsionables para aplicación en medios acuosos (Peterson *et al.*, 2016). Cuando una formulación emulsionable de éster 2,4-D se mezcla con agua, el agente emulsionante forma gotas aceitosas suspendidas, sin embargo, al no disociarse ni ionizarse en este medio, no se desarrolla una reacción con los cationes del agua dura para formar precipitados insolubles (Peterson *et al.*, 2016).

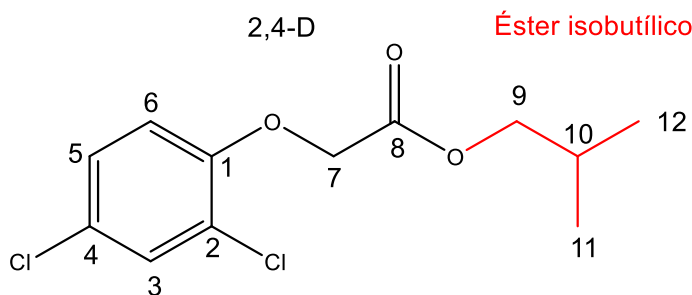


Figura 2. Estructura química del éster isobutílico ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.

La formulación de sal de dimetilamina 2,4-D se caracteriza por tener un peso molecular de 266.13 g/mol y una presión de vapor de  $<1 \times 10^{-7}$  mm Hg a 25°C, se presenta en forma de líquido o sales y no es volátil (Qurratu & Reehan, 2016). La elaboración de este tipo de formulación se da cuando el 2,4-D reacciona con una amina (Peterson *et al.*, 2016). La presencia de sales hace que sea soluble en agua, pero cabe resaltar que al utilizar agua dura con un alto contenido de iones que pueden asociarse con el 2,4-D, se corre el riesgo de formar sales insolubles precipitables, por esta razón, se incluyen en las marcas comerciales con este tipo de formulaciones agentes secuestrantes (Peterson *et al.*, 2016).

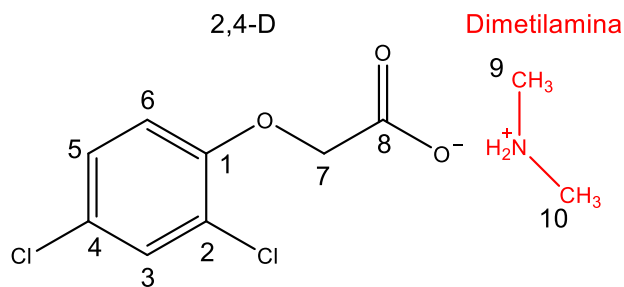


Figura 3. Estructura química de la sal de dimetilamina ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.

### 3.2 Distribución del 2,4-D en diferentes compartimentos ambientales

Islam *et al.* (2018) describen las formas de propagación del 2,4-D en diferentes ambientes. De acuerdo con la información recopilada por parte de estos autores (Figura 4): cuando el 2,4-D se aplica en los cultivos, este herbicida es capaz de distribuirse al medio acuático mediante el fenómeno físico denominado escorrentía. Cuando ocurren inundaciones, el agua de lluvia arrastra los residuos de 2,4-D llegando hasta redes fluviales, en medios acuáticos, el 2,4-D puede ser degradado a través de hidrólisis y fotólisis, o generar una bioacumulación en organismos acuáticos no blanco. De igual forma, el 2,4-D puede ser absorbido por sedimentos, induciendo procesos de volatilización, sorción, desorción, degradación química y biológica, absorción, escorrentía o lixiviación (si el suelo contiene bajas cantidades de arcilla o poca materia orgánica). Cabe mencionar

que estos mecanismos dependen de las propiedades fisicoquímicas que conforman las distintas formulaciones de 2,4-D, además de las condiciones ambientales y los microorganismos presentes en el sustrato. Asimismo, el 2,4-D puede transmitirse hacia el aire por volatilización o erosión eólica.

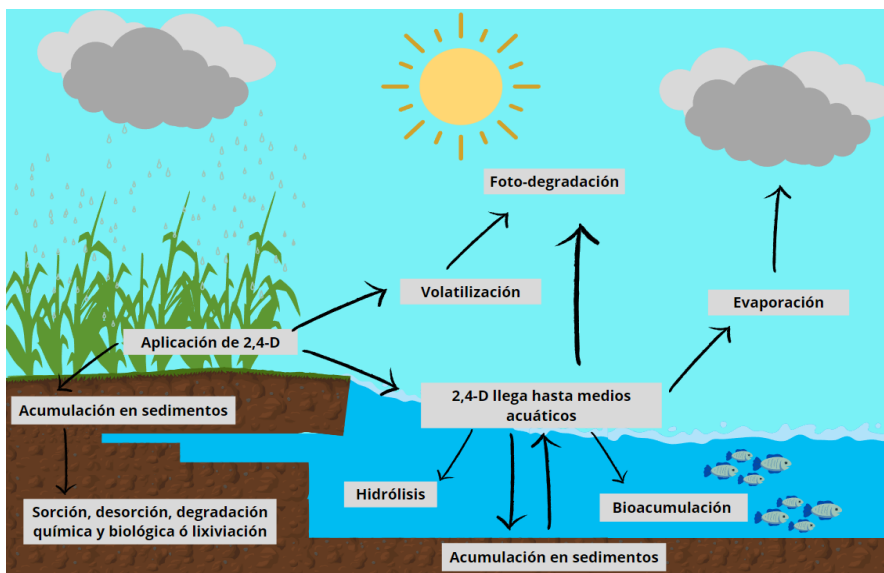


Figura 4. Esquema general sobre la distribución del 2,4-D en diferentes compartimentos ambientales. Elaboración propia.

### 3.3 Impacto ambiental que genera la aplicación indiscriminada de 2,4-D en cultivos

En México, el uso de herbicidas se ha intensificado a través de los años. En 1994, SEMARNAT reportó que la producción de estas sustancias fue aproximadamente de 11,100 mil toneladas, mientras que para el año 2010 se generó un aumento equivalente a 31,878 mil toneladas, y en 2018 de hasta 33,977 mil toneladas (CEDRSSA, 2020; SEMARNAT, 2016; SEMARNAT, 2018). De lo anterior, destaca el 2,4-D como el cuarto herbicida más utilizado en México con una cantidad aplicada de 273,239.48kg/i.a durante el periodo de 2007 a 2015 (SEMARNAT, 2022).

Así, con el incremento del empleo de este tipo de sustancias para combatir la maleza, se ha normalizado su uso excesivo en los cultivos, lo que ha llevado a su propagación en diferentes compartimentos ambientales. De acuerdo con un

estudio elaborado en 2019 por la SEMARNAT para el desarrollo de un diagnóstico de la contaminación por plaguicidas en agua y suelos, se determinó que los estados con mayor número de sitios con presencia y niveles medidos de plaguicidas son Campeche, Sinaloa y Guerrero. Además, la información recopilada muestra concentraciones de compuestos provenientes de herbicidas detectados en cuerpos de agua correspondientes al Río Atoyac en Puebla, y Río La Laja en Guanajuato, en este último se encontró la presencia de 2,4-D. No obstante, el panorama antes referido podría estar subestimado dada la falta de registros en México que involucren información estadística concerniente a la contaminación producida por el 2,4-D (SEMARNAT, 2019).

Por consiguiente, la inminente presencia de este tipo de sustancias, incluyendo el 2,4-D, en medios acuáticos genera un riesgo por exposición a los organismos habitantes de diferentes niveles tróficos, lo que ocasiona efectos tóxicos en ellos asociados a la dosis y la frecuencia de exposición, aumentando su susceptibilidad y la sensibilidad (Islam *et al.*, 2018). Se ha estimado que alrededor del 91.7% del herbicida 2,4-D aplicado en el cultivo termina en agua (Mountassif *et al.*, 2008). De esta manera, su presencia en aguas superficiales y subterráneas es innegable dado que el 2,4-D ingresa por escorrentía y lixiviación, lo cual denota múltiples efectos directos o indirectos en biotas acuáticas (Zafra-Lemos *et al.*, 2021). Además, productos acuáticos o terrestres se utilizan para producir alimentos, así los residuos se bioconcentran en animales, cuyas carnes y productos lácteos son finalmente consumidos por humanos (Islam *et al.*, 2018).

### **3.4 Estudios relacionados con la ecotoxicidad inducida por 2,4-D en organismos no blanco**

En la Tabla 1 se describen respuestas asociadas a un estrés biológico ocasionado por exposición al 2,4-D sobre organismos provenientes de ecosistemas acuáticos, las principales afecciones se registran en el metabolismo, estructura de los tejidos, inhibición del crecimiento y anomalías fisiológicas.



Tabla 1. Efectos biológicos inducidos por el 2,4-D en organismos no blanco de acuerdo con la información recopilada por Islam et al. (2018).

Compartimiento ambiental	Organismos no blanco afectados	Alteraciones inducidas debido a la exposición de 2,4-D
<b>Acuático</b>	Peces	Disminución en el consumo de oxígeno celular Alteraciones histopatológicas Afectaciones en el peso, longitud corporal total y tasa de crecimiento Alteración en órganos sensoriales Menor producción de mucus Disrupción endocrina
	Anfibios	Inhibición de la maduración de ovocitos Alteración de la metamorfosis Neurotoxicidad y estrés oxidativo Supresión inmunológica
	Crustáceos	Cambios catabólicos Alteraciones en parámetros poblaciones Afectaciones en la producción enzimática
	Algas	Inhibición sobre la fotosíntesis y/o respiración
<b>Terrestre</b>	Rumiantes	Disrupción endocrina por especies reactivas de oxígeno Inhibición del metabolismo lipídico y síntesis de proteínas Disminución de la actividad enzimática mitocondrial
	Insectos	Decaimiento poblacional Cambios reproductivos Daño oxidativo
	Lumbrícidos	Acumulación de especies reactivas de oxígeno
	Hongos	Disminución en la producción de glucosa y nitrógeno
	Bacterias	Alteraciones sobre la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético, transporte intermembrana y procesos de oxidación

Por otro lado, la evaluación del efecto ecotoxicológico en especies no blanco afectadas por contaminantes, se emplean biomarcadores, los cuales se utilizan para medir la interacción entre un sistema biológico y un agente químico, físico o biológico, dando como resultado una respuesta funcional o fisiológica, que puede ocurrir a nivel celular o molecular (Arango, 2012). El uso de biomarcadores se considera uno de los mejores procedimientos para detectar *in situ* el impacto

ecológico de sustancias nocivas (Barata *et al.*, 2007).

Así pues, con el objetivo de identificar alteraciones biológicas inducidas por el 2,4-D (Tabla 2) tales como cambios moleculares, fisiológicos, metabólicos y enzimáticos, se han propuestos diversos biomarcadores cuyo empleo ha facilitado la comprensión de la respuesta fisiológica ante exposición a dicho herbicida (Cattaneo *et al.*, 2008).

Tabla 2. Ejemplos de biomarcadores que permiten evaluar las alteraciones inducidas por el 2,4-D en distintos organismos.

Biomarcador	Alteración asociada	Organismos donde se ha identificado	Referencia
Expresión de proteínas de choque térmico (HSP)	Estrés oxidativo	<i>Squalus acanthias</i> <i>Chironomus riparius</i>	Villalobos <i>et al.</i> (2006), Park <i>et al.</i> (2010)
Aumento en la actividad de proteínas glutatión S-transferasas (GST)	Afectaciones en reacciones redox	<i>Rana temporaria</i>	Aronzon <i>et al.</i> (2011)
Activación de proliferadores peroxisómicos tipo alfa (PPAR $\alpha$ ) en células de Leydig	Deterioro en la Espermatogénesis	<i>Mus musculus</i>	Harada <i>et al.</i> (2016)
Supresión de la proteína del grupo 1 de alta movilidad (Hmgcs1) y la proteína 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (Hmgcr) en células de Leydig	Deterioro en la Espermatogénesis	<i>Mus musculus</i>	Harada <i>et al.</i> (2016)
Expresión de enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión S-transferasa (GST)	Presencia de especies reactivas de oxígeno	<i>Eisenia andrei</i>	Hattab <i>et al.</i> (2022)
Producción de 8-hidroxidesoxiguanosina sérica (8-OHdG) y 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHG)	Estrés oxidativo	Humano (Mujeres embarazadas)	Wang <i>et al.</i> (2022)
Producción de ácido 4-hidroxinonalmercaptopúrico (HNEMA)	Peroxidación lipídica	Humano (Mujeres embarazadas)	Wang <i>et al.</i> (2022)

### **3.4.1 Evaluación histológica**

En la actualidad se sabe que el 2,4-D provoca daños en múltiples tipos de tejidos en una gran variedad de especies, por ello es imperante tomar en cuenta evaluaciones histológicas. Por mencionar algunos ejemplos, en cordados acuáticos, se reportan malformaciones en hígado donde se incluye vacuolización de hepatocitos, agrandamiento de sinusoides, dilatación de vasos sanguíneos y un aumento número de melanomacrófagos (Cury *et al.*, 2019). En el caso de tejidos, se reportan malformaciones del disco oral, anomalías intestinales, daños en el riñón; los cuales incluyen alteraciones glomerulares y congestión vascular (Cury *et al.*, 2019; Tayeb *et al.*, 2012). En órganos reproductivos de los peces *Clarias Batrachus*, en hembras se ha detectado que el 2,4-D provoca presencia de ovocitos atrésicos, hipertrofia, deformidades mitocondriales, vacuolización y heterocromatinización, mientras que, en machos, la estructura de los túbulos seminíferos contiene signos de necrosis con disolución del núcleo y la membrana nuclear, además de células de Leydig hipertrofiadas (Ateeq *et al.*, 2006; de Castro Marcato, 2017).

### **3.4.2 Cambios en el comportamiento y dinámica poblacional**

Otro aspecto relevante es que las respuestas de los organismos a los cambios en el medio ambiente por efecto de la contaminación, a menudo se manifiestan con cambios en el comportamiento. Lo anterior debido a las afecciones inducidas en múltiples sistemas fisiológicos que conforman a los individuos, cuyos efectos adversos se ven reflejados en el comportamiento social, reproductivo, cognitivo y nutricional, entre muchos otros (Schuijt *et al.*, 2021). Este tipo de cambios en el comportamiento debido a la exposición de 2,4-D han sido muy abordados en roedores y peces. De igual forma, destacan estudios que evalúan las alteraciones en el comportamiento natatorio debido a exposición por herbicidas, de ahí que el análisis de tales parámetros se considere un novedoso enfoque metodológico en estudios ecotoxicológicos (Bownik, 2017). Se ha encontrado que el 2,4-D puede inducir comportamientos anormales asociados a la natación de peces a

determinadas concentraciones (Sarıkaya & Yılmaz, 2003; Moreira *et al.*, 2021). Análogamente, los contaminantes químicos pueden afectar la dinámica poblacional de las especies expuestas al aumentar la tasa de mortalidad y/o reducir la tasa de natalidad, dando como resultado una disminución en el crecimiento de la población (Schuijt *et al.*, 2021). Aunque no se ha ahondado sobre el impacto del 2,4-D en la dinámica población de organismos acuáticos, se ha determinado que el 2,4-D influye negativamente en el crecimiento poblacional de especies como *Brachionus patulus* (Sarma *et al.*, 2001).

### **3.5 *Daphnia magna* como biomodelo para estudios de ecotoxicidad**

*Daphnia magna* (Cladocera: Daphniidae) es un organismo plantónico ampliamente utilizado como biomodelo para investigaciones biológicas asociadas a la ecología, evolución y biología reproductiva, pero sobre todo en la ecotoxicología, debido a que es un organismo sensible ante la presencia de factores y cambios ambientales, se emplea para determinar toxicidad aguda, toxicidad crónica, mediante la evaluación de biomarcadores en respuesta a diversos estresores químicos o físicos (Lee *et al.*, 2019).

Viven en depósitos de agua dulce donde desempeñan un papel clave en la estructura y funcionamiento del ecosistema, puesto que en la cadena trófica actúa como alimento para peces depredadores (Pauwels *et al* 2010; Lee *et al.*, 2019). Así mismo, son filtradores no selectivos de partículas, lo que permite mejorar las condiciones del agua al reducir la concentración de sólidos en suspensión (Stevčić *et al.*, 2020).

Respecto a sus características morfológicas (Figura 5), *D. magna* tiene un tamaño de 5 a 6 mm (Lee *et al.*, 2019). También está constituido por un exoesqueleto de quitina. Las funciones de sus apéndices, además de permitir la locomoción, se relacionan con diferencias en la actividad mecano-sensorial y quimio-sensorial (Klann & Stollewerk, 2017).



Figura 5. Morfología de *D. magna*. Imagen tomada de Ebert (2005).

Su ciclo de vida se caracteriza por una reproducción asexual o sexual cuando hay condiciones estresantes en el ambiente (Figura 6). Generalmente experimenta partenogénesis cíclica, donde una hembra produce una nidada de huevos (amícticos) en la cámara de cría, liberada después de cada muda. A 20 °C, los embriones eclosionan después de 24 horas. Después de 3 días, la madre libera neonatos idénticos a ella. La edad a la que se depositan los primeros huevos en la cámara de cría es de 5 a 10 días. Una hembra adulta puede producir una nidada de huevos cada 3 o 4 días hasta su muerte (*D. magna* vive aproximadamente 45 días) (Ebert, 2005).

En el caso de la reproducción sexual, se producen huevos diploides (2N) que desarrolla tanto a machos como hembras, y otro tipo diferente de huevo haploide (N) que entra en una fase de reposo. Los óvulos en reposo son encapsulados en una estructura llamada *ephipium*, suele estar melanizada y generalmente

contiene 2 óvulos grandes. Los machos diploides fertilizan los huevos haploides, la fertilización es interna y ocurre entre una muda y la deposición de huevos en el *ephipium*. Después de ser liberados, los huevos pueden permanecer en reposo durante un largo periodo de tiempo hasta eclosionar cuando haya períodos favorables que aseguren la persistencia de la población.

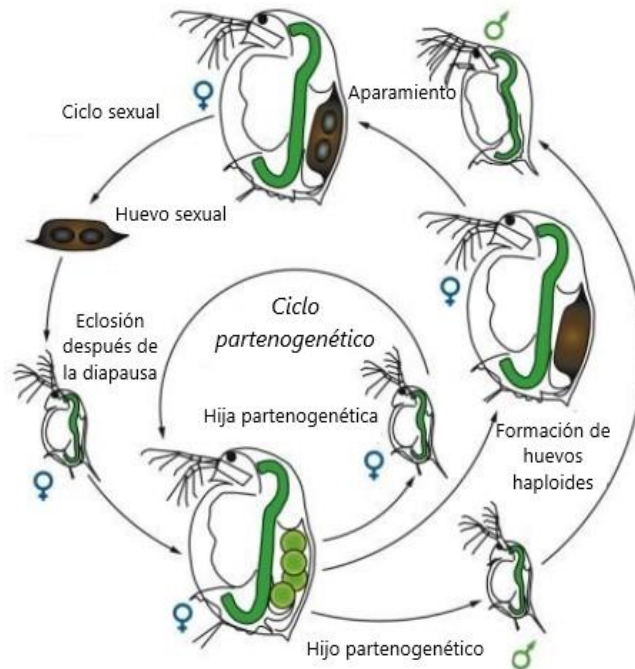


Figura 6. Ciclo partenogenético y ciclo sexual de *D. magna*. Imagen tomada de Ebert (2005).

### 3.5.1 Estudios de ecotoxicidad del 2,4-D en *Daphnia magna*

Para reportar el efecto ecotoxicológico agudo de cualquier sustancia nociva en *D. magna* normalmente se determina la dosis efectiva media (CE<sub>50</sub>) o dosis letal media (CL<sub>50</sub>), a las 48 h, este valor varía dependiendo del tipo de herbicida que se emplee (marca y vehículo), también es posible estudiar las afectaciones hacia los organismos mediante análisis de toxicidad a largo plazo (Martins *et al.*, 2007). Se han realizado algunos estudios del efecto que provoca el 2,4-D en *D. magna*, de entre ellos destaca el trabajo de De Coen & Janssen (1998) quienes investigaron la toxicidad aguda del 2,4-D en *D. magna* mediante el uso de biomarcadores asociados a la fisiología digestiva y bioenergética de los

organismos, a través de la evaluación de la actividad enzimática. Se observaron diferencias significativas en el catabolismo de los individuos: donde no hubo recuperación de la actividad de ingestión, además, se registraron aumentos significativos en la actividad de la enzima esterasa, y afectaciones en enzimas responsables de la digestión de proteínas y lípidos.

Al pasar de los años, las investigaciones relacionadas con la ecotoxicidad del herbicida en *D. magna* fueron disminuyendo, reportando principalmente la CE<sub>50</sub> y/o la CL<sub>50</sub>. Actualmente se han retomado, un estudio reciente por Moreira *et al.* (2022) evaluó la capacidad de *D. magna* para detectar y evitar hábitats contaminados por fipronil y 2,4-D, los investigadores encontraron que hay preferencia por parte de los organismos a ubicaciones con poca cantidad de tóxico, no todos los individuos logran escapar con éxito de las zonas contaminadas. En ensayos de toxicidad crónica se mencionan parámetros como supervivencia materna, fecundidad y longitud del cuerpo.

La confluencia de investigaciones apremia la continuidad en el análisis ecotoxicológico del 2,4-D en este modelo de estudio, tomando en cuenta otros parámetros que proporcionen más información sobre los efectos nocivos de este herbicida en organismos no blanco.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es uno de los herbicidas más utilizados en la agricultura por su alta efectividad y bajo costo; no obstante, el uso indiscriminado de las diferentes presentaciones comerciales ha facilitado su dispersión hacia otros compartimentos ambientales, lo que le confiere la cualidad de contaminante químico para las especies que habitan ecosistemas acuáticos. La urgencia de investigar sobre los efectos ecotoxicológicos en organismos no blanco como el modelo de agua dulce *Daphnia magna*, se debe a que los individuos pueden bioacumular el 2,4-D en un corto periodo de tiempo con la consecuente generación de respuestas asociadas a cambios en su metabolismo, fisiología, estructura de sus tejidos y anomalías reproductivas, además de la propagación del 2,4-D en la cadena trófica.

Por lo que en este trabajo se estudiará el impacto ecotoxicológico agudo y crónico en el modelo de estudio, mediante la evaluación de parámetros bioquímicos, fisiológicos e histológicos, paralelo al análisis del comportamiento e historia de vida a través de modelación matemática, lo que contribuirá a estimar posibles riesgos ambientales promovidos por el 2,4-D a largo plazo y con ello cimentar precedentes en la ecotoxicología de ecosistemas de agua dulce.



## 5. OBJETIVOS

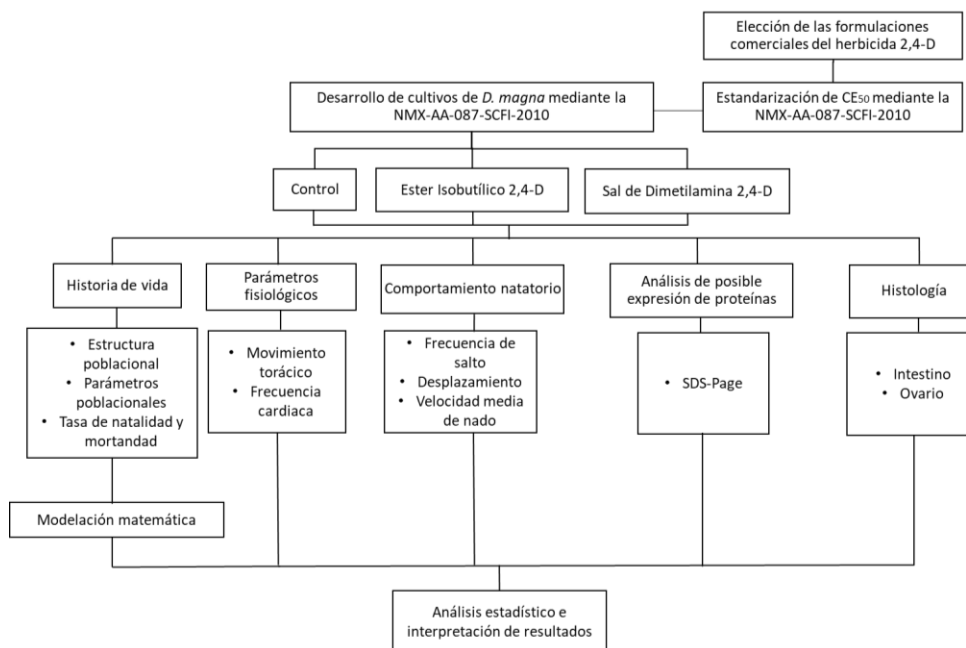
### 5.1 Objetivo general

Evaluar el impacto ecotoxicológico de distintas formulaciones comerciales del fenoxi-herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético en el modelo de agua dulce *Daphnia magna*.

### 5.2 Objetivos particulares

- Evaluar los efectos inducidos por dos formulaciones comerciales de 2,4-D en *D. magna* relacionados con características de su historia de vida.
- Realizar un modelo matemático que prediga los cambios poblacionales promovidos por el 2,4-D en *D. magna*.
- Evaluar los efectos inducidos por dos formulaciones comerciales de 2,4-D en *D. magna* relacionados con parámetros fisiológicos (frecuencia torácica y frecuencia cardíaca) y comportamiento natatorio.
- Identificar los perfiles proteicos que podrían considerarse como biomarcadores asociados al estrés inducido por la exposición aguda y crónica de dos formulaciones comerciales de 2,4-D en *D. magna*.
- Describir los cambios histológicos por toxicidad aguda y crónica de dos formulaciones comerciales de 2,4-D en *D. magna*.

## 6. DIAGRAMA DE TRABAJO



## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Estandarización para el desarrollo del cultivo para *Daphnia magna*

El mantenimiento adecuado de *D. magna* se consiguió a través del protocolo establecido por la NMX-AA-087-SCFI-2010. Se iniciaron cultivos a partir de 20 individuos hembra con reproducción asexual distribuidos en 200ml de agua dura reconstituida (pH de  $8.0 \pm 0.2$ ) con dureza total de 250 mg/L y recambio dos veces por semana. La alimentación se efectuó con alga *Spirulina* triturada de la marca TetraVeggieTM a una concentración de 250,000 células/ml cada tercer día. Así mismo, los organismos se conservaron a temperatura ambiente ( $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), expuestos a un fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 horas de oscuridad (.

### 7.2 Elección de las formulaciones comerciales del herbicida 2,4-D

Con el fin de seleccionar los tipos de herbicidas comerciales a emplearse en la evaluación de los efectos toxicológicos del 2,4-D en *D. magna*, se realizó una encuesta a productores en los municipios pertenecientes al estado de Puebla y

en algunos de otros estados como Oaxaca, Veracruz, Sonora, Nayarit y Guerrero.

El muestreo fue no probabilístico por conveniencia dada la facilidad de acceso, se encuestó a 30 productores mayores a 18 años. La estructura interna de la encuesta se muestra en el anexo 1.

Ahora bien, la eficiencia en el proceso de medición considera la validación y confiabilidad del instrumento, por tanto, la validez se determinó mediante el cálculo del alfa de Cronbach con el programa R studio versión 4.2.1.

### **7.3 Tratamiento de los grupos experimentales**

Con el objetivo de definir la concentración subletal a utilizar de cada herbicida para analizar el daño ecotoxicológico a largo plazo, en primera instancia se determinó la dosis efectiva media ( $CE_{50}$ ) de cada formulación. Se realizaron pruebas exploratorias a partir de los resultados preliminares que establece la hoja de seguridad de los herbicidas y siguiendo la metodología descrita por la NMX-AA-087-SCFI-2010. El análisis estadístico se efectuó a partir de Probit.

Utilizando la información de la  $CE_{50}$ , se formaron 3 grupos experimentales, cada uno constituido por 3 lotes de 10 individuos distribuidos en un volumen de 150 ml. En el primer grupo, los organismos fueron expuestos al herbicida que contenía éster isobutílico 2,4-D a una concentración de 0.5 mg/L. En el segundo grupo los organismos se sometieron a una concentración de 200 mg/L del herbicida con sal de dimetilamina 2,4-D. Y finalmente, el tercer grupo fue utilizado como control, conteniendo únicamente agua dura reconstituida.

Durante un lapso de 21 días, se evaluó el efecto crónico de los herbicidas. Con respecto a la historia de vida, los parámetros fisiológicos y comportamiento natatorio de cada grupo, se realizó monitoreo en los días 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21. Mientras que para la determinación de las pruebas de SDS-Page y análisis histológico se tomaron muestras a los días 1, 2, 12 y 21 de exposición.

## **7.4 Evaluación de parámetros de historia de vida de *Daphnia magna***

### **7.4.1 Dinámica poblacional**

Los efectos de la toxicidad crónica inducida por los herbicidas en *D. magna* se evaluaron mediante el monitoreo en las variaciones asociadas a la dinámica poblacional. Para ello se registró el número total de neonatos, jóvenes, adultos, hembras grávidas, mudas y decesos. De esta manera se determinó la estructura y crecimiento poblacional, tasa de natalidad y mortalidad. Con los resultados obtenidos, se realizó un modelado matemático a través de la ecuación de Gompertz y otra ecuación propuesta para la exposición a sal de dimetilamina 2,4-D, con el fin de describir las afectaciones promovidas por el 2,4-D hacia el crecimiento poblacional de *D. magna* en largos periodos de tiempo.

### **7.4.2 Parámetros fisiológicos**

Como parámetros fisiológicos, se evaluaron la frecuencia cardíaca y movimiento torácico de los organismos. Para su correcta evaluación se siguió la metodología propuesta por Bownik *et al.* (2017). Se seleccionó un individuo al azar de cada tipo de estadio (neonato, joven y adulto) procedentes de los distintos tratamientos y el grupo control. Cada individuo fue transferido a un portaobjetos, colocándolo en una gota de solución experimental con volumen aproximado de 35  $\mu$ l. Mediante el uso de una cámara digital Moticam-X (con resolución de 1.3 MP) acoplada a un microscopio ZEISS® Primo Star con aumento total de 100x, se grabó durante 1 minuto el movimiento del corazón y miembros torácicos. Estos procedimientos se realizaron por triplicado. Para estimar la frecuencia cardíaca y movimiento torácico, se procesaron los videos en el programa Tracker versión 6.0.9, contabilizando cuadro por cuadro los latidos cardíacos y las contracciones del tórax durante 1 min.

### **7.4.3 Comportamiento natatorio**

Las afectaciones en el comportamiento natatorio inducidas por los herbicidas se determinaron mediante el monitoreo de los siguientes parámetros: distancia recorrida, velocidad media de nado y frecuencia media de salto, lo anterior

nuevamente bajo lo propuesto por Bownik *et al.* (2017). Los ensayos de cada uno de estos parámetros se realizaron por triplicado, eligiendo un individuo al azar de cada tipo de estadio (neonato, joven y adulto) procedentes de cada grupo. Los videos fueron capturados a través de una cámara digital Leica® MC170 HD.

Para calcular la distancia recorrida los organismos fueron colocados en una caja Petri de plástico de 12 mm de diámetro, constituida por un volumen de 12 ml de la solución experimental. Posterior a un periodo de aclimatación correspondiente a 20 min, se inició la grabación de su desplazamiento durante un minuto.

**Nota:** Es importante destacar que el desplazamiento de los organismos originalmente se realiza en 3 dimensiones (volumen), sin embargo, para facilitar el procesamiento de la información, únicamente se tomaron en cuenta 2 dimensiones (X y Y).

Con respecto a la frecuencia de salto, los organismos fueron dispuestos en recipientes cilíndricos pequeños con capacidad de 30 ml con 15 ml de solución experimental con una aclimatación de 20 minutos en el nuevo recipiente, para después grabar su frecuencia de salto durante un minuto.

Los videos fueron analizados a partir del Tracker versión 6.0.9. Así pues, se registró el rastro con la consecuente obtención de la distancia recorrida a fin de calcular la velocidad media de nado (m/s). Paralelamente, se logró la cuantificación cuadro por cuadro de los saltos generados (Bownik *et al.*, 2017).

## **7.5 Identificación de perfiles proteicos**

### **7.5.1 Obtención de proteínas**

El extracto proteico se consiguió aludiendo a la metodología de Jordão *et al.* (2015). Por tanto, se elaboró un buffer homogeneizador con la siguiente composición: Tris-HCl 50 mM pH 7.6, sucrosa 0.5 M, KCl 0.15 M, Tritón x-100 al 0.1%, 2-mercaptoetanol 1 mM, fenantrolina 0.1 mM, PMSF 0.1 mM y EDTA 1mM. Veinte organismos se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 500 µL

buffer previamente preparado, para proceder a macerar las muestras con ayuda de un homogeneizador. La mezcla se centrifugó a 16000 rpm durante 10 min a 4°C (centrifuga marca Eppendorf® modelo 5424r). Los sobrenadantes se alicuotaron y almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

Las proteínas totales se cuantificaron mediante el método de Bradford (1976), con una curva de calibración de albúmina sérica bovina.

### **7.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)**

Las muestras se desnaturalizaron a baño seco (marca Labnet® modelo D1301) a 95°C por 5 minutos, luego se diluyeron 1:5 para obtener 4 µg de proteína de la muestra buffer de carga 5x (volumen final 30µl), el cual se preparó de la siguiente manera para 10 ml: 0.3 g de azul de bromofenol, SDS al 10%, 2.5 ml de 2-mercaptoetanol, Tris-HCl 25mM pH 6.8, y glicerol al 50%. Se empleó como marcador de peso molecular el mix de proteínas preteñidas PageRuler™, de 10 a 180 kDa (Número de catálogo: 26616) de la marca Thermo Scientific™.

El gel concentrador fue preparado al 5% y se aplicó un voltaje de 60 V, mientras que el gel separador fue al 12% y se sometió a 110 V. Transcurrido el corrimiento electroforético, el gel se tiñó con azul Coomassie R-250 por una hora y media, posteriormente se destiñó durante 12 horas en agitación (Green & Sambrook, 2012; Gonzaga Garita, 2021).

### **7.5.3 Búsqueda de información de posibles proteínas expresadas**

Las bandas de proteína se detectaron por medio del software Gel Analyzer versión 19.1, a la par se identificaron las bandas con mayor intensidad y volumen. Respecto al peso molecular de las bandas, este se determinó a partir de una curva de correlación logarítmica.

Con la información del peso molecular, se realizó una búsqueda de proteínas expresadas en *D. magna* usando como símil el peso molecular en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

## 7.6 Histología

El análisis histológico se efectuó bajo el amparo de la técnica establecida por Dey (2018), con las siguientes modificaciones para *D. magna*: los individuos fueron expuestos a formol al 4% durante un lapso de 7 días. Las muestras se deshidrataron y blanquearon durante 30 minutos en agitación con cada uno de los siguientes reactivos mediante este orden: Alcohol etílico 70%, alcohol etílico 96%, alcohol etílico 96%, alcohol etílico 100%, alcohol etílico 100%, alcohol etílico 100%, 50% alcohol etílico-50% xilol, xilol 100% y xilol 100%.

Los organismos se incluyeron en parafina durante 2 horas con recambio pasada la primera hora (cuidando que la temperatura fuera de 56°C), posteriormente se colocaron en moldes metálicos cuadrados de 7mm x 7 mm x 7mm con parafina. Las muestras de *D. magna* se seccionaron en serie a 5 µm en un micrótopo de deslizamiento Leica® SM2010 generando cortes sagitales. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E), para la posterior visualización del tejido. Para la identificación de estructuras dañadas se tomaron fotografías con una cámara digital Leica® MC170 HD acoplada a un microscopio ZEISS® Primo Star. Se contabilizó en el número de oocitos pertenecientes a cada organismo seccionado y con el programa ImageJ se midió la anchura del intestino medio y la pared intestinal, además de la longitud de las microvellosidades.

## 7.7 Análisis estadístico

La normalidad de las variables fue establecida a partir de la prueba Shapiro-Wilk. Consecuentemente, los valores paramétricos se analizaron mediante análisis de varianza tipo 1 (ANOVA) seguido de la prueba Tuckey como post hoc a fin de determinar las diferencias entre grupos.

En el caso de los datos no paramétricos se aplicó la prueba Kruskal Wallis, más una prueba de comparación por pares entre niveles de grupo (pairwise). Todos los análisis estadísticos se realizaron con un valor de significancia ( $\alpha$ ) de 0.05 en el software R versión 4.1.0.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Identificación de formulaciones comerciales del herbicida 2,4-D más utilizadas

Se identificaron las formulaciones comerciales del herbicida 2,4-D más utilizadas por productores agrícolas mexicanos por medio de la aplicación de una encuesta. La confiabilidad de la encuesta se estableció a partir del índice de Alfa de Cronbach, el cual permite medir la confiabilidad de la consistencia interna que conforma la encuesta, a través de la evaluación de la magnitud en que los ítems de un instrumento están correlacionados (Oviedo & Campo-Arias, 2005). El índice de Cronbach muestra un coeficiente que oscila entre 0 y 1, mientras más se acerca a 1, mayor será la consistencia interna de la escala, es decir, los ítems correlacionados presentan una interrelación adecuada entre las preguntas o incisos. El valor máximo esperado es mayor a 0.90, lo que indica que los reactivos miden el mismo constructo y poseen homogeneidad, mientras que el valor mínimo aceptable para el coeficiente alfa de Cronbach es 0.60, por debajo de ese valor, la consistencia interna de la escala es inaceptable (Gliem & Gliem, 2003; George & Mallery, 2003).

Esta encuesta se dividió en 2 dimensiones, la primera abarca los datos generales de los encuestados, constituyendo a 3 ítems, y en la segunda, se contemplaron preguntas enfocadas al tipo de cultivo y el uso de herbicidas, donde se emplearon 7 ítems. El alfa de Cronbach para toda la encuesta mostró un valor de 0.95, para la primera dimensión de 0.89 y de la segunda dimensión de 0.92, así, se muestra que la valoración de la fiabilidad de los ítems analizados que conforman a la encuesta resulta ser adecuada con una buena consistencia interna.

Los resultados de la encuesta (Figura 7) muestran que el 2,4-D es un compuesto empleado en el control de maleza, con un porcentaje de uso del 49%. Los herbicidas seleccionados con menor porcentaje al del 2,4-D fueron: glifosato



(13%), paraquat (13%), atrazina (11%), y aquellos que contienen otros principios activos en un 14% (como dicamba, nicosulfuron, mesotriona, fomesafen y clethodim). Autores señalan que el incremento sobre el manejo del 2,4-D en la agricultura se debe principalmente a la eliminación eficaz de herbáceas resistentes a otros herbicidas (Freydier & Lundgren, 2016). Además, la disminución del uso de glifosato con respecto al 2,4-D en México, se debe a la implementación de acciones legales para la sustitución gradual del glifosato por compuestos químicos alternativos (Diario Oficial de la Federación, 2020).

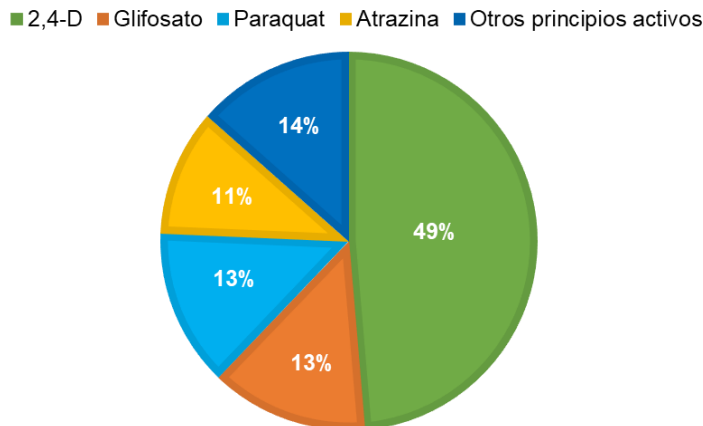


Figura 7. Principales herbicidas empleados en la zona de estudio.

De acuerdo con la Figura 8, el éster isobutílico 2,4-D resultó ser la formulación de 2,4-D más aplicada por los agricultores (50%), seguida por la sal de dimetilamina 2,4-D (40%). Debido a su alta frecuencia con respecto a su uso en campo, se buscaron marcas comerciales que tuvieran esas dos formulaciones. El 10% restante refiere a mezclas de 2,4-D con sal triisopropanolamina picloram. El 2,4-D con picloram es un herbicida post-emergente para el control de una gran variedad de malezas de hoja ancha perennes anuales y de raíces profundas (Salla *et al.*, 2019). El resultado de la combinación de estos compuestos provoca sinergismo como consecuencia de las interacciones químicas, fisiológicas o cinéticas entre los productos (Vidal *et al.*, 2010). Sin embargo, se descartó el uso de este tipo de mezclas para la presente investigación, dado que este estudio se centra en los efectos inducidos por el 2,4-D, y no aquellos que involucren la

combinación del 2,4-D con otros principios activos.

Peterson *et al.* (2016) señalan que la alta efectividad y resistencia frente a las condiciones ambientales es una de las principales razones por las que el éster isobutílico 2,4-D se emplea con mayor frecuencia en comparación con otras formulaciones de 2,4-D. Estas formulaciones de éster no se disocian ni se ionizan cuando se disuelven en agua como lo hacen las formulaciones de amina y, por lo tanto, no reaccionan con cationes provenientes del agua dura para formar precipitados insolubles, lo que le confiere una mayor capacidad para ser absorbido por la planta.

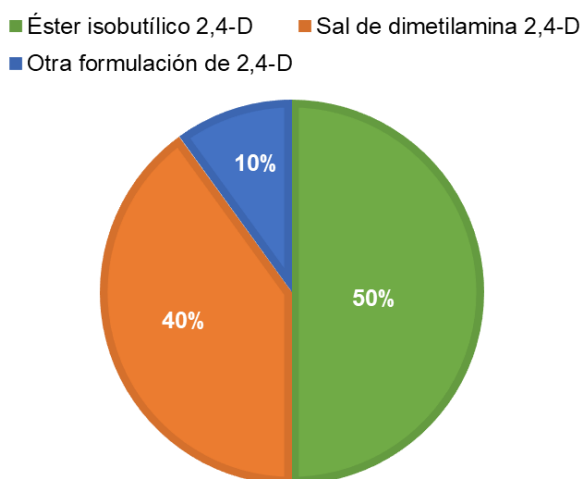


Figura 8. Formulaciones de 2,4-D seleccionadas.

Con respecto a las marcas comerciales que contienen como principio activo 2,4-D (Figura 9), en la encuesta destacó como la más utilizada el Esteron 47M<sup>®</sup>, la cual contiene éster isobutílico 2,4-D. Particularmente, este herbicida sobresale por el alto grado de eficacia sobre la eliminación de maleza (especialmente en herbáceas de hoja ancha) del 90% según la experiencia de los agricultores (Figura 10). Sin embargo, no fue posible utilizarlo para este estudio, debido a que actualmente ya no se vende en el mercado.

Otras dos marcas que contienen éster isobutílico 2,4-D fueron Dragonester 47<sup>®</sup> y Desmorte 4eb<sup>®</sup>, cada una con un porcentaje de uso del 9% (Figura 9). Para poder discernir sobre cuál de estos dos herbicidas emplear, se tomó en cuenta

el porcentaje de eficacia (Figura 10), para Dragonester 47<sup>®</sup> fue del 70% y para Desmonte 4eb<sup>®</sup> del 75%; de esta forma, se adquirió el herbicida comercial Desmonte 4eb<sup>®</sup> para evaluar en *D. magna* los efectos ecotoxicológicos provocados por el éster isobutílico 2,4-D.

La segunda presentación más utilizada (Figura 9) fue Fito Amina<sub>40</sub><sup>®</sup> (27%), también se presentó Hervidex<sup>®</sup> (9%), ambas constituidas por sal de dimetilamina 2,4-D. Dado que Fito Amina<sub>40</sub><sup>®</sup> tuvo mayor porcentaje de uso, también se empleó para estudiar las respuestas ecotoxicológicas inducidas por la sal de dimetilamina 2,4-D en *D. magna*.

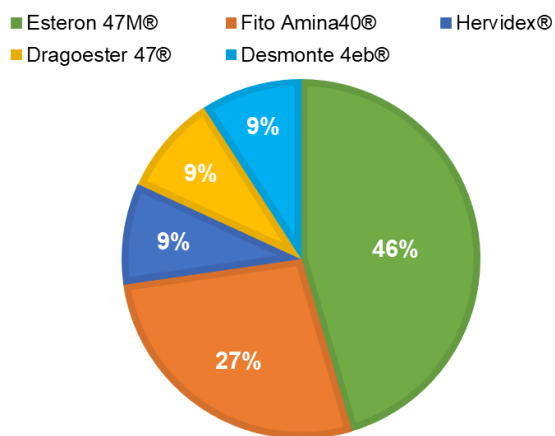


Figura 9. Principales herbicidas comerciales del 2,4-D empleadas por los agricultores.

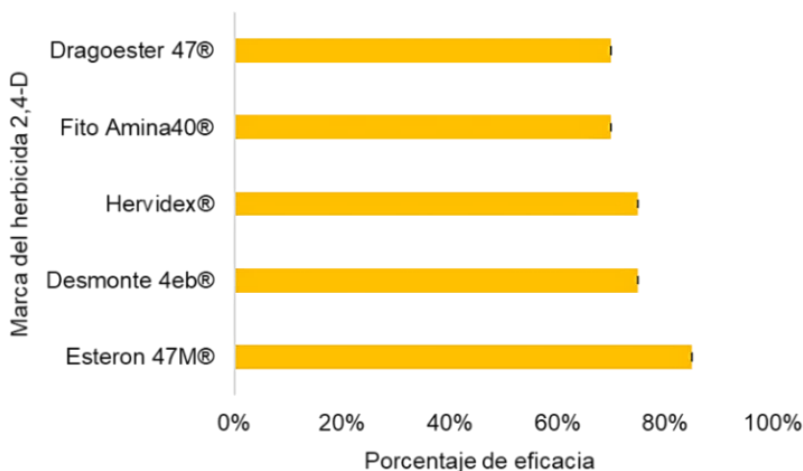


Figura 10. Eficacia en el control de maleza de las principales marcas comerciales del 2,4-D de acuerdo con los agricultores encuestados.

## 8.2 Evaluación de los efectos inducidos por las presentaciones comerciales del herbicida 2,4-D sobre la estructura poblacional de *Daphnia magna*

El primer objetivo específico contempla la evaluación de los efectos inducidos por dos formulaciones comerciales de 2,4-D en *D. magna*, relacionados con características de su historia de vida.

Durante la evaluación de toxicidad crónica se observó un cambio drástico en la estructura poblacional (Tabla 3). Se identificó una disminución significativa en la producción de neonatos respecto al control. La falta de reproducción y el aumento en el número de muertes repercute directamente sobre el crecimiento poblacional de *D. magna* al generar un menor número de jóvenes y adultos.

Tabla 3. Estructura poblacional de *D. magna* durante 21 días de exposición.

Parámetro evaluado	Control	Éster isobutílico 2,4-D	Sal de dimetilamina 2,4-D
Número de neonatos	168.5 ± 0.19 <sup>c</sup>	50.33 ± 0.09 <sup>b</sup>	9±0 <sup>a</sup>
Número de jóvenes	52 ± 0 <sup>b</sup>	11 ± 0.03 <sup>a</sup>	8.66 ± 0.05 <sup>a</sup>
Número de adultos	75.5 ± 0.21 <sup>c</sup>	37.66 ± 0.12 <sup>b</sup>	8.66 ± 0.05 <sup>a</sup>
Número de muertos	7 ± 0.14 <sup>a</sup>	26.33 ± 0.15 <sup>a</sup>	104 ± 0.15 <sup>b</sup>

Los valores son medias ± desviación estándar. Diferencias significativas señaladas por letras (ANOVA  $P < 0.05$ ).

Al dividir a la población de *D. magna* en 3 clases constituidas por neonatos, jóvenes y adultos, fue posible determinar cambios en la dinámica poblacional de cada uno de los grupos experimentales (Figura 11). En condiciones normales se registró un mayor número de neonatos (56%) con respecto a jóvenes (18%) y adultos (28%), lo cual es característico de una población sana capaz de reproducirse y proliferar (LeBlanc, 1982). En el grupo sometido a éster isobutílico 2,4-D el porcentaje de neonatos fue del 51%, de jóvenes del 38% y de adultos del 38%, estos valores fueron significativamente menores respecto al grupo control. Al haber nulo registro de neonatos para el tratamiento de sal de dimetilamina 2,4-D, el porcentaje presente en el gráfico representa a los organismos sobrevivientes con los cuales se inició la prueba de toxicidad, por lo

tanto, la proporción es la misma para neonatos, jóvenes y adultos. De lo anterior, se deduce que las presentaciones de 2,4-D provocan un desequilibrio en la estructura poblacional de *D. magna*, con la consecuente omisión del reemplazo generacional por la disminución de la fecundidad en los individuos (Tabla 4).

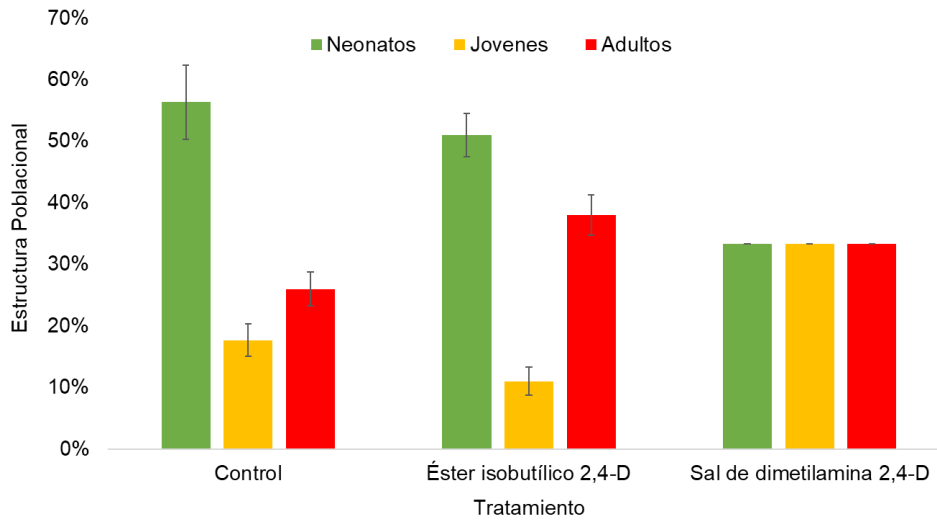


Figura 11. Distribución de las poblaciones de *D. magna* a 21 días de exposición.

En la Tabla 4 se muestra el impacto de los herbicidas comerciales de 2,4-D sobre parámetros de historia de vida en las poblaciones monitoreadas. Específicamente los organismos sometidos a una concentración de 200 mg/L de sal de dimetilamina 2,4-D presentaron expulsiones tempranas del embrión (abortos), limitando completamente su reproducción. Debido a ello no fue posible registrar el tiempo de la primera reproducción, reproducción total y fecundidad. El tiempo de la primera puesta mostró un retraso de 4 días para el tratamiento con éster isobutílico 2,4-D respecto al grupo control. Además, se presentaron otras singularidades asociadas a la reproducción total (número de nacimientos a 21 días de exposición) y la fecundidad (estos dos parámetros están relacionados ya que, a menor número de neonatos por hembra, la reproducción total tiende a disminuir). En condiciones normales, la reproducción total fue de aproximadamente 158.5 neonatos, mientras que la fecundidad por parte de los organismos consistió en aproximadamente 6 neonatos por hembra grávida. Los grupos con éster isobutílico 2,4-D exhibieron reducciones significativas ( $P <$

0.05), la fecundidad de 3.6 neonatos por hembra grávida conlleva a una reproducción total de 40.33 neonatos.

La información bibliográfica revisada hasta la fecha por nuestro grupo de trabajo, no identificó referencias relacionadas con los efectos toxicológicos crónicos del éster isobutílico 2,4-D en la dinámica poblacional en *D. magna* así como tampoco para otros organismos no blanco, sin embargo, para sal de dimetilamina 2,4-D hay registros ampliamente documentados para este tipo de variables de estudio, por ejemplo; los datos previamente señalados difieren con Moreira *et al.* (2022), quienes mencionan no hallar efectos negativos inducidos por toxicidad crónica al 2,4-D en *D. magna* a nivel poblacional a una concentración de 20 µg/L, sin embargo, se han reportado irregularidades asociadas a parámetros poblacionales en otras especies como dípteros (*Chironomus sancticaroli*), peces (*Pimephales promelas*) y anfibios (*Xenopus laevis*) (Coady *et al.*, 2013; DeQuattro & Karasov, 2016; da Silva Pinto *et al.*, 2021). Aunque estos autores no reportan la presencia de abortos, sus trabajos muestran reducciones en la fecundidad o fertilidad, y declaran que estos efectos negativos podrían deberse a anomalías reproductivas.

Finalmente se registró el número total de mudas, este parámetro permite evaluar el impacto asociado al estrés que genera el tóxico sobre la dinámica poblacional de los organismos. Según Soetaert *et al.* (2006) se debe a la “hipótesis del costo metabólico”, donde se explica que en los modelos que involucran respuestas fisiológicas graduadas (metabólicamente costosas) la tasa metabólica tiende a aumentar conforme se incrementan los niveles crecientes del tóxico (Calow, 1989; Calow, 1990). No obstante, la cantidad de energía que se distribuye hacia el crecimiento (producción de mudas) y la reproducción se reduce en respuesta al estrés químico, ya que mayoritariamente se dirige hacia procesos reparadores (Soetaert *et al.*, 2006). Lo anterior podría explicar el descenso en el número de mudas ante la exposición de 2,4-D, ya que los grupos sometidos a éster isobutílico 2,4-D y sal de dimetilamina 2,4-D obtuvieron valores semejantes sobre

este parámetro, ambos significativamente diferentes respecto al control ( $P < 0.05$ ).

Tabla 4. Parámetros de historia de vida de *D. magna* tratada con 2,4-D.

Parámetro de historia de vida	Control	Éster isobutílico 2,4-D	Sal de dimetilamina 2,4-D
Tiempo de la primera reproducción (días)	9 ± 0 <sup>a</sup>	13 ± 0.01 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
Reproducción total (número total de neonatos)	158.50 ± 0.19 <sup>a</sup>	40.33 ± 0.09 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
Número de neonatos por hembra (fecundidad)	6.32 ± 0.40 <sup>a</sup>	3.60 ± 0.01 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Número de mudas	145.5 ± 0.19 <sup>a</sup>	34 ± 0.04 <sup>b</sup>	32 ± 0.08 <sup>b</sup>

Los valores son medias ± desviación estándar. Diferencias significativas señaladas por letras (ANOVA  $P < 0.05$ ).

Es importante señalar que la sal de dimetilamina 2,4-D provocó expulsiones tempranas del embrión (abortos) en todas las hembras grávidas que constituían a la población, lo que implicó un crecimiento poblacional nulo.

Los embriones expulsados tenían diferentes etapas de desarrollo, entre 10 a 25 horas después de la ovulación (Giardini *et al.*, 2015), y se encontraron dispuestos en grupo en el fondo del recipiente donde yacían las poblaciones, así como dentro de los exoesqueletos de los organismos (Figura 12).

Los parámetros registrados en la Tabla 5 evidencian el inicio de los abortos a partir del día 12. Para toda la población se generó un total de 94 abortos con una producción de 3.48 abortos por hembra grávida.

En *D. magna* existen reportes sobre la presencia de abortos ante la exposición a otros tóxicos, siendo los más estudiados; cianotoxinas, metales pesados como el cadmio, fungicidas y el herbicida glifosato. En lo que concierne al 2,4-D, Rodríguez & Pisanó (1993) encontraron que la combinación de éster isobutoxietanol 2,4-D y etil-paratión provoca la pérdida del huevo (abortos) en los cangrejos de la especie *Chasmagnathus granulata*, resalta que las referencias que citan a abortos causados por la sal de dimetilamina 2,4-D en otras especies no blanco son escasas.

Los resultados anteriores podrían deberse a la limitación nutricional que causa la sal de dimetilamina 2,4-D en *Daphnia magna*, dado que el 2,4-D es capaz de bioacumularse en algas (Islam *et al.*, 2018). Esta exposición pudo haber causado cambios en la calidad de las algas verdes utilizadas como alimento en la evaluación crónica con la consecuente generación de afectaciones nutricionales en los organismos. Por otro lado, se ha reportado por Bednarska & Slusarczyk (2014) que la exposición a tóxicos causa una interferencia con el proceso de recolección de alimentos, lo que eventualmente incrementa la frecuencia de los movimientos de limpieza de las garras postabdominales, así todas las partículas de alimentos recolectadas (incluidas las comestibles) se desechan, con ello se reduce la absorción de alimentos, disminuyendo los recursos disponibles para la reproducción y maduración del embrión. Además, aunado a la presencia de malformaciones intestinales provocadas por el 2,4-D (véase análisis histológico de este trabajo), se aumenta la incapacidad de tener una buena nutrición que favorezca también el desarrollo del embrión.

De esta manera, es posible que la poca energía obtenida se distribuya menormente hacia eventos reproductivos (como el mantenimiento del embrión) en consecuencia al estrés al tóxico, provocando una reasignación de la energía que permita hacer frente al estrés fisiológico y la desintoxicación (da Silva Pinto *et al.*, 2021). Además, este patrón puede estar asociado con una designación de energía reducida de los organismos parentales a la siguiente generación, repercutiendo negativamente en su descendencia (da Silva Pinto *et al.*, 2021).



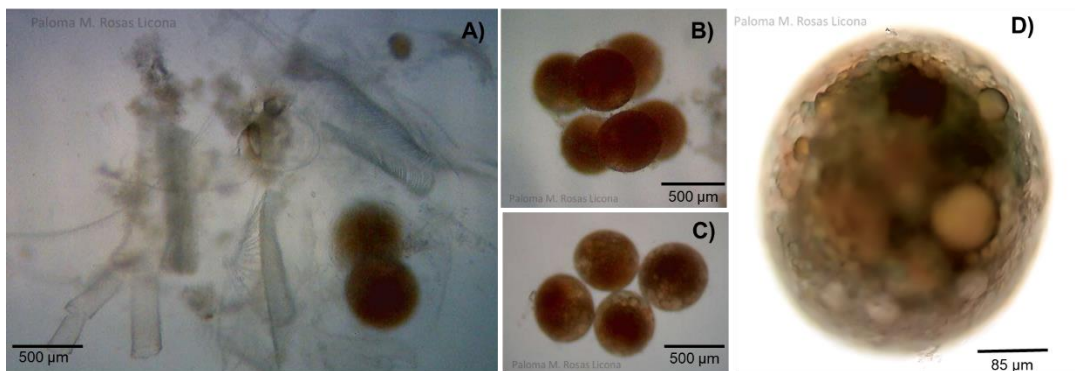


Figura 12. Expulsiones tempranas del embrión en *D. magna* ocasionadas por la sal de dimetilamina 2,4-D. A) Dos embriones con edad aproximada de 10 horas después de la ovulación dentro del exoesqueleto de una hembra grávida. B) 6 embriones de aproximadamente 10 horas después de la ovulación hallados al fondo del recipiente. C) Tétrada de embriones de aproximadamente 25 horas después de la ovulación hallados al fondo del recipiente. D) Vista microscópica de un embrión expulsado con edad aproximada de 25 horas después de la ovulación.

Tabla 5. Parámetros asociados a los abortos inducidos por la sal de dimetilamina 2,4-D en *D. magna*.

Parámetro evaluado	Sal de dimetilamina 2,4-D
Tiempo del primer aborto (días)	12 ± 0
Total de abortos (Número de embriones expulsados)	94 ± 0.18
Abortos por hembra	3.48 ± 0.38

Por otro lado, se calculó tanto la tasa bruta de natalidad (Figura 12), como la tasa bruta mortalidad (Figura 13) con el fin de mostrar el efecto de las distintas formulaciones de 2,4-D respecto al número de nacimientos y decesos en poblaciones de *D. magna*. Se observó que la natalidad disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) en presencia de 2,4-D éster isobutílico, ya que se obtuvo un total de 2.63 nacimientos por cada 10 individuos, mientras que el control indica que por cada 10 individuos hay 5.34 nacimientos. Sobre la misma línea, la tasa bruta de mortalidad del control fue de 0.23 decesos por cada 10 individuos, en tanto que para el 2,4-D éster isobutílico fue de 2.69 decesos por cada 10 individuos, siendo evidente que entre estas dos poblaciones no hay diferencia estadística respecto a este parámetro. En consecuencia a los abortos

producidos por la sal de dimetilamina 2,4-D y la nula reproducción de los organismos, la tasa bruta de natalidad es de 0, además, al considerar a los abortos como decesos, tenemos que este herbicida origina la mayor tasa de mortalidad (16.91 decesos por cada 10 individuos). De esta manera, se determinó que la reducción en la población en presencia de éster isobutílico 2,4-D y sal de dimetilamina 2,4-D se debe en gran parte a la influencia de cuestiones reproductivas negativas.

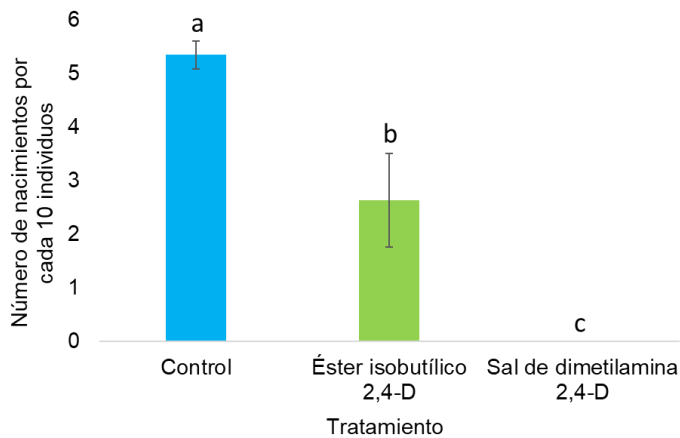


Figura 13. Tasa bruta de natalidad. Número de nacimientos por cada 10 individuos. Diferencias significativas señaladas por letras (Kruskal Wallis  $P < 0.05$ ).

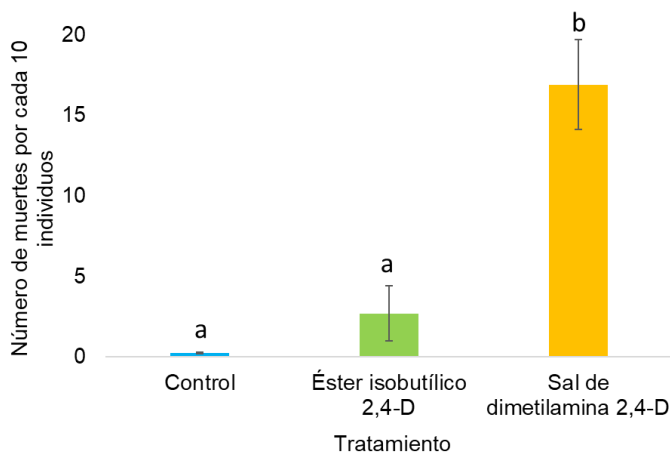


Figura 14. Tasa bruta de mortalidad. Número de muertes por cada 10 individuos. Diferencias significativas señaladas por letras (ANOVA  $P < 0.05$ ).

### 8.3 Modelación matemática del comportamiento poblacional de *Daphnia magna* en presencia de 2,4-D como factor estresante

Con los resultados de historia de vida y dinámica poblacional se desarrolló un modelo matemático, contemplado en el segundo objetivo específico, que permitiera detallar la proyección a futuro del comportamiento poblacional de *D. magna* en presencia de las formulaciones comerciales de 2,4-D hacia periodos prolongados de tiempo.

Así pues, los organismos se clasificaron en tres etapas de acuerdo con su historia de vida: neonatos, jóvenes y adultos. Debido a la distribución de los datos, específicamente para las poblaciones control y expuesta a éster isobutílico 2,4-D, se realizó el modelado a través de la ecuación de Gompertz, la cual se encuentra descrita por una curva sigmoideal misma que ha sido adaptada para la descripción de fenómenos biológicos asociados al crecimiento poblacional, siendo posible calcular la probabilidad de supervivencia de los organismos (Casas *et al.*, 2010).

Ecuación de Gompertz:

$$p(t) = k e^{-B e^{-Ct}} \quad (1)$$

K=capacidad de carga.

B=día de máximo crecimiento.

C=tasa máxima de crecimiento.

En la Figura 14 se aprecia el desarrollo poblacional para *D. magna* en condiciones de control a una proyección de 100 periodos y una capacidad de carga de 250 individuos. La población total posee un entorno óptimo para proliferar mientras que la estructura poblacional se muestra estable y sana, ya que en su mayoría está compuesta por neonatos. Sin embargo, para la población expuesta a éster isobutílico 2,4-D hay una evolución temporal distinta al control. Para éster isobutílico 2,4-D (Figura 15) existe un crecimiento poblacional lento, ya que se requiere mayor cantidad de periodos para que aumente el número de

individuos (150 períodos), no obstante, el incremento en la población total resulta ser menor respecto al grupo control, ya que se alcanza una población total máxima de 93 individuos. A pesar de que la etapa predominante corresponde al estado neonatal, el gráfico muestra menor número para este sector (un máximo de 49 individuos en 150 períodos), incluso el total de estos individuos es ligeramente mayor a los adultos (un máximo de 36 individuos en 150 períodos). Este declive indica que los organismos podrían presentar una potencial extinción debido a la mínima reproducción (Heckmann *et al.*, 2007). La disminución en la tasa de crecimiento poblacional y el número de individuos resulta ser inminente debido a la reducción en la fecundidad, parámetro mostrado anteriormente.

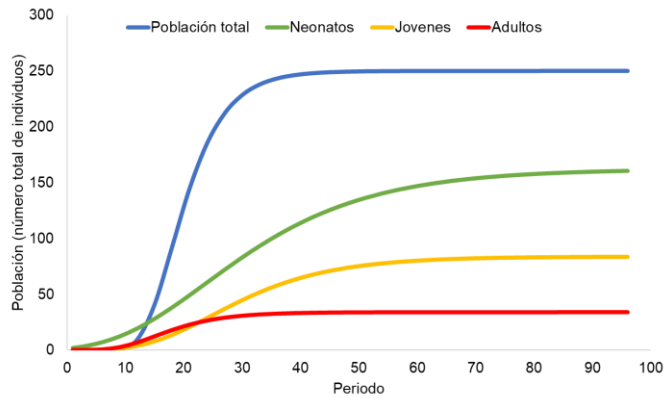


Figura 15. Modelado matemático de la estructura y crecimiento poblacional de *D. magna* en condiciones de control.

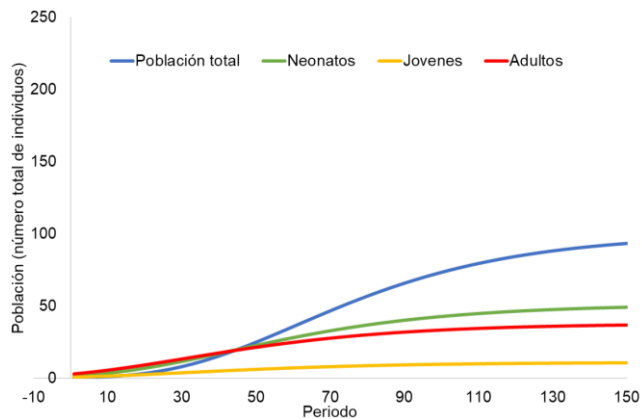


Figura 16. Modelado matemático de la estructura y crecimiento poblacional de *D. magna* expuesta a éster isobutílico 2,4-D.

Para la población expuesta a sal de dimetilamina 2,4-D no fue posible utilizar el modelo de Gompertz, dado que los datos experimentales no muestran una tasa de crecimiento a consecuencia de a los abortos que impiden la proliferación de los organismos. Además, la información obtenida se ajusta como una curva trigonométrica continua decreciente.

De lo anterior, se investigaron otro tipo de modelos matemáticos que se asemejaran al comportamiento de la población problema. Se encontró entonces una variante del modelo de Gompertz denominada “ecuación diferencial del modelo Gompertz” la cual describe a la tasa relativa de crecimiento a partir de una disminución proporcional al logaritmo del número de individuos, expresada de la siguiente manera (Ramos & González, 2020; Linarez Gonzáles, 2019; García Vargas, 2020):

$$\frac{N'(t)}{N(t)} = C - K \log[N(t)] \quad (2)$$

C=tasa máxima de crecimiento.

K=capacidad de carga.

N=Número de individuos.

Aludiendo a la ecuación anterior, se observa la inminencia en la tasa máxima de crecimiento poblacional, luego entonces el empleo de ésta misma en la descripción de la población expuesta a sal de dimetilamina 2,4-D, resultó imposible.

Bajo este contexto y debido a la falta de opciones para establecer un modelo que se ajustara a los datos obtenidos, en este trabajo se propone una ecuación que muestre el decaimiento poblacional de *D. magna* en presencia a un tóxico que impida completamente su reproducción:

$$p(t) = a - (\text{Tan}^{-1}(b t - c) * d) \quad (3)$$

a= Sobrevivencia de la población.

b= Número mínimo de individuos en la población.

c= Período cuando empieza la decadencia poblacional.

d= Expectativa de vida.

En la Figura 16 se observa la representación gráfica de la estructura y decaimiento poblacional de *D. magna* con sal de dimetilamina 2,4-D. El implemento de la función trigonométrica arco tangente concede visualizar la disminución paulatina del número de organismos. La sobrevivencia y la expectativa de vida muestran el número de períodos que permiten mantener la estructura poblacional con pocas reducciones, mientras que el número mínimo de individuos y el período cuando empieza la decadencia indican el inicio de un descenso poblacional.

Con respecto a los datos, la población que constituye a los adultos representa a la población total, debido a la ausencia de los otros estadíos (neonatos y jóvenes). Así, se observa que, si la población inicia con 10 organismos, al alcanzar la edad adulta hay una tendencia a mantener el número de individuos durante periodos cortos de tiempo sin eludir la eventual extinción en el periodo 30, originada por la nula producción de individuos que reemplacen a sus progenitores.

En el caso de los jóvenes, la disminución en su población ocurre en los primeros periodos de exposición, mientras que los neonatos decaen fuertemente en el primer periodo debido a la ausencia de estos inducida por los abortos. La modelación matemática del comportamiento poblacional de *D. magna* muestra que las dos presentaciones de 2,4-D limitan el crecimiento poblacional, sin embargo, se genera una proyección más severa a largo plazo con la formulación de sal de dimetilamina 2,4-D, al modificar los eventos reproductivos.

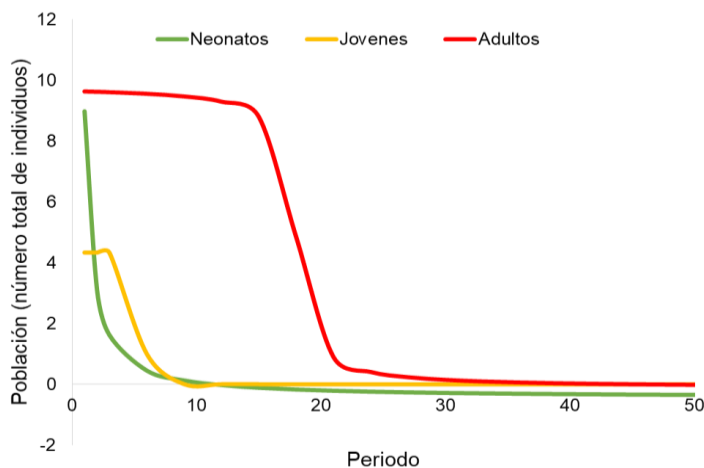


Figura 17. Modelado matemático de la estructura y decaimiento poblacional de *D. magna* expuesta a sal de dimetilamina 2,4-D.

#### 8.4 Evaluación de parámetros fisiológicos asociados a actividad de las extremidades torácicas y frecuencia cardíaca

Respecto al tercer objetivo específico, el cual contempla evaluar los efectos inducidos por las formulaciones comerciales de 2,4-D en *D. magna* relacionados con parámetros fisiológicos, en este estudio se cuantificó la actividad de las extremidades torácicas (total de movimientos torácicos por minuto o frecuencia torácica) y la frecuencia cardíaca (total de latidos por minuto). Estos indicadores permiten evaluar los efectos fisiológicos a largo plazo provocados por sustancias químicas tóxicas, como puede ser las formulaciones de 2,4-D.

Para tal objetivo, los organismos se clasificaron en neonatos, jóvenes, hembras grávidas y adultos. Es importante resaltar que, para este apartado, en el caso de la exposición a sal de dimetilamina 2,4-D, para neonatos y jóvenes solo se registraron estos parámetros para la toxicidad aguda, ya que, debido a los abortos generados, su presencia en el medio de cultivo solo fue al inicio de la prueba, por lo que no fue posible sacar conclusiones de la evolución crónica de la actividad de las extremidades torácicas y la frecuencia cardíaca para esos dos estadios.

En la Figura 18 se encuentra el número total de movimientos torácicos por minuto generados durante 21 días de exposición. En condiciones normales, en todos los

estadios la frecuencia torácica genera aproximadamente más de 350 movimientos torácicos por minuto, con una tendencia a mantener ese número de movimientos a lo largo del tiempo.

El movimiento de los apéndices de los organismos expuestos a éster isobutílico 2,4-D disminuyó en comparación al grupo control. En el caso de los neonatos, organismos que experimentaron una exposición a 24 h, se registró la frecuencia torácica de 265 movimientos por minuto hasta alcanzar menos de 100 movimientos en el día 21 (Figura 18 A), lo que representa una reducción de más del 50%. A una toxicidad aguda para sal de dimetilamina 2,4-D hay 296 movimientos por minuto.

Por otro lado, los jóvenes no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) (Figura 18 B), los organismos que correspondían al grupo de éster isobutílico 2,4-D, comenzaron con 279 movimientos por minuto, con un aumento a 316 movimientos para el día 6, este valor se mantuvo con ligeras reducciones (menores del 5%) durante un lapso de 8 días. A partir del día 15 hasta el día 18 se generaron descensos marcados del 74% con finalmente 68 movimientos. Con la sal de dimetilamina 2,4-D la frecuencia torácica fue de 256 movimientos por minuto en toxicidad aguda.

Para las hembras grávidas (Figura 18 C) se detectó disminución significativa de este parámetro en los dos herbicidas en relación con el control ( $P < 0.05$ ), para éster isobutílico 2,4-D, la población tiende a mantenerse constante con 276 movimientos por minuto (23% menos que el control), pero con sal de dimetilamina 2,4-D la frecuencia torácica inicia con 330 movimientos por minuto, para el día 9 se alcanzaron 284 movimientos, mientras que en el día 15 se registró un descenso (134 movimientos) hasta el día 21 (131 movimientos).

Finalmente, en los adultos (Figura 18 D), la población con sal de dimetilamina 2,4-D posee 362 movimientos torácicos en un inicio hasta llegar al día 21 a 294 movimientos. En caso contrario, éster isobutílico 2,4-D es el tratamiento que muestra diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), con un descenso de 304



movimientos a 86 para el día 21.

La actividad de las extremidades torácicas se encarga de la recolección de flujo de agua permitiendo el paso de alimento y oxígeno al organismo, ya que los apéndices se mueven rítmicamente para bombear agua a través de la cámara de filtración (Tkaczyk *et al.*, 2021). McMahon & Rigler (1963) mencionan que previo a la ingesta de alimentos, *D. magna* debe filtrar el agua que lo acompaña. El agua es bombeada hacia la cavidad abdominal a través de los movimientos torácicos. Las partículas de alimento son recolectadas mediante setas filtrantes ubicadas en cuatro apéndices torácicos. Por medio de un movimiento de barrido, el alimento se redirige hacia la cavidad oral, donde se colecta hasta que una onda peristáltica del esófago lo lleva al intestino medio. De esta manera, la tasa de recolección de alimentos se regula por acción de la tasa de filtración. Sin embargo, al haber una disminución del movimiento de los apéndices torácicos, la tasa de filtración pierde efectividad, lo que ocasiona que el alimento no sea bombeado a la cavidad oral y en consecuencia hacia el intestino.

Bajo este contexto, es posible que al generar una reducción sobre la frecuencia torácica inducida por las dos presentaciones de 2,4-D, *D. magna* disminuya la eficacia de su tasa de filtración, en consecuencia, se reduce la adquisición de alimento que le proporcione energía. Así, como perspectiva, es importante tomar en cuenta y calcular la tasa de filtración de *D. magna* ante la exposición a tóxicos.

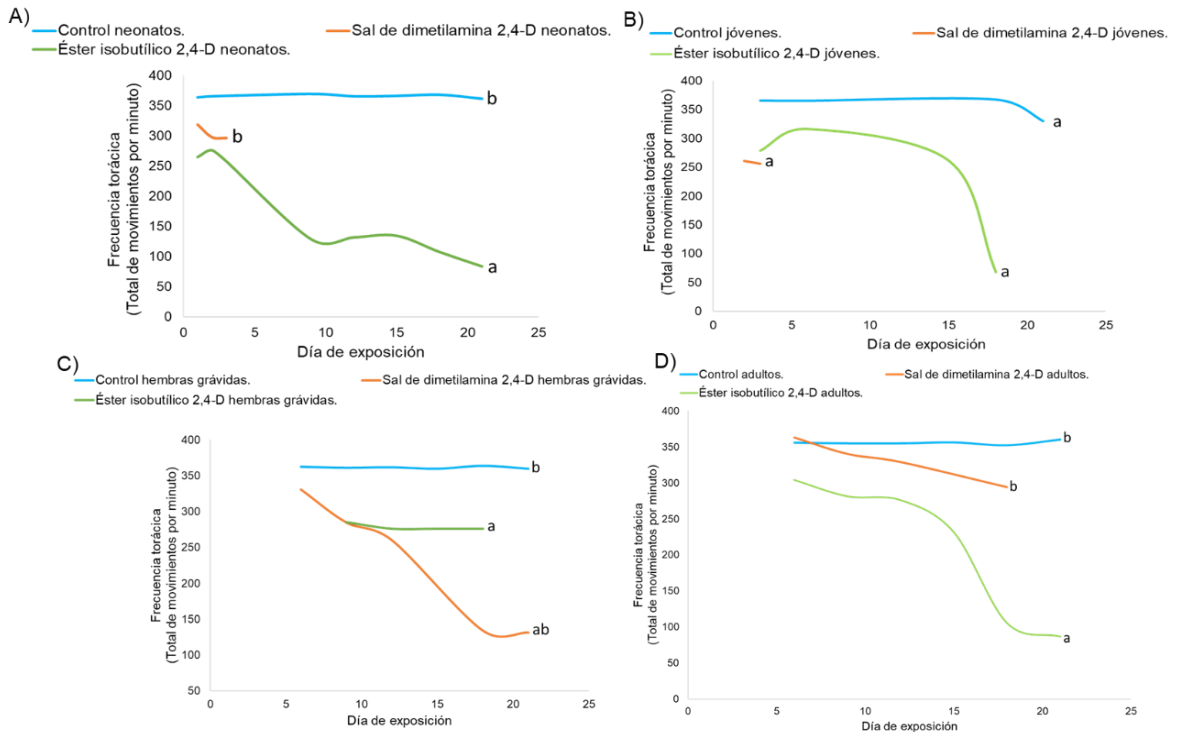


Figura 18. Evaluación crónica de la frecuencia torácica (total de movimientos torácicos por minuto) en *D. magna* expuesta a dos presentaciones comerciales de 2,4-D. A) Frecuencia torácica de neonatos (ANOVA  $P < 0.05$ ). B) Frecuencia torácica de jóvenes (ANOVA  $P > 0.05$ ). C) Frecuencia torácica de hembras grávidas (ANOVA  $P < 0.05$ ). D) Frecuencia torácica de adultos (ANOVA  $P < 0.05$ ). Diferencias significativas señaladas por letras.

Respecto a la frecuencia cardíaca, en la Figura 19 se observa que en todos los estadios existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) comparando entre tratamientos experimentales. El control se mantuvo constante al pasar los días, con una frecuencia cardíaca aproximada de entre 215 y 226 latidos por minuto. Sobre este parámetro en neonatos (Figura 19 A), el éster isobutílico 2,4-D reduce más de un 60% respecto al control, por lo que en el primer día hay una frecuencia cardíaca de 85 hasta 59 latidos en el último día de exposición. La sal de dimetilamina 2,4-D genera 142 latidos a toxicidad aguda.

En jóvenes (Figura 19 B) la toxicidad aguda de la sal de dimetilamina 2,4-D provoca 178 latidos por minuto, mientras que en éster isobutílico 2,4-D hay una reducción paulatina (del 23%) que inicia con 88 latidos (60% menos que el grupo control) y finaliza con 68 latidos.

La frecuencia cardíaca de las hembras grávidas (Figura 19 C) es mayor para sal

de dimetilamina 2,4-D (con aproximadamente 117 latidos por minuto a lo largo de los días) en comparación con el éster isobutílico 2,4-D (se empieza con 92 latidos hasta 61 latidos en el último día), este comportamiento es parecido al de los adultos (Figura 19 D), ya que en el grupo con sal de dimetilamina 2,4-D se empieza con 117 latidos finalizando con 114 latidos, y con éster isobutílico 2,4-D los adultos comienzan con 97 latidos llegando al día 21 con 82 latidos.

En un estudio realizado por Presig & Vero (1983) se describió que en condiciones normales *D. magna* genera 300 latidos por minuto, sin embargo, la exposición a 6 horas con sal de sodio 2,4-D reduce la frecuencia cardiaca a 60 latidos. La descripción de este parámetro en *D. magna* por parte de otros autores es nula para éster isobutílico 2,4-D y sal de dimetilamina 2,4-D, ya sea en evaluaciones de toxicidad aguda o crónica.

Se ha identificado para especies con corazón electrogénico, que el 2,4-D ejerce un efecto negativo sobre las uniones comunicantes de células miocárdicas, Papaefthimiou *et al.* (2002) investigaron la acción del 2,4-D disuelto en solución salina oxigenada sobre el corazón aislado de la abeja melífera (*Apis mellifera*), y sugieren que el 2,4-D genera cambios en el intercambio iónico de las células miocárdicas, conduciendo a una descoordinación de su contracción y en consecuencia la disminución en la frecuencia cardiaca. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que el corazón de *D. magna* es miogénico, por lo que su actividad inicia en el músculo cardíaco con independencia de la estimulación neuronal, metabólica y hormonal (Kaas *et al.*, 2009).

Lo anterior conduce a reconocer la importancia en futuras investigaciones que profundicen en las consecuencias generadas por la exposición a 2,4-D a nivel celular tales como la disminución en la frecuencia cardiaca en *D. magna*, o en general para invertebrados con corazón miogénico.

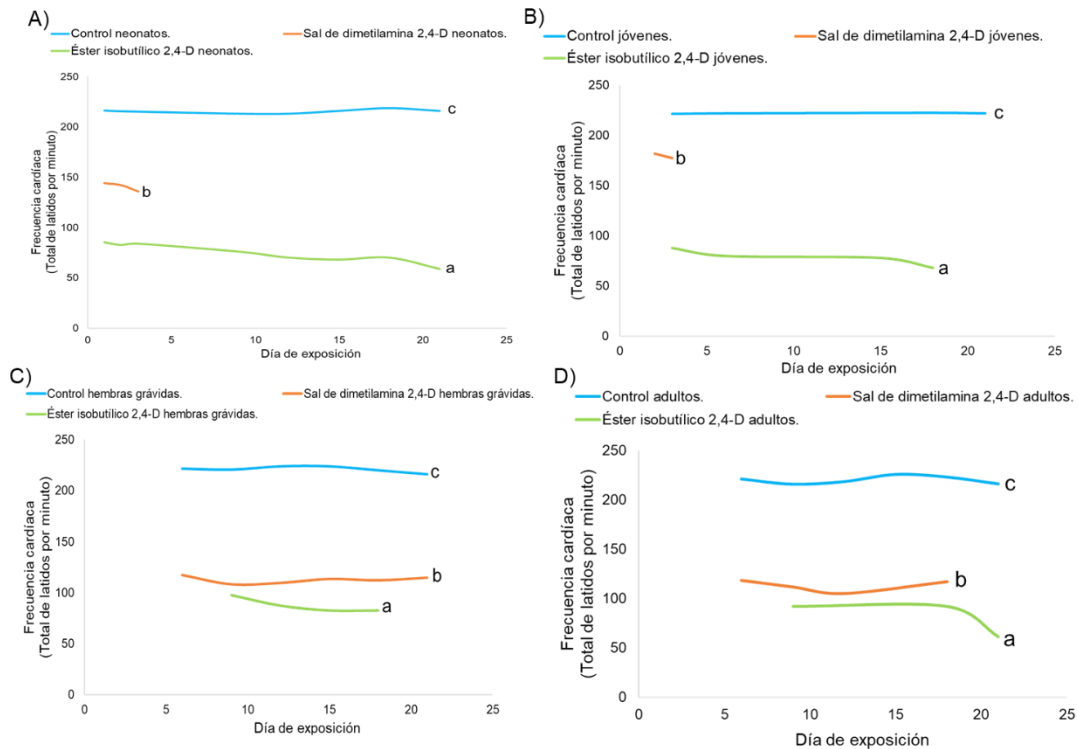


Figura 19. Evaluación crónica de la frecuencia cardíaca (total de latidos cardíacos por minuto) en *D. magna* expuesta a dos presentaciones comerciales de 2,4-D. A) Frecuencia cardíaca de neonatos (ANOVA  $P < 0.05$ ). B) Frecuencia cardíaca de jóvenes (ANOVA  $P < 0.05$ ). C) Frecuencia cardíaca de hembras grávidas (ANOVA  $P < 0.05$ ). D) Frecuencia cardíaca de adultos (ANOVA  $P < 0.05$ ). Diferencias significativas señaladas por letras.

## 8.5 Evaluación del comportamiento natatorio

El comportamiento natatorio de *D. magna* es complejo, multiparamétrico y considerado como uno de los biomarcadores de toxicidad más sensibles (Bownik, 2017) puesto que puede caracterizarse por varios parámetros que reflejan los cambios inducidos por diversos compuestos. En esta sección, para complementar el tercer objetivo específico, se evaluó el efecto crónico de las formulaciones comerciales del 2,4-D sobre la frecuencia de salto, el desplazamiento y la velocidad media de nado en los individuos.

Nuevamente los organismos se clasificaron en neonatos, jóvenes, hembras grávidas y adultos, y para la población con sal de dimetilamina 2,4-D, la explicación de los cambios natatorios inducidos por la toxicidad crónica del herbicida se limitó únicamente a hembras grávidas y adultos.

En la Figura 20 se muestra la frecuencia de salto (número de saltos por minuto) generada por los distintos estadios, destacando la presencia de diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los grupos experimentales. En condiciones normales tanto los neonatos como los jóvenes (Fig. 20 A y B) poseen una frecuencia constante de 120 saltos.

Sin embargo, la exposición a éster isobutílico 2,4-D provoca reducciones mayores al 40% respecto al grupo control. En neonatos se inició con 69 saltos en su primer día, hasta 49 saltos en el día 21 (disminución del 29% durante la prueba crónica), y en jóvenes se empezó con 63 saltos, terminado con únicamente 36 saltos (cuya reducción resultó ser del 43%). Además, la sal de dimetilamina 2,4-D propició 92 saltos en neonatos y 96 saltos en jóvenes expuestos a toxicidad aguda (Fig. 20 A y B).

La frecuencia de salto de hembras grávidas y adultos (Figura 20 C y D) en control es mayor a neonatos y jóvenes, 36 saltos en principio y con el pasar de los días disminuciones menores (del 7%) debido a la edad de los individuos, llegando a 126 saltos en un lapso de 21 días.

Para las hembras grávidas en éster isobutílico 2,4-D se observa que la frecuencia de salto oscila desde 53 saltos hasta 41 saltos finalizada la prueba, mientras que en sal de dimetilamina 2,4-D se inicia con 89 saltos y termina con 53 saltos (Figura 20 C). En adultos, el éster isobutílico 2,4-D provocó 62 saltos al inicio del monitoreo hasta llegar únicamente 25 saltos en el día 21, por otro lado, la sal de dimetilamina 2,4-D provoca 91 saltos en principio y finaliza con 70 saltos (Figura 20 D).

*D. magna* se mueve con una serie de saltos característicos generados por el latido rítmico de las segundas antenas, este movimiento genera una frecuencia de salto, la cual, resulta ser un parámetro que proporciona información detallada sobre la neurotoxicidad potencial de un compuesto y sus efectos sobre la regulación y el nivel de contracciones musculares (Bownik *et al.*, 2017). Algunos contaminantes alteran la frecuencia de salto en *D. magna*, ya que actúan como

sustancias depresoras del sistema nervioso permitiendo el aumento del período de tiempo entre cada salto, lo que a su vez puede alterar la velocidad general de natación (Bownik *et al.*, 2017). En este trabajo, se muestra que las dos presentaciones 2,4-D inducen afectaciones sobre la frecuencia de salto en *D. magna*, provocando su disminución paulatina ante una exposición crónica, e incluso se observan consecuencias más severas con la formulación de éster isobutílico 2,4-D. Aunque no existe información en la literatura que indique que el 2,4-D provoque afectaciones neurotóxicas asociadas al sistema locomotor y movimientos musculares en *D. magna*, en otras especies como en ratas, se ha señalado que el éster isobutílico 2,4-D puede ser una sustancia depresora, responsable de la descoordinación motora (Bernard *et al.*, 1985).

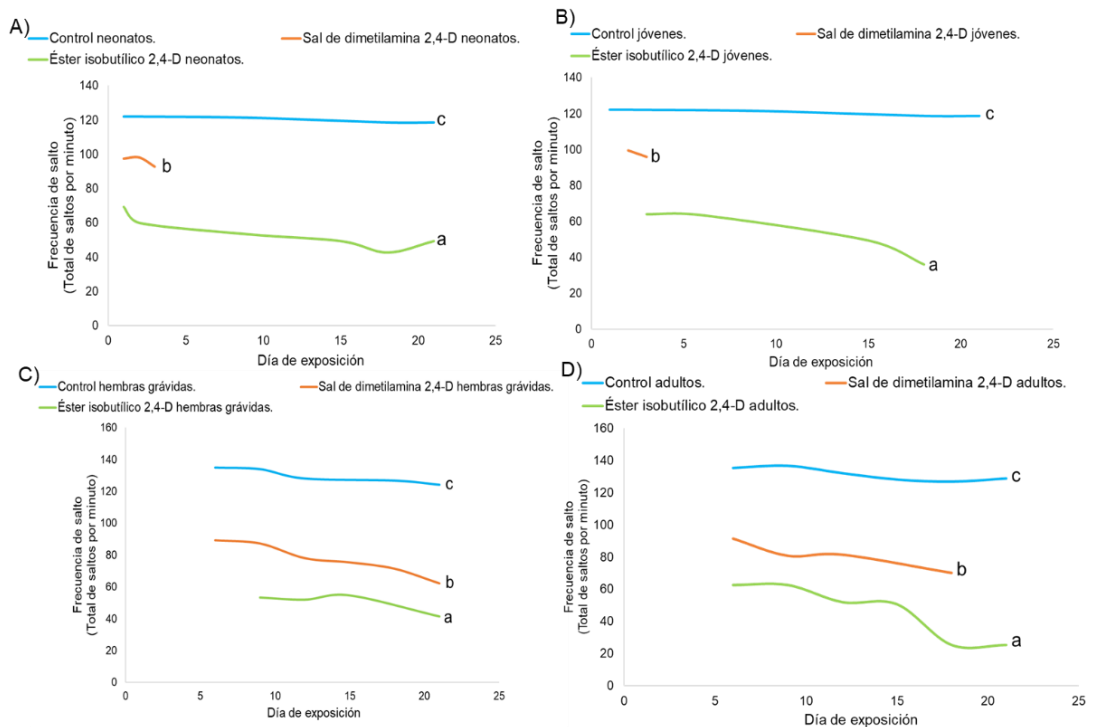


Figura 20. Evaluación crónica de la frecuencia salto (total de saltos por minuto) en *D. magna* expuesta a dos presentaciones comerciales de 2,4-D. A) Frecuencia de salto en neonatos (ANOVA  $P < 0.05$ ). B) Frecuencia salto en jóvenes (ANOVA  $P < 0.05$ ). C) Frecuencia de salto en hembras grávidas (Kruskal Wallis  $P < 0.05$ ). D) Frecuencia de salto en adultos (Kruskal Wallis  $P < 0.05$ ). Diferencias significativas señaladas por letras.

La Figura 21 destaca el desplazamiento (metros recorridos en 1 minuto) generado por los distintos estadios de *D. magna* expuesta a 2,4-D. Se distingue que en condiciones normales, los neonatos (Figura 21 A) poseen un desplazamiento decreciente (del 12%) en los primeros dos días, que va desde 0.1347 m a 0.1057 m, después presenta un comportamiento constante del día 2 hasta el día 9, posteriormente disminuye (un 40%) de 0.1046 m a 0.0628 m entre los días 9 y 12, con un pequeño incremento del 29% hasta el día 21. Con el éster isobutílico 2,4-D en los neonatos se presentan aumentos mayores del 10% respecto al control durante los primeros dos días de tratamiento (toxicidad aguda), en 24 horas se alcanzó 0.1478 m llegando hasta 0.1747 m a las 48 horas de exposición, a partir del día 3 hasta el día 18 existe una disminución mayor del 15% sobre este parámetro (de 0.1497 m a 0.0736 m), y finalmente se obtiene un decaimiento pronunciado (del 61%) en el día 21 (0.0285 m). En sal de dimetilamina 2,4-D, hay un incremento del desplazamiento en los primeros 2 días, el cual es de 0.0982 m (27% mayor al grupo control).

El desplazamiento en jóvenes (Figura 21 B) bajo condiciones normales muestra un comportamiento constante, con variaciones mínimas menores del 5% que van desde 0.1257 m en sus primeros días, hasta 0.1202 m a 21 días de evaluación. La sal de dimetilamina 2,4-D empieza con 0.1478m hasta 0.1351m en toxicidad aguda, mientras que en éster isobutílico 2,4-D inicia con 0.1657 m, finalizando la prueba con 0.0613 m de desplazamiento (cuya reducción es del 53% respecto al inicio de la prueba crónica).

Las hembras grávidas (Figura 21 C) en condiciones normales muestran aumento del 58% en su desplazamiento hasta el día 15 (0.2486 m), para después mantenerse constante al finalizar la prueba (0.2479m). La exposición a sal de dimetilamina 2,4-D exhibe un comportamiento decreciente con el paso del tiempo, ya que inicia con 0.2097 m alcanzando 0.1215 m para el día 21, mostrando una reducción del 58% desde el primer día de exposición hasta el último. En éster isobutílico 2,4-D hasta el día 12 se obtiene un desplazamiento

0.0561 m, en los días restantes se genera una tendencia creciente, donde se alcanza 0.0829 m en el fin de la prueba.

En el caso de los adultos, el desplazamiento (Figura 21 D) para el grupo control inicia con 0.1786 m/s y se prolonga hasta 0.2141 m en el día 18, seguido de un menor desplazamiento a partir del día 21 con 0.1793 m. Con éster isobutílico 2,4-D, se observa un deterioro en el desplazamiento que empieza con 0.1804 m hasta 0.0369 m para el día 21. Con sal de dimetilamina 2,4-D se manifestó un comportamiento constante, 30% mayor a los datos de control.

Es importante resaltar que, respecto a este parámetro, únicamente hubo diferencias significativas entre tratamientos experimentales en el estadio de adultos ( $P < 0.05$ ). Lo descrito con anterioridad puede sustentarse bajo el supuesto de priorización de energía, por lo que la cantidad de energía que se distribuye para llevar a cabo el desplazamiento de los organismos se reduce al anteponer los procesos reparadores (Soetaert *et al.*, 2006).



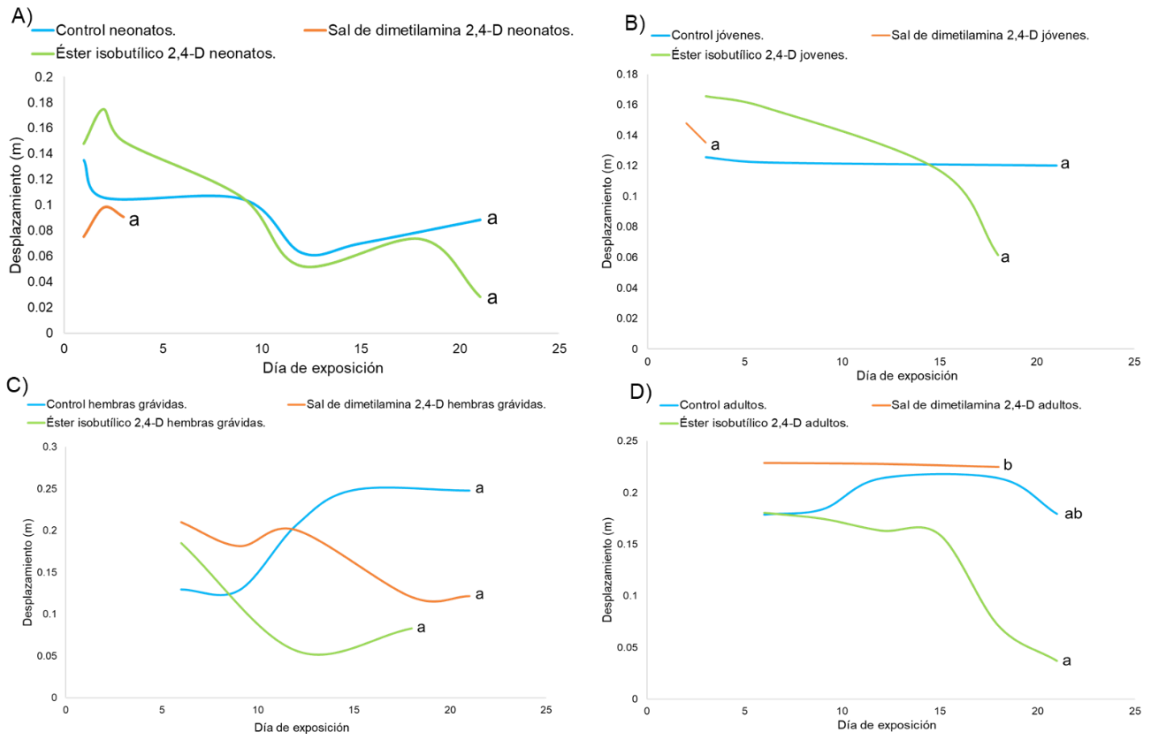


Figura 21. Evaluación del desplazamiento (m) realizado por *D. magna* durante un minuto expuesta a dos presentaciones comerciales de 2,4-D. A) Desplazamiento de neonatos (Kruskal Wallis  $P > 0.05$ ). B) Desplazamiento de jóvenes (Kruskal Wallis  $P > 0.05$ ). C) Desplazamiento de hembras grávidas (Kruskal Wallis  $P > 0.05$ ). D) Desplazamiento de adultos (ANOVA  $P < 0.05$ ). Diferencias significativas señaladas por letras.

Finalmente, la Figura 22 muestra la velocidad media de nado (m/s) producido por los distintos estadios de *D. magna*, destacando la presencia de diferencias significativas en neonatos y en adultos ( $P < 0.05$ ).

En condiciones normales, los neonatos (Figura 22 A) poseen una velocidad constante en los primeros nueve días (0.000021 m/s), a partir del día 12 la velocidad alcanza 0.00004688 m/s, obteniendo para el día 21 un valor máximo de 0.00006 m/s. Sin embargo, con éster isobutílico 2,4-D se inicia con un valor elevado de 0.00015 m/s, el cual decae hasta 0.00009 m/s para el día 12, después se presenta un comportamiento constante hasta el día 18 (0.000063 m/s), pero disminuyendo a 0.000025 m/s para el día 21. Para neonatos en sal de dimetilamina 2,4-D a 24 horas de exposición se registró 0.000094 m/s, decayendo hasta 0.000071 m/s al término de la prueba de toxicidad aguda.

La velocidad media de nado en jóvenes (Figura 22 B) muestra que el control inicia con 0.00016 m/s y finaliza con 0.00013 m/s. Mientras tanto, la velocidad con sal de dimetilamina 2,4-D en toxicidad aguda va de 0.00015 m/s hasta 0.00016 m/s. En éster isobutílico 2,4-D se presenta un incremento en la velocidad a más del 10% respecto al control, con un pico máximo en el día 6 (0.00017 m/s), para luego generar un comportamiento decreciente, obteniendo en el día 18 un valor de 0.00015 m/s.

Con las hembras grávidas (Figura 22 C) se observa que, en condiciones óptimas, al principio su velocidad es de 0.00027 m/s, posteriormente posee un decaimiento del 48% hasta el día 9 (0.00013 m/s), para luego incrementar para el día 21 a 0.00037 m/s. El tratamiento con éster isobutílico 2,4-D exhibe un comportamiento similar al control, con una velocidad inicial de 0.00023 m/s, su potencial disminución a 0.000074 m/s para el día 9 y su posterior aumento hasta (0.00027 m/s) en el día 18. La sal de dimetilamina 2,4-D mostró un inicio en la velocidad de 0.00010 m/s llegando hasta el día 12 con un valor máximo de 0.00026 m/s, para el día 18 únicamente alcanzó una velocidad de 0.00010 m/s.

La velocidad de nado en adultos (Figura 22 D) del grupo control inicia con 0.00027 m/s y termina con 0.00032 m/s en el día 21. Para los adultos en éster isobutílico 2,4-D hay un aumento en la velocidad del 63% ya que la velocidad inicial es de 0.00011 m/s y alcanza el día 15 con un valor máximo de 0.00018 m/s, al finalizar la prueba, la velocidad resulta en 0.0000079 m/s. Con sal de dimetilamina 2,4-D se generó el mismo comportamiento que control, pero con valores menores, se inició con 0.00021 m/s, hasta el día 12 se alcanzó 0.00017 m/s y para el día 18 se obtiene una velocidad de 0.00025 m/s.

Dodson *et al.* (1995) reportan que, en respuesta a estrés químico, el género *Daphnia* puede presentar cambios sobre su velocidad de nado. Estos autores puntualizan que la irritación causada por los contaminantes, pueden potenciar el riesgo de depredación, ya que, al alterarse la velocidad de nado, se aumenta la probabilidad de contacto para los depredadores táctiles (como dípteros del

género *Chuoborus*), además de llamar la atención de depredadores visuales (como peces). De esta manera, no solo se amenaza la estabilidad de las poblaciones biológicas, a la par se promueve la propagación del 2,4-D en la cadena trófica, ya que los residuos de este compuesto terminarían siendo bioacumulados en los depredadores de *D. magna*, causando a su vez en estos animales anomalías fisiológicas y efectos negativos (Islam *et al.*, 2018).

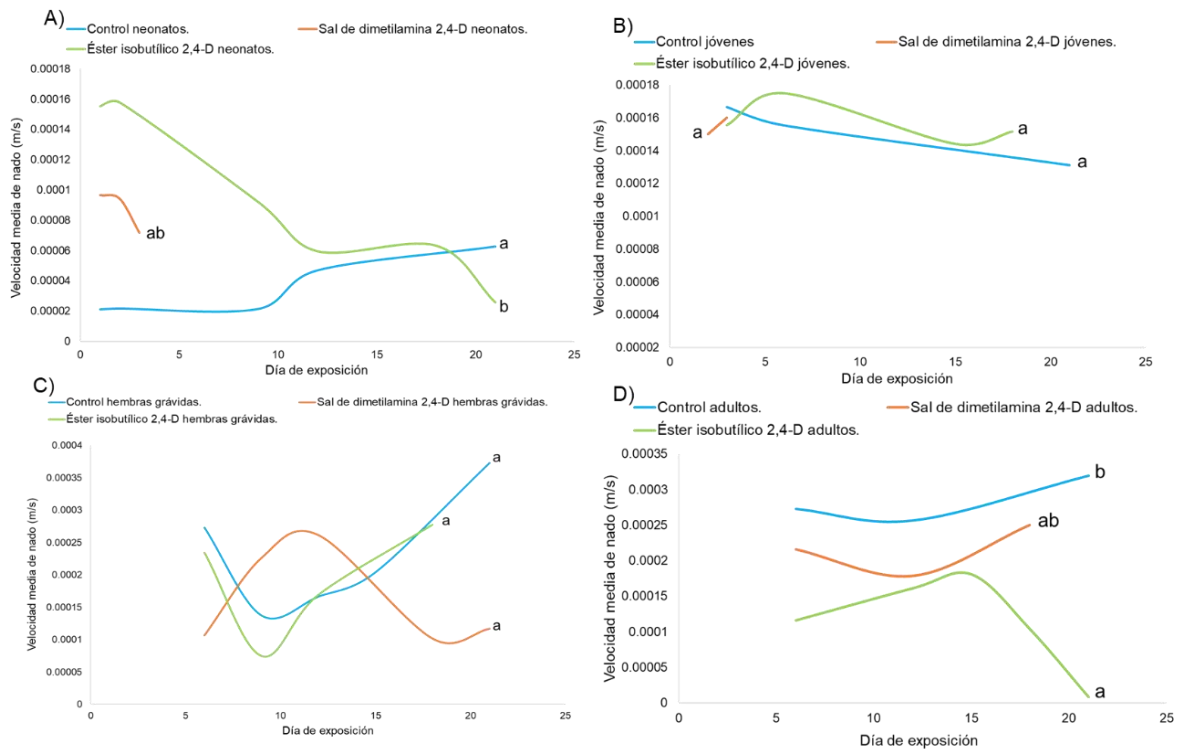


Figura 22. Evaluación crónica de la velocidad media de nado (m/s) en *D. magna* expuesta a dos presentaciones comerciales de 2,4-D. A) Velocidad media de nado en neonatos (Kruskal Wallis  $P < 0.05$ ). B) Velocidad media de nado en jóvenes (Kruskal Wallis  $P > 0.05$ ). C) Velocidad media de nado en hembras grávidas (Kruskal Wallis  $P > 0.05$ ). D) Velocidad media de nado en adultos (Kruskal Wallis  $P < 0.05$ ). Diferencias significativas señaladas por letras.

## 8.6 Identificación de posibles perfiles proteicos asociados al estrés inducido por toxicidad aguda y crónica del 2,4-D

El cuarto objetivo específico de este trabajo consistió en identificar perfiles proteicos que podrían considerarse como biomarcadores asociados al estrés inducido por el 2,4-D en *D. magna*.

La Figura 23 muestra el corrimiento electroforético de proteínas totales de *D. magna* posterior a la exposición a éster isobutílico 2,4-D, mientras que la Figura 24 muestra el corrimiento electroforético de proteínas totales ante una exposición a sal de dimetilamina 2,4-D. Con la determinación del peso molecular de cada banda y la búsqueda de información se identificaron las siguientes proteínas para cada uno de los tratamientos (Tabla 6 y 7).

Se han identificado proteínas de la familia CEP (C-terminally encoded peptide) en *D. magna*. El peso molecular de la proteína CEP164 coincide con la banda número 1 (164 kDa) que corresponde a una exposición a 24 horas, 48 horas, 12 y 21 días de tratamiento con éster isobutílico 2,4-D, además del control. La proteína CEP135 podría ser ubicada en la banda número 2 (135 kDa) tanto en el grupo control como en el grupo asociado a tratamiento con sal de dimetilamina 2,4-D durante 12 y 21 días. La proteína CEP97 (97 kDa) coincidió en peso molecular con la banda número 4 que alude a la exposición a éster isobutílico 2,4-D (incluso estas bandas formaron parte de aquellas que tuvieron mayor intensidad en el gel a una exposición a 24 horas, 48 horas, 12 y 21 días más el control) y sal de dimetilamina 2,4-D (exposición a 12 y 21 días, bandas con intensidad menos pronunciada en comparación con la exposición a éster isobutílico 2,4-D).

De acuerdo con la información recopilada por Kumar *et al.* (2013), el centrosoma es una estructura celular cuya función se relaciona con la citocinesis y la formación de microtúbulos, y la regulación de las actividades de esta estructura son mediadas por proteínas de la familia CEP. En primer lugar, CEP164 es una proteína mediadora requerida para el mantenimiento de la estabilidad genómica

y desempeña un papel fundamental sobre las divisiones nucleares, estas evidencias sugieren que CEP164 se expresa también para controlar los trastornos relacionados con daños en el ADN. En segundo lugar, CEP135 regula la biogénesis del centriolo y el proceso de duplicación del centrosoma. Y finalmente, CEP97 influye sobre la formación de cilios primarios en células en crecimiento. Daños durante la citocinesis, en la formación de microtúbulos o la ciliogénesis pueden ser regulados por estas proteínas. No se ha detectado que el 2,4-D cause este tipo de daños, sin embargo, se insiste en análisis que profundicen en los posibles efectos no reportados hasta el momento.

Debido al peso molecular (70 kDa) de la banda 4 en los grupos control y todos los tratamientos de éster isobutílico 2,4-D y sal de dimetilamina 2,4-D, la banda podría asociarse a expresión de proteínas HSP70. Mientras que la banda número 7 (60 kDa) del gel correspondiente a sal de dimetilamina 2,4-D podría tratarse de HSP60 expresada a 24 horas, 48 horas, 12 y 21 días de exposición.

Se ha reportado que un ejemplo de biomarcador inducido por el 2,4-D es la expresión de la proteína HSP70 (Villalobos *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2010). La familia de proteínas de choque térmico HSP son chaperonas de respuesta al estrés celular, de las cuales HSP70 (70 kDa) resulta ser la más estudiada, especialmente en invertebrados acuáticos (Park *et al.*, 2010). La regulación de su expresión en eucariotas depende de la activación del factor de transcripción HSF, ya que su unión a HSP70 en el citoplasma forma un homotrímero que migra al núcleo e interactúa con elementos asociados al choque térmico en la región promotora de los genes HSP, lo que conduce a su transcripción (Ait-Aïssa *et al.*, 2000). Se ha planteado la posibilidad de que su expresión se debe a que el 2,4-D podría inducir daños oxidativos y cambios en el sistema endocrino de los organismos (Park *et al.*, 2010). Se ha detectado un nivel alto de expresión de proteínas HSP en organismos expuestos a 2,4-D, donde se incluye al condriectio *Squalus acanthias* y al díptero *Chironomus riparius* (Villalobos *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2010).

Continuando con el análisis, la banda número 7 (45 kDa) presente en el grupo control y en el grupo expuesto a 12 y 21 días a éster isobutílico 2,4-D, así como la banda número 9 de 45 kDa (con intensidad altamente pronunciada) correspondiente al grupo control y a todos los tratamientos con sal de dimetilamina 2,4-D, poseen un peso molecular similar a el factor 45 de Splicing (SPF45).

Martín *et al.* (2021) mencionan que SPF45 es un factor de empalme que se ha relacionado con diferentes procesos y vías biológicas. Esta proteína forma un complejo que regula eventos de empalme alternativos. SPF45 controla la expresión de proteínas asociadas a la proliferación, la progresión del ciclo celular y resistencia a la apoptosis de líneas celulares. De lo anterior se dilucida la potencialidad de esta proteína como biomarcador en toxicidad que conlleve muerte celular.

La banda 9 (36 kDa), la más intensa en todo el gel, ubicada en todos los tratamientos con éster isobutílico 2,4-D y la banda 12 (36 kDa) ubicada en todos los tratamientos con sal de dimetilamina 2,4-D, siendo mayor su intensidad durante exposición aguda a 24 y 48 horas, podría representar a la proteína ubiquitina ligasa E3 CHIP.

De acuerdo con la información proporcionada por Wang *et al.* (2020), la transferencia de ubiquitina a una proteína sustrato es mediada por proteínas ubiquitina ligasa E3. La proteína CHIP es una ubiquitina ligasa E3 dependiente de chaperonas, la cual interactúa con las proteínas como HSP70. La formación de complejos proteicos conformados por CHIP y proteínas chaperonas facilita la interacción con los sustratos que se buscan ubiquitinar. Debido a ello, se prevé que, si se tiene la expresión de HSP70, también es posible la expresión de proteína CHIP para llevar a cabo procesos de ubiquitinación, tal y como muestra este trabajo. Y sobre su función se ha propuesto que CHIP controla la homeostasis del plegamiento de proteínas en el sistema inmunológico, neurológico y óseo. En *D. magna* se ha identificado la expresión de esta proteína

ante la exposición a bisfenol-A, químico clasificado como un disruptor endocrino que provoca efectos adversos en el desarrollo, reproducción, neurología e inmunidad de los organismos (Jeong *et al.*, 2013).

En el gel de corrimiento electroforético de proteínas totales de *D. magna* expuesta a sal de dimetilamina 2,4-D se ubicó que a la banda número 3 con un peso molecular de 110 kDa, y aunque estuvo presente en todos los tratamientos, hubo mayor intensidad después de 12 y 21 días de tratamiento. Esta banda puede asociarse a la proteína enrollada centriolar de 110 kDa (Ccp110).

Ccp110 es supresor clave de la ciliogénesis, esta proteína se expresa en mayor medida cuando las células entran en fase S y se encarga de cubrir los extremos distales de los centríolos en células no ciliadas para evitar su elongación (Yadav *et al.*, 2016). A medida que las células comienzan a desarrollar un cilio, Ccp110 se degrada para poder llevar a cabo la ciliogénesis (Yadav *et al.*, 2016). Esta proteína también interactúa con otras proteínas como CEP97 (mencionada anteriormente) para formar un complejo proteico que regula negativamente la ciliogénesis, de igual forma, evita la formación de ciliopatías (Yadav *et al.*, 2016). Las ciliopatías son una condición que puede desarrollarse por estresores ambientales, y aunque no se menciona al 2,4-D, se detecta como un posible riesgo ante la exposición a contaminantes ambientales como metales pesados (Sarkar & De, 2016).

Sobre la misma línea, la exposición aguda a sal de dimetilamina 2,4-D reveló la presencia de la banda número 6, con peso molecular de 65 kDa, la cual podría tratarse de una proteína flavoenzima glutatión tiorredoxina reductasa (TRxR). Tang *et al.* (2019) reconocen que esta proteína se expresa en *D. magna* cuando hay producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El daño oxidativo causado por las ROS es eliminado por los sistemas de defensa antioxidantes, que consisten en enzimas como las tiorredoxinas. Estas proteínas deben mantenerse en estado reducido, acción que se logra mediante las proteínas TRxR. La exposición a diversas tensiones ambientales, como el herbicida

paraquat, cadmio, luz ultravioleta y los microplásticos, genera la expresión del gen TRxR. Paralelamente, se ha observado que el 2,4-D es inductor de ROS (Islam *et al.*, 2018), por lo que esta proteína pudiera tener un papel importante sobre la regulación de estrés oxidativo.

En el caso de los grupos expuestos a éster isobutílico 2,4-D, el corrimiento electroforético de proteínas totales mostró la presencia de bandas con pesos moleculares de 145 kDa, 125 kDa (bandas con una de las mayores intensidades en todos los tratamientos), 48 kDa, 38 kDa (nuevamente bandas con una de las mayores intensidades en todos los tratamientos), 32 kDa (bandas con mayor intensidad a una exposición de 21 días y en el control), y 25 kDa. Mientras que el corrimiento electroforético con sal de dimetilamina 2,4-D evidenció a bandas con pesos moleculares de 170 kDa (presentes únicamente a un tratamiento aguda), 48 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 32 kDa (destacando su intensidad a 12 y 21 días de exposición), y 28 kDa (con mayor intensidad a 12 de exposición). Sin embargo, no se encontró información en la base de datos de proteínas en *D. magna* que permitiera la identificación de proteínas relacionadas con estas bandas o de su expresión a causa de la exposición a presentaciones de 2,4-D en otras especies. De ahí la importancia en estudios que ahonden en la búsqueda de proteínas homólogas en *D. magna* que pudieran ser expresadas en distintas especies a causa de efectos asociados a tóxicos relevantes como el 2,4-D.



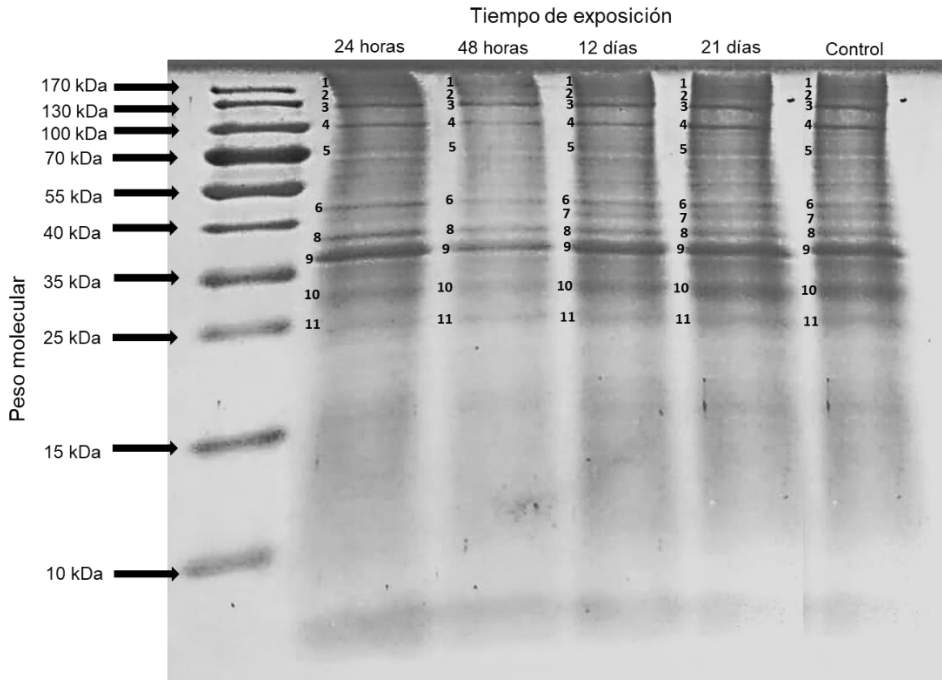


Figura 23. Corrimiento electroforético de proteínas totales de *D. magna* expuesta a toxicidad aguda y crónica de éster isobutílico 2,4-D.

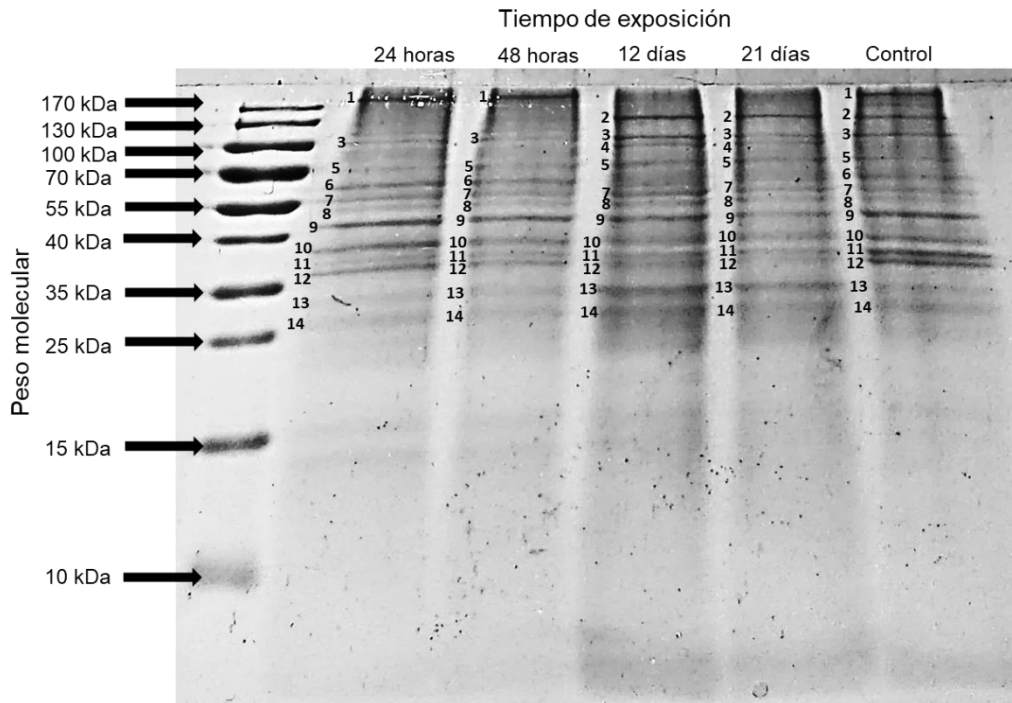


Figura 24. Corrimiento electroforético de proteínas totales de *D. magna* expuesta a toxicidad aguda y crónica de sal de dimetilamina 2,4-D.

Tabla 6 Posibles proteínas expresadas en *D. magna* ante la exposición aguda y crónica con éster isobutílico 2,4-D.

Banda	Peso molecular aproximado (kDa)	Posibles proteínas expresadas	Control	Tratamiento con éster isobutílico 2,4-D				Función	Código NCBI
				24 horas de exposición	48 horas de exposición	12 días de exposición	21 días de exposición		
1	164		CEP164	CEP164	CEP164	CEP164	CEP164	Organización de microtúbulos	116917735
2	145		-	-	-	-	-	-	-
3	125		-	-	-	-	-	-	-
4	97		<b>CEP97</b>	<b>CEP97</b>	<b>CEP97</b>	<b>CEP97</b>	<b>CEP97</b>	Regulador negativo de la citogénesis	116923818
5	70		HSP70	HSP70	HSP70	HSP70	HSP70	Chaperona proteica	116927964
6	48		-	-	-	-	-	-	-
7	45		SPF45	NP	NP	SPF45	SPF45	Eliminación de intrones	116928389
8	38		-	-	-	-	-	-	-
9	36		<b>E3 ubiquitina ligasa CHIP</b>	<b>E3 ubiquitina ligasa CHIP</b>	<b>E3 ubiquitina ligasa CHIP</b>	<b>E3 ubiquitina ligasa CHIP</b>	<b>E3 ubiquitina ligasa CHIP</b>	Degradación de proteínas mediada por ubiquitina	116925927
10	32		-	-	-	-	-	-	-
11	25		-	-	-	-	-	-	-

No presentó banda (NP). Información no identificada (-). En negritas, bandas con mayor intensidad.

Tabla 7. Posibles proteínas expresadas en *D. magna* ante la exposición aguda y crónica con sal de dimetilamina 2,4-D.

Banda	Peso molecular aproximado (kDa)	Posibles proteínas expresadas	Control	Tratamiento con sal de dimetilamina 2,4-D				Función	Código NCBI
				24 horas de exposición	48 horas de exposición	12 días de exposición	21 días de exposición		
1	170		-	-	-	NP	NP	-	-
2	135		<b>CEP135</b>	NP	NP	<b>CEP135</b>	<b>CEP135</b>	Biogénesis del centriolo	116931090
3	110		<b>Ccp110</b>	Ccp110	Ccp110	<b>Ccp110</b>	<b>Ccp110</b>	Regulador negativo de la ciliogénesis	116919013
4	97		NP	NP	NP	CEP97	CEP97	Regulador negativo de la ciliogénesis	116923818
5	70		HSP70	HSP70	HSP70	HSP70	HSP70	Chaperona proteica	116927964
6	65		TRxR	TRxR	TRxR	NP	NP	Elimina ROS	-
7	60		HSP60	HSP60	HSP60	HSP60	HSP60	Chaperona proteica	116928797
8	48		-	-	-	-	-	-	-
9	45		<b>SPF45</b>	<b>SPF45</b>	<b>SPF45</b>	<b>SPF45</b>	<b>SPF45</b>	Eliminación de intrones	116928389
10	38		-	-	-	-	-	-	-
11	37		-	-	-	-	-	-	-
12	36		E3 ubiquitina ligasa CHIP	<b>E3 ubiquitin a ligasa CHIP</b>	<b>E3 ubiquitin a ligasa CHIP</b>	E3 ubiquitina ligasa CHIP	E3 ubiquitina ligasa CHIP	Degradación de proteínas mediada por ubiquitina	116925927
13	32		-	-	-	-	-	-	-
14	28		-	-	-	-	-	-	-

No presentó banda (NP). Información no identificada (-). En negritas, bandas con mayor intensidad.

## 8.7 Análisis histológico

Finalmente, respecto al último objetivo específico de este trabajo, se llevó a cabo un análisis histológico sobre el cambio tisular en *D. magna*, con el fin de identificar las alteraciones sobre el tejido inducidas por las formulaciones comerciales de 2,4-D.

La figura 25 muestra las estructuras anatómicas identificadas en los cortes en plano sagital realizados para *D. magna*. Con ayuda del atlas de referencia de histología, elaborado por Ngu *et al.* (2022), se logró reconocer cada uno de los tejidos señalados en la imagen.

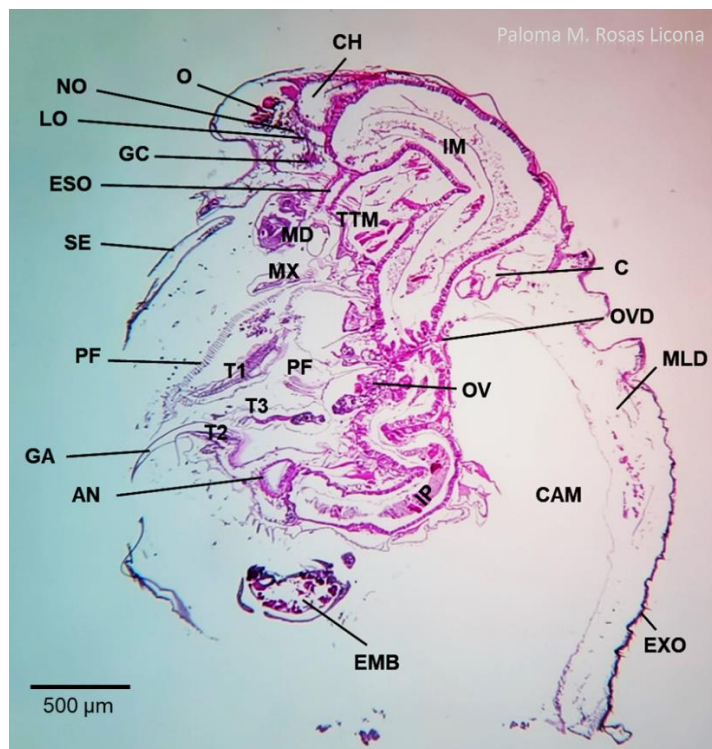


Figura 25. Corte histológico en plano sagital de *D. magna* control. Con las siguientes estructuras anatómicas identificadas: tres extremidades torácicas (T1-T3) con placas de filtro (PF). Corazón (C), extensión del músculo longitudinal dorsal (MLD) a lo largo del intestino medio (IM) y posterior (IP), caparazón (EXO), ciego hepático (CH), tendón transverso mandibular (TTM). Conexión del ojo compuesto (O) con el lóbulo óptico (LO), ganglio cerebral (GC), nervios ópticos (NO). Maxilar (Mxl), mandíbula (Md) y esófago (ESO). Ano (AN), garra abdominal (GA), cámara embrionaria (CAM), oviducto (OVD), seta alargada (SE) y embrión (EMB).

### 8.7.1 Sistema digestivo

La exposición aguda y crónica de las formulaciones comerciales del 2,4-D

condujo a variaciones respecto a la morfología del intestino. La Figura 26 presenta imágenes referentes a cambios histológicos en el intestino medio de *D. magna*.

En condiciones normales, se sabe que el intestino medio de *D. magna* posee un grosor de aproximadamente 171  $\mu\text{m}$  (Figura 27). De acuerdo con Schultz & Kennedy (1976), el intestino del género *Daphnia* se conforma por una capa de tejido epitelial que rodea el lumen, denominada pared intestinal. La pared intestinal se deriva del ectodermo estomodeal y consta de un tipo de célula básica (célula enterocítica) que descansa sobre una lámina basal que se encuentra rodeada por una capa muscular externa. Recubriendo el tejido epitelial se encuentra una capa de mucus y glicocálix, que se caracteriza por poseer propiedades tensoactivas que previene la adhesión de enterobacterias a la pared intestinal (Salvo-Romero *et al.*, 2015). En la Figura 28 se muestra que la pared del intestino medio cuenta con un grosor aproximado de 26.07  $\mu\text{m}$ .

A exposición aguda de 24 y 48 horas, se visualiza que las células que constituyen la pared intestinal secretan mucus (Figura 26). Específicamente, a 24 horas de tratamiento, los organismos sometidos a éster isobutílico 2,4-D mostraron que el grosor del intestino fue en promedio de 165.1  $\mu\text{m}$ , en tanto que la anchura de la pared intestinal fue de 26.28  $\mu\text{m}$  (Figura 28). Pasadas 48 horas, el grosor total decayó a 160.68  $\mu\text{m}$  (Figura 27), mientras que la pared intestinal fue de 26.21  $\mu\text{m}$  (Figura 28).

Análogamente, los organismos tratados con sal de dimetilamina 2,4-D registraron un grosor intestinal de 163.26  $\mu\text{m}$  (Figura 27) con una pared intestinal de 24.39  $\mu\text{m}$  (Figura 28). Posterior a las 48 horas de exposición, el intestino presentó un grosor de 163.5  $\mu\text{m}$  (Figura 27) y 27.26  $\mu\text{m}$  para la pared intestinal (Figura 28). Después de 12 días, la capa de mucus que rodea a las células epiteliales tenía un espesor más evidente, presencia de renovación de tejido epitelial (Figura 26) y malformaciones celulares (explicadas a profundidad más adelante en la descripción de la Figura 29) que afectaron la estructura de la pared intestinal. Los

organismos presentaron incremento significativo del grosor total del intestino medio, con éster isobutílico 2,4-D, aproximadamente de 43.16  $\mu\text{m}$ , para un valor total de 203.84  $\mu\text{m}$  y con sal de dimetilamina 2,4-D hubo un aumento de 42.08  $\mu\text{m}$ , resultando en una anchura equivalente a 205.58  $\mu\text{m}$  (Figura 27). Por el contrario, la pared intestinal muestra reducciones respecto al grupo control, siendo 22.5  $\mu\text{m}$  con éster isobutílico 2,4-D y 20.9  $\mu\text{m}$  con sal de dimetilamina 2,4-D (Figura 28).

Al finalizar la prueba de toxicidad crónica después de 21 días de exposición, se presentó muerte celular del epitelio intestinal y la nula visibilidad de una capa de mucus (Figura 26). Además, el intestino de los grupos sometidos a éster isobutílico 2,4-D alcanzó un grosor total de 203.95  $\mu\text{m}$  (Figura 27), mientras que, dada la pérdida de células en el tejido epitelial, la pared intestinal midió únicamente 2.14  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 28). Para el caso de los organismos expuestos a sal de dimetilamina 2,4-D el grosor fue de 202.53  $\mu\text{m}$  (Figura 27) y 2.25  $\mu\text{m}$  para la pared intestinal (Figura 28).

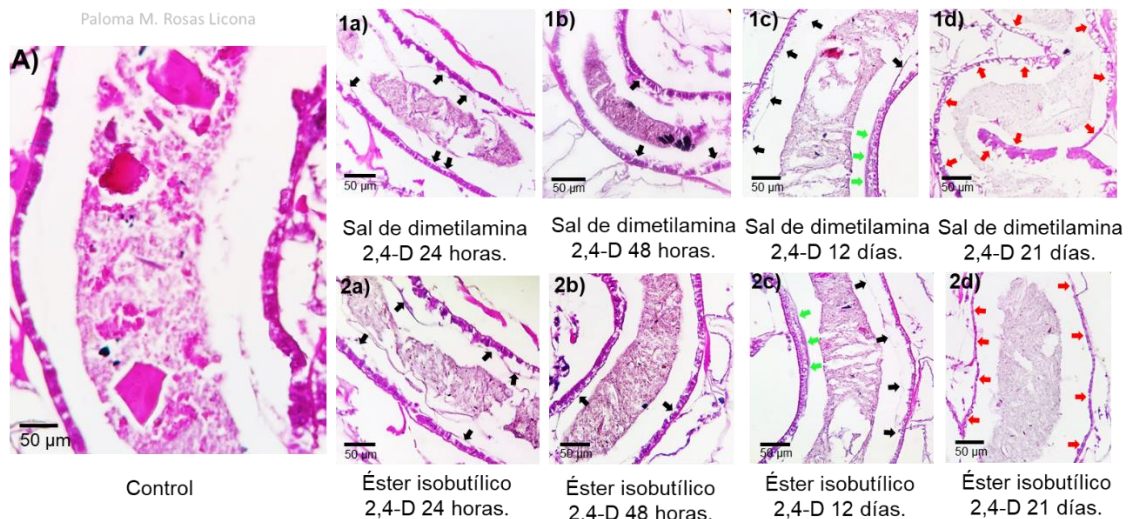


Figura 26. Cambios histológicos en el grosor del intestino medio de *D. magna* inducidos por las presentaciones comerciales de 2,4-D A) Organismo control. 1a) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 24 horas. 1b) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 48 horas. 1c) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 12 días. 1d) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 21 días. 2a) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 24 horas. 2b) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 48 horas. 2c) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 12 días. 2d) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 21 días. Las flechas negras indican secreción de mucus. Las flechas verdes señalan presencia de renovación celular. Las flechas rojas indican muerte celular.

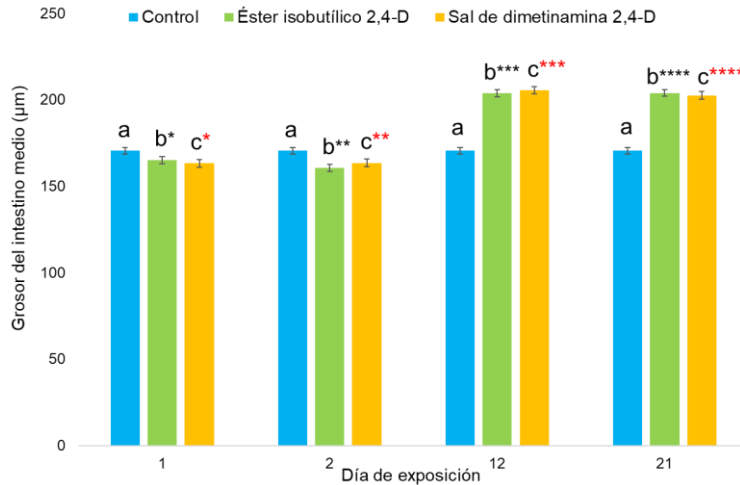


Figura 27. Medidas que corresponden al grosor ( $\mu\text{m}$ ) del intestino medio de *D. magna* expuesta a toxicidad aguda y crónica de las presentaciones comerciales de 2,4-D. Diferencias significativas señaladas por letras y asteriscos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

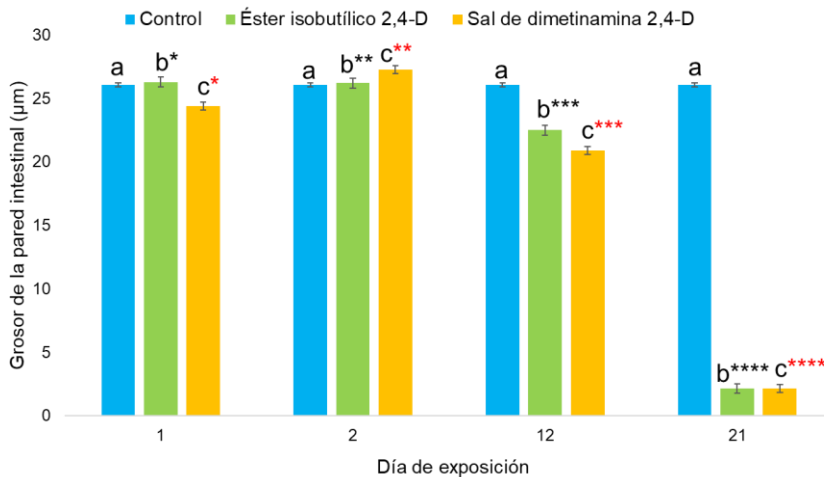


Figura 28. Medidas que corresponden al grosor ( $\mu\text{m}$ ) de pared intestinal de *D. magna* expuesta a toxicidad aguda y crónica de las presentaciones comerciales de 2,4-D. Diferencias significativas señaladas por letras y asteriscos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

Las células del intestino medio se examinaron y se mostró diversidad morfológica entre tratamientos (Figura 29). En condiciones normales, las células epiteliales, específicamente los enterocitos poseían una forma cilíndrica con un borde de microvellosidades en el extremo distal, proyectándose desde el polo apical hacia la luz del intestino medio (Quaglia *et al.*, 1976). El intestino medio de los organismos control mostró un estado no distendido, ya que las células de la

región poseían mayor altura que anchura. Las microvellosidades presentaron una longitud promedio de 10.37  $\mu\text{m}$  (Figura 30) con una disposición triangular y bifurcaciones. También se caracterizaron por tener un núcleo ovalado, el cual, ocupaba casi todo el diámetro de la célula, aunado la presencia de más de dos nucleolos.

Después de la exposición aguda de 2,4-D (24 y 48 horas de tratamiento) se observaron cambios mínimos en la morfología de los enterocitos, el intestino no poseía un estado distendido, las células epiteliales aún conservaban una estructura columnar cilíndrica alargada y la presencia de núcleos definidos en los enterocitos. Sin embargo, las células empiezan a secretar mucus, formando una capa que rodea el tracto gastrointestinal. Además, respecto a la longitud de las microvellosidades intestinales, con éster isobutílico 2,4-D, a 24 horas de exposición estas estructuras midieron 7.5  $\mu\text{m}$  y a 48 horas 7  $\mu\text{m}$  (Figura 30). Mientras que la sal de dimetilamina 2,4-D provocó que las microvellosidades intestinales se caracterizan por una longitud de 6.9  $\mu\text{m}$  y 6.8  $\mu\text{m}$  a 48 horas de exposición (Figura 30).

Luego entonces, a consecuencia de la toxicidad crónica, a los 12 días de exposición con ambas formulaciones comerciales se vislumbran malformaciones más severas con presencia de núcleos picnóticos en los enterocitos, regiones con vesículas de mucus y células con morfología cuboide, lo cual es señal de distensión intestinal (Figura 29). Resalta, la disminución en el tamaño de las microvellosidades (Figura 30), con éster isobutílico 2,4-D, hay una reducción de 4.3  $\mu\text{m}$  respecto al valor que poseían a las 48 horas de exposición para una longitud total de 2.7  $\mu\text{m}$ . La sal de dimetilamina 2,4-D genera una pérdida de 4.2  $\mu\text{m}$ , siendo 2.6  $\mu\text{m}$  la longitud total de las microvellosidades.

Finalmente, a 21 días de exposición, es inminente la muerte celular de los enterocitos (Figura 29). En las regiones donde aún se observan células vivas, se aprecian microvellosidades con longitud mínima de 1.7  $\mu\text{m}$  para los grupos con éster isobutílico 2,4-D y 1.76  $\mu\text{m}$  para los tratamientos con sal de dimetilamina



## 2,4-D (Figura 30).

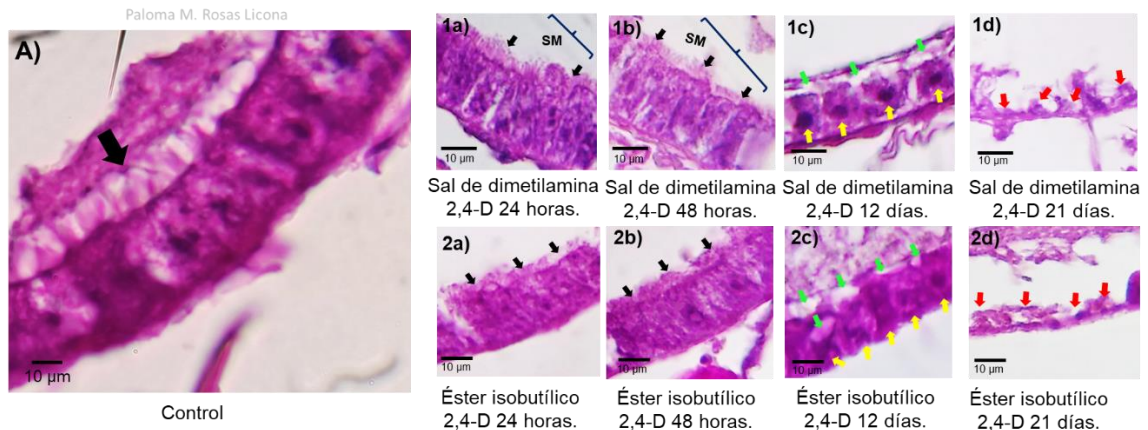


Figura 29. Cambios histológicos en el intestino medio de *D. magna* inducidos por las presentaciones comerciales de 2,4-D. A) Organismo control. 1a) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 24 horas. 1b) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 48 horas. 1c) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 12 días. 1d) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 21 días. 2a) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 24 horas. 2b) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 48 horas. 2c) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 12 días. 2d) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 21 días. Las flechas negras indican las microvellosidades en el intestino. La línea azul delimita una capa formada por la secreción de mucus (SM). Las flechas amarillas indican enterocitos con núcleo picnótico. Las flechas verdes señalan a vesículas de mucus. Las flechas rojas indican la presencia de muerte celular.

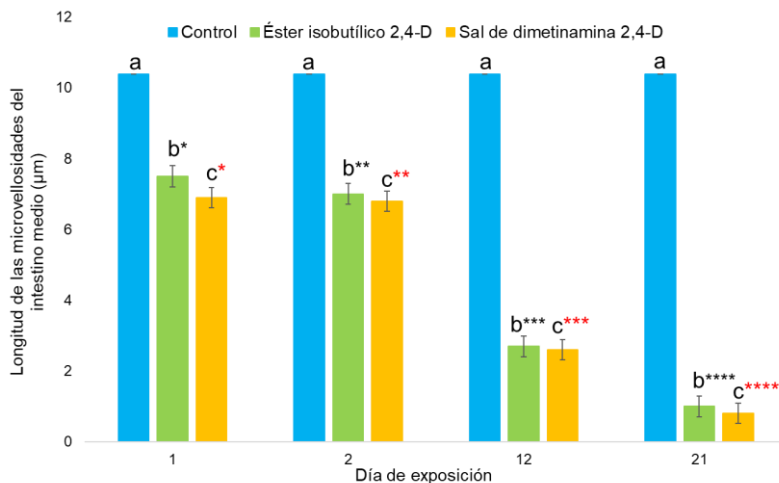


Figura 30. Medidas que corresponden a la longitud ( $\mu\text{m}$ ) de las microvellosidades en el intestino medio de *D. magna* expuesta a toxicidad aguda y crónica de las presentaciones comerciales de 2,4-D. Diferencias significativas señaladas por letras y asteriscos (ANOVA  $P < 0.05$ ).

Tomando en cuenta que las células epiteliales en el intestino se encargan principalmente de la absorción de nutrientes que provienen de la degradación

enzimática, además de formar una barrera protectora que impide la entrada de antígenos hacia el sistema vascular, se vuelve evidente que la presencia de alteraciones celulares inducidas por ambas presentaciones comerciales podría repercutir negativamente sobre la función digestiva, metabólica y protectora de la pared intestinal.

Lo anterior, bajo la afirmación de que las microvellosidades contribuyen a aumentar la superficie intestinal, con el fin de generar una mejor absorción de los nutrientes: a mayor área de contacto, mayor transferencia de materia en una misma cantidad de tiempo (Herrería Román, 2013). Así pues, al reducir su tamaño, hay menor área de superficie en la pared del intestino delgado, lo que provoca una disminución en la tasa de absorción de los alimentos digeridos (Ayala *et al.*, 2004).

En segundo lugar, también se observó la presencia de núcleos picnóticos. La picnosis se refiere al proceso de compactación nuclear causado por una hipercondensación de la cromatina (Harvey *et al.*, 2012). Este cambio epigenético en el enterocito puede provocar la inhibición de la expresión de genes asociados a: transporte de moléculas, producción enzimática, absorción de carbohidratos y lípidos, protección y regulación de la respuesta inmunitaria (Salvo-Romero *et al.*, 2015). Por ejemplo, los enterocitos de *D. magna* cuentan con las proteínas CD36, las cuales permiten la incorporación de lípidos a través de la membrana del enterocito (Cifarelli & Abumrad, 2018). Se ha identificado en humanos que sitios de metilación del ADN reducen fuertemente la expresión de CD36, generando anomalías en el metabolismo de los lípidos; como la formación de quilomicrones y cambios en la concentración de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad (Love-Gregory *et al.*, 2016). Aún hay poca información referente a los cambios epigenéticos inducidos por el 2,4-D, por lo que se insta la identificación de posibles genes silenciados y las consecuencias metabólicas de su inhibición.

Por otra parte, cabe mencionar que este evento aunado a la reducción en el tamaño de las microvellosidades da indicios a la posibilidad de que los

enterocitos se encuentren en una fase de necrosis o apoptosis. do Vale *et al.* (2007) describen que el proceso de apoptosis de los enterocitos involucra la pérdida de polarización de la célula, condensación de la cromatina (la cual lleva posteriormente a una fragmentación de la envoltura nuclear) y ruptura de la membrana externa con ausencia de microvellosidades. Después de 21 días de exposición fue evidente la muerte celular de los enterocitos, lo cual podría evitar la absorción de nutrientes en el intestino e inducir alteraciones en la función de la pared intestinal como barrera defensiva ante patógenos.

En condiciones normales, los enterocitos son renovados constantemente. Las células dañadas entran en fase apoptótica y son removidas de la pared intestinal con reemplazo por células sanas (Snoeck *et al.*, 2005). Sin embargo, después de 21 días de tratamiento, las células muertas permanecieron en la pared intestinal de los organismos. Respecto a esta cuestión, se ha observado que la exposición a tóxicos provoca la falta de eliminación por fagocitosis de los enterocitos en apoptosis; no obstante, se desconoce por qué no se puede llevar a cabo la renovación celular (do Vale *et al.*, 2007).

En tercer lugar, retomando los resultados durante la prueba de toxicidad crónica, la forma cuboidea de las células epiteliales se distingue como indicio de un intestino en estado distendido. Schultz & Kennedy (1976) mencionan que cuando el intestino medio está en un estado no distendido, las células de la pared intestinal son columnares, con una altura superior a su anchura, sin embargo, cuando el intestino se distiende, debido a la presencia de grandes cantidades de alimento que no ha sido metabolizado, las células del intestino medio tienden a reducir su tamaño asemejando la forma de un cubo. Anteriormente, en la Figura 29 se distinguió la reducción paulatina de la pared intestinal, su disminución podría ser explicada por los cambios en la morfología de las células. También en la Figura 27 se mostraron las medidas que corresponden a los cambios en el grosor del intestino medio de *D. magna*, este aumento en el ancho se da en el lumen, por las grandes cantidades de comida acumulada.

Con este resultado, más aquellos asociados a la frecuencia torácica, es posible complementar la suposición de que las presentaciones comerciales de 2,4-D llevan a una limitación nutricional con la consecuente disminución de recursos energéticos disponibles para llevar a cabo procesos biológicos asociados a la reproducción, maduración del embrión y movimiento natatorio.

### **8.7.2 Aparato reproductor**

Finalmente, se realizó histología en el ovario de los organismos. El sistema reproductor de una hembra de *D. magna* se conforma por el ovario, el cual se encuentra emparejado y situado ventralmente a lo largo del intestino (Lumer, 1937). En condiciones ambientales favorables, las hembras se reproducen partenogenéticamente y desarrollan crías genéticamente idénticas. El ovario de una hembra partenogenética (Figura 30) contiene una gran cantidad de gotas de aceite y gránulos de yema que rodean al oocito (Ngu *et al.*, 2022). También se encuentra la presencia de células nodrizas, encargadas de suministrar material nutritivo al oocito (Lumer, 1937).

Después de la exposición aguda y crónica a las formulaciones de 2,4-D, los organismos no presentaron alteraciones morfológicas en la estructura de los oocitos. Ahora bien, tanto en el grupo control como en los tratamientos se distinguen periodos normales de crecimiento, ya que los oocitos en etapas tempranas poseían un gran cuerpo sólido y esférico, en etapas más avanzadas, el núcleo comienza a desintegrarse gradualmente observándose vacuolado e irregular en el contorno, además de la formación de material granular alrededor del nucléolo (Lumer, 1937). Aunque se ha reportado que la exposición a estresores ambientales como radiación gamma y UVB en *D. magna* inducen atresia folicular (morfológicamente los oocitos presentan vacualización y fagocitosis) (Song *et al.*, 2020; Huebner *et al.*, 2013) y que los insecticidas pueden inhibir el desarrollo de los oocitos (Papchenkova & Makrushin, 2013), en este trabajo no se visualizaron este tipo de afectaciones ante la presencia de 2,4-D.

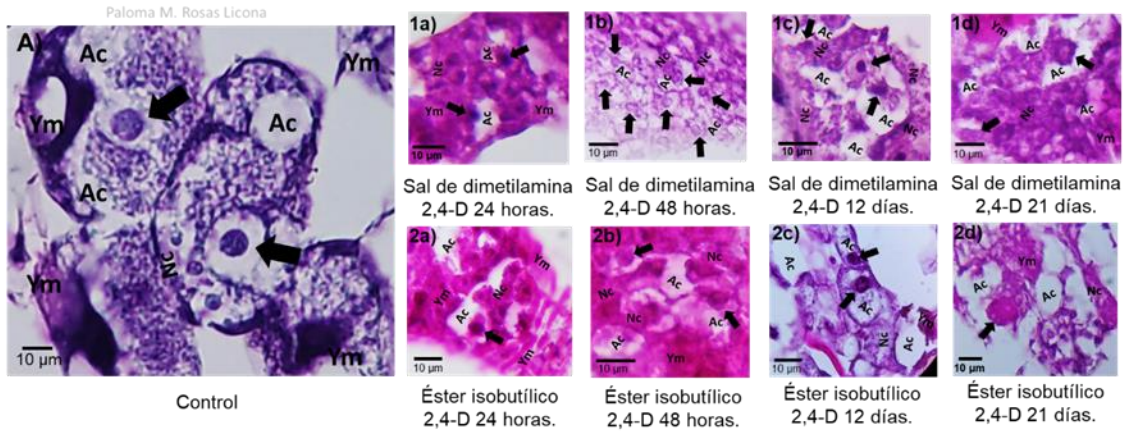


Figura 31. Cambios histológicos en el ovario de *D. magna* inducidos por las presentaciones comerciales de 2,4-D. A) Organismo control. 1a) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 24 horas. 1b) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 48 horas. 1c) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 12 días. 1d) Exposición a sal de dimetilamina 2,4-D durante 21 días. 2a) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 24 horas. 2b) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 48 horas. 2c) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 12 días. 2d) Exposición a éster isobutílico 2,4-D durante 21 días. Las flechas negras indican la presencia de oocitos sanos. Células nodrizas (Nc), Yema (Ym) y gotas de aceite (Ac).

Sin embargo, se destaca la reducción significativa en el número de oocitos presentes (Figura 32). Ante exposición aguda a éster isobutílico 2,4-D, después de 24 y 48 horas, el número de oocitos por hembra fue en promedio de 43.2 y con sal de dimetilamina 2,4-D fue de 41.76, estos valores resultaron más bajos que el control, puesto que en condiciones normales *D. magna* obtuvo 72 oocitos. Posteriormente, en el día 12 (21 días de edad para los organismos), el grupo control se distinguió por un total de 42 oocitos a consecuencia de una prolífica descendencia. En el caso de éster isobutílico 2,4-D, el número de oocitos se modificó a 25.20 y con sal de dimetilamina 2,4-D el valor total fue de 24.36. En el último día de monitoreo, la edad alcanzada fue de 30 días, este tiempo transcurrido aunado a la producción de neonatos en los organismos control, provocó que el número de oocitos disminuyera a 24. Después de 21 días de exposición se registraron 12.4 oocitos por hembra en el tratamiento con éster isobutílico y 13.92 en sal de dimetilamina 2,4-D.

Se ha reportado en otras especies como *Pimephales promelas*, *Drosophila melanogaster* y *Danio rerio* que la exposición a tóxicos como insecticidas y

efluentes industriales puede reducir el número de oocitos en los organismos (Carnikian Fernández, 2016; Pérez, 2021; Tenorio Chávez, 2021), pese a que no se han reportado este tipo de afectaciones ante exposición por 2,4-D, es importante su mención y más aún el énfasis en el desarrollo de futuras investigaciones que diluciden el origen de esta afectación.

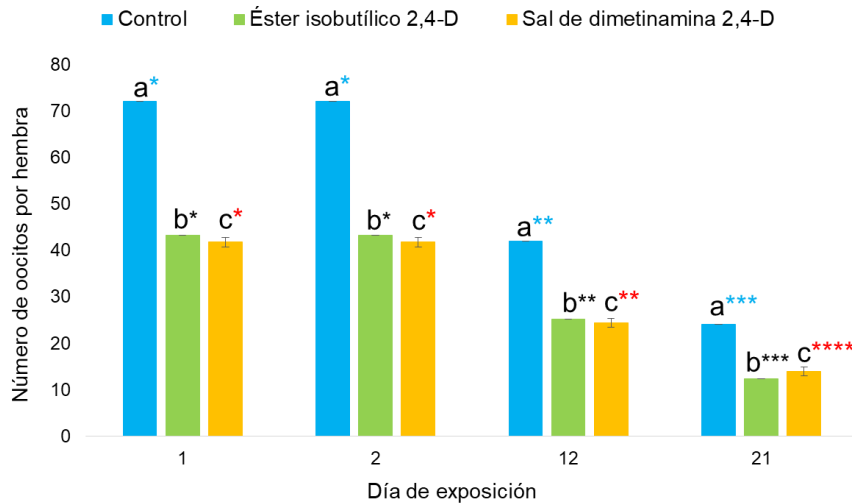


Figura 32. Número de oocitos presentes en el ovario *D. magna* expuesta a toxicidad aguda y crónica de las presentaciones comerciales de 2,4-D. Diferencias significativas señaladas por letras y asteriscos (ANOVA P < 0.05).

## 9. CONCLUSIONES

- El 2,4-D es un estresor químico que altera las características relacionadas con la historia de vida de *D. magna* al modificar su comportamiento poblacional y generar anomalías reproductivas.
- El éster isobutílico 2,4-D induce una reducción en la fecundidad y reproducción total, mientras que la sal de dimetilamina 2,4-D provoca la expulsión temprana del embrión, lo que eventualmente ocasiona una ineficiente reproducción de este organismo.
- La modelación matemática muestra que las dos presentaciones de 2,4-D limitan el crecimiento poblacional de *D. magna*, sin embargo, se genera una proyección más severa a largo plazo con la formulación de sal de dimetilamina 2,4-D, al modificar el ciclo reproductivo.
- La evaluación crónica de los efectos inducidos por el 2,4-D en *D. magna* relacionados con parámetros fisiológicos indica que la exposición al tóxico disminuye la frecuencia cardiaca y torácica de los organismos.
- La evaluación crónica de los efectos inducidos por el 2,4-D en *D. magna* relacionados con el comportamiento natatorio señala que la actividad mayormente afectada es la frecuencia de salto, promoviendo un efecto más severo sobre la disminución del movimiento con el éster isobutílico 2,4-D. Respecto al desplazamiento y la velocidad media de nado, el estadio con reducciones significativas sobre estos parámetros fueron los adultos.
- Se identificaron perfiles proteicos que podrían considerarse como biomarcadores asociados al estrés inducido por el 2,4-D en *D. magna*.
- El análisis histológico muestra cambios negativos principalmente sobre la morfología del intestino de *D. magna* provocados por la exposición crónica al 2,4-D, destacando: distensión del intestino, reducción de la pared

intestinal y anomalías en los enterocitos como la reducción en la longitud de las microvellosidades, presencia de núcleos pignóticos y muerte celular.

- Las malformaciones en el intestino de *D. magna* aunado a la disminución de la frecuencia torácica permite suponer que la exposición a 2,4-D conducen a una limitación nutricional en los organismos, en consecuencia, existen menos recursos energéticos disponibles para llevar a cabo procesos biológicos asociados a la reproducción, maduración del embrión y movimiento natatorio.
- Finalmente, el análisis histológico del ovario no mostró alteraciones asociadas a la morfología del tejido, sin embargo, los organismos presentaron reducciones en el número de oocitos, afectación que repercute sobre la fecundidad de los individuos y cuyo origen aún es desconocido.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Ait-Aissa, S., Porcher, J. M., Arrigo, A. P., & Lambre, C. (2000). Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology*, 145(2-3), 147-157.
- Alexander, H. C., Gersich, F. M., & Mayes, M. A. (1985). Acute toxicity of four phenoxy herbicides to aquatic organisms. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 35, 314-321.
- Arango, S. S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 30(1), 75-82.
- Aronzon, C. M., Sandoval, M. T., Herkovits, J., & Pérez-Coll, C. S. (2011). Stage-dependent toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental toxicology*, 26(4), 373-381.
- Ateeq, B., Farah, M. A., & Ahmad, W. (2006). Evidence of apoptotic effects of 2, 4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. *Life Sciences*, 78(9), 977-986.
- Ayala, E., Frisancho, O., & Chacón Yupanqui, P. (2004). Cambios histológicos del íleon distal en diarrea crónica asociada con anemia megaloblástica. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 24(2), 117-121.
- Barata, C., Damasio, J., López, M. A., Kuster, M., De Alda, M. L., Barceló, D., ... & Raldúa, D. (2007). Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(2), 370-379.
- Bednarska, A., Pietrzak, B., & Pijanowska, J. (2014). Effect of poor manageability and low nutritional value of cyanobacteria on *Daphnia magna* life history performance. *Journal of Plankton Research*, 36(3), 838-847.
- Bernard, P. A., Toyoshima, E., Eccles, C. U., Mayer, R. F., Johnson, K. P., & Max, S. R. (1985). 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) reduces acetylcholinesterase activity in rat muscle. *Experimental neurology*, 87(3), 544-556.
- Binh, Q. A., & Nguyen, H. H. (2020). Investigation the isotherm and kinetics of adsorption mechanism of herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) on corn cob biochar. *Bioresource Technology Reports*, 11, 100520.
- Bownik, A. (2017). *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: a review. *Science of the total environment*, 601, 194-205.
- Bownik, A., Pawłocik, M., & Sokołowska, N. (2017). Effects of neonicotinoid insecticide acetamiprid on swimming velocity, heart rate and thoracic limb movement of *Daphnia magna*. *Pol. J. Nat. Sci*, 32(3), 481-493.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Cattaneo, R., Loro, V. L., Spanevello, R., Silveira, F. A., Luz, L., Miron, D. S., ... & Clasen, B. (2008). Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92(3), 133-137.
- Casas, G. A., Rodríguez, D., & Afanador Téllez, G. (2010). Propiedades matemáticas del modelo de Gompertz y su aplicación al crecimiento de los cerdos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(3), 349-358.
- Calow, P. (1989). Physiological ecotoxicology: theory, practice and application. In 1. European Conference

on Ecotoxicology. Copenhagen (Denmark). 17-19 Oct 1988.

Calow, P. (1991). Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, 100(1-2), 3-6.

Carnikian Fernandez, A. (2016). Evaluación de los efectos de efluentes industriales y urbanos sobre aspectos de la reproducción en el pez *Pimephales promelas*. (Bachelor's thesis, Universidad de la República Oriental del Uruguay).

CEDRSSA, Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. (2020). Uso y regulación de herbicidas en México [PDF]. <http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/76Herbicidas.pdf>

Cifarelli, V., & Abumrad, N. A. (2018). Intestinal CD36 and other key proteins of lipid utilization: role in absorption and gut homeostasis. *Comprehensive Physiology*, 8(2), 493.

Coady, K., Marino, T., Thomas, J., Sosinski, L., Neal, B., & Hammond, L. (2013). An evaluation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in the amphibian metamorphosis assay and the fish short-term reproduction assay. *Ecotoxicology and environmental safety*, 90, 143-150.

Curi, L. M., Peltzer, P. M., Sandoval, M. T., & Lajmanovich, R. C. (2019). Acute toxicity and sublethal effects caused by a commercial herbicide formulated with 2, 4-D on *Physalaemus albonotatus* tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(1), 1-15.

da Silva Pinto, T. J., Rocha, G. S., Moreira, R. A., da Silva, L. C. M., Yoshii, M. P. C., Goulart, B. V., ... & Espindola, E. L. G. (2021). Multi-generational exposure to fipronil, 2, 4-D, and their mixtures in *Chironomus sancticarloi*: Biochemical, individual, and population endpoints. *Environmental Pollution*, 283, 117384.

de Castro Marcato, A. C., de Souza, C. P., & Fontanetti, C. S. (2017). Herbicide 2, 4-D: a review of toxicity on non-target organisms. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(3), 1-12.

De Coen, W. M., & Janssen, C. R. (1998). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. *Hydrobiologia*, 367(1), 199-209.

DeQuattro, Z. A., & Karasov, W. H. (2016). Impacts of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid aquatic herbicide formulations on reproduction and development of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental toxicology and chemistry*, 35(6), 1478-1488.

Dey, P. (2018). *Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology*. Springer Singapore.

Diario Oficial de la Federación. (2020, 31 diciembre). Secretaría de Gobernación. Recuperado 15 de marzo de 2023, de [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5609365&fecha=31/12/2020#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5609365&fecha=31/12/2020#gsc.tab=0)

Dodson, S. I., Hanazato, T., & Gorski, P. R. (1995). Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and *Chaoborus kairimone*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 14(1), 43-50.

Dolatabadi, M., Ghaneian, M. T., Wang, C., & Ahmadzadeh, S. (2021). Electro-Fenton approach for highly efficient degradation of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid from agricultural wastewater: Process optimization, kinetic and mechanism. *Journal of Molecular Liquids*, 334, 116116.

Doose, K. (2021). A global problem in a divided world: climate change research during the late Cold War, 1972–1991. *Cold War History*, 1-21.

do Vale, A., Costa-Ramos, C., Silva, D. S., Macedo, P. M., Fernandes, R., Sampaio, P., ... & Silva, M. T. (2007). Cytochemical and ultrastructural study of anoikis and secondary necrosis in enterocytes detached in vivo. *Apoptosis*, 12(6), 1069-1083.

Ebert, D. (2005). Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia*. Chapter 2, Introduction to *Daphnia* Biology. National Library of Medicine.

Fai, P. B. A., Mbida, M., Demefack, J. M., & Yamssi, C. (2015). Potential of the microbial assay for risk assessment (MARA) for assessing ecotoxicological effects of herbicides to non-target organisms. *Ecotoxicology*, 24, 1915-1922.

Fargašová, A. (1994). Comparative study of plant growth hormone (herbicide) toxicity in various biological subjects. *Ecotoxicology and environmental safety*, 29(3), 359-364.

Freydier, L., & Lundgren, J. G. (2016). Unintended effects of the herbicides 2, 4-D and dicamba on lady beetles. *Ecotoxicology*, 25, 1270-1277.

García Vargas, S. A., & GARCIA VARGAS, S. A. (2020). Efecto de dialil trisulfuro sobre alteraciones del desarrollo poblacional y expresión genética inducidas por UVB en *Daphnia magna* (Bachelor's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

George, D., & Mallery, P. (2003). *SPSS for Windows step by step: A simple guide and reference*. 11.0 update (4th ed.). Boston: Allyn & Bacon

Giardini, J. L., Yan, N. D., & Heyland, A. (2015). Consequences of calcium decline on the embryogenesis and life history of *Daphnia magna*. *The Journal of Experimental Biology*, 218(13), 2005-2014.

Gliem, J. A., & Gliem, R. R. (2003). Calculating, interpreting, and reporting Cronbach's alpha reliability coefficient for Likert-type scales. Midwest Research-to-Practice Conference in Adult, Continuing, and Community Education.

Gonzaga Garita, G. (2021). Identificación de la proteína HSP70 y modelación del desarrollo poblacional por toxicidad de UVB y tratamiento con Dialiltrisulfuro en *Daphnia magna* (Bachelor's thesis).

Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning. A Laboratory Manual* 4th.

González Ferriol, M., Betancourt AGuiar, J. L., & Ramos, L. (2018). Endocrinología de la reproducción en crustáceos decápodos (Crustacea: Decapoda): Avances científicos y perspectivas futuras.

Haggblade, S., Minten, B., Pray, C., Reardon, T., & Zilberman, D. (2017). The herbicide revolution in developing countries: Patterns, causes, and implications. *The European Journal of Development Research*, 29(3), 533-559.

Harada, Y., Tanaka, N., Ichikawa, M., Kamijo, Y., Sugiyama, E., Gonzalez, F. J., & Aoyama, T. (2016). PPAR $\alpha$ -dependent cholesterol/testosterone disruption in Leydig cells mediates 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-induced testicular toxicity in mice. *Archives of toxicology*, 90, 3061-3071.

Harvey, J. W., Stevens, A., Lowe, J. S., & Scott, I. (2012). *Veterinary hematology* (pp. 234-259). St. Louis: WB Saunders.

Hattab, S., Boughattas, I., Boussetta, H., Viarengo, A., Banni, M., & Sforzini, S. (2015). Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in the earthworm *Eisenia andrei* after exposure to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 122, 76-82.

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

Herrería Román, E. (2013). Intestino delgado y patologías asociadas a la malabsorción intestinal.

Huebner, J. D., Loadman, N. L., Wiegand, M. D., Huebner, E., Palitsky, D. J., & Husarewycz, W. H. (2013). UVB radiation affects growth, reproduction and tissue structure of *Daphnia magna* across several

temperatures. Photochemistry and photobiology, 89(1), 103-110.

INECC, Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (s.f.). 2,4-D. Consultado el 17 de septiembre de 2022. [PDF]. [http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/2\\_4\\_D.pdf](http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/2_4_D.pdf)

Islam, F., Wang, J., Farooq, M. A., Khan, M. S., Xu, L., Zhu, J., ... & Zhou, W. (2018). Potential impact of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environment international*, 111, 332-351.

Jeong, S. W., Lee, S. M., Yum, S. S., Iguchi, T., & Seo, Y. R. (2013). Genomic expression responses toward bisphenol-A toxicity in *Daphnia magna* in terms of reproductive activity. *Molecular & Cellular Toxicology*, 9, 149-158.

Jordão R., Camposa B., Lemosc M. F. L., Soaresb A., Taulera R., Barata C. (2015). Induction of multixenobiotic defense mechanisms in resistant *Daphnia magna* clones as a general cellular response to stress. *Aquatic Toxicology* 175 (2016) 132–143.

Jote, C. A. (2019). A Review of 2, 4-D Environmental fate, persistence and toxicity effects on living organisms. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 9(1), 22-32.

Juan, V. F., Fré, F. R. N., Saint-André, H. M., & Fernández, R. R. (2021). Responses of 2, 4-D resistant *Brassica rapa* L. biotype to various 2, 4-D formulations and other auxinic herbicides. *Crop Protection*, 145, 105621.

Kashian, D. R., & Dodson, S. I. (2002). Effects of common-use pesticides on developmental and reproductive processes in *Daphnia*. *Toxicology and industrial health*, 18(5), 225-235.

Klann, M., & Stollewerk, A. (2017). Evolutionary variation in neural gene expression in the developing sense organs of the crustacean *Daphnia magna*. *Developmental biology*, 424(1), 50-61.

Kumar, A., Rajendran, V., Sethumadhavan, R., & Purohit, R. (2013). CEP proteins: the knights of centrosome dynasty. *Protoplasma*, 250, 965-983

LeBlanc, G. A. (1982). Laboratory investigation into the development of resistance of *Daphnia magna* (straus) to environmental pollutants. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 27(4), 309-322.

Lee, B. Y., Choi, B. S., Kim, M. S., Park, J. C., Jeong, C. B., Han, J., & Lee, J. S. (2019). The genome of the freshwater water flea *Daphnia magna*: A potential use for freshwater molecular ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 210, 69-84.

Linarez Gonzáles, Y. A. (2019). Descripción del comportamiento poblacional de *Daphnia magna* en presencia de los factores estresantes oxitetraciclina y radiación UV-B mediante modelado matemático (Master's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla)

Love-Gregory, L., Kraja, A. T., Allum, F., Aslibekyan, S., Hedman, Å. K., Duan, Y., ... & Abumrad, N. A. (2016). Higher chylomicron remnants and LDL particle numbers associate with CD36 SNPs and DNA methylation sites that reduce CD36 [S]. *Journal of lipid research*, 57(12), 2176-2184.

Lumer, H. (1937). Growth and maturation in the parthenogenetic eggs of *Daphnia magna* Strauss. *Cytologia*, 8(1), 1-14.

Magnoli, K., Carranza, C. S., Aluffi, M. E., Magnoli, C. E., & Barberis, C. L. (2020). Herbicides based on 2, 4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.

Martín, E., Vivori, C., Rogalska, M., Herrero-Vicente, J., & Valcárcel, J. (2021). Alternative splicing regulation of cell-cycle genes by SPF45/SR140/CHERP complex controls cell proliferation. *RNA*, 27(12), 1557-1576.

Martins, J., Teles, L. O., & Vasconcelos, V. (2007). Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environment International*, 33(3), 414-425.

Mountassif, D., Kabine, M., Mounchid, K., Mounaji, K., & Latruffe, N. (2008). Biochemical and histological alterations of cellular metabolism from jerboa (*Jaculus orientalis*) by 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid: Effects on D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Pesticide biochemistry and physiology*, 90(2), 87-96.

Moreira, R. A., Araújo, C. V., da Silva Pinto, T. J., da Silva, L. C. M., Goulart, B. V., Viana, N. P., ... & Espindola, E. L. G. (2021). Fipronil and 2, 4-D effects on tropical fish: Could avoidance response be explained by changes in swimming behavior and neurotransmission impairments?. *Chemosphere*, 263, 127972.

Moreira, R. A., Polo-Castellano, C., Cordero-de-Castro, A., Dias, M. A., Pinto, T. J., Montagner, C. C., ... & Araújo, C. V. (2022). Short and long-term exposure to the pesticides fipronil and 2, 4-D: Effects on behavior and life history of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 136719.

NCBI, National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 1486, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. Consultado el 17 de septiembre de 2022. [En línea]. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_4-Dichlorophenoxyacetic-acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dichlorophenoxyacetic-acid).

Ngu, M. S., Vanselow, D. J., Zaino, C. R., Lin, A. Y., Copper, J. E., Beaton, M. J., ... & Ang, K. C. (2022). Web-based histology reference atlas for the freshwater crustacean *Daphnia magna*. *bioRxiv*, 2022-03.

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.

Oviedo, H. C., & Campo-Arias, A. (2005). Aproximación al uso del coeficiente alfa de Cronbach. *Revista colombiana de psiquiatría*, 34(4), 572-580.

Palma-Bautista, C., Rojano-Delgado, A. M., Dellaferrera, I., Rosario, J. M., Vigna, M. R., Torra, J., & de Prado, R. (2020). Resistance mechanisms to 2, 4-D in six different dicotyledonous weeds around the world. *Agronomy*, 10(4), 566.

Papaefthimiou, C., Pavlidou, V., Gregorc, A., & Theophilidis, G. (2002). The action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on the isolated heart of insect and amphibia. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11(2), 127-140.

Park, K., Park, J., Kim, J., & Kwak, I. S. (2010). Biological and molecular responses of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) to herbicide 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(4), 439-446.

Pauwels, K., Stoks, R., & De Meester, L. (2010). Enhanced anti-predator defence in the presence of food stress in the water flea *Daphnia magna*. *Functional Ecology*, 24(2), 322-329.

Papchenkova, G. A., & Makrushin, A. V. (2013). Effect of the insecticide Tanrec® on reproduction and vital activity of *Daphnia magna* Straus in a 15-day test. *Inland water biology*, 6, 344-350.

Pérez, A. K. G. (2021). Evaluación del riesgo ecotoxicológico del insecticida cetoenol Movento® 240SC mediante el uso del organismo modelo *Drosophila melanogaster* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México).

Peterson, M. A., McMaster, S. A., Riechers, D. E., Skelton, J., & Stahlman, P. W. (2016). 2, 4-D past, present, and future: a review. *Weed Technology*, 30(2), 303-345.

Présing, M., & Véro, M. (1983). A new method for determining the heart beat rate of *Daphnia magna*. *Water Research*, 17(10), 1245-1248.

- Quaglia, A., Sabelli, B., & Villani, L. (1976). Studies on the intestine of Daphnidae (Crustacea, Cladocera) ultrastructure of the midgut of *Daphnia magna* and *Daphnia obtusa*. *Journal of Morphology*, 150(3), 711-725.
- Qurratu, A., & Reehan, A. (2016). A review of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) derivatives: 2, 4-D dimethylamine salt and 2, 4-D butyl ester. *International Journal of Applied Engineering Research*, 11(19), 9946-55.
- Ramos, R., & González, G. (2020). Modelo Gompertz. CONACYT. Recuperado 2 de abril de 2023, de <https://salud.conacyt.mx/coronavirus/investigacion/proyectos/gompertz.html>
- Ranke-Rybicka, B., Plachta, J., & Zyciński, D. (1995). Effect of water contamination with surface active substances and plant protecting agents on aquatic organisms. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 46(2), 175-181.
- Relyea, R. A. (2005). The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological applications*, 15(2), 618-627
- Rodríguez, E. M., & Pisanó, A. (1993). Effects of parathion and 2, 4-D to eggs incubation and larvae hatching in *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 104(1), 71-78.
- Salla, G. B. F., Bracht, L., Parizotto, A. V., Comar, J. F., Peralta, R. M., Bracht, F., & Bracht, A. (2019). Kinetics of the metabolic effects, distribution spaces and lipid-bilayer affinities of the organo-chlorinated herbicides 2, 4-D and picloram in the liver. *Toxicology Letters*, 313, 137-149.
- Salvo Romero, E., Alonso Cotoner, C., Pardo Camacho, C., Casado Bedmar, M., & Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig*, 107(11), 686-96.
- Sarikaya, R., & Yılmaz, M. (2003). Investigation of acute toxicity and the effect of 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). *Chemosphere*, 52(1), 195-201.
- Sarkar, S. K., & De, S. K. (2016). Electron microscope based X-ray microanalysis on bioaccumulation of heavy metals and neural degeneration in mudskipper [*Pseudapocryptes lanceolatus*]. *Journal of microscopy and ultrastructure*, 4(4), 211-221.
- Sarma, S. S. S., Ramírez-Pérez, T., Nandini, S., & Peñalosa-Castro, I. (2001). Combined effects of food concentration and the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on the population dynamics of *Brachionus patulus* (Rotifera). *Ecotoxicology*, 10(2), 91-99.
- Schuijt, L. M., Peng, F. J., van den Berg, S. J., Dingemans, M. M., & Van den Brink, P. J. (2021). (Eco) toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Facts, challenges, and future. *Science of the total environment*, 795, 148776.
- Schultz, T. W., & Kennedy, J. R. (1976). The fine structure of the digestive system of *Daphnia pulex* (Crustacea: Cladocera). *Tissue and Cell*, 8(3), 479-490.
- SEMARNAT, Secretaría de Medio ambiente y Recursos Naturales. (2016). Producción de insecticidas y plaguicidas de la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera (Toneladas) [Conjunto de datos]. [https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/compendio\\_2016/dgeiawf.semarnat.gob.mx\\_8080/ibi\\_apps/WFServlet7312.html](https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/compendio_2016/dgeiawf.semarnat.gob.mx_8080/ibi_apps/WFServlet7312.html)
- SEMARNAT, Secretaría de Medio ambiente y Recursos Naturales. (2018). Informe de rendición de Cuentas de Conclusión de la Administración 2012-2018 [línea]. <https://www.gob.mx/semarnat/acciones-y-programas/informe-de-rendicion-de-cuentas-2012-2018>
- SEMARNAT, Secretaría de Medio ambiente y Recursos Naturales. (2019). Diagnóstico sobre la

Contaminación por Plaguicidas en Agua Superficial, Agua Subterránea y Suelo [PDF]. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/495283/Diagnostico\\_sobre\\_la\\_Contaminacion\\_por\\_Plaguicidas\\_en\\_Agua\\_Superficial\\_Agua\\_Subterranea\\_y\\_Suelo\\_versi\\_n\\_final\\_s-d.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/495283/Diagnostico_sobre_la_Contaminacion_por_Plaguicidas_en_Agua_Superficial_Agua_Subterranea_y_Suelo_versi_n_final_s-d.pdf)

SEMARNAT, Secretaría de Medio ambiente y Recursos Naturales. (2022). Estudios sobre uso de plaguicidas en México compilación 1980-2018 [PDF]. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728079/141\\_2022\\_Estudios\\_plaguicidas\\_Mexico\\_1980-2018.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/728079/141_2022_Estudios_plaguicidas_Mexico_1980-2018.pdf)

Soetaert, A., van der Ven, K., Moens, L. N., Vandenbrouck, T., van Remortel, P., & De Coen, W. M. (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(1), 60-71.

Snoeck, V., Goddeeris, B., & Cox, E. (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes and infection*, 7(7-8), 997-1004.

Song, Y., Xie, L., Lee, Y., Brede, D. A., Lyne, F., Kassaye, Y., ... & Tollefsen, K. E. (2020). Integrative assessment of low-dose gamma radiation effects on *Daphnia magna* reproduction: Toxicity pathway assembly and AOP development. *Science of the total environment*, 705, 135912.

Stellman, J. M., & Stellman, S. D. (2018). Agent Orange during the Vietnam War: the lingering issue of its civilian and military health impact. *American journal of public health*, 108(6), 726-728.

Stevčić, Č., Pulkkinen, K., & Pirhonen, J. (2020). Efficiency of *Daphnia magna* in removal of green microalgae cultivated in Nordic recirculating aquaculture system wastewater. *Algal Research*, 52, 102108.

Tkaczyk, A., Bownik, A., Dudka, J., Kowal, K., & Ślaska, B. (2021). *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of the Total Environment*, 763, 143038.

Tang, J., Wang, X., Yin, J., Han, Y., Yang, J., Lu, X., ... & Yang, Z. (2019). Molecular characterization of thioredoxin reductase in waterflea *Daphnia magna* and its expression regulation by polystyrene microplastics. *Aquatic Toxicology*, 208, 90-97

Tayeb, W., Nakbi, A., Trabelsi, M., Miled, A., & Hammami, M. (2012). Biochemical and histological evaluation of kidney damage after sub-acute exposure to 2, 4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rats: involvement of oxidative stress. *Toxicology mechanisms and methods*, 22(9), 696-704.

Tenorio Chávez, P. Influencia de un alimento funcional enriquecido con espirulina sobre la embriotoxicidad y teratogenicidad inducidos por tetraciclina sobre *Danio rerio*. (Bachelor's thesis, Universidad Autónoma del Estado de México).

Vidal, R. A., Rainero, H. P., Kalsing, A., & Trezzi, M. M. (2010). Prospección de las combinaciones de herbicidas para prevenir malezas tolerantes y resistentes al glifosato. *Planta Daninha*, 28, 159-165.

Villalobos, A. R., Higgins, J., Vosburgh, B., & Renfro, J. L. (2006). Trimethylamine oxide (TMAO) decreases stress-induced alteration of Hsp70 production and organic acid transport by the choroid plexus (CP) of the dogfish shark, *Squalus acanthias*.

Wang, T., Wang, W., Wang, Q., Xie, R., Landay, A., & Chen, D. (2020). The E3 ubiquitin ligase CHIP in normal cell function and in disease conditions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1460(1), 3-10.

Wang, Y., Wan, Y., Cao, M., Wang, A., Mahai, G., He, Z., ... & Xia, W. (2022). Urinary 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in Chinese pregnant women at three trimesters: Variability, exposure characteristics, and association with oxidative stress biomarkers. *Chemosphere*, 304, 135266.

Yadav, S. P., Sharma, N. K., Liu, C., Dong, L., Li, T., & Swaroop, A. (2016). Centrosomal protein CP110 controls maturation of the mother centriole during cilia biogenesis. *Development*, 143(9), 1491-1501.

Zafra-Lemos, L., Cusioli, L. F., Bergamasco, R., Borin-Carvalho, L. A., & de Brito Portela-Castro, A. L. (2021).

Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of exposure to the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in *Astyanax lacustris* (Pisces, Characidae) and the potential for its removal from contaminated water using a biosorbent. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 865, 503335.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1

#### Formato de encuesta

#### Encuesta

#### Tipo y uso de herbicidas

La presente encuesta consta de 7 reactivos que buscan conocer el tipo de herbicida más empleado en los cultivos, así como particularidades en su aplicación.

De las siguientes preguntas, seleccione la opción que consideré describe la situación en el empleo de herbicidas en su zona de trabajo. No hay respuestas correctas o incorrectas, las elecciones que haga deberán depender por completo de su juicio personal.

Antes de comenzar, usted debe saber que:

- Su participación en este estudio es totalmente voluntaria.
- Todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales.
- La información obtenida, únicamente se utilizará para los fines específicos del estudio.

Gracias por su cooperación y su ayuda.

#### Parte I

Edad	
Sexo (marque con X)	Femenino ( <input type="checkbox"/> ) Masculino ( <input type="checkbox"/> )
Lugar de residencia (municipio y estado)	

#### Parte II

1. El cultivo lo realiza en:

- Vivero
- Invernadero
- Huerta
- Zonas agrícolas
- Otro\_

2. ¿Qué tipo de cultivo realiza?

- Alimentario
- Forraje
- Textil
- Oleaginoso
- Ornamental
- Industrial

3. ¿Específicamente qué produce? Puede escoger más de una opción

- Leguminosas



- Tubérculos
- Gramíneas
- Cereales
- Verduras
- Plantas aromáticas para condimento
- Frutas
- Plantas ornamentales
- Otro\_

4. **¿Utiliza herbicidas para el control de maleza en sus cultivos?**

- Sí
- No

Si su respuesta es sí, conteste las siguientes preguntas:

5. **Seleccione la formulación de los herbicidas que utiliza (Puede escoger más de una opción):**

- 2,4-D con Ester
- 2,4-D con Sal
- Otra formulación de 2,4-D\_
- Otro herbicida\_

6. **¿Qué tipo de maleza controlan con el empleo de este herbicida?**

- Maleza de hoja ancha
- Maleza de hoja angosta
- Ambas

7. **Según su experiencia, ¿cuál es la eficiencia del herbicida o mezcla de herbicidas en el control de la maleza?**

- Entre 100%-90%
- Entre 89%-80%
- Entre 79%-50%
- Menor del 50%

Figura 33. Estructura de la encuesta realizada.

