



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

HISTOPATOLOGÍA DE HÍGADO, RIÑÓN Y BRANQUIAS DE *Ambystoma mexicanum*
EXPUESTO POR VÍA ORAL A MICROCISTINA-LR OBTENIDA DE UN FLORECIMIENTO
CIANOBACTERIANO DE XOCHIMILCO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Alejandro Chávez Ríos

DIRECTOR DE TESIS

Biol. José del Carmen Benítez Flores

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres, por brindarme su apoyo durante todo el tiempo que duró mi preparación profesional, sin su ayuda nunca lo habría logrado, les demostraré que puedo ser alguien importante en la vida haciendo lo que más me apasiona.

A mis hermanos Jorge, Luis, Susana y Jhonatan por ser un ejemplo para mí, no me quedaré atrás solo por ser el hermano menor.

A todos y cada uno de mis mejores amigos con los que he compartido muy buenos momentos de mi vida: Rous, Midori, Frank, Lidia (mención especial por ayudarme en el proyecto), Siddartha, Karen Acevedo, Ferz y Ewilio, no olvidaré todas esas épicas aventuras que pasamos durante la carrera.

A mis amigos con los que cursé los niveles para la acreditación de inglés, aparecieron en el momento más oportuno, fueron como una familia para mí.

A todos los colegas con los que pasé maravillosos momentos en el laboratorio de Histología de la batícueva, Ale niña, Thor, Elenka, Abraham, María, Iván, Manuel, Aidin, Jacaranda, Daniel, Adriana, Diana, Aldo, Sayra, y wendy.

A mis primeras alumnas: Karen, Sofi y Mariana por hacerme pasar momentos agradables, me recordaron a mí cuando inicié la carrera, aun les falta un largo viaje, pero saben que pueden contar conmigo por cualquier duda que tengan.

A todos los camaradas biólogos de la generación 2012-2015 así como a los colegas que conocí de la carrera de optometría, odontología y psicología de la FES Iztacala.

A mi familia del VIVARIO: Dotore, profe Raúl, Sandra, Cesar, Gaby y a los demás compañeros con los que compartí una muy bonita estancia, el Ajolotario se levantara en lo más alto...

Por ustedes no me rendiré hasta alcanzar mis sueños

Atentamente: Ale Axolote

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de la Arq. Lourdes Pérez, directora de infraestructura del Instituto del deporte del Distrito Federal, por permitirnos realizar este trabajo de investigación dentro de las instalaciones de la Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe el 1 de mayo del 2016.

Al Biol. José del Carmen Benítez Flores por ser mi mentor, compartiéndome sus vastos conocimientos no solo de histología, sino de toda la vida, además de ser un gran amigo, que este sea el primero de muchos otros proyectos a futuro.

A la Dra. María del Rosario Gonzales Valle por enseñarme la forma en la que uno debe trabajar en el laboratorio, pero también por enseñarme a que un investigador no debe olvidar nunca su lado humano.

Al maestro Gabriel Camarena por darme muchos consejos acerca del proceso de investigación y sobre todo por enseñarme lo que es la “ciencia colmillo”.

A la M. en C. Gloria Garduño Solórzano por apoyarme a adentrarme a un área de conocimiento del cual yo tenía poca experiencia y animarme cuando los experimentos no salían de acuerdo a lo planeado.

A los doctores Nandini Sarma y a SSS Sarma, así como al M. en C. Cesar Alejandro Zamora Barrios por el apoyo brindado en la elaboración del proyecto.

A todos mis sinodales por revisar minuciosamente esta tesis de investigación compartiéndome conocimientos y sugerencias para el mejoramiento del trabajo.

Al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla por permitirme realizar el análisis de HPLC en las instalaciones de su laboratorio.

A todos los camaradas que conocí en el curso “toxicología de cianobacterias” en junio del 2016, me di cuenta del gran potencial que tiene el país para realizar investigaciones relacionadas con este tema.

Al Dr. Vitor Manuel de Oliveira e Vasconcelos de la Universidad de Porto, Portugal, por ampliar mi panorama acerca de la toxicidad de cianobacterias en el mundo, nos volveremos a ver en un futuro...

«Dans les champs de l'observation, le hasard ne favorise
que les esprits préparés.»
Louis Pasteur

1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN	11
2.1. Biodiversidad en México	11
2.2. Anfibios	11
2.3. Extinción masiva de anfibios	12
2.4. <i>Ambystoma mexicanum</i> (Shaw and Nodder, 1798)	12
2.5. Morfología externa.....	12
2.6. Ciclo de vida	13
2.7. Distribución geográfica.....	15
2.8. Xochimilco	15
2.9. Deterioro de Xochimilco.....	16
2.10. Eutrofización	16
2.11. Cianobacterias	17
2.12. Consecuencias de los florecimientos cianobacterianos nocivos	17
2.13. Cianotoxinas	18
2.14. Clasificación de cianotoxinas.....	18
2.15. Microcistinas	20
2.16. Estabilidad y remoción de la microcistina-LR	20
2.17. Toxicidad de microcistina-LR.....	21
3. ANTECEDENTES	23
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. OBJETIVO GENERAL	25
6. OBJETIVOS PARTICULARES	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS	26
7.1 Área de estudio	26
7.2. Muestreo y colecta de muestras biológicas cianobacterianas.....	27
7.3. Determinación de variables fisicoquímicas	27
7.4. Análisis cualitativo y cuantitativo del fitoplancton.	28
7.5. Cuantificación de microcistina-LR por el método inmunológico de ELISA	28

7.6. Cuantificación de microcistina-LR por el método de HPLC	30
7.7. Obtención y mantenimiento de <i>Ambystoma mexicanum</i>	31
7.8. Elaboración de pellets para el bioensayo de toxicidad	32
7.9. Bioensayo de toxicidad subcrónica	32
7.10. Sacrificio, observación macroscópica y técnica histológica	32
8. RESULTADOS	33
8.1. Determinación taxonómica	33
Microcystis botrys Teiling 1942.....	34
Microcystis aeruginosa (Kütz.) Kütz, 1846.....	34
Microcystis flos-aquae (Wittr.) Kirchner 1898	34
Microcystis panniformis Komárek et al., 2002	34
8.2. Análisis cuantitativo	35
8.3. Parámetros fisicoquímicos	36
8.4. Cuantificación de microcistinas por el ensayo de ELISA.....	36
8.5. Cuantificación de microcistinas por método de HPLC.....	37
8.6. Ensayo de toxicidad subcrónica	38
8.7. Registro de peso y talla	42
8.8. Descripción histológica.....	43
Hígado	43
Riñones.....	47
Branquias.....	50
9. DISCUSIÓN	53
9.1. Composición fitoplanctónica.....	53
9.2. Parámetros fisicoquímicos del agua.....	54
pH y oxígeno disuelto	54
Alcalinidad y dureza total	55
Nitratos y fosfatos	55
9.3. Determinación de Microcistina-LR por el método inmunológico de ELISA.....	56
9.4. Determinación de Microcistina-LR por el método de HPLC	57
9.5. Bioensayo de toxicidad subcrónica con <i>A. mexicanum</i>	58
9.6. Efectos de microcistina-LR en hígado de <i>A. mexicanum</i>	59
9.7. Efectos de Microcistina-LR en riñones de <i>A. mexicanum</i>	61

9.8. Efectos de microcistina-LR en branquias de <i>A. mexicanum</i>	62
10. CONCLUSIONES	64
11. PERSPECTIVAS	65
12. LITERATURA CITADA	66

Índice de Figuras

-Figura 1. <i>Ambystoma mexicanum</i> en etapa de larva temprana.	13
-Figura 2. Ciclo de vida de <i>Ambystoma mexicanum</i>	14
-Figura 3. Estructura química de microcistina LR (Wiegand y Pflugmacher, 2005).	20
-Figura 4. Área de estudio (Fotografía tomada con Google Earth; mapa de la Ciudad de México tomada de INEGI, 2016).	26
-Figura 5. Vista general de la Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe.	27
-Figura 6. Condiciones de mantenimiento de <i>A. Mexicanum</i> durante el bioensayo de toxicidad.	31
-Figura 7. Especies de cianobacterias identificadas durante el florecimiento cianobacteriano nocivo detectado en la Pista Olímpica de remo y canotaje en mayo del 2016, A) <i>Microcystis botrys</i> , B) <i>Microcystis aeruginosa</i> , C) <i>Microcystis flos-aquae</i> , D) <i>Microcystis panniformis</i> , 400X.....	33
-Figura 8. Abundancia de especies de cianobacterias determinadas en el florecimiento cianobacteriano en la Pista de Remo y Canotaje en mayo del 2016, células/ml.....	35
-Figura 9. Cromatograma obtenido a partir del patrón estándar de 10 µg/ml de Microcistina-LR de SIGMA-ALDRICH, la flecha indica el pico de Microcistina-LR detectado.....	37
-Figura 10. Cromatograma obtenido a partir de un extracto metanólico elaborado con células liofilizadas provenientes del florecimiento cianobacteriano nocivo proveniente de la pista olímpica en mayo del 2016.....	38
-Figura 11. Cromatograma obtenido de la repetición del extracto metanólico elaborado con células liofilizadas provenientes de la pista olímpica en mayo del 2016.....	38
-Figura 12. Apariencia de las excretas de los individuos del tratamiento control (A) y del tratamiento experimental (B).	39

-Figura 13. Individuos del tratamiento control (A) experimental (B) el día 24 del experimento.....	40
-Figura 14. Imágenes que muestran algunos órganos abdominales en individuos del tratamiento control (A y C) y experimental (B y D).....	41
-Figura 15. Registro del peso de todos los individuos durante el bioensayo de toxicidad subcrónica.	42
-Figura 16. Registro de la talla de todos los individuos durante el bioensayo de toxicidad subcrónica.....	43
-Figura 17. Estructura histológica del hígado de <i>Ambystoma mexicanum</i> del grupo con el tratamiento control sacrificados el día 24 y 30 del experimento, se observan hepatocitos (H), corteza hematopoyética (Ch), vena central (VC), vena porta (VP), cápsula hepática (flecha), sinusoides (triángulo), melanomacrófagos (circulo). Tinción de Hematoxilina- Eosina, A (100X), B, C y D (400X).....	44
-Figura 18. Estructura histológica del hígado de <i>Ambystoma mexicanum</i> del grupo con tratamiento experimental sacrificado el día 30 del bioensayo, (A) formación de centros melanomacrófagos, (B) infiltrado celular inflamatorio perivascular, (C) esteatosis focal, vacuolas lipídicas (flechas negras), (D) vista detallada de los centros melanomacrófagos (CMM). Tinción con Hematoxilina-Eosina, A y B (100X), C (400X), D (1000X).....	45
-Figura 19. Estructura histológica del hígado de <i>Ambystoma mexicanum</i> del del grupo con tratamiento experimental sacrificado el día 24 del bioensayo, (A) pérdida de la arquitectura hepática y reducción de la corteza hematopoyética, (B) hepatocitos necróticos, (C) balonización de hepatocitos (circulo) (D) vista detallada de los centros melanomacrófagos (CMM), cambios degenerativos de núcleo (flecha). Tinción con Hematoxilina-Eosina, A (100X), B y C (400X), D (1000X).....	46
-Figura 20. Imágenes que muestran la organización histológica del riñón de <i>Ambystoma mexicanum</i> del grupo con tratamiento control sacrificados el 24 y 30 del experimento. Se señalan diferentes estructuras como: cápsula renal (Cap), corteza (C) medula (M), conducto mesonefrítico (CM). Tinción con Hematoxilina-Eosina (100X)...	47
-Figura 21. Detalle de la estructura histológica de los riñones de <i>Ambystoma mexicanum</i> del grupo con tratamiento control sacrificados el día 24 y 30 del experimento, (A) corpúsculo renal (Cr), glomérulo (G), capsula de Bowman (flecha), (B) túbulo contorneado proximal (Tcp), túbulo contorneado distal (Tcd), (C) Detalle de los túbulos contorneados proximal y distal, Intersticio renal (Ir), (D) arteriola (a). Tinción con Hematoxilina-Eosina, A, B y D (400X), C (1000X).....	48

-Figura 22. Detalle de la estructura histológica de los riñones de *Ambystoma mexicanum* del grupo con tratamiento experimental sacrificados el día 30 (A, B, C y D) y 24 (E y F) del experimento, (A) Dilatación de la cápsula de Bowman, (B) Degeneración de los túbulos contorneados proximales, dilatación del capilar glomerular (triángulo) y de la cápsula de Bowman, (C) depósitos proteicos dentro del espacio de Bowman (estrella), (D) degeneración de los túbulos contorneados, (círculo), tejido edematoso (e). (E y F) necrosis de los túbulos contorneados proximales. Se observan núcleos picnóticos (flecha negras). Tinción con Hematoxilina-Eosina, 400X.....49

-Figura 23. Estructura histológica de las branquias de *Ambystoma mexicanum* del grupo con tratamiento control sacrificados el día 24 y 30 del experimento. Filamentos principales (Fp), lamelas (L), arteria (flecha), músculo (m). Tinción con Hematoxilina-Eosina, 40X.....50

-Figura 24. Detalle de las branquias de *Ambystoma mexicanum* del grupo con tratamiento control sacrificados el día 24 y 30 del experimento. (A) Epitelio del filamento principal. (B) Lamelas. (C) Epitelio lamelar. (D) Arteriola en región apical de lamela. Célula pavimentosa (Cp), células de Leydig (CL), membrana basal (Mb), cromatóforos (Cr), lamela (L), capilares (Triángulo), célula ciliada (CC), célula en forma de pera (Cfp), arteriola (A). Tinción con Hematoxilina-Eosina, (C) contraste de fases, (A, C y D) 400X, (B) 100X.....51

-Figura 25. Detalle de las branquias de los individuos del grupo con tratamiento experimental que fueron sacrificados el día 24 del bioensayo de toxicidad. (A) Hemorragias en lamelas. (B) Arteria del filamento principal. (C) Lamelas. (D) Sección transversal de lamelas. (E) cuerpos apoptóticos en lamelas. (F) infiltrado inflamatorio. Lamela (L), hemorragia (triángulo), hipertrofia de arteria (flecha negra), infiltrado inflamatorio perivascular (líneas punteadas) tejido edematoso (círculo), cuerpos apoptóticos (flecha blanca), linfocitos (estrella), eritrocitos (er), eosinófilos (eo). Tinción con Hematoxilina-Eosina, (A y B) 100X, (C y D) 400X, (E y F) 1000X.....52

Índice de tablas

-Tabla 1. Géneros más comunes de cianobacterias productoras de cianotoxinas (Bernad, 2014 y Wiegand & Pflugmacher 2005)..... 19

-Tabla 2. Matriz de muestras analizadas para la elaboración del ensayo de ELISA, Control negativo (CN), Extracto crudo (EC), soluciones patrón 0.16, 0.60 Y 2.50 µg/l..29

-Tabla 3. Valores de parámetros físico-químicos obtenidos de la Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe en mayo del 2016, SP: Sin presencia. 36

1. RESUMEN

Ambystoma mexicanum es un anfibio de gran importancia cultural, médica y evolutiva, es una especie nativa de la zona lacustre de Xochimilco, sin embargo, sus poblaciones naturales se han reducido drásticamente debido a la contaminación de los canales con fertilizantes y aguas residuales provenientes de asentamientos urbanos irregulares e industrias que ocasionan eutrofización del agua y proliferación de cianobacterias que originan “blooms” o florecimientos cianobacterianos nocivos. Los florecimientos cianobacterianos nocivos generan problemas ecológicos y sanitarios debido a la presencia de cianotoxinas producidas por cianobacterias del género *Microcystis*, siendo la microcistina-LR la más comúnmente encontrada, por lo que se cree que la presencia de dicha toxina puede afectar a las poblaciones silvestres de *A. mexicanum* debido a la ingesta de organismos que bioacumulan la microcistina-LR. Para ello se tomaron varias muestras de un florecimiento cianobacteriano nocivo detectado en la Pista Olímpica de Remo y Canotaje “Virgilio Uribe”, Cuemanco, se realizó un análisis cuantitativo por el método de Utermöhl, se identificaron las especies de cianobacterias productoras de microcistina-LR, se cuantificó la concentración de microcistina-LR por los métodos de ELISA y HPLC y se realizó un ensayo de toxicidad subcrónica con larvas inmaduras de *A. mexicanum* de ocho meses de edad, administrándoles una dosis diaria de 20 µg de microcistina-LR por vía oral durante 30 días. A la vez se registró el peso y la talla de cada individuo durante todo el experimento. Al final del ensayo todos los individuos fueron sacrificados y algunos órganos como el hígado, riñones y branquias se procesaron por el método histológico convencional. Se observó que a pesar de no encontrarse efectos en el crecimiento de los individuos durante todo el experimento, se presentaron daños en los órganos que fueron analizados como necrosis severa en hepatocitos, túbulos contorneados y glomérulos, así como se evidenció la presencia de cuerpos apoptóticos en las células ciliadas de las lámelas, además el tracto digestivo de los individuos a los que se les administró la cianotoxina pudo haberse afectado debido a la mayor cantidad de moco encontrado en las excretas. Por otro lado, se observó infiltrado inflamatorio en los órganos analizados, lo que indica que la respuesta inmunológica cumple un papel importante en la desintoxicación de microcistina-LR.

Palabras clave: *Ajolote, eutrofización, cianotoxinas, cianobacterias, histología.*

2. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental es un problema que afecta a la humanidad (Peñaloza, 2015), desde su aparición, el hombre ha alterado los ecosistemas, pero a partir de la explosión industrial y urbana del siglo XIX este problema creció significativamente (Senent, 1973).

Varias actividades que tienen un efecto negativo hacia el ambiente como la sobreexplotación de los recursos naturales (Londoño, 2006), el crecimiento del sector agroindustrial y la generación de gases de efecto invernadero (CMM, 2007), aumentan cada vez más debido al crecimiento demográfico (Garza & Schteingart, 2010, INEGI, 2015) y a la expansión de la mancha urbana (INEGI, 2015).

Todos estos factores tienen como consecuencia la aceleración del cambio climático, la aparición de nuevas enfermedades, la fragmentación de los ecosistemas, la contaminación de suelos y cuerpos de agua y la pérdida de biodiversidad (SEMARNAT, 2007).

2.1. Biodiversidad en México

México es considerado uno de los 17 países megadiversos, ya que posee el 12 % de la biodiversidad mundial a pesar de solo contar con el 1.3 % del territorio continental global (SEMARNAT, 2007); esto se debe a varios factores como la confluencia de dos regiones biogeográficas como son la neártica y la neotropical, así como la topografía del país y la variedad de climas que se encuentran en él (SEMARNAT, 2011), la interacción de estos factores genera una gran variedad de microclimas, hecho que provoca una elevada cantidad de endemismos (CONABIO, 2000).

México es el cuarto país con mayor riqueza de anfibios en el mundo (SEMARNAT, 2007), contando con 376 especies reportadas hasta ahora, de las cuales el 50 % de estas son endémicas, lo que lo hace el tercer país con mayor endemismos de anfibios (Angulo *et al.*, 2006), desafortunadamente el 46 % de las especies se encuentra en algún estado de vulnerabilidad (Parra-Olea *et al.*, 2014).

2.2. Anfibios

Los anfibios son un grupo de vertebrados de gran importancia, ya que representan el eslabón entre la vida acuática y la terrestre (Servín, 2011). Con excepción de los polos, este grupo taxonómico se distribuye en todo el planeta (Vitt & Caldwell, 2014), y cumple un papel importante en los ecosistemas; ya que forman parte fundamental de las cadenas tróficas (Ortuño & Díaz, 2004).

La mayoría de los anfibios deben tener contacto constante con el agua debido a que tienen la piel delgada y permeable, lo que los hace vulnerables a los contaminantes diluidos en el agua, por lo que también son buenos bioindicadores (Parra-Olea *et al.*, 2014).

2.3. Extinción masiva de anfibios

La drástica disminución de las poblaciones de anfibios ha llamado la atención de la comunidad científica desde 1960. La Unión Mundial para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ha reportado que de las 5743 especies de anfibios que se han descrito en el mundo, el 32.3 % se encuentran globalmente amenazadas (Angulo *et al.*, 2006).

La disminución de las poblaciones de anfibios se debe directa e indirectamente a las actividades antropogénicas (Contreras *et al.*, 2009). Algunos factores como el aumento de la radiación ultravioleta (Marco, 2003), el cambio climático (Collins & Storfer, 2003) y la transmisión de enfermedades (Bosch, 2003) han contribuido a dicha disminución, pero las causas que ejercen mayor impacto son la introducción de especies invasoras (Zambrano *et al.*, 2003), la pérdida del hábitat natural y la contaminación de los cuerpos de agua (Marco, 2002, Marco, 2003), tal como ocurre con *Ambystoma mexicanum*, el ajolote de Xochimilco.

2.4. *Ambystoma mexicanum* (Shaw and Nodder, 1798)

Ambystoma mexicanum es un anfibio endémico del valle de México. Las primeras descripciones científicas acerca de esta especie se realizaron en 1615, aunque anteriormente ya se había descrito su importancia para las civilizaciones prehispánicas en el libro "*Historia general de las cosas de la Nueva España*" (Casas, 2004), pero no fue sino hasta 1865 cuando Georges Cuvier lo clasificó en el grupo de las salamandras (Maya 2002).

A. mexicanum pertenece al orden *Caudata*, dentro de la familia *Ambistomatidae*, que posee 32 especies que se distribuyen exclusivamente en Norteamérica (Servin, 2011). En México se encuentran 18 especies, 16 son endémicas y su distribución geográfica se concentra en la región central del país (Aguilar *et al.*, 2009).

2.5. Morfología externa

Su cabeza es aplanada dorsoventralmente y muy ancha con relación al resto de su cuerpo, posee 3 pares de branquias externas ramificadas a los laterales de la cabeza, ojos rudimentarios y sin párpados, su cuerpo es alargado con surcos laterales, cola aplanada lateralmente con una aleta dorsal que empieza desde la base de la cabeza hasta la punta

de la cola y continua por la parte ventral hasta la cloaca, cuatro extremidades cortas, las torácicas con 4 dedos y las abdominales con 5, su coloración es normalmente oscura con manchas más claras, aunque varia mucho, puede llegar a medir 30 cm y vivir 20 años en cautiverio (Figura 1) (Servín, 2011, Maya, 2002, Aguilar & Casas, 2005, CONABIO, 2011).

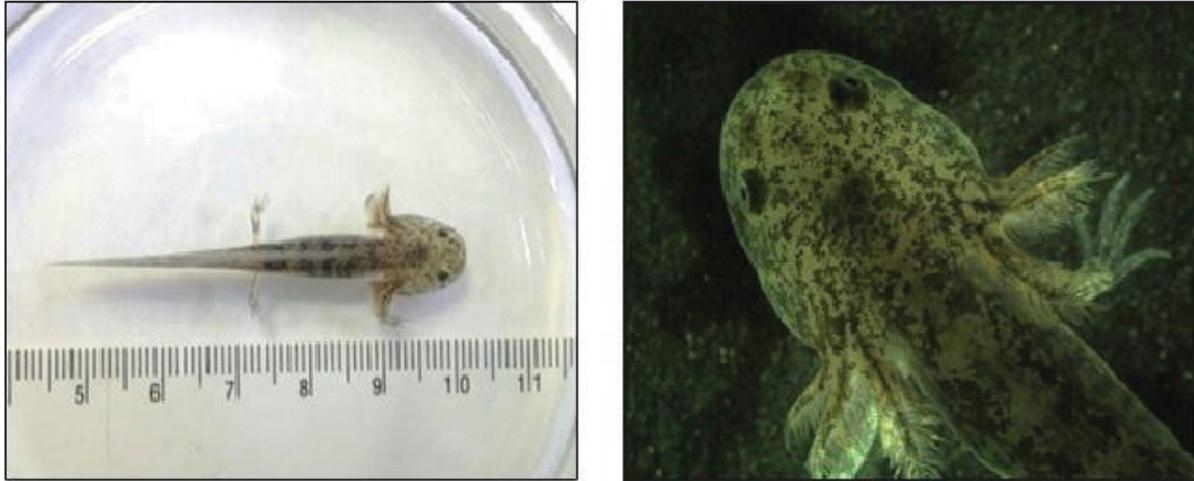


Figura 1. *Ambystoma mexicanum* en etapa de larva temprana.

A. mexicanum posee la particularidad de ser un organismo neoténico (López & Lira, 2001), que consiste en la conservación de características larvianas aun después alcanzar la maduración sexual, varios autores consideran a *A. mexicanum* como neoténica facultativa (Molina, 2009), debido a que su glándula tiroides no sintetiza hormona tiroxina T3, que es la encargada de llevar a cabo los cambios morfofisiológicos durante la metamorfosis, pero bajo condiciones de laboratorio pueden inducirse estos cambios (Dermican *et al.*, 2016, Servin, 2011).

2.6. Ciclo de vida

La temporada de reproducción de las poblaciones silvestres de *A. mexicanum* comienza desde noviembre hasta abril, debido a que la temperatura y la incidencia de luz disminuyen (Zambrano *et al.*, 2003). Cuando la longitud de los individuos es mayor de 12 cm y/o alcanzan el año de edad, se les considera larva madura (Maya, 2002), en esta etapa se producen cambios en la diferenciación sexual, los machos presentan un abultamiento en la zona cloacal debido al crecimiento de las glándulas cloacales y las hembras presentan una mayor complejidad corporal debido al incremento del tamaño de los ovarios (González & Servín, 2014).

Su reproducción consiste en un ritual de apareamiento regulado por señalizaciones hormonales, el macho deposita un espermatozoido en el sustrato y guía a la hembra para que pueda introducirlo en su cloaca. La ovoposición tarda de 24 a 48 horas; pueden depositar más de 600 huevos (Estrada, 2015) y el tiempo de eclosión en promedio es de 20 días (Servín, 2011). Los organismos recién eclosionados se les considera larva temprana, en esta etapa los individuos no poseen extremidades, pero gradualmente se van desarrollando. Después de alcanzar 5.9 cm aproximadamente y/o superar los 4 meses de edad se les considera larva inmadura (Maya, 2002).

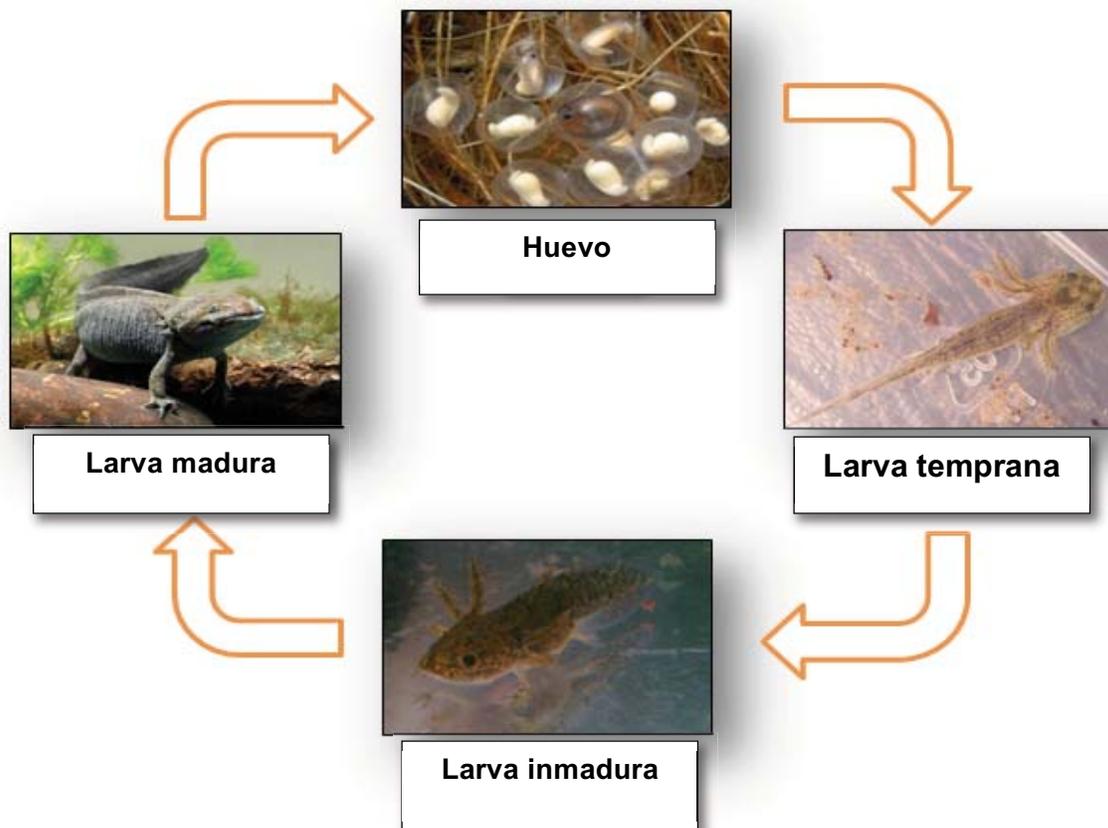


Figura 2. Ciclo de vida de *Ambystoma mexicanum*.

2.7. Distribución geográfica

Durante el siglo XVI, *A. mexicanum* se distribuía en todo el complejo lagunar del valle de México que comprendían los lagos de Texcoco, Zumpango, Xaltocan, Chalco y Xochimilco, pero actualmente su distribución se ha restringido a los canales remanentes de la zona lacustre de Xochimilco y algunas partes de Chalco (Zambrano *et al.*, 2003, Molina, 2009 y CONABIO, 2011).

En 1998 se reportó que la densidad de *A. mexicanum* era de 6 individuos por Km², para el año 2002 su densidad disminuyó hasta 1 individuo por km² (Zambrano *et al.*, 2003), además se encontró que *A. mexicanum* no se distribuye por toda la zona lacustre de manera homogénea, sino que su distribución se ve influenciada por el uso de suelo, siendo la zona chinampera y los pocos manantiales que quedan de su preferencia (Contreras *et al.*, 2009).

2.8. Xochimilco

La zona lacustre de Xochimilco se localiza en la región centro-oriental del Eje Neovolcánico Transversal, sobre la Altiplanicie Mexicana, rodeada de varias cadenas montañosas; con altitudes que van de 2240-2750 msnm (Serra, 1994). Forma parte de la cuenca de México que es de tipo endorreica debido a que no existe una conexión con el mar. La precipitación anual de la región es de 1343.7 mm y la temperatura media anual es de 9.4 °C, por lo que el tipo de clima predominante es C(E)(w2) que corresponde a un clima templado subhúmedo con lluvias en verano (Figueroa *et al.*, 2014).

En la actualidad, la zona lacustre de Xochimilco es una red compleja de canales, lagos pequeños y humedales temporales que abarcan una longitud total de 203 km, cubriendo un área de 42,232 hectáreas y atraviesa las delegaciones de Milpa Alta, Tláhuac, Xochimilco, Tlalpan, Coyoacán e Iztapalapa (Figueroa *et al.*, 2014).

En 1986 se estableció la zona lacustre de Xochimilco como patrimonio natural y cultural de la humanidad por la UNESCO por ser un reservorio para una gran diversidad biológica acuática, subacuática, halófito y terrestre (SMA. GDF, 2012). En 1992 se destinaron 2657 hectáreas para establecer el Área Natural protegida: Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco, debido a que de las 139 especies encontradas en la región, 5 especies son endémicas y 9 especies se encuentran enlistadas dentro de alguna categoría de protección de acuerdo con la NOM-059-SEMARNAT-2010, incluyendo a *A. mexicanum* (SEMARNAT, 2010).

En 2004 se estableció la zona lacustre de Xochimilco como uno de los 37 humedales de importancia estratégica mundial por la convención RAMSAR debido a los servicios ambientales que puede proveer (Figuroa *et al.*, 2014) y es considerada una zona de gran importancia turística y cultural ya que aquí se encuentran las famosas “chinampas” que son una forma de cultivo tradicional de la región (Chávez-López *et al.*, 2011).

2.9. Deterioro de Xochimilco

Durante la época prehispánica las civilizaciones que vivían en la zona lacustre de Xochimilco aprovechaban los recursos hídricos (Chávez-López *et al.*, 2011), sin embargo, era poco el impacto negativo ocasionado hacia el ecosistema; no fue sino hasta inicios del siglo XX cuando comenzaron a extraerse grandes cantidades de agua de los mantos acuíferos de Xochimilco para mantener el suministro de agua de la creciente Ciudad de México (Banister & Widdifield, 2014).

Debido a que varios canales comenzaron a desecarse, se construyeron plantas de tratamiento de aguas residuales como el del Cerro de la Estrella y otras zonas aledañas para alimentar los canales artificialmente con agua tratada, pero debido a la aparición de varios asentamientos irregulares dentro del Área Natural Protegida, se depositaron directamente grandes cantidades de aguas negras a los canales (Figuroa *et al.*, 2014). Aunado a esto, el abandono y sustitución de las chinampas por métodos de cultivo modernos ocasionaron la eutrofización de varios canales (Moreno *et al.*, 2010).

2.10. Eutrofización

La eutrofización es un fenómeno que consiste en el deterioro de la apariencia y calidad del agua debido a la sobrecarga de nutrientes disueltos en el cuerpo de agua (Ledesma *et al.*, 2013). Este proceso puede ocurrir de forma natural, pero cuando la actividad humana influye en su aparición, se le conoce como eutrofización antropogénica (Chapa & Guerrero, 2001). Este fenómeno es muy común en lagos artificiales y en cuerpos de agua cercanos a ciudades (Pineda-Mendoza *et al.*, 2011) y es causado principalmente por el uso excesivo de fertilizantes que son arrastrados hacia el cuerpo de agua por medio de la lluvia, así como el proceso de erosión y el vertido de efluentes industriales y domésticas (CICEANA, 2004).

Debido a la acumulación de nutrientes como amonio (NH_4^+), nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-), fosfatos (PO_4^{3-}) y materia orgánica algunos organismos oportunistas se desarrollan de forma descontrolada (Ledesma *et al.*, 2013). Varias especies de plantas acuáticas y organismos que componen el fitoplancton tales como clorofíceas, diatomeas y las cianobacterias tienden a proliferar, pero las cianobacterias poseen mayor relevancia, ya

que pueden originar “blooms” o florecimientos cianobacterianos nocivos (Sabour *et al.*, 2005).

2.11. Cianobacterias

Las cianobacterias son organismos procariotas del reino monera, que aparecieron hace 3500 millones de años. Crecen en ambientes marinos, dulceacuícolas y terrestres, y su distribución es cosmopolita (Cronberg & Annadotter, 2006; Bonilla, 2009; Bernard, 2014).

Las cianobacterias son organismos fotosintéticos debido a la presencia de clorofila-a, además también poseen la capacidad de producir varios pigmentos accesorios como carotenoides, ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina (Seañez, 2011), esta gama de pigmentos les permite captar la luz más eficientemente (500-600 nm), por lo que las cianobacterias pueden desarrollarse bajo la sombra del resto del fitoplancton (Arzate, 2008).

Los florecimientos cianobacterianos nocivos ocurren más comúnmente en verano debido a que la luz y la temperatura aumentan, gracias a ello las cianobacterias se ven favorecidas en el crecimiento; ya que la tasa máxima de crecimiento de estos organismos se alcanza a los 25 °C lo cual es mayor que las del resto del fitoplancton (Sabour *et al.*, 2005).

Cuando comienza el otoño y la temperatura baja, algunos géneros como *Microcystis* se sedimentan en el fondo de la columna de agua, pero debido a su forma de crecimiento; muchas células del interior de las colonias quedan protegidas y pueden mantenerse latentes hasta que las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables (Lago *et al.*, 2015), además muchas otras especies pueden generar acinetos, que son estructuras de resistencia que protegen al organismo cuando las condiciones ambientales no son favorables (Arzate, 2008).

2.12. Consecuencias de los florecimientos cianobacterianos nocivos

Uno de los problemas que ocasionan los florecimientos cianobacterianos nocivos es la alteración de la composición de la comunidad planctónica, ya que generalmente predomina una o dos especies de cianobacterias, desplazando a las demás poblaciones que conforman el fitoplancton y ocasionando su reducción (Barreiro & Vasconcelos, 2014), aunado a esto; se ha reportado que varias especies de copépodos, cladóceros y rotíferos evitan consumir a las cianobacterias, desapareciendo al no contar con alimento, por lo que también se ven alteradas las cadenas tróficas (Chapa & Guerrero, 2001, Zamora *et al.*, 2014, Olvera-Ramírez *et al.*, 2010).

Otro problema es la aparición de mortandades masivas de peces, debido a cambios bruscos en la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del día; ya que en la noche la tasa de respiración de las cianobacterias es superior a la tasa de producción de oxígeno, generándose condiciones de anoxia (Mancera y Vidal, 1994), además la falta de oxígeno provoca la proliferación de bacterias anaerobias que producen ácido sulfhídrico, tóxico para otros organismos (Chapa & Guerrero, 2001).

Otro problema que ocasionan los florecimientos cianobacterianos nocivos es la contaminación del agua con cianotoxinas que son producidas por varias taxa; causando problemas sanitarios, ambientales, sociales y económicos considerables (Codd, 2000).

2.13. Cianotoxinas

Las cianotoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos por varios géneros de cianobacterias (Tabla 1). Estas toxinas presentan una gran diversidad química y sus efectos tóxicos son muy variables (Seañez, 2011).

2.14. Clasificación de cianotoxinas

Las cianotoxinas se clasifican químicamente en péptidos cíclicos como las microcistinas y las nodularinas, alcaloides como las saxitoxinas, anatoxinas y cilindropermopsinas y en lipopolisacáridos (Wiegand, & Pflugmacher, 2005), también se clasifican con base en sus efectos fisiológicos en: neurotoxinas, dermatotoxinas, citotoxinas y hepatotoxinas (Seañez, 2011).

Las neurotoxinas, están conformadas por saxitoxinas y anatoxinas, se ha reportado que las saxitoxinas pueden bloquear los canales de sodio de las células nerviosas, inhibiendo la despolarización axonal; lo que conduce a la parálisis de los músculos y a la muerte por paro respiratorio en mamíferos (Wiegand & Pflugmacher, 2005; Ledreux *et al.*, 2010).

En cambio, Bernard en 2014 menciona que la muerte provocada por paro respiratorio en mamíferos que consumieron anatoxinas; se debe a la inhibición de la acetilcolinesterasa; lo cual concuerda con el reporte de Gugger y colaboradores en 2005 en el que asocian la muerte de dos perros envenenados en Francia con el consumo de agua contaminada con anatoxina-a que fue producida por *Phormidium favosum*.

Dentro de las citotoxinas solo se encuentran las cilindropermopsinas, estas toxinas presentan una toxicidad no específica y se ha reportado que en ratones causan daño en las células de hígado, riñón, timo y corazón; además, también se asocian con posibles efectos mutagénicos, (Wiegand & Pflugmacher, 2005 y Bernard, 2014). Para esta toxina no se conoce con detalle su mecanismo de acción (Guzmán-Gillén *et al.*, 2014).

Las dermatotoxinas, están conformadas por lipopolisacáridos que se encuentran en todas las especies de cianobacterias, ya que forman parte de la membrana externa de la célula cianobacteriana. El contacto con lipopolisacáridos provenientes de cianobacterias puede provocar irritación en los ojos, piel, fiebre y problemas gastrointestinales, además se han reportado posibles efectos sinérgicos con hepatotoxinas (Wiegand y Pflugmacher, 2005 y Seañez, 2011).

Tabla 1. Géneros más comunes de cianobacterias productoras de cianotoxinas (Bernad, 2014 y Wiegand & Pflugmacher 2005)

Toxina	Géneros
Microcistinas	<i>Microcystis, Dolichospermum, Anabaenopsis, Annamia, Aphanizomenon, Artrospira, Calothrix, Fischerella, Geitlerinema, Gomphosphaeria, Hapalosiphon, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Merismopedia, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium, Planktothrix, Plectonema, Pseudanabaena, Radiocystis, Spirulina, Synechococcus, Woronichinia</i>
Anatoxinas	<i>Dolichospermum, Anabaenopsis, Aphanizomenon, Cyndrospermum, Hydrocoelum, Lyngbya, Oscillatoria, Microcystis, Phormidium, Raphidiopsis, Woronichinia, Planktothrix</i>
Anatoxina-a(s)	<i>Dolichospermum</i>
Saxitoxinas	<i>Dolichospermum, Aphanizomenon, Cyndrospermopsis, Lyngbya, Oscillatoria, Raphidiopsis, Umezakia</i>
Nodularinas	<i>Nodularia</i>
Cilindropermopsinas	<i>Cyndrospermopsis, Aphanizomenon, Lyngbya, Oscillatoria, Raphidiopsis, Umezakia</i>
Lipopolisacaridos	Todos los géneros

Las hepatotoxinas afectan al hígado principalmente (Wiegand y Pflugmacher, 2005), además son potentes promotores de tumores hepáticos (Žegura *et al.*, 2003). Dentro de las hepatotoxinas se encuentran las nodularinas y las microcistinas, de las cuales las microcistinas son las más ampliamente estudiadas debido a que son muy comunes en la naturaleza (Bernad, 2014, Roset *et al.*, 2001, Wiegand & Pflugmacher, 2005).

2.15. Microcistinas

Las microcistinas son una familia de heptapéptidos cíclicos muy estables (Moreno *et al.*, 2003). Generalmente están compuestos de tres D-aminoácidos (D-Alanina, Metil D-Ácido aspártico y D-ácido glutámico), dos aminoácidos inusuales como Mdha (N-metildeshidroalanina) y Adda (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico) y dos L-aminoácidos en los sitios 2 y 4 que varían en la posición X y Z de acuerdo con el tipo de microcistina, como por ejemplo la microcistina-LR (Figura 3) que posee leucina y arginina (Seañez, 2011).

Debido a la gran variedad de cambios en la estructura química de la molécula, se han reconocido actualmente más de 100 variantes esta toxina (Puddick *et al.*, 2014), siendo la microcistina-LR la más conocida, debido a su alta toxicidad (Moreno *et al.*, 2003, Wiegand & Pflugmacher, 2005).

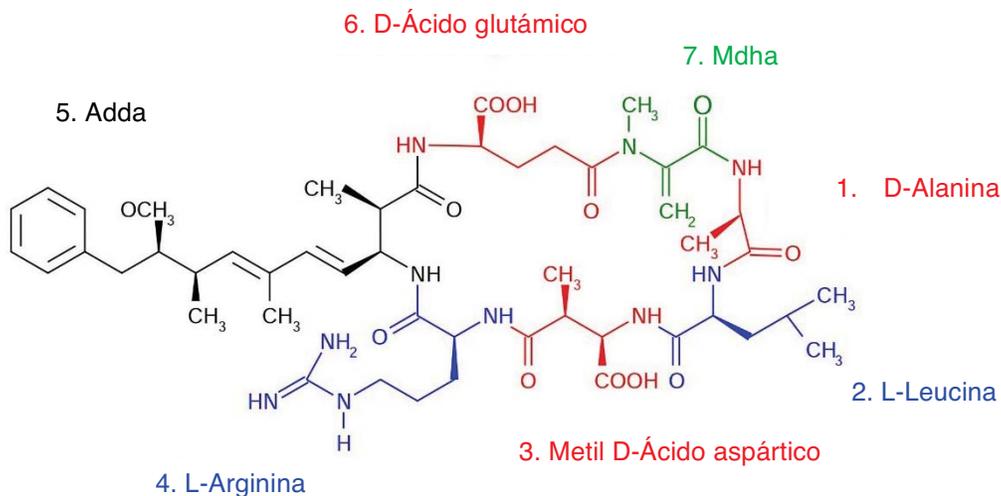


Figura 3. Estructura química de microcistina LR (Wiegand y Pflugmacher, 2005).

2.16. Estabilidad y remoción de la microcistina-LR

Debido a su estructura cíclica, la microcistina-LR es una molécula resistente a la hidrólisis enzimática, soporta temperaturas de hasta 300°C, pH muy ácido o muy alcalino y no puede ser degradada por oxidantes comunes (Seañez, 2011).

Para la remoción adecuada de microcistina-LR del agua se utilizan técnicas como coagulación, flotación por aire disuelto, filtración con membrana, ósmosis inversa y el uso de técnicas de oxidación avanzadas como la ozonificación, fotólisis con rayos UV, Sonólisis, reacción de Fenton y fotocátalisis con dióxido de titanio (Pinho *et al.*, 2015, Rositano, 2001), pero debido a su alto costo, no se han podido implementar estas técnicas en varias plantas de tratamiento en el mundo (Hoeger *et al.*, 2005).

2.17. Toxicidad de microcistina-LR

En general la microcistina-LR tiene la capacidad de inhibir específicamente las fosfoproteínas fosfatasas PP1 y PP2A de organismos eucariotas debido a que el residuo Adda y el grupo metilo del residuo Mdha forma enlaces covalentes con residuos de cisteína de estas enzimas, evitando que el sitio activo y el sustrato puedan interactuar (Pereira *et al.*, 2013).

Se han estudiado estos efectos en microalgas (Barreiro & Vasconcelos, 2014), plantas (Saqrane *et al.*, 2007), e invertebrados (Galanti *et al.*, 2013), pero la gran mayoría de los estudios se enfocan en los vertebrados (Zhao *et al.*, 2008, Prieto *et al.*, 2008).

En vertebrados, la microcistina-LR pasa a través del torrente sanguíneo por medio de los ácidos biliares, causan necrosis en células del hígado, los riñones, las branquias, los pulmones y el tracto digestivo (Prieto *et al.*, 2008), además, también se ha demostrado que pueden afectar a órganos reproductores (Chen *et al.*, 2016).

Las enzimas PP1 y PP2A regulan y controlan varias funciones de la célula, como el ciclo celular y el mantenimiento de la arquitectura celular (Mezhoud *et al.*, 2008); mediante reacciones de desfosforilación (Hernández, 2012). Por lo que al inhibir la función de PP1 y PP2A se rompe el equilibrio de fosforilación/desfosforilación crucial para el metabolismo celular (Wiegand & Pflugmacher, 2005), causando necrosis de los tejidos, hemorragias internas y el organismo muere a causa de un choque hipovolémico (Prieto *et al.*, 2008), aunado a esto, se ha demostrado que la microcistina-LR puede causar estrés oxidante (Bruzuzan *et al.*, 2009).

Anteriormente se han reportado casos de intoxicación por microcistina-LR en humanos. En 1996 ocurrió un incidente dentro de una clínica de hemodiálisis en Brasil, en la cual más de 50 personas murieron debido a una exposición aguda a través de agua contaminada con microcistina-LR (Fernandes, 2011), por lo cual, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció un valor guía de microcistina-LR en el agua potable de 1 µg/L y 10 µg/L para el agua de recreación (OMS, 2006). Sin embargo; en varios lagos de la cuenca de México se han detectado concentraciones muy por encima de estos valores (Seañez,

2011, Vasconcelos *et al.*, 2010), por lo que los organismos que se desarrollan en la zona lacustre de Xochimilco incluyendo a *A. mexicanum* y la población humana que realiza actividades recreativas cercanas a los canales podrían estar expuestos a altas concentraciones de microcistina-LR (Backer *et al.*, 2010).

Dentro de los ecosistemas acuáticos la vía de exposición a microcistina-LR puede ser por inmersión o por vía oral, siendo esta última la más destacada debido a que es una forma en la que esta cianotoxina puede llegar a concentrarse (Qiao *et al.*, 2013). Barreiro y Vasconcelos en 2014 mencionan que cuando se presenta un florecimiento cianobacteriano nocivo se altera la composición zooplanctónica debido a que algunas especies evitan consumir cianobacterias, llegando a desaparecer, sin embargo hay especies que pueden tolerar concentraciones moderadas de microcistina-LR, pudiéndose alimentar de las células cianobacterianas que la producen (Zamora *et al.*, 2014, Nogueira *et al.*, 2006, Prieto *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2016), acumulándose considerables concentraciones de microcistina-LR dentro de los individuos y transferirse de un estado trófico a otro al ser consumidos por depredadores (Sabatini *et al.*, 2011, Osswald *et al.*, 2008, Galanti *et al.*, 2013).

Este fenómeno se observó en estudios realizados por Papadimitriou y colaboradores en 2012, en el que detectaron concentraciones de hasta 152 µgMC-LReq/g en peso seco de muestras de zooplancton recolectadas del lago Pamvótida, Grecia, además también determinaron concentraciones de hasta 581.46 ngMC-LReq/g en hígados de la rana endémica (*Rana epirotica*), por lo que durante un florecimiento cianobacteriano nocivo es posible que las especies acuáticas ingieran considerables concentraciones de microcistina-LR.

3. ANTECEDENTES

Se han elaborado varios trabajos en algunos vertebrados, como el realizado por Li y colaboradores en 2013, en el que encontraron que en la carpa (*Carassius auratus*); una dosis de 200 µg/Kg de microcistina-LR, administrado por vía intraperitoneal ocasionó severos cambios estructurales renales, como la dilatación de la cápsula de Bowman, degeneración de los procesos podocitarios, pérdida de la membrana basal glomerular, y proliferación de células mesangiales en el corpúsculo renal y en cuanto a los túbulos contorneados proximales se observaron varias células con proliferación de lisosomas, degeneración hidrópica de las mitocondrias, núcleos picnóticos, vacuolización citoplasmática y necrosis de las células epiteliales de los túbulos, ocasionando la muerte de los individuos en 60 horas.

Por otra parte, Hou y colaboradores en 2015, reportaron que en el pez cebra (*Danio rerio*) la administración de 200 µg/Kg de microcistina-LR por vía intraperitoneal ocasionaron graves hemorragias hepáticas, vacuolización hepática grave y degeneración de los hepatocitos, además se observó una disminución significativa de la concentración de catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, debido a la inhibición de la transcripción de estas enzimas, también encontraron una disminución significativa de glutatión, lo cual sugiere que esta molécula desempeña un papel crucial en la respuesta antioxidante y en la desintoxicación de microcistina-LR.

Así mismo, Molina y colaboradores en 2005 encontraron que en la tilapia (*Oreochromis niloticus*), la administración oral diaria durante 21 días de 60 µg de microcistina-LR proveniente de cianobacterias liofilizadas, ocasionaron alteraciones estructurales de la arquitectura hepática, así como la aparición de núcleos picnóticos, vacuolización citoplasmática y contracción del acino pancreático. En cuanto al riñón se observó la dilatación de la cápsula de Bowman, nefrosis tóxica y además se observó precipitado basófilo en los túbulos contorneados.

En mamíferos Zhao y colaboradores en 2008 encontraron que la administración por vía intraperitoneal de 12.5 µgMC-LR/Kg en conejos, aumentó significativamente la actividad de superóxido dismutasa y provocó mayor peroxidación lipídica en el hígado, también se observó degeneración hidrópica de las mitocondrias, sin embargo, a partir de las 24 horas se presentó una recuperación del daño mitocondrial debido a que pudo haberse estimulado una respuesta compensatoria.

En cuanto a anfibios, Zhang y colaboradores en 2013, pudieron demostrar que la exposición subcrónica de 1 µg/l de microcistina-LR disuelta en el agua durante 14 días en *Rana nigromaculata* ocasionó peroxidación lipídica en el hígado, así como la expresión significativa de caspasas 3, 8 y 9, citocromo c y Bax que son proteínas

promotoras de apoptosis, también se observó una considerable disminución de la concentración de glutatión peroxidasa y glutatión.

A pesar de que se conocen los efectos de microcistina-LR en vertebrados, no hay suficientes trabajos realizados en anfibios, tomando en cuenta que la exposición a microcistina-LR podría influir en el declive de sus poblaciones (Zhang *et al.*, 2013).

4. JUSTIFICACIÓN

A. mexicanum es una especie con gran importancia cultural (Casas, 2004), médica (Seifert & Madem, 2014, González *et al.*, 2005, Carlson, 1982) y evolutiva (Hanken, 1999), pero debido a la drástica disminución de sus poblaciones, está catalogada como especie en peligro de extinción por la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010), y se encuentra en la categoría de especies críticamente amenazadas por la Unión Mundial para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2015).

La Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) y el Instituto Politécnico Nacional (IPN) han dedicado algunos de sus proyectos de investigación a generar información ecológica acerca de la zona lacustre de Xochimilco, que además, junto con la comunidad de la región se llevan a cabo diferentes planes de conservación de *A. mexicanum* (Figueroa *et al.*, 2014 y Zambrano, 2004).

Sin embargo, no se ha contemplado la problemática de la contaminación del agua con microcistina-LR, ya que se han reportado florecimientos cianobacterianos nocivos en varios lagos urbanos de la zona metropolitana del Valle de México, incluyendo algunos canales de Xochimilco (Arzate, 2008, Arzate *et al.*, 2010, Ortiz *et al.*, 2012 y Vasconcelos *et al.*, 2010), por lo que *A. mexicanum* y varias otras especies acuáticas podrían estar expuestas a la microcistina-LR.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos histopatológicos producidos en hígado, riñón y branquias de *Ambystoma mexicanum* después de la administración subcrónica por vía oral de microcistina-LR proveniente de un florecimiento cianobacteriano nocivo de Xochimilco detectado en mayo del 2016.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la composición y abundancia de cianobacterias productoras de cianotoxinas que conforman el florecimiento cianobacteriano nocivo durante mayo del 2016.
- Describir la relación que tienen algunas características físico-químicas del agua como temperatura, pH, alcalinidad, dureza total, oxígeno disuelto, concentración de fosfatos y concentración de nitratos con la aparición del florecimiento cianobacteriano nocivo.
- Determinar la concentración de microcistina-LR de extractos elaborados a partir del florecimiento cianobacteriano nocivo mediante técnicas de ELISA y HPLC.
- Determinar si la exposición subcrónica de microcistina-LR durante 30 días puede afectar el crecimiento de *A. mexicanum* en etapa de larva inmadura.
- Describir los efectos de la dosificación subcrónica de microcistina-LR en hígado, riñón y branquias de *A. mexicanum* en etapa de larva inmadura mediante el uso de la histología.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Área de estudio

El sitio de estudio se localizó en la Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe, situada en paralelo al canal de Cuemanco, dentro de la zona lacustre de Xochimilco. Se localiza entre las coordenadas 19°17'06" latitud norte y 99°06'08" longitud oeste, con una altitud de 2239 msnm, tiene una superficie de 600,000 m², posee una longitud de 2200 m de largo, 125 m de ancho y 2 m de profundidad. Sistema que recibe aguas tratadas y pluviales (FMC, 2016).

Su construcción se realizó entre enero de 1967 y julio de 1968 con el objetivo de recibir a deportistas del mundo para las olimpiadas de México en 1968. Actualmente se realizan actividades deportivas como competencias de remo o canotaje y caminata (FMC, 2016).

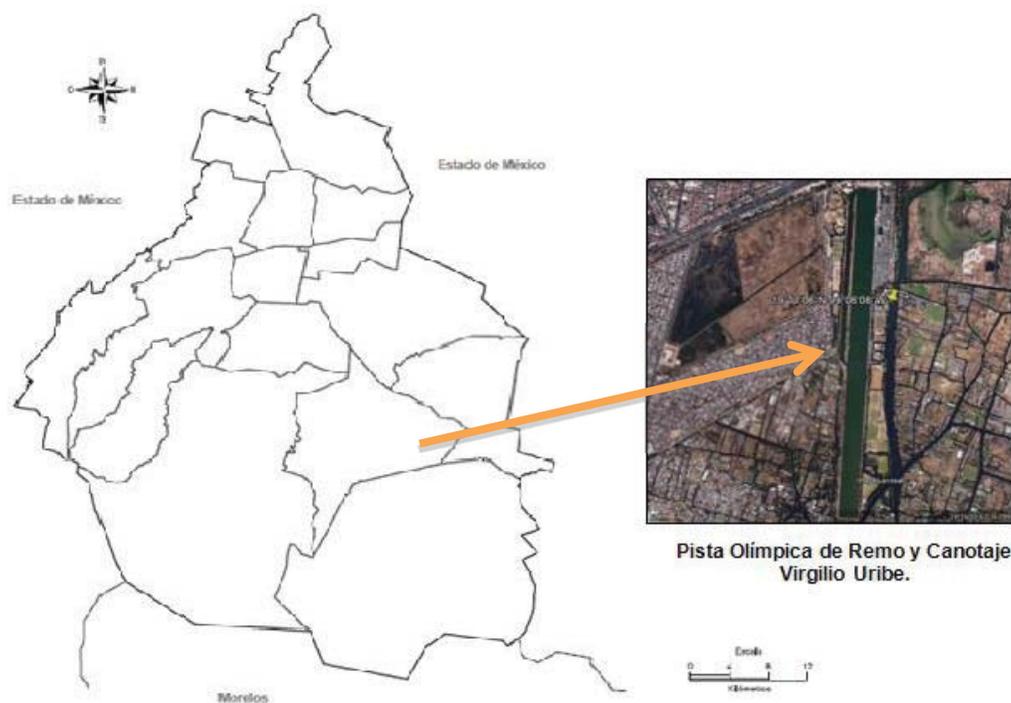


Figura 4. Área de estudio (Fotografía tomada con Google Earth; mapa de la Ciudad de México tomada de INEGI, 2016).

7.2. Muestreo y colecta de muestras biológicas cianobacterianas.

El material biológico se colectó a partir de un florecimiento en mayo del 2016. La muestra se colectó filtrando 40 litros de agua con una red de fitoplancton de 20 μm de apertura de malla, hasta reunir cerca de cuatro litros (Bonilla, 2009).

También se colectaron 500 ml de muestra directa, de la cual, la mitad se conservó con una solución de acetolugol 1% para elaborar el análisis cuantitativo, la otra mitad se utilizó para realizar observaciones *in vivo*, elaborar el análisis cualitativo y cuantificar microcistinas (Chorus & Bartram, 1999 y Bonilla, 2009).

El material biológico filtrado se transportó al laboratorio. La muestra *in vivo* se mantuvo a 4°C hasta su uso, la muestra conservada en la solución de acetolugol 1% se mantuvo a temperatura ambiente y en oscuridad para evitar su degradación y el material filtrado colectado se congeló a -20°C y posteriormente se liofilizó con ayuda de un liofilizador marca LABCONCO modelo FREEZONE 4.5, las cianobacterias liofilizadas se pesaron con ayuda de una balanza analítica y se almacenaron a -20°C hasta su uso (Chorus & Bartram, 1999).



Figura 5. Vista general de la Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe.

7.3. Determinación de variables fisicoquímicas

Por otro lado, se midieron algunos parámetros *in situ* del agua como la temperatura, pH con ayuda de un potenciómetro marca CONDUCTRONIC, modelo pH10, alcalinidad, dureza total y oxígeno disuelto a través de técnicas titulométricas (Gama *et al.*, 2010). Paralelamente para la concentración de fosfatos y nitratos se usó la técnica de molibdovanadato y reducción de cadmio respectivamente con ayuda de un fotómetro marca Hanna, modelo HI 83200.

7.4. Análisis cualitativo y cuantitativo del fitoplancton.

Los análisis cualitativos y cuantitativos se realizaron con el apoyo de la M. en C. Gloria Garduño Solórzano del Herbario de la FES-Iztacala. Se observó la muestra *in vivo* de cianobacterias en un microscopio marca Leica, modelo DM500 y se identificaron las especies de cianobacterias según las claves de Cronberg y Annadotter (2006), con base en el tamaño de las células, el tipo de mucilago que presentan usando azul de cresil y la forma de la colonia, además se tomaron micrografías de las especies encontradas con una cámara marca Leica modelo ICC50 (Seañez, 2011).

Para el análisis cuantitativo se elaboró una dilución 1:10 con la muestra conservada en la solución de acetolugol 1%, se colocaron 10 ml de esta dentro de una cámara de Utermöhl y se dejó reposar durante 24 horas para sedimentar la muestra uniformemente, posteriormente se observó con ayuda de un microscopio invertido marca Motic con un objetivo de 40X (Wetzel & Likens, 2000, Cortes, 1998), y se determinó el número de células por mililitro con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{no. de células}}{\text{ml}} = \frac{C \times A_t}{A_f \times F \times V}$$

Dónde:

C= Número de organismos contados

A_t= Área total del fondo de la cámara (mm²)

A_f= Área de un campo (mm²)

F= Número de campos contados

V= Volumen de la muestra sedimentada (ml)

Se contó un mínimo de 400 células de cada especie dentro de campos seleccionados aleatoriamente para que el grado de error fuera <10% (Wetzel & Likens, 2000).

7.5. Cuantificación de microcistina-LR por el método inmunológico de ELISA

Se elaboró un extracto crudo a partir de la muestra directa *in vivo* de cianobacterias, tomando una alícuota de 50 ml, congelándola a -20°C durante 2 días y descongelándola durante 1 día a temperatura ambiente, después la muestra se sonicó durante 10 minutos y se volvió a congelar a -20°C, este proceso se repitió 3 veces para asegurar la completa ruptura de las células (Chorus & Bartram, 1999), posteriormente el extracto crudo se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos, después se recuperó el

sobrenadante y se filtró con un filtro Milipore de 0.2 µm de poro (Chorus & Bartram, 1999).

Para la cuantificación de microcistinas se utilizó el kit QuantiPlate™ Kit for Microcystins de ENVIROLOGIX siguiendo las indicaciones:

El kit usado en este trabajo fue un ensayo de ELISA competitivo que consiste en la competencia de la microcistina-LR proveniente de una solución problema contra microcistina-LR conjugada con la enzima peroxidasa de rábano por unirse a una determinada cantidad de anticuerpos monoclonales anti-Adda (AD4G2) que se encuentran en los pozos para placas de ELISA.

1. Antes de realizar el ensayo se sacaron los reactivos y tiras con pozos reactivos del refrigerador y se aclimataron durante 30 minutos a temperatura ambiente.
2. Se utilizaron 2 tiras con 8 pozos sujetados en un bastidor para placas de ELISA y se diseñó un diagrama en el que se asignaron los pozos donde se colocarían las soluciones patrón, el control negativo y el extracto crudo (Tabla 2).

Tabla 2. Matriz de muestras analizadas para la elaboración del ensayo de ELISA, Control negativo (CN), Extracto crudo (EC), soluciones patrón 0.16, 0.60 Y 2.50 µg/l.

	1	2
A	CN	CN
B	0.16 µg/l	0.16 µg/l
C	0.60 µg/l	0.60µg/l
D	2.50 µg/l	2.50 µg/l
E	EC	EC

3. Se colocaron 125 µl de solución diluyente en cada pozo y 20 µl del control negativo, las soluciones patrón y el extracto crudo en sus respectivos pozos, después se cubrieron con Parafilm, se agitaron suavemente durante 30 segundos y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

4. Se colocaron 100 µl de la solución de microcistina conjugada con peroxidasa de rábano en cada pozo, se agitaron suavemente durante 30 segundos, se volvieron a cubrir en parafilm y se volvieron a incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Se vació el contenido de cada pozo y se lavo con la solución de lavado.
6. Se colocaron 100 µl de la solución sustrato de peroxido de hidrogeno a cada pozo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Se adicionaron 50 µl de solución stop en cada pozo para detener la reacción.
9. Se realizó la lectura de los pozos en un lector de ELISA, a una longitud de onda de 450 nm.
10. Se realizó el cálculo de %B0 utilizando la siguiente formula:

$$\%B0 = \frac{(\text{Promedio de Abs. calibrador o muestra} - \text{Promedio blanco}) * 100}{\text{Promedio control negativo}}$$

11. Se elaboró una curva patrón graficando en escala semilogarítmica %B0 de cada solución patrón contra la concentración, después se obtuvo la ecuación de la recta para calcular la concentración de microcistinas expresado en µg/L de microcistina equivalentes, debido a que este kit no distingue variantes de esta toxina.

7.6. Cuantificación de microcistina-LR por el método de HPLC

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es un método de separación muy utilizado para la detección y cuantificación de microcistina-LR, este método analítico se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) FES-Iztacala con el apoyo del M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla con un equipo Hewlett Packard series 1100 Automated Quaternary LC3D System con detector de arreglo de diodos a 238 nm. Se usó una columna Discovery C18, 250 X 4.6 mm; la fase móvil se mantuvo en un flujo constante de 1 ml/min. Se utilizó una solución de 10 µg/ml de Microcistina-LR de SIGMA-ALDRICH como patrón estándar (Moreno *et al.*, 2005).

La solución problema se preparó mezclando 100 mg de muestra liofilizada con 20 ml de metanol puro, después se sonicó con un ultrasonificador durante 10 minutos y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se tomó el sobrenadante y se utilizaron 20 µl del extracto para el análisis (Moreno *et al.*, 2005).

Se elaboró una corrida en gradiente, La composición de la fase móvil A fue acetato de amonio 10 mM, de la fase móvil B fue metanol absoluto y la fase móvil C fue acetonitrilo. La corrida inició con 93 % de la fase A y 2 % de la fase B durante los primeros 15 minutos, del minuto 15 al minuto 20 cambió a 60 % la fase A y 35 % la fase B y se mantuvo durante 6 minutos; después cambió del minuto 26 al minuto 30 a 93 % de la fase A y 2 % de la fase B y se mantuvo durante 2 minutos, en cuanto a la fase C se mantuvo constante en 5 %. El tiempo total de corrida fue de 32 minutos (Moreno *et al.*, 2005).

7.7. Obtención y mantenimiento de *Ambystoma mexicanum*

Se obtuvieron 14 individuos de la misma puesta, provenientes del ajolotario de la FES Iztacala, y se mantuvieron en contenedores de 4 litros con 2 individuos separados, se utilizó agua corriente declorada, con un valor de pH de 7.5-8, 110 mg/L de dureza total, 70 mg/L de alcalinidad, temperatura de 16-19°C, un fotoperiodo luz/oscuridad de 12 horas (Robles-Mendoza *et al.*, 2011 y Estrada, 2015) y fueron alimentados cada tercer día con 100 mg de alimento comercial Reptile Sticks de la marca Wardley, así como también se llevó a cabo el mantenimiento de los contenedores cada tercer día con un cambio total del agua (Figura 6).



Figura 6. Condiciones de mantenimiento de *A. Mexicanum* durante el bioensayo de toxicidad.

7.8. Elaboración de pellets para el bioensayo de toxicidad

Después de determinar la concentración de microcistina-LR del material liofilizado, se elaboraron pellets con 1g de cianobacterias liofilizadas, 1g de alimento comercial y 1 ml de una solución de 12 mg/ml de grenetina con agua miliQ y se mezcló hasta hacer una masa homogénea, después se cortaron pequeños pedazos de 25 mg y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para el tratamiento control se mezclaron 2g del alimento comercial con 1ml de la solución de 12 mg/ml de grenetina con agua miliQ. Los pellets de ambos tratamientos se mantuvieron a una temperatura de 4°C y antes de cada administración se aclimataron a temperatura ambiente.

7.9. Bioensayo de toxicidad subcrónica

Cuando los individuos cumplieron 47 semanas de edad se establecieron dos tratamientos con siete individuos seleccionados al azar en cada uno, un grupo control (C) en el que cada individuo fue alimentado diariamente con 100 mg de pellets sin cianobacterias y un grupo experimental (Ex) que fue alimentado con 100 mg de pellets elaborados con cianobacterias liofilizadas, conteniendo el equivalente a 20 µg de microcistina-LR (Hou *et al.*, 2015), el experimento duró 30 días.

A partir de una semana antes de iniciar el experimento y hasta el día 30 de este, se registró el peso y la talla de cada individuo para determinar posibles efectos en el desarrollo (Molina *et al.*, 2005). Los datos obtenidos a partir del registro de la talla y peso de cada individuo de los dos grupos se analizaron con una prueba de t-student para determinar alguna diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$) (Hou *et al.*, 2015).

7.10. Sacrificio, observación macroscópica y técnica histológica

Todos los individuos fueron anestesiados con eugenol y sacrificados por decapitación, se observó el hígado y branquias registrándose en fotografías las observaciones de los órganos de estudio para después hacer comparaciones entre los dos tratamientos (Hou *et al.*, 2015).

Posteriormente los órganos extraídos se conservaron en paraformaldehído al 4 % en PBS pH 7.2 y se procesaron por la técnica histológica por inclusión en parafina (Benítez & González, 2016). Se elaboraron secciones de 4-5 µm de grosor y se realizó la tinción de Hematoxilina y Eosina. Después los cortes se observaron en microscopio

óptico y se tomaron micrografías para describir y comparar los efectos que pudieran presentarse (Molina *et al.*, 2005).

8. RESULTADOS

8.1. Determinación taxonómica

En el florecimiento cianobacteriano detectado en mayo del 2016 en la Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe se identificaron a *Microcystis botrys*, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis flos-aquae* y *Microcystis panniformis* (Figura 7).

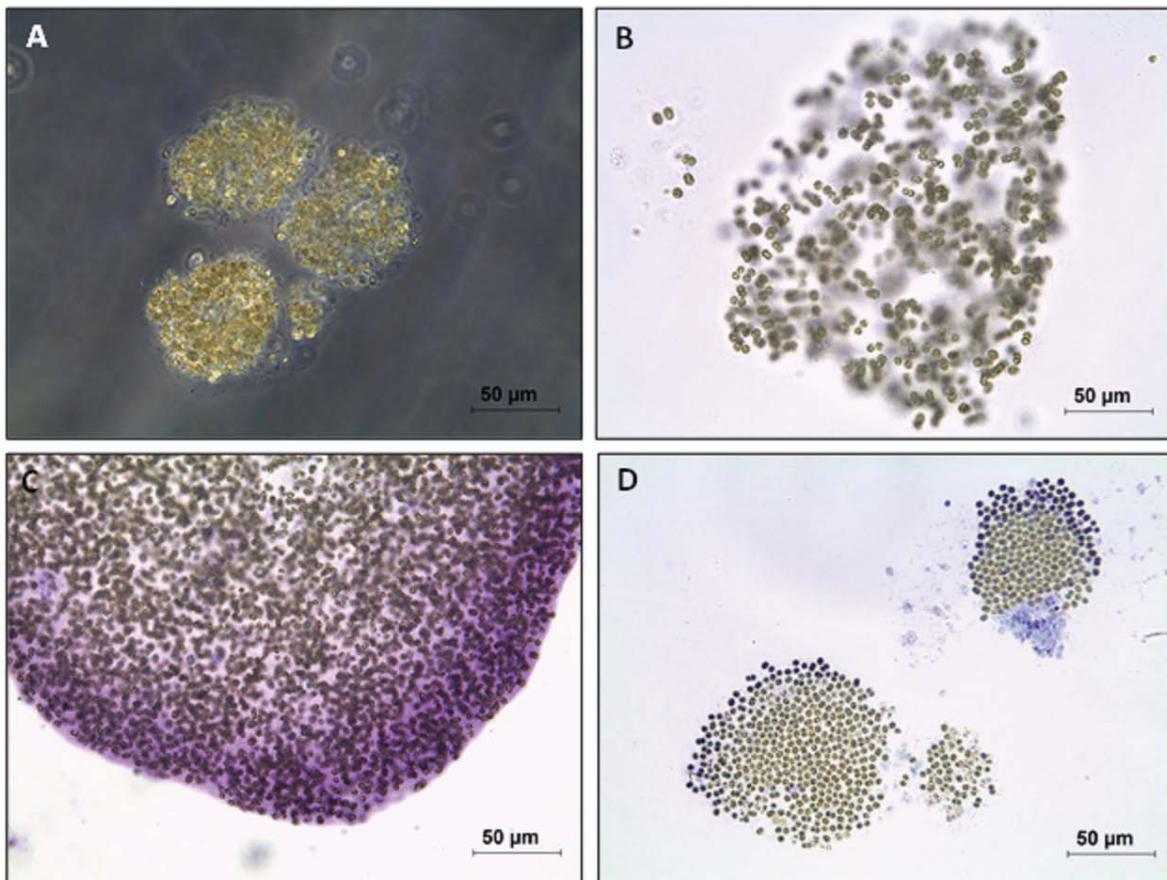


Figura 7. Especies de cianobacterias identificadas durante el florecimiento cianobacteriano nocivo detectado en la Pista Olímpica de remo y canotaje en mayo del 2016, A) *Microcystis botrys*, B) *Microcystis aeruginosa*, C) *Microcystis flos-aquae*, D) *Microcystis panniformis*, 400X.

***Microcystis botrys* Teiling 1942**

Colonias de forma más o menos esférica con irregularidades, células densamente empaquetadas en sub-colonias, el mucílago alrededor de las colonias es amplio, incoloro, a veces estructuradas con tubos radiales gelatinosos. Las células poseen muchos aerotopos, son esféricas y con un diámetro de 5-6 μm , es una especie productora de cianotoxinas (Guiry & Guiry, 2016).

Distribución en el Valle de México: Ciudad de México, Tezozomoc, Lago Mayor y Lago Menor de Chapultepec (Alcocer *et al.*, 2007, Sánchez *et al.*, 2007, Oliva *et al.*, 2008); **Estado de México**, Presa Guadalupe y Valle de Bravo (Seañez, 2011).

***Microcystis aeruginosa* (Kütz.) Kütz, 1846**

Colonias clatradas con células muy separadas, células con coloración azul-verdoso y con muchos aerotopos, el diámetro de cada célula es de 4-6 μm , mucílago difluente incoloro con márgenes estrechos alrededor de las células, las colonias varían de acuerdo a la estación del año (Cronberg & Annadotter, 2006).

Distribución en el Valle de México: Ciudad de México, Xochimilco, Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe, Lago mayor y Lago menor de Chapultepec, Alameda Oriente (Vasconcelos *et al.*, 2010, Pineda-Mendoza *et al.*, 2011, Komárek & Komárková, 2002); **Estado de México**, Zumpango y Presa Guadalupe (Vasconcelos *et al.*, 2010, Seañez, 2011).

***Microcystis flos-aquae* (Wittr.) Kirchner 1898**

Colonias flotantes, esféricas o irregulares con solo una delgada capa de mucílago, el borde de la colonia es suave, las células son esféricas con muchos aerotopos con un diámetro de 3-4.8 μm .

Distribución en el Valle de México: Ciudad de México, Lago de Tezozomoc, Xochimilco (Figueroa-Torres *et al.*, 2015, Oliva *et al.*, 2008, Sánchez *et al.*, 2007); **Estado de México**, Valle de Bravo y Presa Guadalupe (Seañez, 2011, Gaytán *et al.*, 2011)

***Microcystis panniformis* Komárek *et al.*, 2002**

Colonias planctónicas microscópicas o macroscópicas que son inicialmente irregulares, estrechamente agregadas tridimensionalmente en racimos, después aplastadas, las células acomodadas homogéneamente principalmente cerca de la superficie de la colonia, coloración amarillenta, azul-verdosa, verde oliva o café oscuro, las colonias

algunas veces presentan huecos, los márgenes de las colonias son muy irregulares y no están delimitados, células esféricas con un diámetro de 2.5-4.8 μm .

Distribución en el Valle de México: Ciudad de México, Lago Mayor y Lago Menor de Chapultepec y Tezozomoc (Vasconcelos *et al.*, 2010, Sánchez *et al.*, 2007, Komárek & Komárková, 2002); **Estado de México**, Zumpango y Presa Guadalupe (Vasconcelos *et al.*, 2010, Seañez, 2011).

8.2. Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo mostró un total de 1.3×10^6 células/ml para el género *Microcystis*. En la figura 8 se observa que la especie más abundante fue *M. flos-aquae* con 5.1×10^5 células/ml, seguido de *M. panniformis* con 3.9×10^5 células/ml, para la especie *M. aeruginosa* se obtuvo un valor 2.4×10^5 células/ml y la especie con menor abundancia fue *M. botrys* con 1.4×10^5 células/ml.

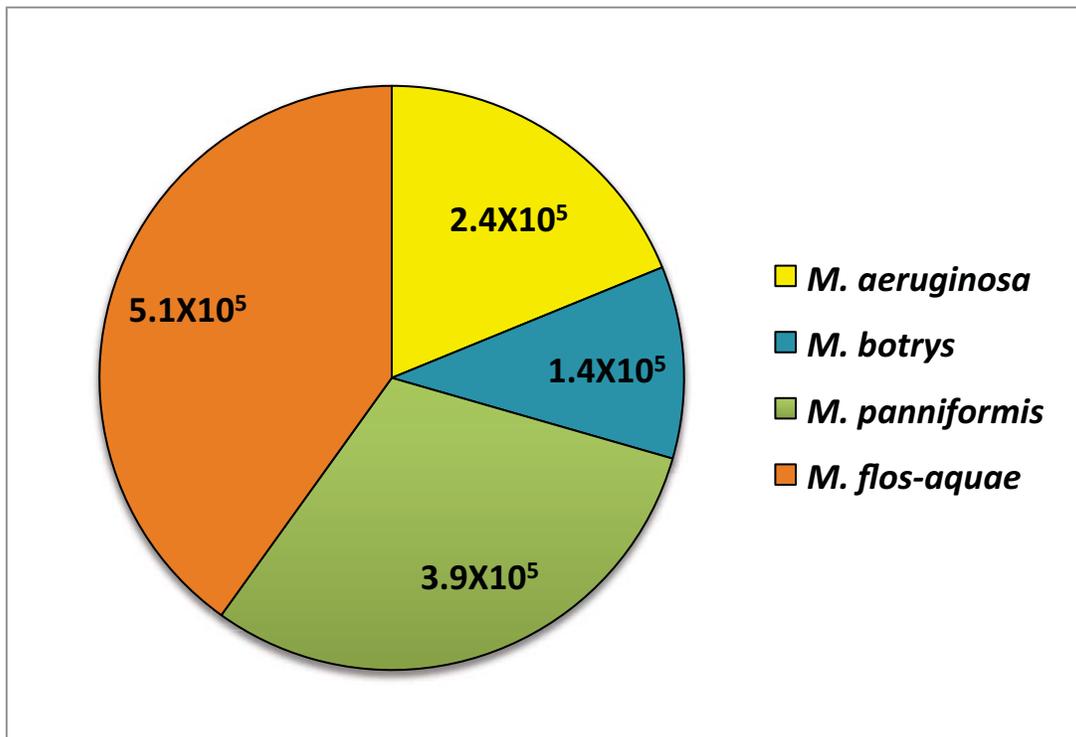


Figura 8. Abundancia de especies de cianobacterias determinadas en el florecimiento cianobacteriano en la Pista de Remo y Canotaje en mayo del 2016, células/ml.

8.3. Parámetros fisicoquímicos

La tabla 3 indica los valores obtenidos de los parámetros fisicoquímicos que se analizaron para este trabajo.

Tabla 3. Valores de parámetros físico-químicos obtenidos en la Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe en mayo del 2016, SP: Sin presencia.

Parámetro físico-químico	Mayo 2016
pH	9.6 unidades
Temperatura	22-26°C
Fosfatos	4.6 mg/l
Nitratos	SP
Oxígeno disuelto	5.6 mg/l
Alcalinidad total	450 mg/l
Dureza total	90 mg/l
Microcistina-LR	2.8 µg/l

8.4. Cuantificación de microcistinas por el ensayo de ELISA

La concentración de microcistinas de la muestra directa tomada de la Pista Olímpica en mayo del 2016 sobrepasó el límite de detección del kit de ELISA, por lo que extrapolando el valor con la ecuación de la recta se obtuvo un valor de 2.8 µg/l de microcistina-LR.

8.5. Cuantificación de microcistinas por metodo de HPLC

En la figura 9 se observa que el tiempo de detección del patrón estándar de 10 µg/ml de Microcistina-LR de SIGMA-ALDRICH fue A los 23.275 minutos y el pico detectado alcanzó una altura de 76.8 mAU.

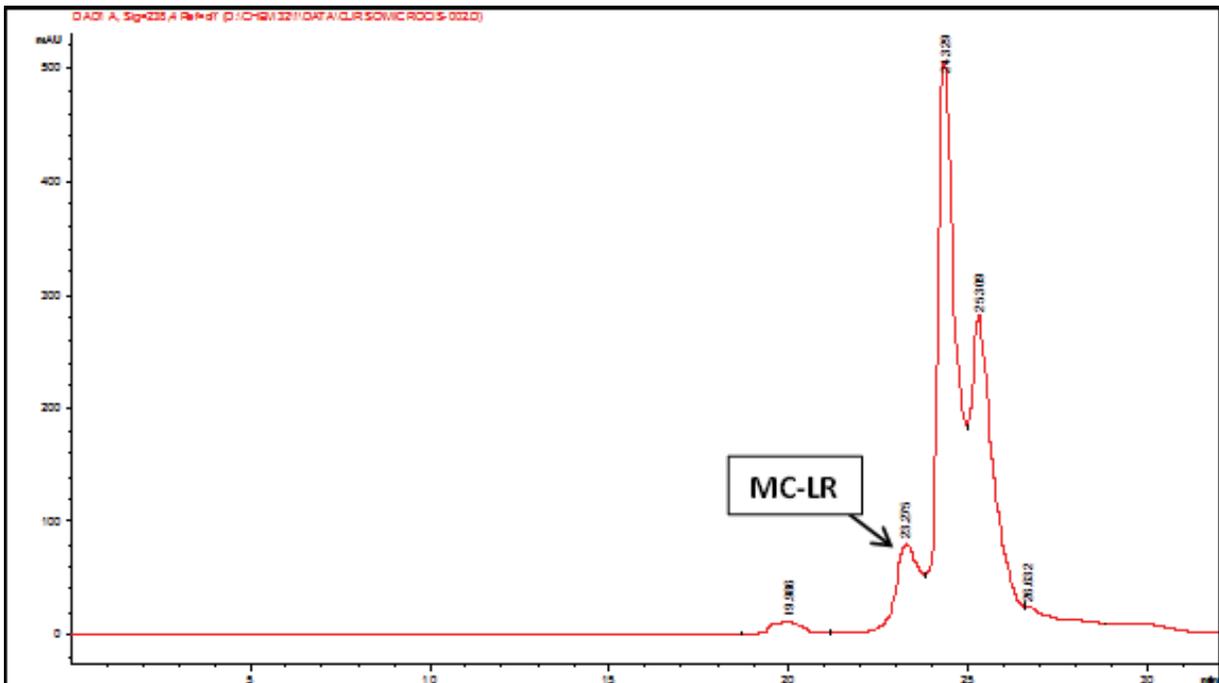


Figura 9. Cromatograma obtenido a partir del patrón estándar de 10 µg/ml de Microcistina-LR de SIGMA-ALDRICH, la flecha indica el pico de Microcistina-LR detectado

En la figura 10 se observa que el tiempo de detección del pico de Microcistina-LR del extracto metanólico elaborado a partir de la muestra liofilizada proveniente del material biológico recolectado de la pista olímpica fue de 22.764 minutos, alcanzando una altura de 65.1 mAU, en la figura 11 se observa la repetición del extracto metanólico, con un tiempo de detección de 22.775 minutos y una altura de 61.6 mAU, corroborando la presencia de Microcistina-LR en la muestra recolectada con una concentración de 1646 µg/g de material liofilizado

consistencia en comparación con los individuos del tratamiento control, además de tener mayor cantidad de moco.

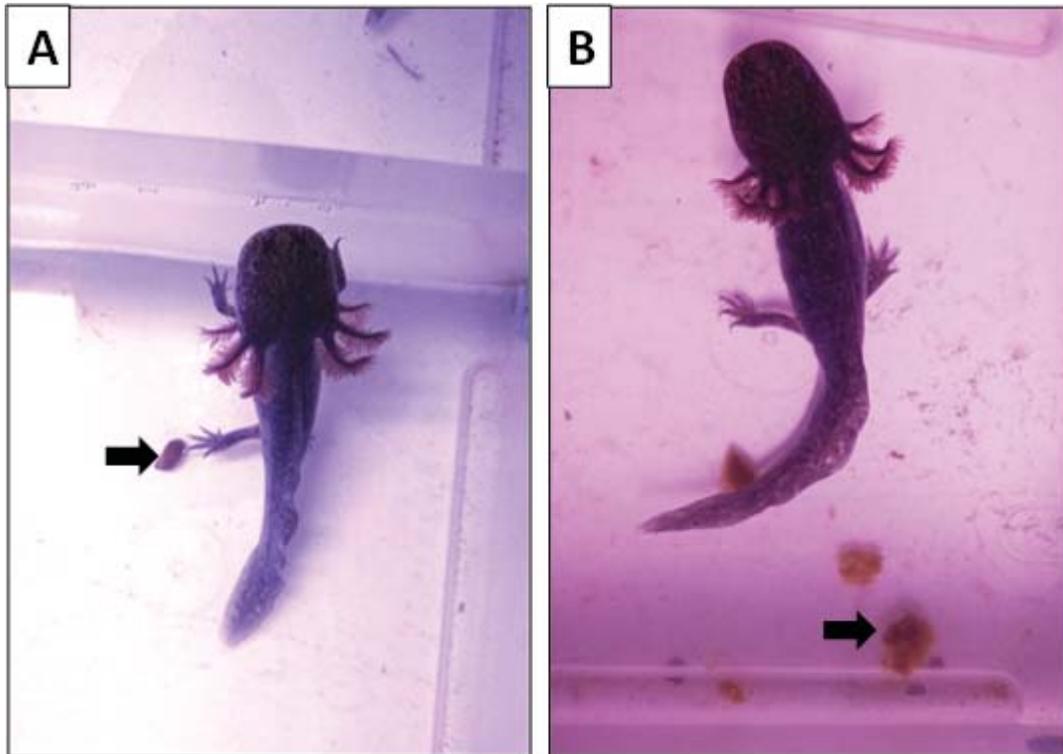


Figura 12. Apariencia de las excretas de los individuos del tratamiento control (A) y del tratamiento experimental (B).

En el día 24 del experimento de manera inesperada tres individuos (3/7) del tratamiento experimental se comportaron de forma inusual, ya que no se alimentaban y tenían dificultad para moverse, también se les observaron las branquias congestionadas y se arquearon hacia adelante, lo cual fue una clara señal de estrés (Figura 13), por lo que estos individuos tuvieron que ser sacrificados ese mismo día, junto con tres individuos del tratamiento control tomados al azar.



Figura 13. Individuos del tratamiento control (A) experimental (B) el día 24 del experimento.

Después del sacrificio y disección, se pudo observar claramente la diferencia en la coloración del hígado de los individuos de ambos tratamientos. En el hígado de los individuos del tratamiento control se observó una coloración rosada, característica de un individuo sano. En comparación, el hígado de los individuos del tratamiento experimental presentó una coloración amarilla. Este color es un signo que indica hepatotoxicidad (Figura 14 A y B).

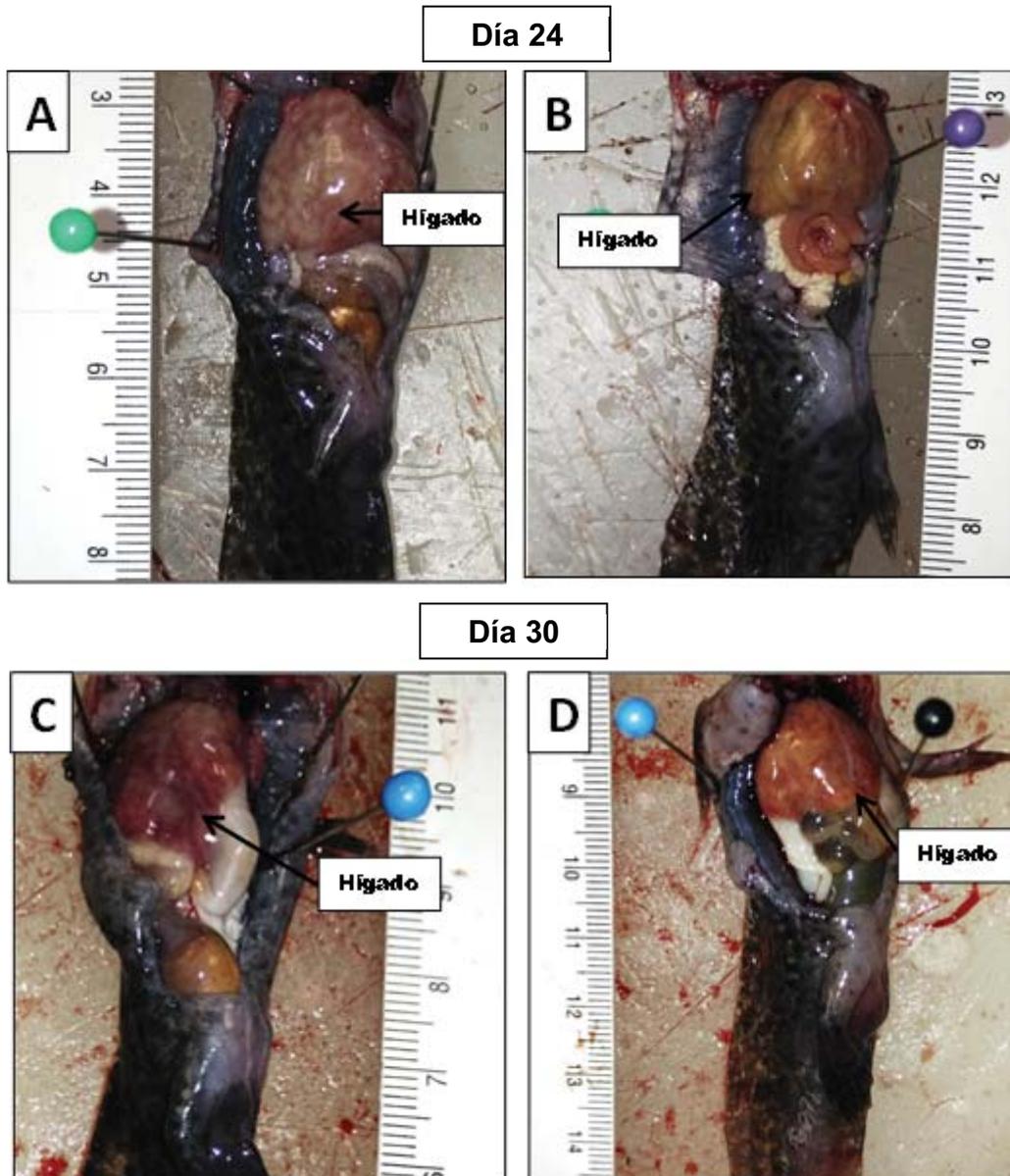


Figura 14. Imágenes que muestran algunos órganos abdominales en individuos del tratamiento control (A y C) y experimental (B y D).

En el día 30 del experimento el comportamiento y apariencia externa de los individuos que sobraron de ambos tratamientos fué normal. La morfología de las branquias de los individuos de ambos tratamientos fué similar, pero después de realizar las disecciones se pudo apreciar la misma variación en la coloración del hígado en los individuos de ambos tratamientos (Figura 14, C y D).

8.7. Registro de peso y talla

En la figura 15 se puede apreciar una ligera tendencia al aumento de peso en los individuos del grupo experimental con respecto al grupo control a partir del día 7 del experimento hasta el día 21 del experimento, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los individuos de los dos tratamientos durante el tiempo que duró el ensayo ($p < 0.05$).

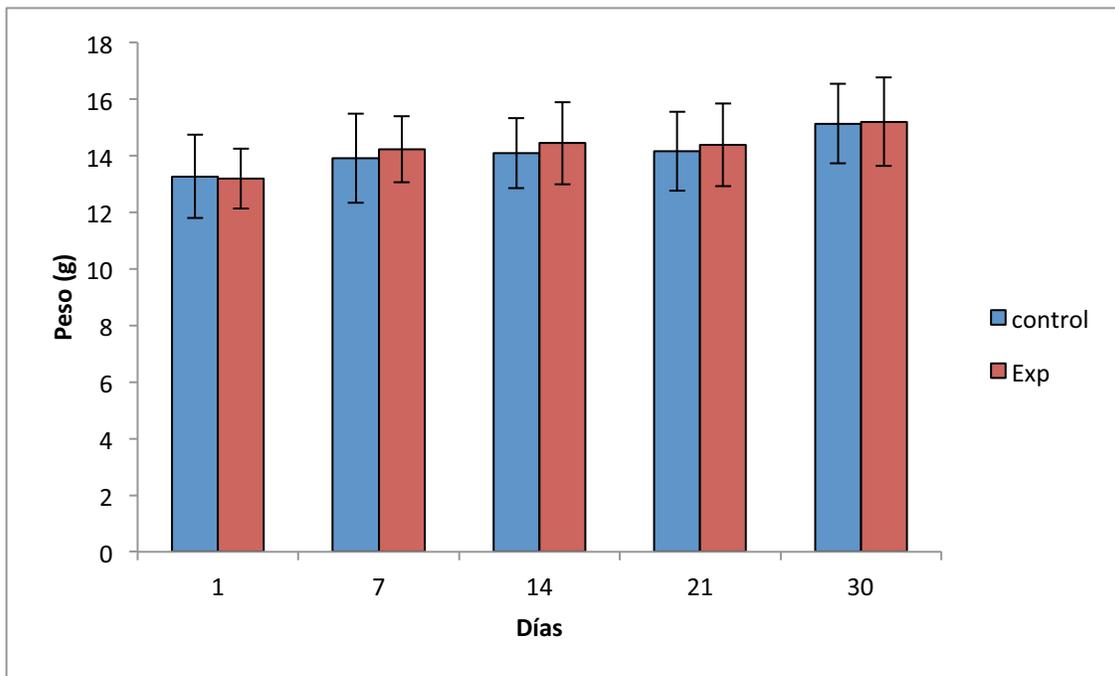


Figura 15. Registro del peso de todos los individuos durante el bioensayo de toxicidad subcrónica.

En cuanto a la talla (Figura 16) se puede apreciar una leve tendencia en el crecimiento de los individuos del tratamiento experimental que se detuvo en el día 14 del experimento, sin embargo, en el día 21 del experimento se volvieron a regular, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos ($p < 0.05$).

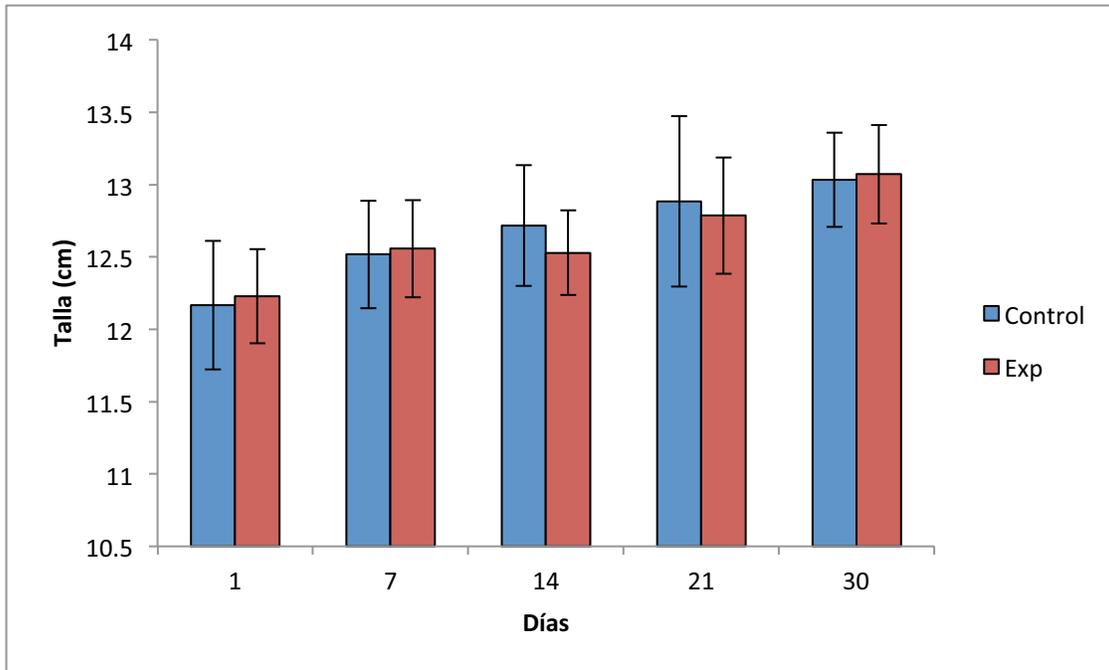


Figura 16. Registro de la talla de todos los individuos durante el bioensayo de toxicidad subcrónica.

8.8. Descripción histológica

Hígado

Una de las unidades estructurales básicas del hígado de los vertebrados es el lobulillo hepático, sin embargo en *A. mexicanum* no se pudo identificar claramente esta organización, no obstante, se pudieron reconocer algunas estructuras presentes en el hígado de vertebrados como venas centrales rodeadas de hepatocitos organizados de forma radial (Figura 17).

Los hepatocitos son el tipo celular predominante del hígado de *A. mexicanum*, tienen forma poliédrica y un poco alargada, son mononucleadas y la posición de este puede variar en cualquier región del citoplasma y además almacenan lípidos y glucógeno.

Los hepatocitos forman cordones, los cuales se bifurcan, entre ellos se observan capilares llamados sinusoides que están conformados por una fina capa endotelial. También se observaron células ricas en melanina llamadas melanomacrófagos que tienen función fagocítica.

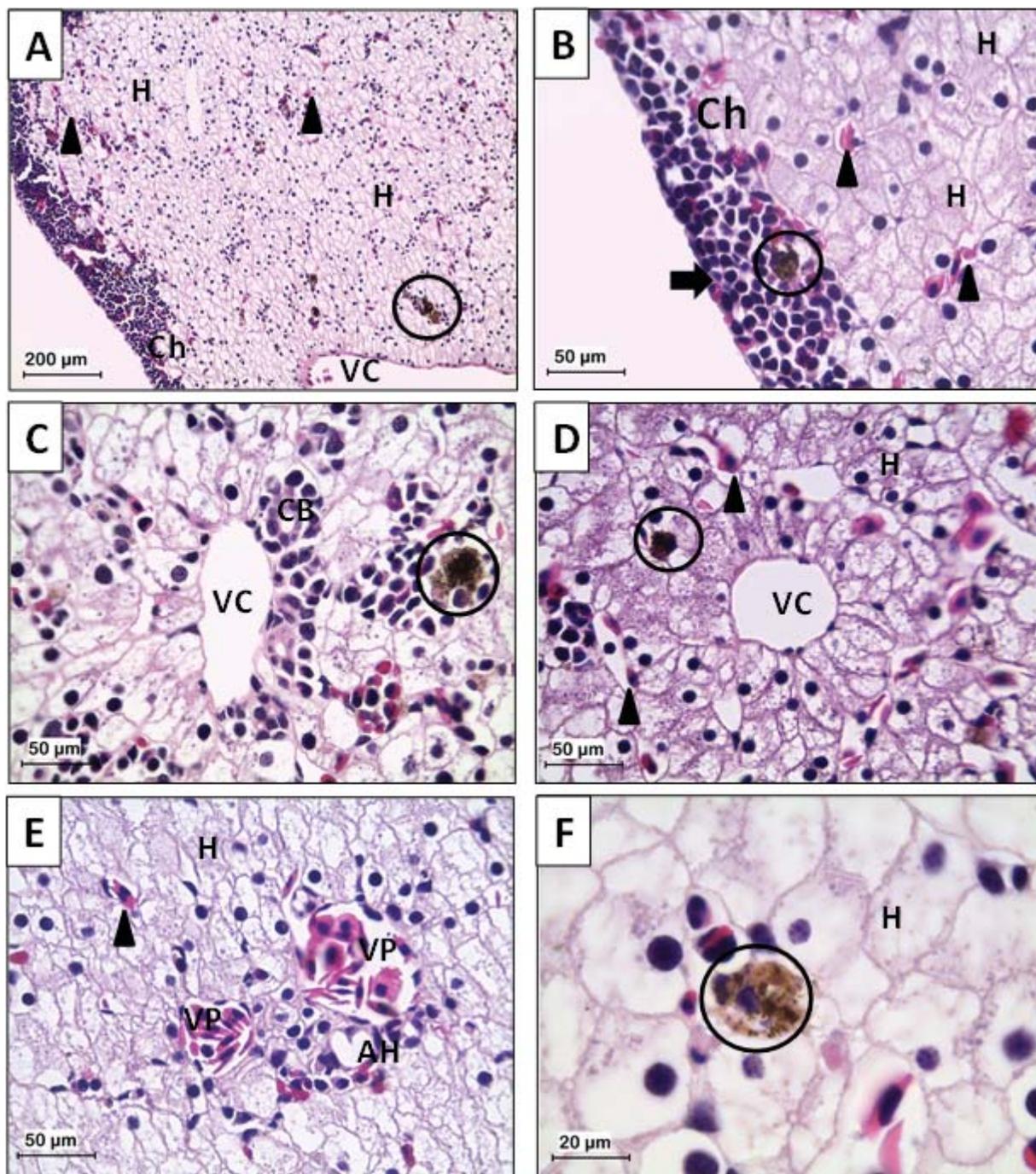


Figura 17. Estructura histológica del hígado de *Ambystoma mexicanum* del grupo con el tratamiento control sacrificados el día 24 y 30 del experimento, se observan hepatocitos (H), corteza hematopoyética (Ch), vena central (VC), vena porta (VP), cápsula hepática (flecha), sinusoides (triángulo), melanomacrófagos (circulo). Tinción de Hematoxilina-Eosina, A (100X), B, C y D (400X).

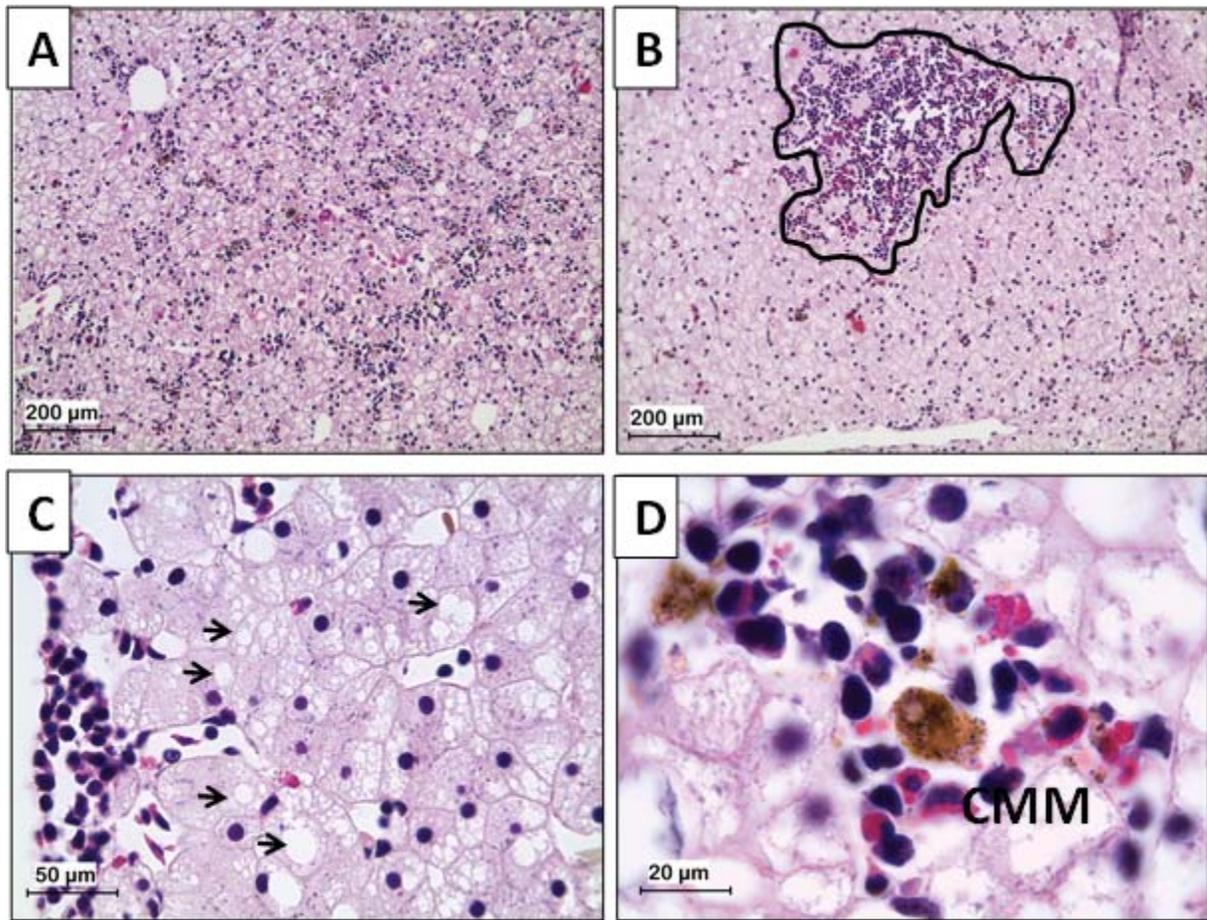


Figura 18. Estructura histológica del hígado de *Ambystoma mexicanum* del grupo con tratamiento experimental sacrificado el día 30 del bioensayo, (A) formación de centros melanomacrófagos, (B) infiltrado celular inflamatorio perivascular, (C) esteatosis focal, vacuolas lipídicas (flechas negras), (D) vista detallada de los centros melanomacrófagos (CMM). Tinción con Hematoxilina-Eosina, A y B (100X), C (400X), D (1000X).

Dentro del parénquima hepático del grupo control sacrificado tanto el día 24 como el 30 del experimento se observan espacios portales (Figura 17), sin embargo estos se conforman solamente de venas portales y conductos biliares, en cambio la vascularización arterial es escasa.

Por debajo de la cápsula del hígado se pudo observar una capa de tejido hematopoyético llamada corteza hematopoyética.

En el hígado de los individuos del tratamiento experimental sacrificados el día 30 los cambios detectados fueron: esteatosis leve, hepatitis leve, aumento de centros melanomacrófagos y reducción de la corteza hematopoyética (Figura 18).

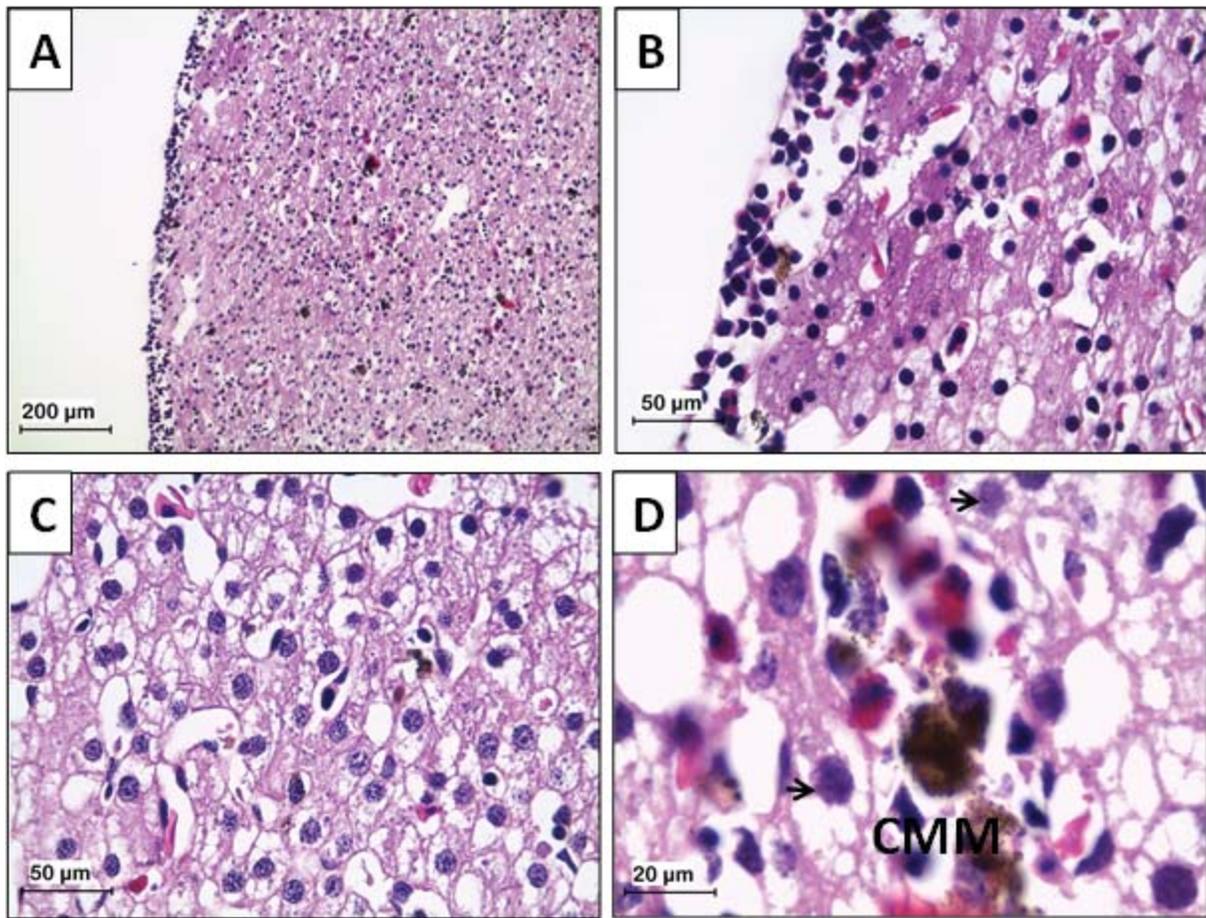


Figura 19. Estructura histológica del hígado de *Ambystoma mexicanum* del del grupo con tratamiento experimental sacrificado el día 24 del bioensayo, (A) pérdida de la arquitectura hepática y reducción de la corteza hematopoyética, (B) hepatocitos necróticos, (C) balonización de hepatocitos (circulo) (D) vista detallada de los centros melanomacrófagos (CMM), cambios degenerativos de núcleo (flecha). Tinción con Hematoxilina-Eosina, A (100X), B y C (400X), D (1000X).

El hígado de los individuos del tratamiento experimental que fueron sacrificados el día 24 también presentaron reducción de la corteza hematopoyética, además se pudieron identificar algunos cambios histopatológicos más severos, como balonización de los hepatocitos, ocasionando pérdida de la arquitectura del parénquima hepático, lo cual indica necrosis severa multifocal (Figura 19).

Riñones

Los riñones de *A. mexicanum* son de tipo mesonéfrico, poseen al igual que otros vertebrados una corteza y una médula. La unidad estructural y fisiológica básica es la nefrona, la cual se compone de un corpúsculo renal y varios túbulos contorneados (Figura 20).

El corpúsculo renal se compone de la cápsula de Bowman y el glomérulo. El glomérulo de *A. mexicanum* es una red de capilares anastomosados que se forman a partir de la arteria aferente. El glomérulo posee una membrana basal y está sostenida por células de la capa visceral ó podocitos y células del mesangio. El glomérulo es la estructura encargada de filtrar el plasma; evitando que células y moléculas de gran tamaño pasen al filtrado glomerular.

La cápsula de Bowman rodea al glomérulo y constituye la capa parietal, es un epitelio plano y debajo de él se encuentra una membrana basal.

El tejido conectivo que mantiene unidas a las nefronas se le conoce como intersticio renal, el cual contiene vasos sanguíneos y arteriolas.

El túbulo contorneado está conectado con el corpúsculo renal y se divide en túbulo contorneado proximal y túbulo contorneado distal, las células del túbulo contorneado proximal son cilíndricas con microvellosidades, en cuanto al túbulo contorneado distal está compuesto de células más aplanadas que carecen de microvellosidades (Figura 21).

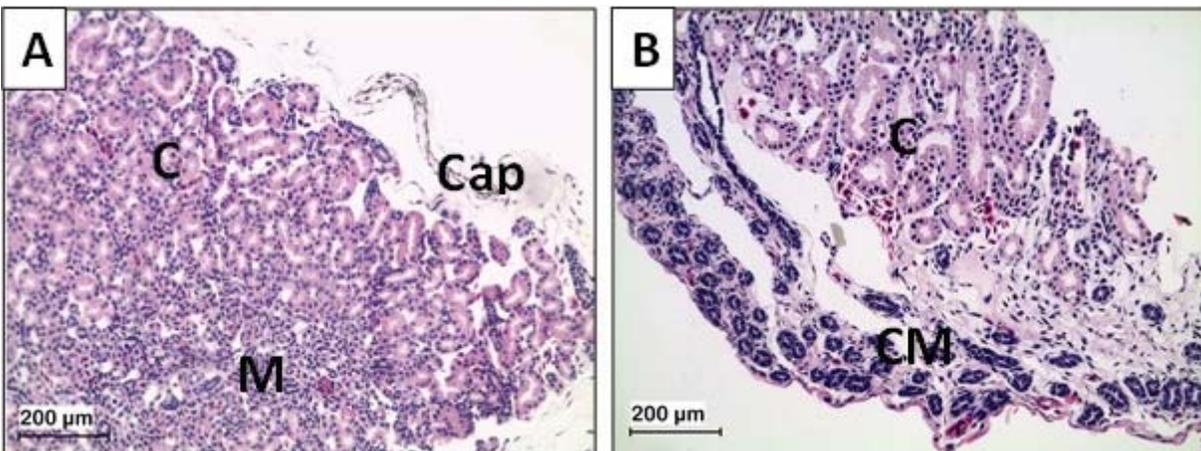


Figura 20. Imágenes que muestran la organización histológica del riñón de *Ambystoma mexicanum* del grupo con tratamiento control sacrificados el 24 y 30 del experimento. Se señalan diferentes estructuras como: cápsula renal (Cap), corteza (C) medula (M), conducto mesonefrítico (CM). Tinción con Hematoxilina-Eosina (100X).

El túbulo contorneado distal se comunica con el conducto mesonefrítico y éste se encuentra en la parte más externa del riñón, dentro de la cápsula renal compuesta de tejido conectivo.

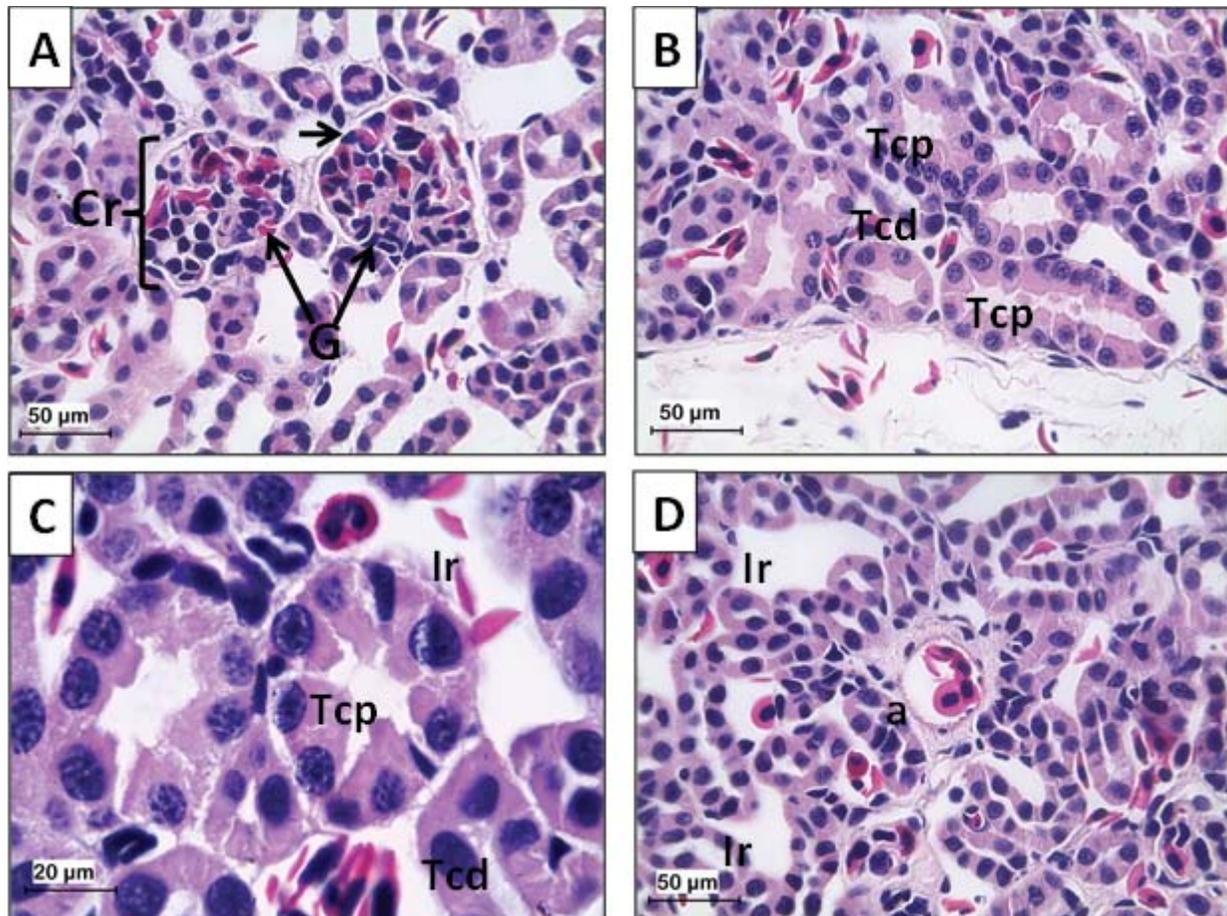


Figura 21. Detalle de la estructura histológica de los riñones de *Ambystoma mexicanum* del grupo con tratamiento control sacrificados el día 24 y 30 del experimento, (A) corpúsculo renal (Cr), glomérulo (G), capsula de Bowman (flecha), (B) túbulo contorneado proximal (Tcp), túbulo contorneado distal (Tcd), (C) Detalle de los túbulos contorneados proximal y distal, Intersticio renal (Ir), (D) arteriola (a). Tinción con Hematoxilina-Eosina, A, B y D (400X), C (1000X).

En los riñones de los individuos del tratamiento experimental sacrificados el día 30 del ensayo (Figura 22 C, D, E y F) se reconocieron algunos cambios histopatológicos como la dilatación tanto de la cápsula de Bowman como del capilar glomerular. También se pudo observar tejido edematoso, lo cual sugiere inflamación, depósitos proteicos dentro espacio de Bowman. Además se pudo apreciar pérdida de la integridad de los túbulos contorneados proximales y distales que sugieren necrosis tubular.

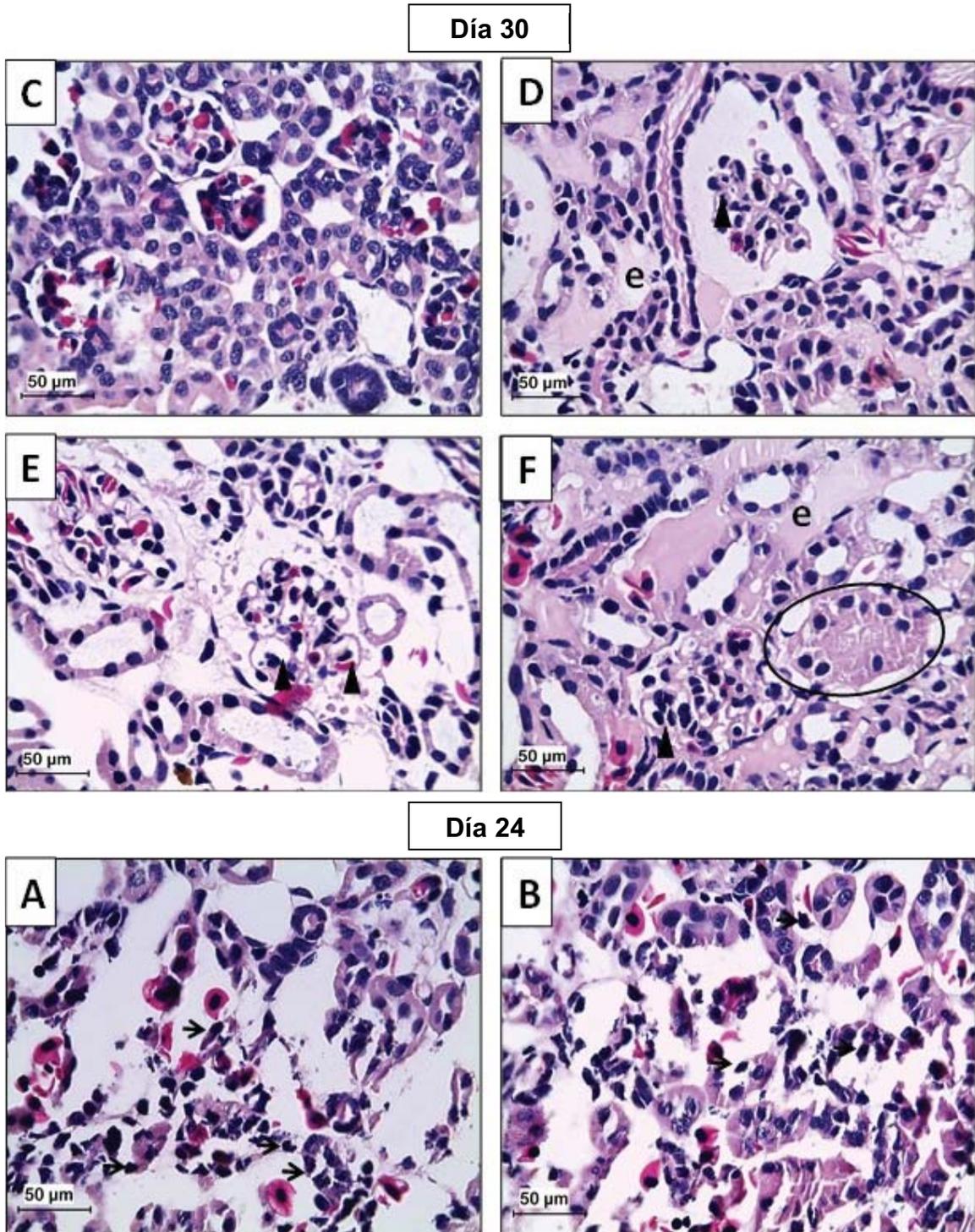


Figura 22. Detalle de la estructura histológica de los riñones de *Ambystoma mexicanum* del grupo con tratamiento experimental sacrificados el día 30 (A, B, C y D) y 24 (E y F) del experimento, (A) Dilatación de la cápsula de Bowman, (B) Degeneración de los túbulos contorneados proximales, dilatación del capilar glomerular (triángulo) y de la cápsula de Bowman, (C) depósitos proteicos dentro del espacio de Bowman (estrella), (D) degeneración de los túbulos contorneados, (círculo), tejido edematoso (e). (E y F) necrosis de los túbulos contorneados proximales. Se observan núcleos picnóticos (flecha negras). Tinción con Hematoxilina-Eosina, 400X.

En los individuos del tratamiento experimental que fueron sacrificados el día 24 del ensayo (Figura 22 D y F), se pudieron reconocer cambios estructurales más severos como degeneración y necrosis de los túbulos contorneados y los glomérulos, por lo tanto la lesión se catalogó como necrosis tubular y glomerular multifocal severa.

Branquias

El aparato branquial está constituido por un par de branquias localizadas en la región anterior del organismo, en los laterales de la cabeza, cada branquia se compone de 3 filamentos principales, que a su vez contienen dos hileras de lamelas de distintos tamaños (Figura 23).

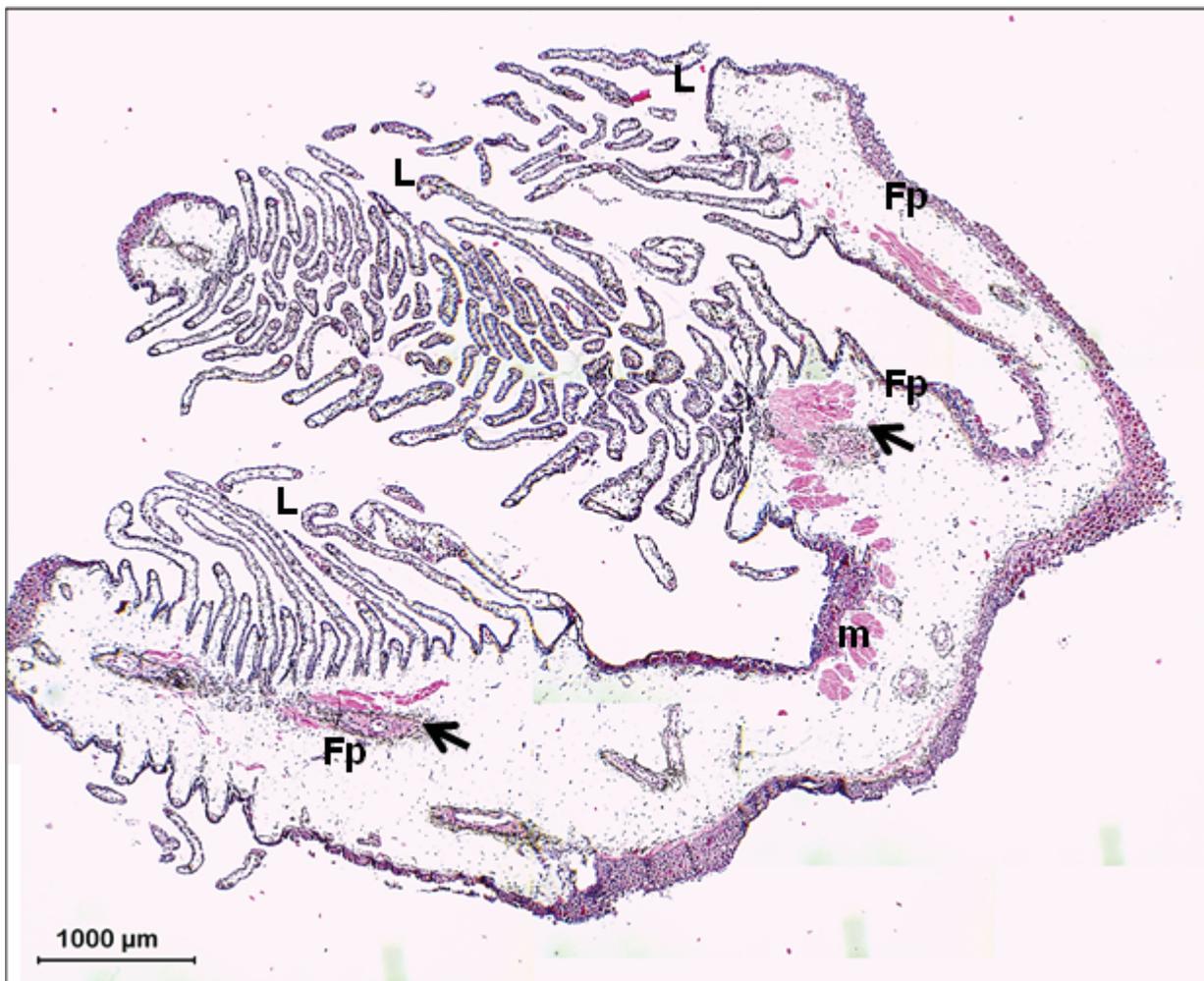


Figura 23. Estructura histológica de las branquias de *Ambystoma mexicanum* del grupo con tratamiento control sacrificados el día 24 y 30 del experimento. Filamentos principales (Fp), lamelas (L), arteria (flecha), músculo (m). Tinción con Hematoxilina-Eosina, 40X.

Cada filamento principal se compone de un epitelio plano estratificado con aproximadamente 4 estratos, en él pueden encontrarse células de Leydig, las cuales son glándulas unicelulares (Brunelli *et al.*, 2009), debajo del estrato basal hay tejido conjuntivo laxo y cromatóforos de melanina, además se observa una arteria que recorre todo el filamento principal y rodeando a la arteria se puede apreciar músculo estriado esquelético (Figura 24).

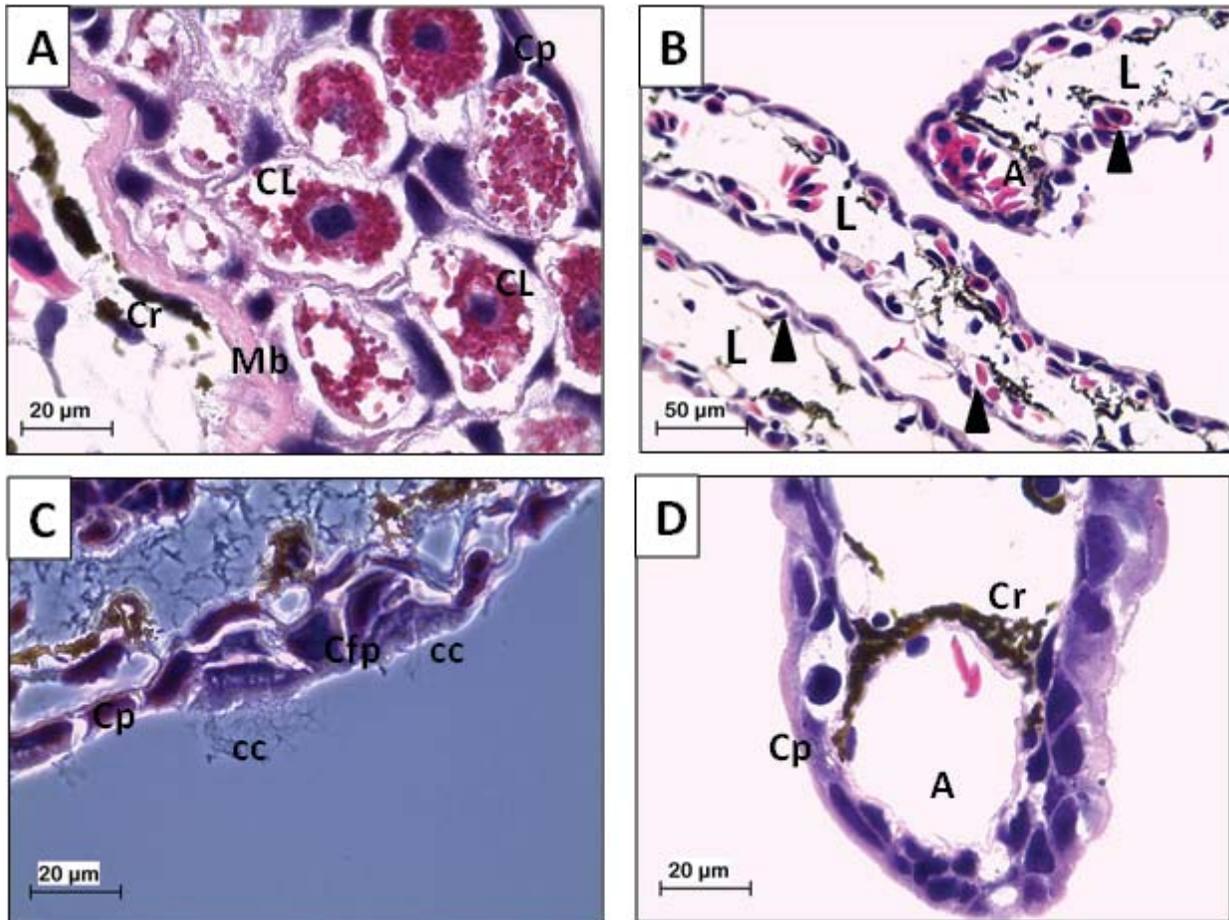


Figura 24. Detalle de las branquias de *Ambystoma mexicanum* del grupo con tratamiento control sacrificados el día 24 y 30 del experimento. (A) Epitelio del filamento principal. (B) Lamelas. (C) Epitelio lamelar. (D) Arteriola en región apical de lamela. Célula pavimentosa (Cp), células de Leydig (CL), membrana basal (Mb), cromatóforos (Cr), lamela (L), capilares (Triángulo), célula ciliada (CC), célula en forma de pera (Cfp), arteriola (A). Tinción con Hematoxilina-Eosina, (C) contraste de fases, (A, C y D) 400X, (B) 100X.

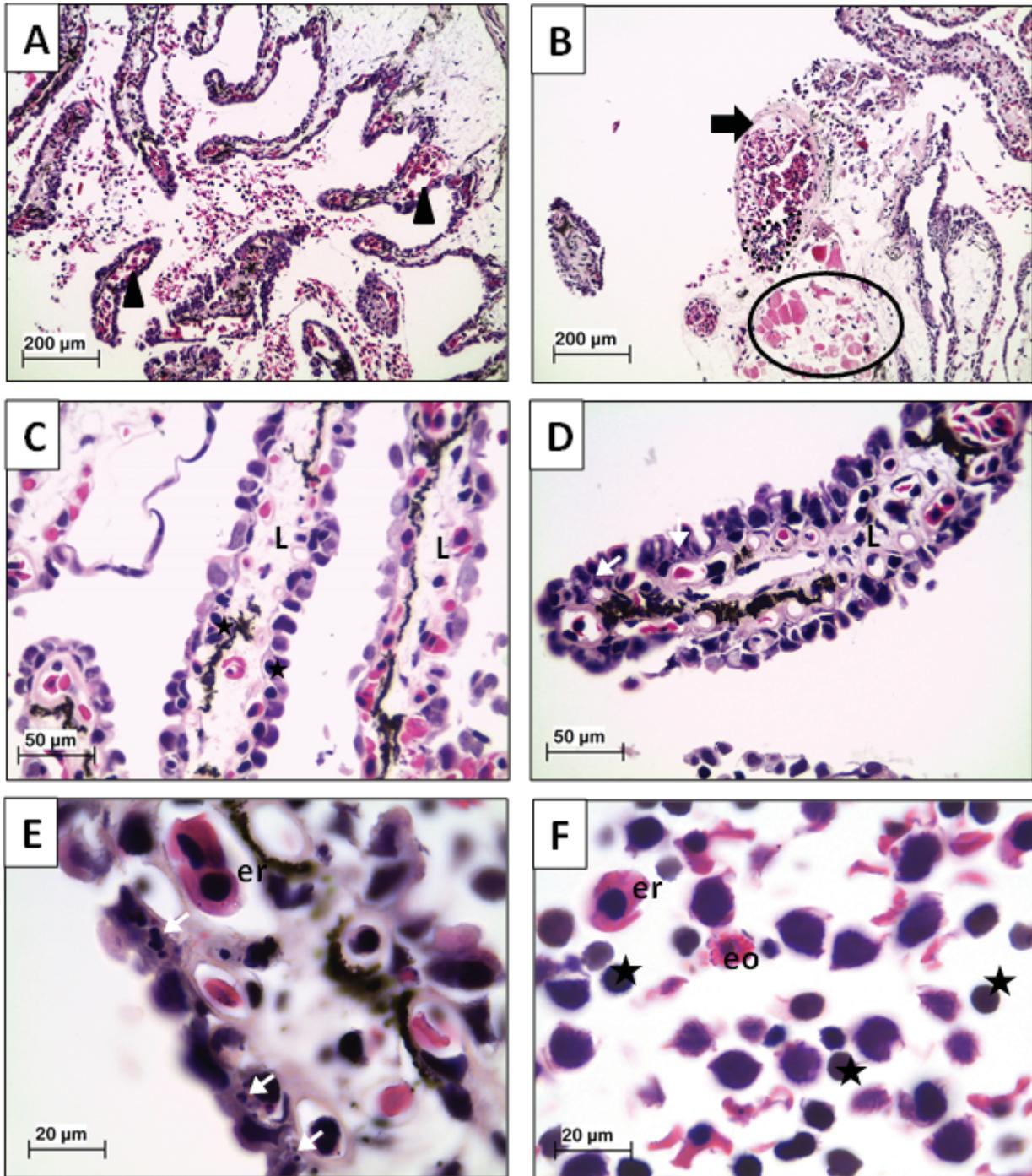


Figura 25. Detalle de las branquias de los individuos del grupo con tratamiento experimental que fueron sacrificados el día 24 del bioensayo de toxicidad. (A) Hemorragias en lamelas. (B) Arteria del filamento principal. (C) Lamelas. (D) Sección transversal de lamelas. (E) cuerpos apoptóticos en lamelas. (F) infiltrado inflamatorio. Lamela (L), hemorragia (triángulo), hipertrofia de arteria (flecha negra), infiltrado inflamatorio perivascular (líneas punteadas) tejido edematoso (círculo), cuerpos apoptóticos (flecha blanca), linfocitos (estrella), eritrocitos (er), eosinófilos (eo). Tinción con Hematoxilina-Eosina, (A y B) 100X, (C y D) 400X, (E y F) 1000X.

La unidad estructural y fisiológica básica de las branquias de *A. mexicanum* es la lamela, éstas se encuentran unidas de forma perpendicular al filamento principal. El epitelio lamelar es un complejo de varios tipos celulares como células pavimentosas, células en forma de pera y numerosas células ciliadas que secretan sustancias mucosas. Debajo de la lámina basal del epitelio lamelar hay varios vasos aferentes y eferentes embebidos en tejido conectivo.

En los individuos del tratamiento experimental sacrificados el día 24 del bioensayo se detectaron los siguientes cambios: hiperplasia del tejido epitelial lamelar, numerosas hemorragias en las lamelas e hiperemia en las arterias lamelares, así como edema y un infiltrado monocítico, este cuadro histológico corresponde a una branquitis hemorrágica y necrótica. Cabe destacar que en un individuo se observaron cuerpos apoptóticos en el epitelio lamelar. Las branquias de los individuos que fueron sacrificados el día 30 del bioensayo no presentaron daño observable (Figura 25).

9. DISCUSIÓN

9.1. Composición fitoplanctónica

Los resultados obtenidos del análisis cualitativo realizado en este trabajo demostraron la presencia de al menos cuatro de las especies reportadas para el valle de México (*M. botrys*, *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae* y *M. panniformis*), estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Figueroa-Torres y colaboradores en 2015, en el que corroboraron la presencia de *M. aeruginosa* y *M. flos-aquae* en el Área Natural Protegida: Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco.

De acuerdo a los trabajos que se han realizado en el valle de México, se tienen citadas ocho especies de cianobacterias del género *Microcystis* (*M. aeruginosa*, *M. botrys*, *M. flos-aquae*, *M. viridis*, *M. incerta*, *M. protocystis*, *M. wesenbergii* y *M. panniformis*) que se desarrollan normalmente en cuerpos de agua mesotróficos e hipertróficos (Oliva *et al.*, 2008, Vasconcelos *et al.*, 2010).

Para el caso de *M. botrys* y *M. panniformis* se ha reportado su presencia en algunos lagos cercanos a la zona de estudio como Chapultepec y Tezozomoc, por lo que si las condiciones son adecuadas; estas especies podrían desarrollarse en otros cuerpos de agua (Alcocer *et al.*, 2007, Sánchez *et al.*, 2007 y Oliva *et al.*, 2008).

La abundancia del género *Microcystis* en Cuemanco concuerda con los resultados obtenidos en el trabajo realizado por Seañez en 2011, en el que encontró a *Microcystis* como el género con mayor abundancia, contando hasta 532,000 células/ml en Presa

Guadalupe, durante la temporada de sequía del año 2010; por otro lado, el trabajo de Hernández en 2014 se encontró a *M. flos-aquae* como la especie más abundante con 346,762,559 células/ml en el lago Tezozomoc al inicio de la temporada de lluvias del 2010, otro estudio realizado por Tomasini-Ortiz y colaboradores en 2012 mostró que en un florecimiento cianobacteriano nocivo localizado en el lago de Pátzcuaro, Michoacán, se obtuvo un conteo de hasta 15,531,636 células/ml en el mes de abril del 2011, siendo *Microcystis* el segundo género con mayor abundancia.

Todos los trabajos antes citados coinciden en que las mayores abundancias surgieron en temporada de sequía o inicios de la temporada de lluvias, cuando la temperatura aumenta, la insolación es mayor y hay poco viento, ofreciendo las condiciones idóneas para el desarrollo de este género, cabe destacar que varias especies de cianobacterias incluyendo a *Microcystis* alcanzan su máxima tasa de crecimiento a una temperatura de 25 °C, siendo mayor que clorofíceas o diatomeas (Sabour *et al.*, 2005, Seañez, 2015, Arzate, 2008) en este trabajo se registró una temperatura de 22°C, sin embargo vale la pena resaltar que conforme transcurría el día, se alcanzó una temperatura de hasta 26°C al medio día.

El género *Microcystis* posee varias características estructurales que le proveen mayores ventajas adaptativas con respecto a las demás especies del fitoplancton, tales como la forma de crecimiento en colonias que otorga cierta protección a las células del centro, y la producción de mucilago que dificulta su depredación por parte de otras especies (Hernández, 2014, Lago *et al.*, 2015, Arzate, 2008). Otra característica que posee el género *Microcystis* es la presencia de vesículas de gas que ayudan a regular su posición vertical de acuerdo a la intensidad lumínica que reciben, aunado a esto la presencia de pigmentos accesorios ayuda a eficientizar la radiación lumínica que reciben las células (Seañez, 2011; Arzate, 2008; Hernández, 2014), las cuales pueden explicar la dominancia de este género en la Pista Olímpica.

9.2. Parámetros fisicoquímicos del agua

pH y oxígeno disuelto

Durante un florecimiento cianobacteriano nocivo las condiciones fisicoquímicas del agua cambian drásticamente, ya que el pH tiende a subir debido a que durante el día la tasa fotosintética aumenta; llegando a saturar de oxígeno el epilimnion, sin embargo el CO₂ disuelto en el agua en forma de ácido carbónico es consumido rápidamente por las cianobacterias (Seañez, 2011, Schmidt *et al.*, 2014), este fenómeno se observó en estudios realizados por Arzate y colaboradores en 2010, debido a que reportan valores de pH de hasta 10.74 en el lago de la primera sección del bosque de Chapultepec y

concentración de oxígeno disuelto de 5.08 mgL^{-1} y en la pista Olímpica reportaron un pH de 10.28 y una concentración de oxígeno disuelto de hasta 8.86 mgL^{-1} .

Por su parte, Hernández en 2014, reporta un pH de 9.81 y una concentración de oxígeno disuelto de 7.5 mgL^{-1} en el lago Tezozomoc, en este trabajo se obtuvo un valor de pH de 9.64 y una concentración de oxígeno disuelto de 5.6 mgL^{-1} , lo cual muestra un compartamiento similar.

Alcalinidad y dureza total

La alcalinidad es la capacidad que tiene el agua de aceptar protones, principalmente se compone de la concentración de carbonatos y bicarbonatos, esta característica le confiere cierta resistencia a un cambio abrupto del pH (Gama *et al.*, 2010), en este trabajo se obtuvo una alcalinidad total de 450 mgL^{-1} , lo cual es considerado como muy alto según Mora-Navarro y colaboradores en 2004.

Además de altas concentraciones de nutrientes disueltos en el agua, la alcalinidad también es un factor importante durante la aparición de un florecimiento cianobacteriano nocivo debido a que algunas especies que componen el fitoplancton incluyendo a las cianobacterias pueden tomar los carbonatos y bicarbonatos como una fuente adicional de carbono (Bermúdez *et al.*, 2003).

La dureza total es la concentración de sales de Calcio y Magnesio que se encuentran disueltos en el agua. En este trabajo se obtuvo un valor de 90 mgL^{-1} lo cual es considerado como moderadamente dura (Gama *et al.*, 2010), este parámetro puede influir en la composición fitoplanctónica ya que en estudios realizados por Mora-Navarro y colaboradores en 2003 encontraron que altas concentraciones de sales de calcio y magnesio disueltos en el agua ocasiona una reducción de la riqueza específica del fitoplancton, debido a que varias especies son incapaces de tolerar altos niveles de dureza. A pesar de que en este estudio la dureza calculada no fue alta, cabe destacar que el género *Microcystis* puede tolerar aguas con muy alta dureza, lo cual refleja otra ventaja adaptativa con respecto a las demás especies del fitoplancton (Zamora, 2015).

Nitratos y fosfatos

La disponibilidad de nutrientes como nitrógeno y fósforo, cumple un papel importante en el control de la producción de biomasa y de la composición de la comunidad fitoplanctónica (Sabour *et al.*, 2009). Según Amateco en 2011, menciona que una proporción de nitrógeno y fósforo parecido a 1P:16N favorece notablemente el crecimiento del fitoplancton, no obstante la deficiencia de algún nutriente limita el desarrollo de este.

Para la Pista Olímpica de Cuemanco, Arzate y colaboradores en 2010 encontraron una concentración de 1.50 mgL^{-1} de nitratos, sin embargo en este trabajo no se detectaron nitratos en el agua, lo cual podría indicar que en este cuerpo de agua el nitrógeno actuó como nutriente limitante, pero a pesar de ello *Microcystis* aún era muy abundante, esto se puede explicar con el trabajo realizado por Sabour y colaboradores en 2009, que demostraron en cultivos aislados de *Microcystis ichthyoblabe* sometidos a condiciones limitantes de nitrógeno que las células utilizan alguna reserva interna de nitrógeno para sobrevivir.

Otro aspecto que se debe considerar es que a pesar de que no se hayan detectado nitratos en el agua; no hay suficiente evidencia que indique que no se encuentre disponible otra fuente de nitrógeno como nitritos (NO_2), amoníaco (NH_3) o amonio (NH_4), ya que estos también pueden ser asimilados (Mazzeo *et al.*, 2002), o bien el mismo florecimiento pudo haber consumido estos nutrientes (Bonilla, 2010), por lo que es de suma importancia tomar en cuenta estos parámetros para futuros trabajos.

El fósforo sólo se encuentra disponible como fosfatos y ortofosfatos, ya que fácilmente puede interactuar con otros compuestos y precipitarse, evitando su asimilación (Gama *et al.*, 2010). En este trabajo se detectó una concentración de 4.6 mgL^{-1} de fosfatos, lo cual según Amateco en 2011 se clasifica como extremadamente alto, superando incluso el valor que detecto en su trabajo de 3.2 mgL^{-1} en el lago de Catemaco, Veracruz e indica que se trata de un ambiente hipereutrofico. La concentración de fosfatos detectados en este trabajo es mayor que el valor obtenido por Arzate y colaboradores en 2010 de 1.62 mgL^{-1} de fosfatos en la Pista Olímpica.

Es de importancia destacar que el valor de fosfatos obtenido en este trabajo es similar al que se obtuvo en el trabajo de Arzate y colaboradores en 2010, ya que en lago de Alameda Oriente se determinó una concentración de 4.40 mg L^{-1} .

9.3. Determinación de Microcistina-LR por el método inmunológico de ELISA

Según el ensayo inmunológico de ELISA realizado con extracto crudo elaborado a partir de la muestra directa proveniente de la Pista Olímpica no se pudo determinar la concentración exacta de microcistina, ya que sobrepasó el límite de detección establecido en el kit, por lo que es necesario diluir el extracto crudo para futuros trabajos.

El resultado obtenido en este trabajo fue mayor que el valor guía establecido por la OMS de $1 \text{ } \mu\text{g/L}$ para agua potable, sin embargo este valor se encuentra dentro de lo

establecido para aguas de recreación de 10 µg/L, por lo que es bajo el riesgo de intoxicación aguda por contacto directo con el agua de la Pista Olímpica, no obstante no se descartan posibles efectos crónicos.

Anteriormente varios autores han realizado algunos trabajos en la misma área de estudio, como el trabajo realizado por Vasconcelos en 2010 en el que detectaron 4.9 µg/L, Arzate y colaboradores en 2010 detectaron 3.55 µg/L y en 2008, Arzate detectó 3.47 µg/L lo cual puede coincidir con el resultado obtenido en este trabajo, no obstante es importante repetir este análisis incluyendo diferentes diluciones del extracto para poder encontrar con mayor precisión la concentración de microcistinas en el área de estudio.

9.4. Determinación de Microcistina-LR por el método de HPLC

La concentración de microcistina-LR del extracto crudo concentrado elaborado a partir del florecimiento cianobacteriano nocivo de la Pista Olímpica analizada por el método de HPLC fue de 1646 µg/g de biomasa liofilizada, lo cual es menor en comparación con otros trabajos, como los realizados por Molina y colaboradores en 2005, en el que encontraron concentraciones de 3230 y 2647 µg/g microcistina-LR en biomasa liofilizada obtenida del río Guadiana, Portugal.

Atencio y colaboradores en 2008 determinaron una concentración de 2885 µg/g en el mismo sitio de estudio a pesar de que *Microcistis aeruginosa* era la especie dominante en ambos casos. Mientras que Ramírez y colaboradores en 2004, pudieron detectar una concentración de 3761 µg de Microcistina-LR por gramo de biomasa liofilizada en Valle de Bravo, México durante junio del 2001.

A pesar de que se tienen reportes de que varias de las especies de cianobacterias presentes en florecimientos cianobacterianos nocivos se asocian a la presencia de microcistinas en el agua, recientemente se ha llegado a la conclusión de que la variabilidad genética es un factor muy importante que determina la capacidad productora de toxinas en el organismo (Moreira *et al.*, 2014, Saker *et al.*, 2007), pudiendo encontrarse cepas de cianobacterias de la misma especie con genotipos productores de microcistinas en un florecimiento (Puddick *et al.*, 2014, Kim *et al.*, 2015), aunado a esto, la proporción de las diferentes cepas varía en función de las condiciones ambientales temporales (Sabour *et al.*, 2005).

Como se ha demostrado en trabajos realizados anteriormente (Sevilla *et al.*, 2006, Martín *et al.*, 2002, Dittmann & Börner, 2005) las microcistinas son polipéptidos de

origen no ribosomal que se sintetizan gracias a proteínas péptido sintetasas, las cuales se originan por el cluster *mcy* (Puddick *et al.*, 2014, Dittmann & Börner, 2005, Arzate, 2008). Es decir la presencia o ausencia del cluster *mcy* determina la síntesis de dicha toxina, no obstante varios factores ambientales también influyen en la producción de microcistinas como la concentración de hierro en el agua, la concentración de sales, la alta incidencia lumínica y la presencia de depredadores, sin embargo no se conocen muchos detalles acerca de ello (Sevilla *et al.*, 2006, Dittmann & Börner, 2005).

9.5. Bioensayo de toxicidad subcrónica con *A. mexicanum*

Según el análisis estadístico realizado a partir del registro de talla y peso de los individuos con los que se llevó a cabo este estudio (Figuras 16 y 17) no se encontraron evidencias que demostraran que la administración diaria de 20 µg de microcistina-LR en los pellets elaborados con las células cianobacterianas liofilizadas afecten el desarrollo de *A. mexicanum*, sin embargo se debe tomar en cuenta que el tiempo de duración de este ensayo fue un mes menor que el estudio realizado por Bury y colaboradores en 1995, en el que hallaron diferencias significativas en el crecimiento de truchas que estuvieron expuestas a concentraciones de 41-57 µgMC-LR durante 63 días; considerando que los efectos crónicos de microcistina-LR varía a nivel interespecífico (Prieto *et al.*, 2008, Atencio *et al.*, 2008).

Durante el tiempo en el que se llevó a cabo el bioensayo de toxicidad, algunos individuos mostraron signos más graves de intoxicación a microcistina-LR que otros, como movimientos erráticos e incapacidad para comer, esto se debe a que algunos factores como la edad, el sexo, la nutrición, el estrés y el fondo genético de cada individuo puede influir en su resistencia a algún contaminante (Vega, 2008).

A pesar de que este trabajo se enfocó en describir algunos efectos histopatológicos de microcistina-LR en hígado, riñón y branquias de *A. mexicanum* debido a que dichos órganos se involucran en el proceso de desintoxicación de esta cianotoxina (Zhang *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2013, Hou *et al.*, 2015, Molina *et al.*, 2005); vale la pena resaltar que durante los primeros días del ensayo de toxicidad la consistencia de los excrementos producidos por los individuos del tratamiento experimental tenían menor firmeza y mayor mucosidad que los individuos del tratamiento control (Figura 13), lo cual podría indicar posibles efectos en el sistema digestivo (Barragan *et al.*, 2007), dicha observación concuerda con los resultados de Djediat y colaboradores en 2010, en el que reportaron pérdida de la membrana basal en varias regiones del intestino delgado, hiperplasia de células caliciformes, necrosis y apoptosis de los enterocitos en peces medaka (*Orizyas latipes*) después de administrarles 5 µg de microcistina-LR por gramo de individuo por vía oral, por lo que se debe considerar analizar el tracto digestivo de los individuos.

9.6. Efectos de microcistina-LR en hígado de *A. mexicanum*

El hígado es un órgano de gran importancia en vertebrados, ya que además de realizar varias funciones metabólicas importantes, cumple un papel muy relevante en la acumulación, biotransformación y excreción de un amplio rango de contaminantes (Ross & Pawlina, 2006, León, 2016). La entrada de microcistinas a los hepatocitos se da gracias a su unión con proteínas transportadoras de aniones orgánicos que se encuentran en los ácidos biliares (Dias *et al.*, 2009)

La estructura histológica básica del hígado de *A. mexicanum* no es común al resto de los vertebrados, sin embargo sigue un patrón morfológico similar a otras especies de anfibios del orden caudata (Bernabò *et al.*, 2014, Xie *et al.*, 2011, Demircan *et al.*, 2016).

En el hígado de los individuos del tratamiento experimental que fueron sacrificados tanto en el día 24 como el día 30 (Figuras 19 y 20), se pudieron identificar algunas alteraciones estructurales como esteatosis, hipertrofia del tejido hematopoyético, pérdida de la arquitectura hepática y necrosis, además se observó respuesta inflamatoria y proliferación de melanomacrófagos, todas estas alteraciones han sido identificadas en varios trabajos en los que se les ha atribuido dichos efectos a Microcistina-LR (Atencio *et al.*, 2008, Carvalho *et al.*, 2016, Hou *et al.*, 2015, Moreno *et al.*, 2003, Molina *et al.*, 2005).

De acuerdo a la figura 15, el hígado de los individuos del tratamiento experimental que fueron sacrificados tanto en el día 24 como el día 30, adquirieron una coloración amarillenta en comparación con el hígado de los individuos del tratamiento control que eran rosados tanto los que fueron sacrificados en el día 24 como en el día 30 del experimento, este cambio de tonalidad en dicho órgano se observó en el trabajo realizado por Molina y colaboradores en 2005 después de administrarle a tilapias 60 µg de microcistina-LR por vía oral diariamente durante 14 y 21 días.

El cambio de coloración del hígado corresponde a esteatosis y consiste en la aparición de vacuolas lipídicas dentro de los hepatocitos. Atencio y colaboradores (2008) le atribuyen este cambio estructural a la alteración de funciones metabólicas de la célula, provocando desequilibrio entre la tasa de síntesis de sustancias lipídicas y la velocidad de su liberación hacia el torrente sanguíneo. La esteatosis es un estado fisiológico que puede revertirse si el factor que la estimula cesa, pero si continua, la célula afectada alcanza un punto de no retorno y muere (Kumar *et al.*, 2010).

Algunos autores como Hou y colaboradores en 2015 han concluido que la microcistina-LR causa efectos dosis-dependiente en exposiciones agudas debido a que encontraron

esteatosis hepática en pez cebra después de administrarle una dosis de 50 µg/kg de microcistina-LR por vía intraperitoneal, sin embargo, al administrarles una dosis de 200 µg/kg detectaron necrosis. En exposiciones crónicas el daño puede llegar a ser progresivo, como lo reportaron Molina y colaboradores en 2005, que administraron de manera sub-crónica 60 µg de microcistina-LR por vía oral diariamente durante 14 y 21 días en tilapias, encontrando a los 14 días esteatosis, pero en el día 21 encontraron necrosis severa de los hepatocitos además de abundantes hemorragias. Por otro lado, Zhang y colaboradores en 2013 pudieron demostrar daño oxidativo en *Rana nigromaculata* después de exponerla de manera sub-crónica por inmersión a 1 µg/L de microcistina-LR durante 7 días, encontrando células TUNEL positivas en muestras de hígado, por lo que el daño observado en el hígado de *A. mexicanum* también podría deberse a apoptosis.

Los resultados obtenidos en este trabajo varían a los resultados reportados por los autores anteriormente citados, debido a que en el hígado de los individuos que fueron sacrificados el día 24 del bioensayo (Figura 19) se identificó necrosis severa de los hepatocitos, en cambio en el hígado de los individuos sacrificados el día 30 se encontró esteatosis, no obstante cabe destacar que también se observó la proliferación y agrupación de melanomacrófagos, células indicadoras de inflamación crónica como linfocitos e hipertrofia del tejido hematopoyético, por lo que se plantea en este trabajo que la respuesta inmunológica cumple un papel clave en la protección contra microcistina-LR.

Los centros melanomacrófagos son agrupaciones de macrófagos, estas células son el equivalente a las células de Kupffer en hígado de mamíferos debido a que cumplen las mismas funciones. Además se observaron neutrófilos y monocitos que forman parte de la respuesta inmune innata (Agius & Roberts, 2003), poseen la capacidad de reconocer patógenos, toxinas y restos celulares para fagocitarlos, se ha reportado su presencia en algunos órganos como hígado, riñón y bazo y su presencia puede indicar inflamación aguda (Gallone *et al.*, 2002).

Los melanomacrófagos poseen pigmentos como melanina, lipofuscina y hemosiderina los cuales se cree que son utilizados para neutralizar radicales libres, por lo que se considera que su proliferación también puede ser indicador de daño oxidativo (Agius & Roberts, 2003, Gallone *et al.*, 2002). Además de la función fagocitaria, los melanomacrófagos pueden liberar interleucinas que atraen linfocitos y estos a su vez llevan a cabo la respuesta inmunológica específica (Agius & Roberts, 2003).

Agius y Roberts en 2003 mencionan que la observación de una mayor abundancia de centros melanomacrófagos en hígado y bazo son indicadores de estrés ambiental, por lo

que la medición del tamaño y abundancia de dichos complejos puede servir como un bioindicador de contaminación ambiental.

La detección de centros melanomacrófagos dentro del tejido hepático se ha observado en varios trabajos en los cuales se les atribuye su presencia a la toxicidad producida por microcistina, como en el trabajo realizado por Dyk y colaboradores en 2012, en el que observaron el mismo fenómeno en hígado de peces gato *Clarias gariepinus* recolectados en un lago hipertrófico de Sudáfrica.

Por otro lado Qiao y colaboradores en 2013 encontraron que tras 30 días de administración de dosis orales de 5.64 y 11.28 mg/Kg de microcistina-LR en carpas (*Carassius auratus*), además de provocar proliferación significativa de melanomacrófagos en hígado y bazo, también observaron un fenómeno llamado hormesis, que consiste en la inmunoestimulación o inmunosupresión de la respuesta específica en función de la dosis administrada, provocando un aumento significativo de linfocitos en la dosis más baja, en cambio en la dosis más alta se observó una disminución significativa de linfocitos debido a que la microcistina-LR en altas concentraciones también afecta al tejido hematopoyético, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Djediat y colaboradores en 2010, en el que pudieron inmunolocalizar microcistina-LR dentro de macrófagos con el anticuerpo monoclonal MC10E7 después de administrarle por vía oral una dosis de 5 µg de microcistina-LR en pez medaka.

9.7. Efectos de Microcistina-LR en riñones de *A. mexicanum*

Los riñones son los órganos que se encargan de mantener el nivel de agua del organismo y de desechar sustancias dañinas como sales, amoníaco y varias toxinas como las microcistinas (Ross & Pawlina, 2006).

Sicińska y colaboradores en 2006 mencionan que el proceso de desintoxicación de microcistina-LR consiste en su conjugación con la molécula de glutatión dentro de los hepatocitos, posteriormente el conjugado se transporta hacia los riñones e intestino para su eliminación, sin embargo Schmidt y colaboradores en 2014 reportaron que aún después de unirse la microcistina-LR a glutatión, su capacidad de inhibición de fosfatasa prevalece, pudiendo afectar al riñón.

Como ya se mencionó anteriormente, las microcistinas pueden entrar a los hepatocitos gracias a las proteínas transportadoras de aniones orgánicos, no obstante Hagenbuch y Meier en 2003 han encontrado estas proteínas en riñón humano, lo cual sugiere que la microcistina-LR entra a las células renales de igual manera.

En los riñones de los individuos del tratamiento experimental se observaron algunas alteraciones histopatológicas como degeneración de los túbulos contorneados proximales y distales, nefritis intersticial y dilatación de la capsula de Bowman, además de la observación de depósitos eosinofílicos en el espacio de la capsula de Bowman, los cuales concuerdan con varios estudios realizados en los que les atribuyen dichos daños a la microcistina-LR (Li *et al.*, 2013, Atencio *et al.*, 2008).

Li y colaboradores en 2013 pudieron detectar algunas alteraciones ultraestructurales en riñones de carpa (*Carassius auratus*) después de administrarles una dosis de 200 µg/Kg de microcistina-LR por vía intraperitoneal como la degradación de podocitos en los glomérulos, lo cual podría explicar en este trabajo la razón por la que se observó precipitado eosinofílico en los riñones del tratamiento experimental, ya que los podocitos participan en la filtración de la sangre que pasa por el glomérulo, al degradarse los podocitos; material eosinofílico como proteínas llegan al espacio de la capsula de Bowman. La necrosis del glomérulo que se observó en los individuos del tratamiento experimental que fueron sacrificados el día 24 del ensayo podría corresponder a podocitos y células endoteliales. Cabe resaltar que estas observaciones concuerdan con el trabajo de Atencio y colaboradores en 2008 en el que administraron una dosis de 25 µg de microcistina-LR por vía oral a tencas (*Tinca tinca*) diariamente por 96 horas.

Con respecto a la degeneración y necrosis de los túbulos contorneados observados en este trabajo, Li y colaboradores en 2013 también detectaron este daño en carpas, ya que ellos observaron esteatosis en los riñones de los individuos a los que se les administro una dosis de 50 µg/Kg de microcistina-LR por vía intraperitoneal, en cambio en los individuos a los que se les administro una dosis de 200 µg/Kg de microcistina-LR se pudo observar necrosis de los túbulos contorneados, por lo que los efectos de la microcistina-LR en las células de los túbulos contorneados son similares a los observados en hepatocitos.

La observación de la histología de los riñones de *A. mexicanum* del tratamiento experimental de los individuos sacrificados en el día 24 y el día 30 evidenció nefritis intersticial, este daño no se ha reportado en riñones de algún organismo que haya sido expuesto a microcistina-LR.

9.8. Efectos de microcistina-LR en branquias de *A. mexicanum*.

Las branquias de *A. mexicanum* además de cumplir un papel importante en la respiración, también llevan a cabo funciones relacionadas con el equilibrio osmótico y el deshecho de compuestos tóxicos (Brunelli *et al.*, 2009), sin embargo no se cuenta

con la suficiente información acerca de la estructura histológica de dicho órgano en larvas de urodelos en general (Brunelli *et al.*, 2005, Brunelli *et al.*, 2009).

A pesar de no contar con suficiente información acerca de los efectos histopatológicos de microcistina-LR en branquias de larvas de urodelos, algunos efectos encontrados en este trabajo son parecidos a algunas investigaciones realizadas por otros autores en branquias de peces (Lei *et al.*, 2007, Molina *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2016).

Se sabe que después de llegar al hígado, la microcistina-LR circula libremente por todo el torrente sanguíneo y se distribuye especialmente en los órganos que poseen mayor irrigación sanguínea, esto ya ha sido demostrado anteriormente gracias al trabajo realizado por Lei y colaboradores en 2007, en el que pudieron detectar en carpas concentraciones mayores a 3000 ng de microcistina-LR/g de sangre en peso seco dentro de la primera hora después de administrarles 200 µg/Kg de microcistina-LR por vía intraperitoneal, además encontraron en branquias concentraciones de más de 80 ng de microcistina-LR por gramo de tejido en peso seco.

Según el estudio llevado a cabo por Molina y colaboradores en 2005, en el cual pudieron apreciar hiperemia e hipertrofia de las células epiteliales del tejido lamelar en tilapias a las que se les administraron 60 µg de microcistina-LR diariamente por vía oral durante 28 días, por lo que se podría decir que los efectos observados en las branquias de peces son similares a los encontrados en *A. mexicanum*.

Cabe destacar que en las branquias de *A. mexicanum* igualmente se observó infiltrado inflamatorio como en los órganos anteriormente analizados, coincidiendo con los resultados encontrados por Chen y colaboradores en 2016 en el que pudieron evidenciar infiltración de linfocitos en branquias de peces cebra que fueron expuestos por inmersión a una concentración de 20 µg/L de microcistina-LR durante 30 días.

Es importante señalar que otro fenómeno asociado a la exposición a microcistinas, es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. Wiegand y Flugmacher (2005) mencionan que las microcistinas, pueden también generar enlaces covalentes con enzimas ATPasas dentro de las mitocondrias, interrumpiendo la cadena transportadora de electrones, por consiguiente la acumulación de radicales libres ocasiona que la célula inicie el mecanismo de muerte celular programada o apoptosis, esto ya ha sido comprobado anteriormente gracias al trabajo realizado por Brzusan y colaboradores en 2009, en el que administraron una dosis de 100 µg/Kg de microcistina-LR por vía intraperitoneal en peces lavareto (*Coregonus lavaretus*), 72 horas después de la intoxicación pudieron detectar RNAm que codifica para las proteínas p53 y Bcl-2 en hígado, los cuales son conocidos por ser indicadores de apoptosis.

De acuerdo a las descripciones ultraestructurales de las branquias de larvas de *Salamandrina terdigitata* y *Triturus carnifex* realizadas por Brunelli y colaboradores en

2009, tanto las células en forma de pera, como las células ciliadas del epitelio lamelar contienen una gran cantidad de mitocondrias, lo que sugiere que dichas células cumplen importantes funciones de intercambio activo de iones con el medio exterior, por consiguiente la detección de cuerpos apoptóticos en las branquias de los individuos utilizados en este trabajo posiblemente se deba a los efectos ocasionados por la administración de microcistina-LR, sin embargo es necesario realizar más estudios al respecto.

10. CONCLUSIONES

Se determinó a *Microcystis* como el género de cianobacteria dominante en el florecimiento cianobacteriano nocivo detectado en la Pista Olímpica de Remo y Canotaje Virgilio Uribe en mayo del 2016 con cuatro especies determinadas.

Algunos parámetros fisicoquímicos del agua como la alta alcalinidad, alta temperatura, elevado pH y una mayor concentración de fosfatos favorecen el desarrollo de un florecimiento cianobacteriano nocivo constituido por *Microcystis*.

La concentración de microcistina-LR del área de estudio superó el límite máximo permisible de 1 µg/L establecido por la OMS para el agua potable, sin embargo no supero el limite establecido para el agua de recreación de 10 µg/L, por lo que no hay riesgo de intoxicación aguda por contacto con el agua de la pista.

No se encontraron evidencias que demostraran que la administración oral diaria de 20 µg de microcistina-LR durante 30 días afecte la talla y el peso a corto plazo de *Ambystoma mexicanum* en etapa de larva inmadura.

La administración subcrónica de 20 µg de microcistina-LR por vía oral en *Ambystoma mexicanum* durante 24 días ocasiono necrosis severa multifocal de hepatocitos y perdida de la capa hematopoyética en hígado, necrosis tubular y glomerular multifocal severa en riñón y branquitis hemorrágica y necrotica en branquias, sin embargo a los 30 días algunos organismos presentaron daños menos severos como esteatosis del parénquima hepático y en riñón perdida de la cápsula glomerular debido a diferencias en el fondo genético de cada individuo.

La detección de cuerpos apoptóticos en las branquias de los individuos a los que se les administró una dosis diaria de 20 µg de microcistina-LR por vía oral durante 24 días evidenció daño oxidativo.

La pérdida de tejido hematopoyético en el hígado de los individuos a los que se les administró una dosis diaria de 20 µg de microcistina-LR durante 24 días y la fuerte respuesta inmunológica observada en el hígado de individuos a los que se les administró la misma dosis durante 30 días evidenció el fenómeno de hormesis.

11. PERSPECTIVAS

Es de gran importancia tomar este trabajo como una base sólida a partir del cual pueden originarse futuros estudios relacionados a la toxicidad de la microcistina-LR en anfibios, ya que la cada vez más frecuente aparición de florecimientos cianobacterianos nocivos en varios lagos del país podría contribuir a la desaparición de varias poblaciones de anfibios.

Es necesario llevar a cabo un análisis cuantitativo en las muestras de hígado en función del área de los centros melanomacrofagos, ya que pueden servir como un bioindicador de contaminación ambiental.

Es importante realizar una descripción histológica del sistema digestivo de *A. mexicanum*, debido a que en este trabajo se encontraron evidencias que indican posible daño a este sistema.

Para futuros trabajos se sugiere complementar el análisis histológico con técnicas enzimática y/o moleculares, para poder apreciar un panorama más amplio acerca de los efectos nocivos de microcistina-LR en *A. mexicanum* en diferentes etapas de su ciclo de vida.

Es de gran importancia elaborar técnicas inmunohistoquímicas como la prueba de detección de células TUNEL y la inmunolocalización de microcistina-LR.

Se sugiere llevar a cabo un estudio de la sangre de individuos intoxicados con microcistina-LR, ya que podría ser un indicador confiable de toxicidad.

12. LITERATURA CITADA

- Agius, C. Roberts, J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*. 26: 499-509.
- Aguilar, M. Casas, A. 2005. *Ambystoma mexicanum* Shaw, 1789. CONABIO. México. DF.
- Aguilar, M. Casas, A. Cárdenas, R. Cantellano, E. 2009. Análisis espacial y conservación de los anfibios y reptiles del estado de México. *Ciencia Ergo sum*. (16)2: 171-180.
- Alcocer, J. Lugo, A. Vilaclara, G. Sánchez, R. Chávez, M. 2007. Los Lagos de Chapultepec, Ciudad de México. De la Lanza, E. (Comp.) Hernández, S. (Col.). AGT. Editor, S.A. México. 113-124.
- Amateco, F. 2011. Composición del fitoplancton del lago de Catemaco, Veracruz, México. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Angulo, A. Rueda-Almonacid, J. Rodríguez-Mahecha, J, La Marca, E. 2006 Técnicas de inventario y monitoreo para los anfibios de la región tropical andina. Conservación internacional. Panamericana formas e impresos. Bogotá.
- Arzate, M. 2008. Detección de cianobacterias toxígenicas pertenecientes al género *Microcystis* mediante marcadores moleculares y ensayos biológicos. Tesis de maestría. IPN. 69pp.
- Arzate, M. Olvera, R. Martínez, F. 2010. *Microcystis* toxigenic strains in urban lakes: a case of study in Mexico City. *Ecotoxicology*. 19: 1157-1165.
- Atencio, L. Moreno, I. Jos, A. Moyano, R. Blanco, A. Cameán, A. 2008. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. *Toxicon*. 52: 1-12.
- Atencio, L. Moreno, I. Prieto, A. Moyano, R. Molina, A. Cameán, A. 2008. Acute Effects of Microcystins MC-LR and MC-RR on Acid and Alkaline Phosphatase Activities and Pathological Changes in Intraperitoneally Exposed Tilapia Fish (*Oreochromis sp.*). *Toxicologic pathology*. 36: 449-458.
- Backer, L. McNeel, S. Barber, T. Kirkpatrick, B. Williams, C. Irvin, M. Zhou, Y. Johnson, T. Nierenberg, K. Aubel, M. LePrell, R. Chapman, A. Foss, A. Corum, S. Hill, V. Kieszak, S. Cheng, Y. 2010. Recreational exposure to microcystins during algal blooms in two California lakes. *Toxicon*. 55: 909-921.

- Banister, M. Widdifield, S. 2014. The debut of “modern water” in early 20th century Mexico City: the Xochimilco potable waterworks. *Journal Historical Geography*.46:30-52.
- Barreiro, A. Vasconcelos, V. 2014. Interactions between allelopathic properties and growth kinetics in four freshwater phytoplankton species studied by model simulations. *Aquatic Ecology*. 48: 191-205.
- Barragan, L. Duarte, W. Mocha, P. 2007. Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux 411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista colombiana de ciencias pecuarias*. 20: 431- 446.
- Benítez, J. González, M. 2016. Manual de técnica histológica. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. En prensa.
- Bermúdez, J. Sánchez, G. Fuenmayor, G. Morales, E. 2003. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de pigmentos de la microalga marina *Chroomonas* sp. *CIENCIA*. 11(4): 265-269.
- Bernabò, I. Biasone, P. Macirella, R. Tripepi, S. Brunelli, E. 2014. Liver histology and ultrastructure of the Italian newt (*Lissotriton italicus*): normal structure and modifications after acute exposure to nonylphenol ethoxylates. *Experimental and Toxicologic Pathology*.
- Bernard, C. 2014. Les cyanobacteriés et leur toxines. *Revue Francophone de Laboratoires*. 460:53-68.
- Bonilla, S. 2009. Cianobacterias planctónicas del Uruguay, manual para la identificación y medida de gestión. UNESCO. Uruguay. 96 pp.
- Bosch, J. 2003. Nuevas amenazas para los anfibios: enfermedades emergentes. Museo Nacional de Ciencias Naturales. 16: 56-73.
- Brunelli, E. Tripepi, S. 2005. Effects of low pH acute exposure on survival and gill morphology in *Trirurus italicus* larvae. *Journal of experimental zoology*. 303: 946-957.
- Brunelli, E. Sperone, E. Maisano, M. Tripepi, S. 2009. Morphology and ultrastructure of the gills in two Urodela species: *Salamandrina terdigitata* and *Triturus carnifex*. *Italian Journal of Zoology*. 76(2): 158-164.
- Brzuzan, P. Wozny, M. Ciesielski, S. Luczynski, M. Góra, M. Kuzminski, H. Dobosz, S. 2009. Microcystin-LR induced apoptosis and mRNA expression of p53 and cdkn1a in liver of whitefish (*Coregonus lavaretus* L.). *Toxicon*. 54: 170-183.

- Bury, N. Eddy, F. Codd, G. 1995. The effects of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR, and ammonia on growth rate and ionic regulation of brown trout. *Journal of Fish Biology*.46: 1042-1054.
- Carlson, B. 1982. The regeneration of Axolotl limbs covered by frog skin. *Developmental biology*. 90:435-440.
- Carvalho, G. Oliveira, V. Vasconcelos, N. Pereira, A. Moraes, R. Azevedo, S. Pereira, K. Santos, S. Araujo, W. 2016. Pulmonary and hepatic injury after sub-chronic exposure to sublethal doses of microcystin-LR. *Toxicon*. 112: 51-58.
- Casas, G. Cruz, R. Aguilar, X. 2004. Un regalo poco conocido de México al mundo: el ajolote o axolotl (*Ambystoma*: Caudata: Amphibia). *Revista Científica Multidisciplinaria de la Universidad Autónoma del Estado de México*. 10 (3):304-308.
- Chapa, C. Guerrero R. 2001 Eutrofización: abundancia que mata. ¿Cómo ves? 23-25.
- Chávez-López, C. Blanco-Jarvio. A. Luna-Guido, M. Dendooven, L. Cabirol, N. 2011. Removal of methyl parathion from a chinampa agricultural soil of Xochimilco México: A laboratory study. *European Journal of Soil Biology*.47: 264-269.
- Chen, L. Chen, J. Zhang, X. Xie, P. 2016. A review of reproductive toxicity of microcystins. *Journal of Hazardous Materials*.301: 381-399.
- Chen, Ch. Liu, W. Li, L. Chen, Y. Jin, J. Kawan, A. Zhang, X. 2016. Pathological damage and immunomodulatory effects of zebrafish exposed to microcystin-LR. *Toxicon*. 118: 13-20.
- Chorus, I. Bartram, J. 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. Routledge. London. P.p 400.
- Chu, Z. Jin, X. Jang, B. Zheng, Q. 2007. Buoyancy regulation of *Microcystis flos-aquae* during phosphorus-limited and nitrogen-limited growth. *Journal of Plankton research*. 29(9): 739-745.
- CICEANA. 2014. Disponible el 11/8/2016. WWW. ciceana.org.mx.
- CMM. 2007. Inventario de gases de efecto invernadero en Baja California. Disponible el 11/8/2016 <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/gl/lucfspan.html>.
- Collins, J. Storer, A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and distributions*.9: 89-98.
- Cortes, R. 1998. Las mareas rojas. AGT, Editor, S.A. Mexico, DF. P.p 25.

- Codd, G. 2000. Cyanobacterial toxins, the perceptions of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*. 16: 51-60.
- CONABIO. 2000 Estrategia nacional sobre biodiversidad en México. México, DF.
- CONABIO. 2011. Fichas de especies prioritarias. Ajolote mexicano (*ambystoma mexicanum*). Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.
- Contreras, V. Martínez, E. Valiente, E. Zambrano, L. 2009. Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biological conservation*. 142:2881-2885.
- Cronberg, G. annadotter, H. 2006. Manual on aquatic cyanobacteria a photo guide and a synopsis of their toxicology. Danmark. Francia.
- Dermican, T. Elif Ilhan, A. Aytürk, N. Yildirim, B. Öztürk, G. Keskin, I. 2016. A Histological atlas of the tissues and organs of neotenic and metamorphosed axolotl. *Acta Histochemica*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2016.07.006>.
- Dias, E. Andrade, M. Alverca, E. Pereira, P. Batoréu, M. Jordan, P. Silva, M. 2009. Comparative study of the cytotoxic effect of microcystin-LR and purified extracts from *Microcystis aeruginosa* on a kidney cell line. *Toxicon*. 53: 487-495.
- Dittmann, E. Börner, T. 2005. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicology and applied pharmacology*. 203: 192-200.
- Djediat, C. Malécot, M. Luze, A. Bernard, C. Puiseux-Dao, S. 2010. Localization of microcystin-LR in medaka fish tissues after cyanotoxin gavage. *Toxicon*. 55: 531-535.
- Dyk, D. Cochrane, M. Wagenaar 2012. Liver histopathology of the sharptooth catfish *Glarias garipepinus* as a biomarker of aquatic pollution. *Chemosphere*. 87: 301-311.
- Estrada, R. 2015. El ajolote *Ambystoma mexicanum*: su manejo y reproducción en cautiverio (Amphibia: Urodela: Ambystomatidae). Tesis de licenciatura. UNAM. P.p 64.
- Fernandes, H. 2011. A “Tragédia da hemodiálise” 12 anos depois: poderia ela ser evitada?. Tesis de doctorado. RECIFE. P.p 167.
- Figueroa, M. Linares, F. Ferrara, M. Castro, J. 2014. Manejo integral de la cuenca de Xochimilco y sus afluentes. Universidad Nacional Autónoma Metropolitana.

- Figuroa-Torres, M. Arana-Magallón, F. Almanza-Encarnación, S. Ramos-Espinoza, G. Ferrara-Guerrero, J. 2015. Microalgas del Área Natural Protegida Ejidos de Xochimilco y San Gregorio Atlapulco, México. *Ciencia UAT*. 9(2): 15-29.
- FMC. 2016. Disponible el 30/11/2016. <http://fmcanotaje.org/inicio/pista-olimpica/>.
- Gama, J. Pavon, E. Ramírez y T. Ángeles, O. 2010. Análisis de calidad del agua, Relación entre factores bióticos y abióticos. UNAM. México 74 pp.
- Galanti, L. Amé, M. Wunderlin, D. 2013. Accumulation and detoxification dynamic of cyanotoxins in the freshwater shrimp *Palaemonetes argentinus*. *Harmful algae*. 27: 88-97.
- Gallone, A. Guida, G. Maida, I. Cicero, R. 2002. Spleen and liver pigmented Macrophages of *Rana esculenta* L. a new melanogenic system?. *Pigment Cell RES*. 15: 32-40.
- Garduño, G. Oliva, G. Ortega, M. 2009. Algas En: La diversidad Biológica del Estado de México. Estudio de Estado. Ceballos, G. Garduño, G. López, R. Muñozcano, M. Collado, E. San Román, J. (Compiladores). Conabio. Secretaria de Ecología del Estado de México. Pp 62-153.
- Garza, G. Schteingart, M. 2010. Los grandes problemas de México, Desarrollo urbano y regional. V2. El colegio de México A.C. México DF. P.p 657.
- Gaytán, M. Martínez, V. Oliva, G. Duran, A. Ramírez, P. 2011. Temporal variation of phytoplankton from the tropical reservoir Valle de Bravo, México. *Journal of Environmental Biology* .32(1): 117-126.
- González, A. Prado, E. León, M. Guarner, V. Cano, A. 2005. Regeneración miocárdica en *Ambystoma mexicanum* después de la lesión quirúrgica. *Archivos de cardiología de México*. 3:21-29.
- González, M. Servín, Z. 2014. Manual Básico para el cuidado en cautiverio del ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*). 1ª Ed. México: Instituto de Biología. UNAM.
- Gugger, M. Lenoir, S. Berger, C. Ledreux, A. Druart, J. Humbert, J. Guette, C. Bernard, C. 2005. First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon*. 45: 919-128.
- Guiry, M. Guiry, M. 2015. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; consultado el 10 de noviembre del 2015.

- Guzmán-Guillén, R. Gutiérrez-Praena, D. Risalde, M. Moyano, R. Prieto, A. Pichardo, S. Jos, A. Vasconcelos, V. Cameán, A. 2014. Immunohistochemical approach to study Cylindrospermopsin distribution in tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different exposure conditions. *Toxins*. 6: 283-303.
- Hagenbuch, B. Meier, P. 2003. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1609: 1-18.
- Hanken, J. 1999. Larvae in amphibian development and evolution, The origin and evolution of larval forms. Academic press. U.S.A. P.p 61-108.
- Hernández, A. 2014. Evaluación de la comunidad fitoplanctónica en presencia de *Poecilia reticulata*, Peters, 1859 (Pisces: POECILIDAE) bajo condiciones de mesocosmos en un lago hipertrófico. Tesis de licenciatura. UNAM.
- Hernández, R. 2012. Kinasas y fosfatasa: el yin y el yan de la vida. *Revista habanera de ciencias médicas*. 11 (1): 15-24.
- Hoeger, S. Hitzfeld, B. Dietrich, D. 2005. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203: 231-242.
- Hou, J. Li, L. xue, T. Long, M. Su, Y. Wu, N. 2015. Hepatic positive and negative antioxidant responses in zebrafish after intraperitoneal administration of toxic microcystin-LR. *Chemosphere*. 120: 729-736.
- INEGI. 2015. Crecimiento poblacional en México. Disponible el 18/12/2015 en URL: http://cuéntame.inegi.org.mx/población/rur_urb.aspx?tema=P.
- Kim, I. Huong, G. Kim, S. Jang, A. 2015. Qualitative analysis of the most toxic and abundant microcystins variants (LR, RR and YR) by using LCMS-IT-TOF. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 29: 375-381.
- Komárek, J. Komárková, J. 2002. Contribution to the knowledge of planktic cyanoprokaryotes from central México. *Preslia, Praha*. 74: 207-233.
- Kumar, V. Abbas, A. Fausto, F. Aster, J. 2010. Patología estructural y funcional 8^{va} Ed. Elsevier. Inc. España. P.p 1462.
- Lago, L. Barca, S. Vieira-Lanero, R. Cobo, F. 2015. Características ambientales, composición del fitoplancton y variación temporal de microcistina-LR disuelta en el embalse de As Forcadas (Galicia. NW España). *Limnetica*. 34(1): 187-204.

- Ledesma, C. Bonansea, M. Rodríguez, C. Sánchez, A. 2013. Determinación de indicadores de eutrofización en el embalse Río Tercero, Córdoba Argentina. *Revista Ciencia Agronomica*. 44(3): 419-425.
- Ledreux A. Thomaseau, S. Catherine, A. Duval, C. Yéprémian, C. Marie, A. Bernard, C. 2010. Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body. *Harmful Algae*. 10:88-97.
- Lei, H. Xie, P. Chen, J. Liang, G. Dai, M. Zhang, X. 2008. Distribution of toxins in various tissues of crucian carp intraperitoneally injected with hepatotoxic microcystins. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(5): 1167-1174.j
- León, A. 2016. Evaluación histológica y de la función mitocondrial del hígado en ratones deficientes en el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). Tesis de licenciatura. UNAM.
- Li, L. Xie, P. Lei, H. Zhang, X. 2013. Renal accumulation and effects of intraperitoneal injection of extracted microcystins in omnivorous crucian carp (*Carassius auratus*). *Toxicon*. 70: 62-69.
- Londoño, C. 2006. Los recursos naturales y el medio ambiente en la economía del mercado. *Revista científica Guillermo de Ockham*. 4(1):25-42.
- López, H. Lira, I. 2001. Heterocronía y evolución. *Contactos*. 41: 47-50.
- Mancera, J. Vidal, L. 1994. Florecimiento de microalgas relacionado con mortandad masiva de peces en el complejo lagunar Ciénaga Grande de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Anales del instituto de investigaciones marinas de Punta Betin*. 23:103-117.
- Marco, A. 2002. Contaminación global por nitrógeno y declive de anfibios. *Revista española de herpetología*. 7-109.
- Marco, A. 2003. Impacto de radiación ultravioleta y contaminación en anfibios. Consejo superior de investigaciones científicas. 16:44-55.
- Martín, B. Hernández, J. López, S. Ángel, L. Bes, M. Fillat, M. Peleato, L. 2002. Estudios de homología entre regiones del operón *mcy* de *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 y muestras procedentes de La Estanca de Alcañiz (Teruel). *Rev. Real Academia de Ciencias. Zaragoza*. 57: 231-239.
- Maya, P. 2002. Estudio histopatológico de algunas enfermedades y lesiones en la colonia de ajolotes (*Ambystoma mexicanum*) del laboratorio de herpetología de la FES Iztacala. Tesis de Licenciatura. UNAM.

- Mazzeo, N. Clemente, J. García-Rodríguez, F. Gorga, J. Kruk, C. Larrea, D. Meerhoff, M. Quintans, F. Rodríguez-Gallego, L. Scasso, F. 2002. Eutrofización: Causas, consecuencias y manejo. En: Domínguez, A. Prieto, R. Perfil Ambiental, Nordan-Comunidad. Montevideo. P.p 39-55.
- Metcalf, J. Hyestrand, P. Beattie, K. Codd, G. 2000. Effects of physicochemical variables and cyanobacterial extracts on the immunoassay of microcystin-LR by two ELISA kits. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 523-538.
- Mezhoud, K. Praseuth, D. Puisseux-Dao, S. François, J. Bernard, C. Edery, M. 2008. Global quantitative analysis of protein expression and phosphorylation status in the liver of the medaka fish (*Oryzias latipes*) exposed to microcystin-LR I. Balneation study. *Aquatic toxicology*. 86: 166-175.
- Molina, R. Moreno, I. Pichardo, S. Jos, A. Moyano, R. Monterde, J. Cameán A. 2005. Acid and alkaline phosphatase activities and pathological changes induced in Tilapia fish (*Oreochromis sp.*) exposed subchronically to microcystins from toxic cyanobacterial blooms under laboratory conditions. *Toxicon*. 46: 725-735.
- Molina, V. 2009. El ajolote de Xochimilco. *Ciencias*. 98: 54-59.
- Mora-Navarro, R. Vázquez-García, A. Vargas-Rodríguez, Y. 2004. Ordenación de comunidades de fitoplancton en el lago de Chapala, Jalisco-Michoacán, México. *Hidrobiológica*. 14(2): 91-103.
- Moreno, I. Molina, R. Jos, A. Picó Y. Cameán, A. 2005. Determination of microcystins of fish by solvent extraction, and liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1080: 199-203.
- Moreno, D. Quintero, J. López, A. 2010 Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia. *Contactos*. 78:25-33.
- Moreno, I. Repetto, G. Cameán, A. 2003. Interés toxicológico de las microcistinas. *Revista de Toxicología*. 20 (3): 159-165.
- Moreira, C. Ramos, V. Azevedo, J. Vasconcelos, V. 2014. Methods to detect cyanobacteria and their toxins in the environment. *Appl Microbiol Biotechnol*. DOI: 10.1007/s00253-014-5951-9.
- Nogueira, I. Lobo-da-Cunha, A. Vasconcelos, V. 2006. Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanobacteria) ingestion on *Daphnia magna* midgut and associated diverticula epithelium. *Aquatic toxicology*. 80: 194-203.
- Oliva-Martínez, G. Godínez-Ortega, J. Zuñiga-Ramos, C. 2014. Biodiversidad de fitoplancton de aguas continentales en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85:54-61.

- Oliva, G. Rodríguez, A. Lugo, A. 2008. Composición y dinámica del fitoplancton en un lago urbano hipertrófico. *Hidrobiologica*. 18(1): 1-13.
- Olvera-Ramírez, R. Centeno-Ramos, C. Martínez-Jerónimo, F. 2010. Toxic effects of *Pseudanabaena tenuis* (Cyanobacteria) on the cladocerans *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. *Hidrobiologica*. 20(3): 203-212.
- OMS, 2006. Guías para la calidad del agua potable, Suiza. P. 127.
- Ortiz, A. Moeller, C. Sánchez, J. Bravo, J. 2012. Cianobacterias y cianotoxinas en el Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Revista de ingeniería y ciencias ambientales: Investigación, desarrollo y práctica*. 5(2) 93-101.
- Ortuño, I. Díaz, J. 2004. Anfibios: Centinelas de la biodiversidad. *Ciencia y desarrollo*. 30 (178): 6-13.
- Osswald, J. Carvalho, A. Claro, J. Vasconcelos, V. 2008. Effects of cyanobacterial extracts containing anatoxin-a and of pure anatoxin-a on early developmental stages of carp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72: 473-478.
- Papadimitriou, T. Kagalou, I. Stalikas, C. Pilidis, G. Leonardos, I. 2012. Assessment of microcystin distribution and biomagnification in tissues of aquatic food web compartments from a shallow lake and evaluation of potencial risk to public health. *Ecotoxicology*. 21: 1155-1166.
- Parra-Olea, G. Flores-Villela, O. Mendoza-Almeralla, C. 2014. Biodiversidad de anfibios en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 460 – 466.
- Pereira, S. Vasconcelos, V. Antunes, A. 2013. Computational study of the covalent bonding of microcystins to cysteine residues – a reaction involved in the inhibition of the PPP family of protein phosphatases. *The FEBS Journal*. 280: 674-680.
- Peñaloza, A. 2015. Contaminación. *Revista desarrollo local sostenible*. 5(13): 1-6.
- Pineda-Mendoza, R. Martínez-Jerónimo, F. Garduño-Solórzano, G. Olvera-Ramírez, R. 2011. Caracterización morfológica y molecular de cianobacterias filamentosas aisladas de florecimientos de tres lagos urbanos eutróficos de la ciudad de México. *Polibotánica*. 31: 31-50.
- Pinho, L. Azevedo, J. Brito, A. Santos, A. Tamagnini, P. Vilar, V. Vasconcelos, V. Boaventura, R. 2015. Effect of TiO₂ photocatalysis on the destruction of *Microcystis aeruginosa* cells and degradation of cyanotoxins microcystins-LR and cylindropemopsin. *Chemical Engineering Journal*. 268: 144-152.

- Prieto, A. Atencio, L. Puerto, M. Pichardo S. Jos, A. Moreno, I. Cameán, A. 2008. Efectos tóxicos producidos por las microcistinas en peces. *Revista de Toxicología*.25(3): 22-31.
- Puddick, J. Prinsep, M. Wood, S. Kaufononga, S. Craig, S. Hamilton, D. 2014. High levels of structural diversity observed in microcystins from *Microcystis* CAWBG11 and characterization of six new microcystins congenerers. *Marine Drugs*. 12: 5372-5395.
- Qiao, Q. Liang, H. Zhang, X. 2013. Effect of cyanobacteria on immune function of crucian carp (*Carassius auratus*) via chronic exposure in diet. *Chemosphere*. 90: 1167-1176.
- Ramírez, P. Martínez, E. Martínez, D. Eslava, C. 2004. Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana. *In: Microbiología ambiental*. (Ed. Rosas, I. Cravioto, A. Ezcurra, E.) P.p. 83-105. Secretaria del Medio Ambiente.
- Robles-Mendoza, C. Zúñiga-Lagunes, S. Ponce de León-Hill, C. Hernández-soto, J. Vanegas-Pérez, C. 2011. Esterases activity in the Axolotl *Ambystoma mexicanum* exposed to Chlorpyrifos and its implications to motor activity. *Aquatic Toxicology*. 105: 728-734.
- Roset, J. Aguayo, S. Muñoz, M. 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Revista de Toxicología*. 18:65-71.
- Rositano, J. Newcombe, G. Nicholson, B. Sztajn bok, P. 2001. Ozonation of NOM and algal toxins in four treated waters. *Water research*. 35(1): 23-32.
- Ross, M. Pawlina, W. 2006. *Histología Texto y Atlas a Color con Biología Celular y Molecular*. 5a^{Ed}. Editorial medica Panamericana. Buenos Aires.
- Sabatini, S. Brena, B. Luquet, C. San Julián, M. Pirez, M. Molina, M. 2011. Microcystin accumulation and antioxidant responses in the freshwater clam *Diplodon chilensis patagonicus* upon subchronic exposure to toxic *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental safety*.74: 1188-1194.
- Sabour. B. Loudiki, M. Oudra, B. Vasconcelos, V. Fawzi, B. 2005. Dynamics and toxicity of *Anabaena aphanizomenoides* (Cyanobacteria) Waterblooms in the shallow brackish Oued Mellan Lake (Morocco). *Acuatic Ecosystem Health & Management*. 8(1): 95-104.
- Sabour, B. Loudiki, M. Vasconcelos, V. 2009. Growth responses of *Microcystis ichthyoblabe* Kützing and *Anabaena aphanizomenoides* Forti (Cyanobacteria) under different nitrogen and phosphorus conditions. *Chemistry and Ecology*.25(5): 337-344.

- Saker, M. Welker, M. Vasconcelos, V. 2007. Multiplex PCR for the detection of toxigenic cyanobacteria in dietary supplements produced for human consumption. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 73: 1136-1142.
- Sánchez, R. Oliva, G. Castillo, J. Lugo, A. 2007. Lago urbano del parque Tezozomoc, - distrito Federal. Las aguas interiores de México: conceptos y casos, De la Lanza, G. (comp.) Hernández, S. (Col.). AGT. Editor, S.A. México. 125-139.
- Saqrane, S. Ghazali, I. Ouahid, Y. Hassni, M. Hadrami, I. Bouarab, L. Campo, F. Oudra, B. Vasconcelos, V. 2007. Phytotoxic effects of cyanobacterial extractin the aquatic plant *Lemna gibba*: Microcystin accumulation, detoxication and oxidative stress induction. *Aquatic toxicology*. 83: 284-294.
- Schmidt, J. Wilhelm, S. Boyer, G. 2014. The Fate of Microcystins in the Environment and Challenges for Monitoring. *Toxins*. 6: 3354-3387.
- Seañez, F. 2011. Determinación de microcistinas de *Microcystis* spp. en algunos humedales del municipio de Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. Tesis de licenciatura. UNAM. 36 pp.
- Seifert, A. Madem, M. 2014. New Insights into Vertebrate Skin Regeneration. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 310: 130-163.
- SEMARNAT. 2007. ¿Y el medio ambiente? Problemas en México y en el mundo. Dirección General de Estadística e Información Ambiental. México DF. P.p 192.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación.
- SEMARNAT. 2011. Biodiversidad. Conocer para conservar. Dirección General de Estadística e Información Ambiental. México DF. P.p 38.
- Senent, J. 1973. La contaminación. Salvat editores S.A. Barcelona.
- Sicińska, P. Bukowska, B. Michałowicz, J. Duda, W. 2006. Damage of cell membrane and antioxidative system in human erythrocytes incubated with microcistin-LR in vitro. *Toxicon*. 47: 387-397.
- Smienk, H. Sevilla, E. Peleato, M. Razquin, P. Mata, L. 2007. Validacion de un kit para la detección de microcistinas en el agua. *Alimentaria*. 2: 100-111.
- Serra, P. 1994. Xochimilco arqueológico. Patronato del parque ecológico de Xochimilco A.C. México DF.

- Servín, Z. 2011. Manual de mantenimiento en cautiverio y medicina veterinaria aplicada al ajolote de Xochimilco (*Ambystoma mexicanum*) en el zoológico de Chapultepec. Tesis de licenciatura. UNAM.
- SMA GDF. 2012 Xochimilco. 1ª Ed. México DF.
- Sevilla, E. Martín, B. Bes, M. Fillat, M. Peleato, L. 2006. Estudio de factores que inciden en la formación de la cianotoxina microcistina por *Microcystis Aeruginosa*. *TERUEL*. 91(1): 139-147.
- Tomacini-Ortiz, C. Moeller-Chávez, G. Sánchez, J. Bravo, L. 2012. Cianobacterias y cianotoxinas en el lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Revista AIDIS*. 5(2): 93-101.
- UICN. 2015. <http://www.iucnredlist.org/details/1095/0>.
- Vasconcelos, V. Martins, A. Vale, M. Antunes, A. Azevedo, J. Welker, M. Lopez, O. Montejano, G. 2010. First report on the occurrence of microcystins in planktonic cyanobacteria from central Mexico. *Toxicon*. 56: 425-431.
- Vega, G. 2008. La respuesta immune. *Rev. Fac. Med. UNAM*. 51(3): 128-129.
- Vitt, J, Caldwell, P. 2014. Herpetology An introductory Biology of Amphibians and Reptiles. 4ª Ed. Elsevier inc. China.
- Wetzel, G. Likens, E. 2000. Limnological analyses. 3rd Ed. USA. P.p 429.
- Wiegand, C. Pflugmacher, S. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203: 201-218.
- Xie, Z. Zhong, H. Li, H. Hou, Y. 2011. The structural organization of the liver in the Chinese Fire-bellied Newt. (*Cynops orientalis*). *Int J. Morphol*. 29 (4): 1317-1320.
- Zambrano, G. Reinoso. V, Herrera, G. 2003. Abundancia y estructura poblacional del Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) en los sistema dulceacuícolas de Xochimilco y Chalco. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIBCONABIO proyecto No. AS004. 2003. México D. F.
- Zamora, C. Nandini, S. Sarma, S. 2014. Effect of crude extracts of *Dolichospermum planctonicum* on the demography of *Plationus patulus* (Rotifera) and *Ceriodaphnia cornuta* (Cladosera). *Ecotoxicology*.
- Zamora, C. 2015. Efecto de los extractos crudos de un florecimiento cianobacterial presente en el lago de Texcoco sobre las características demográficas de *Brachionus calyciflorus* (ROTIFERA). Tesis de maestria. UNAM.

- Žegura, B. Sedmak, B. Filipič M. 2003. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon*. 41: 41-48.
- Zhang, H. Cai, C. Fang, W. Wang, J. Zhang, Y. Liu, J. Jia, X. 2013. Oxidative damage and apoptosis induced by microcystin-LR in the liver of *Rana nigromaculata* in vivo. *Aquatic toxicology*. 140-141: 11-18.
- Zhao, Y. Xie, P. Tang, R. Zhang, X. Li, L. Li, D. 2008. In vivo studies on the toxic effects of microcystins on mitochondrial electron transport chain and ion regulation in liver and heart of rabbit. *Comparative Biochemistry and physiology, part C*. 148: 204-210.