



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO *IN VITRO* DE LA SOBREVIVENCIA,
REPRODUCCIÓN Y MORFOLOGÍA DE
DAPHNIA PULICARIA IRRADIADA CON UN
LÁSER DE BAJA ENERGÍA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

FABIOLA ZALDÍVAR ORTIZ

ASESOR:

DR. DANIEL OSORIO GONZÁLEZ

CO-ASESOR:

DR. JOSÉ FERNANDO MÉNDEZ SÁNCHEZ

NOVIEMBRE 2018



Índice de contenido

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1. Generalidades del género <i>Daphnia</i>	4
2.2. Curvas de sobrevivencia	5
2.3. Lavado del efecto epigenético	6
2.4. Efecto de la radiación ionizante en la morfología del género <i>Daphnia</i>	8
2.5. Efecto de la radiación ionizante en la mortalidad y sobrevivencia del género <i>Daphnia</i>	9
2.6. Efecto de la radiación ionizante en la reproducción y fertilidad del género <i>Daphnia</i>	10
2.7. Efecto de la radiación ionizante en el ADN del género <i>Daphnia</i>	10
2.8. Efectos de la radiación no ionizante en tejidos biológicos	11
3. Objetivos	13
3.1. Objetivo general	13
3.2. Objetivos específicos	13
3. Mantenimiento y cultivo de <i>Daphnia pulicaria</i>	14
4. Fundamentos de la radiación electromagnética	18
4.1. Espectro electromagnético y espectro visible	18
4.2. Propiedades ópticas o básicas de la luz	21
4.2.1. Reflexión	21
4.2.2. Transmisión	22
4.2.3. Absorción	23
4.2.4. Efectos de la absorción sobre tejidos biológicos	24
5. Desarrollo del experimento	25
5.1. Radiación	25
5.2. Seguimiento del experimento	26
5.2.1. Condiciones de exposición	26
5.2.2. Sobrevivencia y reproducción	27
5.2.3. Morfología	27
5.2.4. Análisis de datos	28
6. Resultados y discusión	28
6.1. Rango de sobrevivencia	28
6.2. Reproducción	29
6.3. Longevidad	30
6.4. Morfología	30
7. Conclusiones	33

9. Anexos	34
10. Glosario de términos	40
11. Referencias	43

Resumen

Título: Estudio *in vitro* de la sobrevivencia, reproducción y morfología de *Daphnia pulicaria* irradiada con un láser de baja energía

Daphnia es un género de crustáceos que es representativo de las comunidades de agua dulce. Las especies exhiben una alta sensibilidad a una amplia gama de compuestos tóxicos, por lo que se han utilizado internacionalmente como biomonitores en pruebas de toxicidad para evaluar las condiciones de los ecosistemas, como la calidad del agua. También es un género modelo en genética, epigenética y ecología reproductiva. En este trabajo, utilizamos *Daphnia pulicaria* como modelo para medir los efectos de la irradiación con láser de baja energía en las variables de sobrevivencia, reproducción y morfología de los organismos parentales y su descendencia. Utilizamos (1) una sola línea de organismos clon para eliminar la variabilidad genética interindividual; (2) individuos de más de 50 generaciones después de que se estableció la línea de clon, y descendientes de la tercera cría para disipar los efectos maternos y epigenéticos, y (3) neonatos, aquellos individuos de las especies que tienen menos de 48 horas de vida, debido a que es la etapa más sensible a los estímulos ópticos. El mantenimiento de los individuos de *Daphnia pulicaria* durante el experimento se llevó a cabo bajo la norma mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010. Se analizó la sobrevivencia, la longevidad, la edad de la primera reproducción, el número de crías por semana, el número total de crías durante todo su ciclo de vida, la longitud corporal, el tamaño de las antenas y la longitud de la espina apical de la 4ª y la 5ª camada de los individuos irradiados, que fueron expuestos a un estímulo de láser azul de 405 nm durante 25 minutos con una potencia de 40 mW a una distancia de 50 cm, en comparación con los del grupo control (no irradiado). El estudio llevado a cabo para este trabajo de tesis mostró que la irradiación con láser azul de estado sólido (longitud de onda de 405 nm) produjo cambios significativos en la sobrevivencia, reproducción y morfología de *Daphnia pulicaria*. Esta dosis fue letal para el 70% de los individuos irradiados y disminuyó el número total de crías de los individuos sobrevivientes. La morfología se vio afectada en neonatos de la 4ª y 5ª camada de diferentes madres radiadas en donde hubo una disminución en el tamaño del cuerpo, un incremento significativo en la espina apical y una tendencia a reducir el tamaño de las anténulas. Los resultados obtenidos muestran que *Daphnia pulicaria* proporciona un modelo experimental útil y muy sensible para el análisis de los efectos a corto y largo plazo a la exposición de un láser de baja energía.

1. Introducción

Los organismos vivos estamos expuestos diariamente a la radiación solar sin la cual no podríamos realizar los procesos metabólicos más básicos para nuestra existencia. Esta radiación es un factor ecológico fundamental en casi todos los ecosistemas naturales. En el caso particular de los organismos acuáticos, el impacto de dicha radiación es de gran importancia para comprender cómo es que responden al ambiente, ya que altas intensidades de radiación solar son perjudiciales.

Los organismos del género *Daphnia* son de los crustáceos zooplanctónicos con amplia distribución alrededor del mundo, son considerados organismos estándar en experimentos de genética, epigenética y ecología reproductiva. Entre sus características principales se encuentran una buena adaptabilidad a las condiciones del laboratorio, su ciclo reproductivo asexual y su corto periodo de vida (Martínez, *et al.*, 1997). La reproducción asexual, que se realiza mediante partenogénesis, se presenta principalmente cuando las condiciones de desarrollo son las adecuadas, produciéndose entonces camadas exclusivamente de hembras, que pueden a su vez alcanzar la fase reproductiva y continuar reproduciéndose de manera asexual mientras persistan condiciones favorables de alimentación, baja densidad poblacional, y los factores ambientales y calidad química del agua sean los adecuados. Cuando alguno o algunos de estos factores se tornan adversos, entonces parte de la progenie estará constituida por machos que al crecer pueden dar lugar a la reproducción sexual al fecundar hembras (Martínez-Jerónimo, 2008). La importancia de la reproducción por partenogénesis radica en que permite una producción rápida y conveniente de ejemplares genéticamente idénticos (Sarapultseva *et al.*, 2017).

El género *Daphnia* es conocido por ser un excelente bioindicador para evaluar y medir los ecosistemas acuáticos y ha sido utilizado internacionalmente en experimentos de toxicidad como biomonitor debido a que presenta una alta sensibilidad a una amplia gama de compuestos tóxicos. En las especies acuáticas particularmente, existe una estrecha relación entre el aumento de la peroxidación lipídica y el deterioro antioxidante (Esterhuizen-Londt *et al.*, 2016).

La evaluación biológica de la calidad del agua se está desarrollando en gran medida debido a la inclusión de indicadores biológicos en las guías de calidad del agua y en la evaluación del impacto ambiental. Uno de los beneficios del uso de bioindicadores es su capacidad para indicar los efectos bióticos indirectos de los contaminantes además de que nos brindan información sobre si nuestras acciones son o no biológicamente sostenibles (Uday *et al.*, 2013). Uday *et al.* (2013) establece que para que un organismo sea considerado como buen indicador debe cumplir las siguientes características: i) que proporcione una respuesta medible (sensible a la perturbación o el estrés), ii) que esté taxonómicamente bien documentado, iii) que sea fácil y barato inspeccionar con el modelo y que pueda identificarse de manera confiable. Además, el organismo debe presentar una amplia distribución temporal y espacial.

Actualmente se han desarrollado normas nacionales como la NMX-AA-087-scfi-2010 e internacionales como la ISO 10706:2000 (ISO, 2000), OCSPP 850.1010 (US EPA, 2016), OPPTS 850.1300 (US EPA, 1996) y OECD 211 (OECD, 2004, 2008) para el uso y manejo de ejemplares del género *Daphnia* en condiciones de laboratorio en donde se establecen los principales parámetros para su cultivo así como guías detalladas para su uso en test de toxicidad. A pesar de que existen numerosos trabajos en donde se evalúa el efecto de diferentes tipos de radiación en la fertilidad, la sobrevivencia y el crecimiento en daphnias y su efecto a través de las generaciones, la mayoría se enfocan en la especie *Daphnia magna*. Lo anterior genera una excelente área de oportunidad para estudiar otras especies como *Daphnia pulex*, pues hasta el momento las investigaciones en esta especie son pocas o casi nulas. Adicionalmente, no existe una investigación en donde se evalúen los efectos de la radiación producida por un láser de baja energía a una longitud de onda de 405 nm en la sobrevivencia, reproducción y morfología en *Daphnia pulex*.

El organismo antes mencionado, pertenece al complejo *pulex*, el cual se ha registrado estar presente en la Presa José Antonio Alzate, en Jilotepec-Ixtlahuaca km 28 y 41 y en la Laguna los Baños en el Estado de México (Gutiérrez *et al.*, 2008); por lo que puede considerarse un habitante natural de los cuerpos del Alto Lerma. En este trabajo de tesis se propuso a *Daphnia pulex* como modelo estándar para evaluar *in vitro* los cambios que induce la radiación de un láser de baja energía en la morfología, sobrevivencia y reproducción en un cultivo de éstas,

y si los cambios producidos perduran o se desvanecen dentro de una única generación de descendientes a través de las reproducciones sucesivas producidas por la descendencia.

2. Antecedentes

2.1. Generalidades del género *Daphnia*

El género *Daphnia* pertenece al orden *Cladocera* de la familia *Daphniidae*, el género incluye a más de 100 especies alrededor del mundo, siendo *Daphnia pulex* la más común (Ebert, 2005). Son crustáceos planctónicos filtradores de agua dulce que consumen una diversidad de partículas que incluyen diferentes especies de microalgas, bacterias o materia orgánica en suspensión, son considerados componentes importantes en los ecosistemas acuáticos al permitir un flujo energético entre los productores primarios y órdenes superiores de consumidores, en las tramas tróficas de los sitios donde se distribuyen (Martínez-Jerónimo, 2008). *Daphnia pulicaria* es un habitante natural de las Ciénegas del Alto Lerma, las cuales están por arriba de los 2600 m.s.n.m (Elías, 2008) esta altitud hace que la *Daphnia pulicaria* sea un modelo de alta montaña y de climas templados y fríos, a diferencia de *Daphnia magna* (Martínez-Jerónimo, 2008) que se distribuye geográficamente en los climas templados de Estados Unidos de Norteamérica, Canadá y Europa a bajas altitudes.

El conocimiento de la anatomía, ecología, filogenia, fisiología y toxicología de las especies de *Daphnia* en conjunto con un genoma completamente secuenciado (wflbase.org) ha permitido el desarrollo de diversos estudios de exposición con diferentes factores estresantes en esta especie (Gomes *et al.*, 2018).

La anatomía en la parte superior de *Daphnia* consta de un ojo compuesto con veintidós omatidios y pigmento negro cuya principal función es la de orientación, debajo de este se encuentran el cerebro, el ocelo, el rostrum, la boca, el esófago, los músculos antenales, la mandíbula y la glándula de cocha. En la parte media se encuentra el corazón, los ovarios emparejados, el grupo de ovocitos partenogenéticos, la cámara de cría y el oviducto por una parte, y por otra los cinco apéndices torácicos; que juegan un papel importante en la filtración e intercambio de gases, y el intestino; el cual consta de tres partes: el esófago, el intestino medio y el intestino grueso. Finalmente, en la parte inferior se encuentran un par de garras, los apéndices caudales, el ano, el abdomen, el postabdomen, las setas abdominales y la espina apical. El cuerpo está cubierto por carapacho el cual confiere protección. El orden *Cladocera*

incluye 10 pares de apéndices, que son (de adelante hacia atrás): anténulas, antenas (las segundas antenas, utilizadas para nadar); maxilas; y mandíbulas; seguido por 5 extremidades en el tronco (Ebert, 2005).

El ciclo asexual de *Daphnia* se caracteriza por la producción de huevos partenogénéticos los cuales se encuentran localizados en la cámara de cría, que se ubica dorsalmente debajo del caparazón y que está cerrada por los procesos abdominales. La temperatura ideal para incubar los huevos es de 20 ° C, los embriones nacen de los huevos después de aproximadamente 1 día y permanecen 3 días en la cámara de cría para completar su desarrollo hasta su liberación a través de la flexión ventral del abdomen posterior. A partir de este punto y hasta un día posterior son considerados como neonatos. Es a partir del tercer día y hasta antes de su primera reproducción, la cual se lleva a cabo entre el décimo y décimo cuarto día, que a las daphnias se les considera como juveniles. Finalmente, se les llama adultas cuando ya han tenido su primera reproducción, éstas pueden llegar a producir un nido de huevos cada 3 o 4 días hasta su muerte. La esperanza de vida del crustáceo se ve afectada si su desarrollo se realiza en el hábitat natural de daphnia, cuya esperanza de vida es de 30 días; o si su mantenimiento se realiza en el laboratorio, donde llegan a vivir hasta más de 2 meses (Ebert, 2005).

2.2. Curvas de sobrevivencia

Una curva de sobrevivencia es una representación gráfica del número de individuos vivos en una población en diferentes edades (Stiling, 2014). Las curvas de sobrevivencia a menudo son utilizadas por los ecólogos para visualizar cómo el número de individuos en una población disminuye con el tiempo y se puede usar para comparar generaciones, poblaciones o incluso especies diferentes. Por ejemplo, para medir una población primero se identifica un grupo de individuos de la misma especie, en la misma población y nacidos al mismo tiempo, posteriormente se recopilan los datos sobre cuándo murió cada individuo en la población y finalmente se grafica el número de sobrevivientes por cada 1,000 individuos en una escala logarítmica en función del tiempo (Rauschert, 2010).

Stiling (2014) describe tres tipos de curvas de sobrevivencia (Fig 1). En la curva de tipo I, la tasa de pérdida en edades tempranas es relativamente baja, sin embargo, la mayoría de los individuos se pierden más adelante en la vida. Los organismos que exhiben una supervivencia

tipo I tienen relativamente pocos hijos, pero invierten mucho tiempo y recursos en la crianza de sus crías. Los humanos y muchos mamíferos grandes son un claro ejemplo de curvas tipo I. Las curvas de Tipo II representan un término medio, con tasas de mortalidad constantes a lo largo del tiempo. Algunas de las especies con curvas de supervivencia de tipo II incluyen aves, pequeños mamíferos, reptiles y algunas plantas anuales. La curva de tipo III, presenta una tasa alta de pérdida de juveniles en edades tempranas y posteriormente la curva de supervivencia se aplana para aquellos organismos lograron sobrevivir a la muerte temprana.

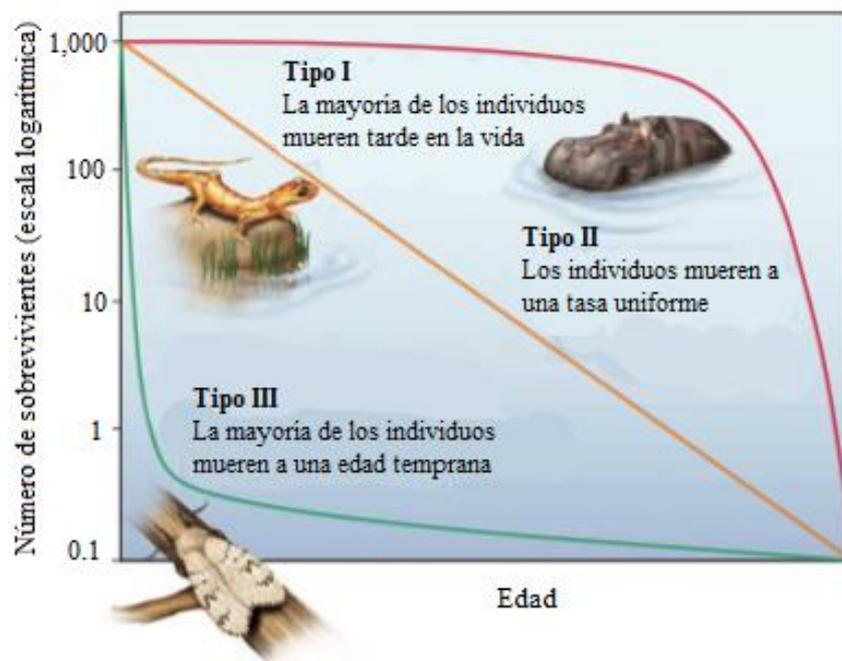


Fig 1. Curvas de supervivencia I, II y III idealizadas. Diagrama adaptado de (Stiling, 2014).

2.3. Lavado del efecto epigenético

La Epigenética se define como el estudio de cambios heredables en el ADN e histonas que no implican necesariamente modificaciones en la secuencia de nucleótidos, pero sí en la estructura y condensación de la cromatina afectando la expresión génica y el fenotipo. Estas modificaciones epigenéticas son metilación del ADN y alteraciones en histonas (García et al., 2012). En los últimos años se ha acuñado el término “dinámica de la epigenética” la cual describe cómo las modificaciones fenotípicas epigenéticas tanto transgeneracionales como intrageneracionales cambian en patrones no lineales a lo largo del tiempo (Burggren, 2012).

En un trabajo reciente (Burggren, 2012) se ha hipotetizado sobre la posibilidad de que las modificaciones fenotípicas epigenéticas pueden desvanecerse lentamente a través de las generaciones hasta que finalmente están por debajo de los niveles detectables. Este lavado epigenético se genera mediante dos procesos: el lavado transgeneracional del efecto epigenético, es aquél en el que las alteraciones epigenéticas fenotípicas van desapareciendo progresivamente a través de las generaciones (Fig 2, lado izquierdo). Por otro lado, en el lavado intrageneracional, los efectos fenotípicos epigenéticos inducidos se desvanecen dentro de una única generación de descendientes a través de las reproducciones sucesivas producidas por la descendencia (Fig 2, lado derecho). Burggren, (2012) reporta que si el efecto epigenético no se desvanece después de la tercera camada o de la tercera generación (F3), dicho efecto será genético y pasará en lo sucesivo a las demás camadas o generaciones.

Hasta ahora han sido poco los estudios cuyo objetivo se enfoque en el lavado intrageneracional y si los efectos fenotípicos inducidos se desvanecen o perduran en el tiempo. Uno de los modelos que más se ha estudiado en este campo y en donde se han hecho pruebas, es el organismo *Daphnia magna* (Harris et al., 2012). En el estudio realizado por Andrewartha y Burggren, (2012) encontraron evidencia preliminar como ellos lo reportan, del lavado intrageneracional de modificaciones fenotípicas epigenéticas en la morfología del cuerpo de la pulga de agua *Daphnia magna* al exponer el organismo a condiciones de hipoxia (4%) por seis días. La exposición hipóxica parental indujo una masa corporal reducida de la generación F1, esta reducción se manifestó en la primera y segunda camada que comprenden la F1, pero posteriormente se “lavaron” antes de la tercera camada que exhibió masas corporales idénticas en comparación con las generaciones de control F1 cuyos padres no habían estado expuestos a hipoxia.

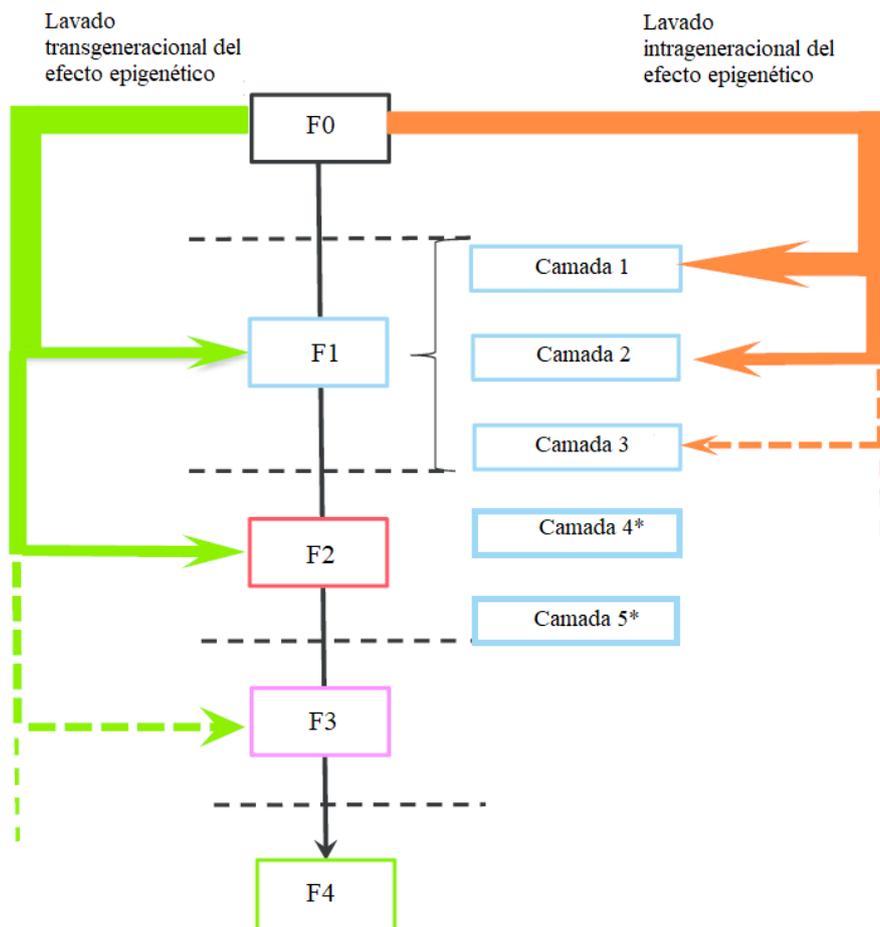


Fig 2. Hipótesis del “lavado” de efectos epigenéticos transgeneracionales (izquierda) e intrageneracionales (derecha). En este esquema hipotético, los rasgos fenotípicos se desvanecen en múltiples generaciones o dentro de la F1 en múltiples crías. Diagrama adaptado de (Burggren, 2015).

2.4. Efecto de la radiación ionizante en la morfología del género *Daphnia*

Cada característica morfológica, de crecimiento y reproductiva es producto de la expresión genética y la interacción con el ambiente por lo que un cambio en este no permite el funcionamiento correcto del organismo y puede verse reflejado con su muerte. Un estudio reciente realizado por Vorob'yeva *et al.*, (2015), mostró que la radiación gamma (632.8 nm) en un rango de dosis de 1.7-1300 mJcm⁻² causa patologías en las antenas en *Daphnia magna* como un subdesarrollo o reducción de las cerdas en las antenas natatorias y deformaciones en espiral de las antenas. Los individuos con antenas defectuosas al no poder moverse libremente morían después de 1-3 días de su nacimiento. También hubo otros cambios morfológicos en la

esquina apical de *Daphnia magna*, la cual se doblaba debajo del borde ventral del caparazón (Vorob'yeva *et al.*, 2015).

Los cambios en el crecimiento son considerados como uno de los puntos finales del ciclo de vida para evaluar el impacto biológico en respuesta a la radiación ionizante. Vorob'yeva *et al.*, (2015) mostraron en su estudio cambios significativos en el crecimiento de *Daphnia magna* generando aumentos y reducciones en la longitud corporal dependiendo de la generación y de la dosis administrada. El cambio en longitud del cuerpo también se vio afectado en la investigación de Parisot *et al.*, (2015) en donde encontró que la radiación gamma crónica genera una pequeña reducción en la longitud del cuerpo de *Daphnia magna*, con una reducción del 5 y 13% en el rango del crecimiento de la generación F2 de daphnias expuestas a 4.7 y 35.4 mGyh⁻¹.

2.5. Efecto de la radiación ionizante en la mortalidad y sobrevivencia del género *Daphnia*

La mortalidad tiene el potencial de alterar la distribución por edades, la tasa de mortalidad y la densidad poblacional (UNSCEAR, 2008); sin embargo, los efectos transgeneracionales de la exposición parental sobre la sobrevivencia siguen siendo poco conocidos. Los datos obtenidos a partir de la mortalidad a menudo se usan para calcular valores de dosis letales (LD₅₀) (Dallas *et al.*, 2012) para derivar jerarquías de radiosensibilidad a través de grupos taxonómicos. Los valores LD₅₀ se usan tradicionalmente en estudios ecotoxicológicos para determinar el riesgo ecológico de las especies (Stark *et al.*, 2004).

En un estudio donde evaluaron los efectos a altas dosis de exposición aguda de rayos gamma en la supervivencia de *Daphnia magna* (Sarapultseva *et al.*, 2009), encontraron que el rango de sobrevivencia de las daphnias expuestas a 20 Gy fue significativamente comprometido, a dosis mayores de 100 Gy se compromete sustancialmente y dosis de 250 Gy y 600 Gy se consideran letales. Según los resultados de estos autores, la dosis semi-letal para *Daphnia magna* es de 63 Gy. En cuanto a la esperanza de vida Sarapultseva *et al.*, (2016) reportaron que las daphnias expuestas a dosis de rayos gamma a 10 mGy fue de 50 días, mientras que a 100 y 1000 mGy fue de 43 y 36 días respectivamente en comparación con el control que tuvo una esperanza de vida de 54 días. Otras investigaciones se han efectuado en torno a otro tipo de radiación como la UV-A y UV-B. El estudio realizado por Vega *et al.*, (2000) mostró que el efecto letal más importante se presentó después de 2 horas de radiación con UV-B en *Daphnia*

longispina, en donde el 80% de los individuos murieron (n=30), mientras que los individuos radiados con UV-A por el mismo periodo de tiempo, murieron sólo el 20% (n=30).

2.6. Efecto de la radiación ionizante en la reproducción y fertilidad del género *Daphnia*

Los efectos subletales de la radiación ionizante reducen la capacidad de producir generaciones adicionales, afectar la sobrevivencia a largo plazo de la especie y, por lo tanto, alterar la dinámica del ecosistema. La reproducción es aquí una de las respuestas biológicas más sensibles, que influye en las poblaciones y mantiene el equilibrio de nicho en los ecosistemas (Gilbin *et al.*, 2008).

El estudio multigeneracional de Parisot *et al.*, (2015) mostró que la reproducción se vio afectada por una reducción del 19% en los 21 días de fecundidad a 35.4 mGyh⁻¹ en F0 y por un retraso de 1.9 días en la liberación de las crías a 0.070, 4.70 y 35.4 mGyh⁻¹ en F2 en *Daphnia magna*. Estos mismos autores concluyeron que hubo una reducción significativa en el número de crías producidas durante las generaciones posteriores. Por su parte, Alonzo *et al.*, (2008 a, b) registraron un retraso en la producción de cría en *D. magna* expuesta a 15 mGyh⁻¹ durante un período de 23 días (recibiendo una dosis total de 0.345 mGyh⁻¹). Sarapultseva *et al.*, (2013) por otro lado, encontraron que dosis de radiación gamma a 100 y 1000 mGy comprometen la fecundidad, el éxito reproductivo y acortan la esperanza de vida en un 20-30% comparado con el control en *D. magna*, manifestando efectos hasta la generación F1. Los últimos autores creen que la supervivencia comprometida de la descendencia de primera generación de daphnia irradiada, puede explicarse debido a los efectos perjudiciales de las mutaciones inducidas en la línea germinal de los padres irradiados.

2.7. Efecto de la radiación ionizante en el ADN del género *Daphnia*

Uno de los mecanismos tóxicos de la radiación ionizante es la generación de especies reactivas de oxígeno (e.j. radicales superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno), la producción en exceso de estos radicales puede causar un agotamiento en la capacidad antioxidante de las células provocando estrés oxidativo, es decir, el desequilibrio entre la generación y la neutralización de las especies reactivas de oxígeno por mecanismos antioxidantes dentro del organismo. Algunos de los ejemplos más conocidos asociados al estrés oxidativo celular son la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daño al ADN. El estrés oxidativo puede cuantificarse mediante el uso de biomarcadores para monitorear el estado de

varios mecanismos de defensa antioxidantes contra los radicales libres (Gomes *et al.*, 2018). Los efectos provocados por la radiación ionizante en el ADN han sido descritos en trabajos anteriores donde se ha demostrado que puede inducir cambios epigenéticos heredables como la metilación del ADN, que causa cambios transgeneracionales en la expresión de los genes (Dubrova, 2003; Skinner, 2008). Las alteraciones en el ADN provocadas por radiación ionizante dependen del tiempo y la dosis suministrada, afectan las células germinales en las hembras y son heredables a su progenie (Parisot *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha comprobado que la actividad antioxidante en *Daphnia* se ve afectada por la edad (Arzate *et al.*, 2011). Los organismos en sus etapas tempranas son más sensibles que aquellos en etapas más avanzadas, es decir que los neonatos y los juveniles poseen una capacidad superior de evitar el daño oxidativo porque poseen un mayor número de defensas.

2.8. Efectos de la radiación no ionizante en tejidos biológicos

La radiación no ionizante es aquella energía radiativa que cuando pasa a través de la materia tiene la energía necesaria para la excitación sin producir iones cargados, es decir no ioniza la materia. La radiación no ionizante es incapaz de impartir suficiente energía a una molécula o un átomo para modificar su estructura y quitarle uno o más electrones. La longitud de onda de 100 nm es la longitud de onda que divide la radiación no ionizante de la radiación ionizante. No obstante, este tipo de radiación también cuenta con el potencial necesario para interactuar y generar efectos biológicos. Las fuentes por las cuales se genera este tipo de radiación incluyen las naturales y las artificiales. Entre las radiaciones ionizantes del espectro electromagnético encontramos las ondas de radio, las microondas, los infrarrojos, la luz visible y los ultravioleta de baja frecuencia (Knave, 2001).

Se ha de destacar que para este trabajo de tesis se utilizó un láser de baja energía como fuente para radiar a los organismos de estudio. Particularmente, cuando se somete una muestra biológica a radiación electromagnética láser, no se observan efectos ionizantes debido a que las longitudes de onda son considerablemente grandes para no alterar los estados energéticos de los electrones, por lo tanto, la radiación láser pertenece a la radiación no ionizante. Sin embargo, se sabe que los láseres tienen efectos destructivos en los organismos vivos, de ahí la creciente preocupación sobre los efectos adversos de las tecnologías láser (Yuan *et al.*, 2018). Hoy en día, no existen estudios que brinden información específica sobre los efectos que puede causar la radiación láser en *Daphnia*, sin embargo, se brindará información del efecto que produce la radiación láser en tejidos biológicos o en otros organismos.

En el estudio realizado por Kushibiki *et al.* (2013) se irradiaron los siguientes tipos de células preadipocitos de ratón (3T3-L1), precondrocitos (ATDC5), mioblastos (C2C12), células del estroma mesenquimatoso (KUSA-A1), células de cáncer de pulmón (LLC), células de insulinooma (MIN6), fibroblastos (NIH-3T3), células de adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa), macrófagos diferenciados de linfocitos (THP-1) con un láser azul (longitud de onda: 405 nm), un láser rojo (longitud de onda: 664 nm) o un láser de infrarrojo cercano (longitud de onda: 808 nm) a 100 mW / cm² durante 60 o 120 segundos. Los autores de este trabajo concluyeron que la terapia láser de bajo nivel induce una cascada de señalización de segundos mensajeros hasta producir especies reactivas de oxígeno en aquellas células irradiadas especialmente con láser azul a una longitud de onda de 405 nm. En contraste, la generación de especies reactivas de oxígeno intracelular no se observó después de la irradiación con un láser rojo o un láser de infrarrojo cercano.

También se han medido los efectos que la radiación láser puede tener en células bacterianas gram-positivas y gram-negativas. A una longitud de onda de 532 nm se observó que la irradiación con láser puede comprometer la función fisiológica de las células bacterianas. Sin embargo, el grado de destrucción dependerá de la dosis suministrada, que se refleja desde una reducción en el crecimiento hasta la pérdida de actividad metabólica y el daño estructural físico. Los autores del estudio concluyeron que el umbral de energía para la destrucción depende de la cepa, donde las células bacterianas gram-positivas son más susceptibles que las cepas bacterianas gram-negativas al daño inducido por la radiación (Yuan *et al.*, 2018).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

1. Determinar el efecto de la radiación con láser azul (405 nm) de estado sólido a una dosis de 40mW en la sobrevivencia, reproducción y morfología de la F0 y F1 de *Daphnia pulex*.

3.2. Objetivos específicos

1. Diseñar, instalar y calibrar un arreglo experimental que posibilite foto-estimular ejemplares de *Daphnia pulex* bajo condiciones controladas de temperatura e intensidad luminosa.
2. Determinar la dosis letal media de irradiación para *Daphnia pulex* con el propósito de establecer la potencia, distancia de irradiación y sección eficaz apropiadas para el estudio de su desarrollo.
3. Medir el número total de crías y camadas de la generación F0 para determinar efectos en la reproducción de *Daphnia pulex* mediante un seguimiento continuo tanto de las daphnias control como de las daphnias irradiadas.
4. Identificar los efectos que produce el láser de baja energía en la generación F0 y F1 en la morfología de *Daphnia pulex* (anténulas, rostrum, espina apical o alguna otra parte del crustáceo) mediante tomas fotográficas del organismo bajo un microscopio óptico.
5. Determinar los efectos en la sobrevivencia de *Daphnia pulex* con el fin de obtener la curva de sobrevivencia (número de sobrevivientes contra el tiempo) del organismo e identificar el tipo de esta.

3. Mantenimiento y cultivo de *Daphnia pulicaria*

El crustáceo *Daphnia pulicaria* Forbes, 1893 (Crustacea, Cladocera) utilizado para este experimento fue colectado de un cuerpo de agua dulce perteneciente a la zona del Alto Lerma, Estado de México y criado exitosamente por 3 años en el laboratorio de Ecofisiología Animal de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México. El clon se ha cultivado en una continua reproducción partenogenética por más de 200 generaciones siguiendo las condiciones ambientales que establece la Norma Mexicana NMX AA-087-SCFI-2010 “Análisis de agua - Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladocera) - Método de prueba”, al ser la única norma mexicana hasta el momento para mantener cultivos de *Daphnia* y el descrito por Martínez-Jerónimo (2008) “Ensayo de toxicidad aguda con cladóceros de la familia *Daphnidae*”. Ambos métodos se basan en la determinación de efectos letales agudos donde la respuesta que se evalúa es la ausencia de movilidad o muerte, bajo condiciones de exposición controlada del crustáceo *Daphnia* durante 48 h. Para realizar las pruebas de toxicidad, la norma establece que sólo deben utilizarse neonatos de la tercera generación en adelante, provenientes de hembras grávidas y evitar el uso de neonatos de hembras de más de 40 días de vida.

Las condiciones ambientales para el cultivo y mantenimiento de organismos de *Daphnia* de la norma establece primeramente un área libre de sustancias tóxicas. El cuidado de los organismos en cultivo conduce a tener un lote controlado de dáfidos cuya densidad no debe ser mayor de 15 organismos/L en agua dura reconstituida de dureza de 250 mg/L \pm 25 mg/L. Cada lote se inicia con neonatos de menos de 24 h de nacidos en estado óptimo, con intensidad de luz de 600 - 1000 lx y un fotoperiodo de 16:8 horas luz: oscuridad, temperatura de 20°C \pm 2°C, una concentración de oxígeno disuelto de 2 mg/L y una dureza (CaCO₃) de 250 \pm 25 mg/L. Los organismos fueron alimentados 3 veces por semana con células suspendidas de cultivo de la microalga *Desmodesmus sp.* (Fig. 3) cultivada en condiciones controladas en el laboratorio Ecofisiología Animal, a una concentración de 750,000 a 800,000 cels/mL. La concentración de las algas fue determinada con la densidad óptica del cultivo usando un espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda.



Fig 3. Desmodesmus sp. cultivada en el laboratorio de Ecofisiología Animal.

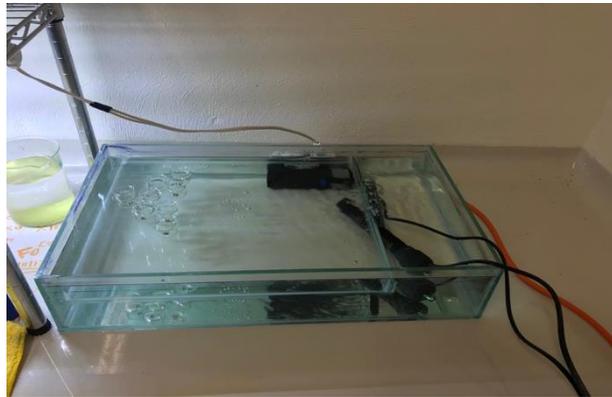


Figura 4. Cámara bioclimática para el mantenimiento de Daphnia pulex.

Para cultivos de *D. pulex* se utilizó agua reconstituida con dureza de $250 \text{ mg/L} \pm 25 \text{ mg/L}$ y pH de 8.0 ± 0.2 . Para elaborar ésta se utilizaron disoluciones stock y su preparación se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de soluciones stock para la elaboración del agua dura reconstituida.

Disolución	Preparación stock	Preparación agua dura reconstituida (1 L)
Disolución de cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).	Disolver 11.76 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.	Agregar 25 mL de la disolución stock.
Disolución de sulfato de magnesio pentahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).	Disolver 4.93 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.	Agregar 25 mL de la disolución stock.
Disolución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	Disolver 2.59 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.	Agregar 25 mL de la disolución stock.
Disolución de cloruro de potasio (KCl).	Disolver 0.23 g del reactivo en agua desionizada y aforar a 1 L.	Agregar 25 mL de la disolución stock.
Disolución de selenito de sodio (Na_2SeO_4)	Disolver 0.001 g del reactivo en agua destilada y aforar a 100 mL.	Agregar 0.2 mL de la disolución stock.

En el siguiente diagrama se resume la metodología llevada a cabo en este trabajo de tesis. Los cuadros en color azul indican condiciones previas al experimento, los cuadros en color verde pertenecen al desarrollo del experimental de la radiación, los cuadros en amarillo indican el seguimiento del experimento, los cuadros en rosa indican los pasos posteriores a la muerte de los organismos y el cuadro en morado al análisis de resultados.

Estudio *in vitro* de la sobrevivencia, reproducción y morfología de *Daphnia pulicaria* irradiada con un láser de baja energía

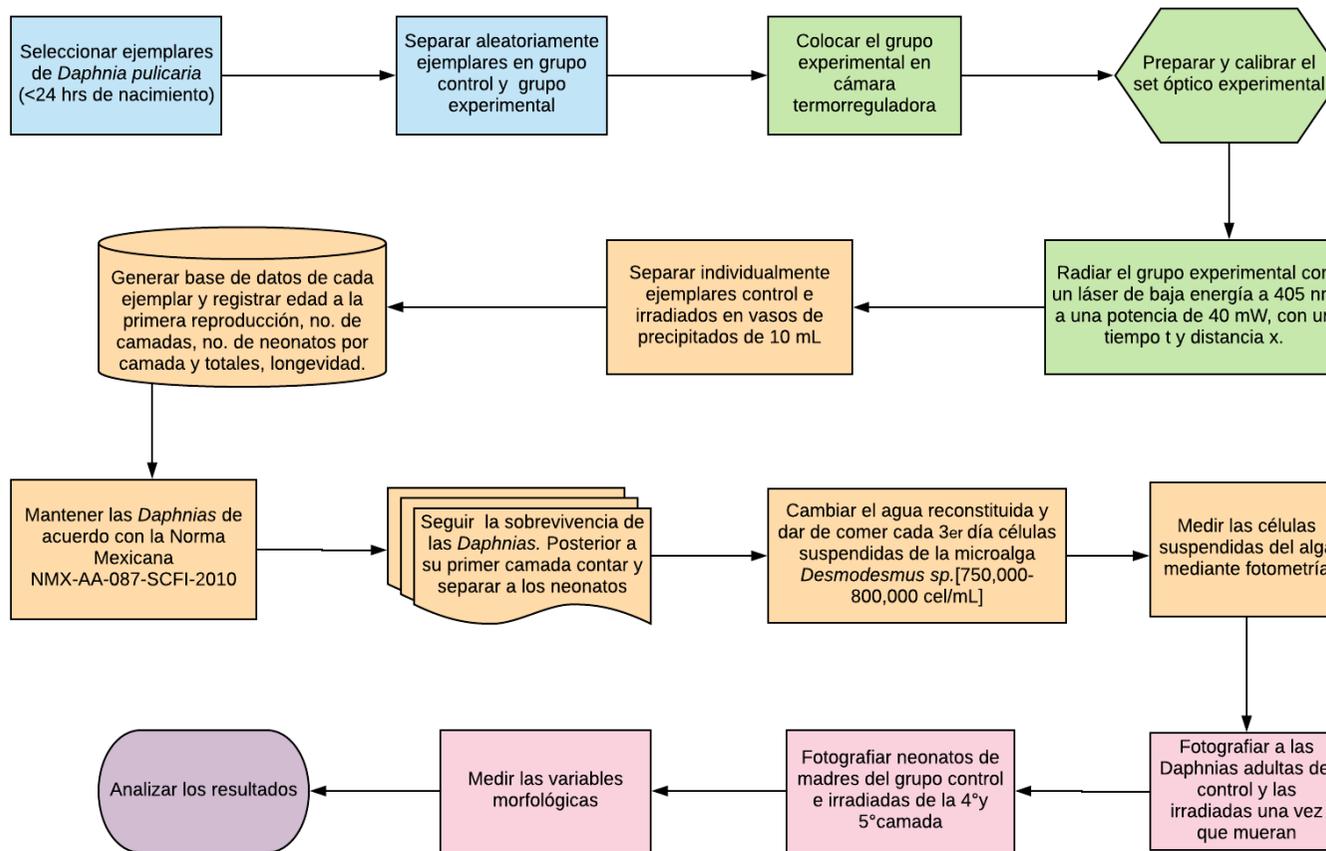


Fig 5. Diagrama de la metodología del estudio *in vitro* de la sobrevivencia, reproducción y morfología de *Daphnia pulicaria* irradiada con un láser de baja energía.

4. Fundamentos de la radiación electromagnética

La luz es una forma de radiación electromagnética a la que se le denomina energía radiante. La energía radiante se distribuye en forma de ondas en cualquier medio con una dirección determinada, y sólo se percibe cuando interactúa con la materia, la cual permite su absorción o reflejo. Para que ocurra este fenómeno de la luz se necesita un cuerpo emisor de energía radiante y otro cuerpo que recibe esta energía radiante. A la interacción o transferencia de energía entre un cuerpo y otro es a lo que se le denomina radiación. Físicamente la luz se puede propagar de dos formas distintas en el espacio: como una onda electromagnética o como un corpúsculo o partícula (Sirlin, 2005).

4.1. Espectro electromagnético y espectro visible

El espectro electromagnético (Fig. 6) es un ordenamiento de la energía radiante según la longitud de onda o la frecuencia. Las longitudes de onda van desde los 10^{-16} metros hasta los 105 metros. Por un lado del espectro, tenemos las frecuencias más altas y de onda corta y son los que presentan mayor energía como por ejemplo los rayos cósmicos. En el otro extremo se encuentran las ondas largas, utilizadas para comunicaciones de radio, que van de unos milímetros a kilómetros de longitud de onda. Entre estos extremos están los rayos X, los ultravioleta, los visibles y los infrarrojos. Para medir el espectro visible la unidad de medida más usada es el nanómetro (nm), que equivale a 10^{-9} metros (Sirlin, 2005)

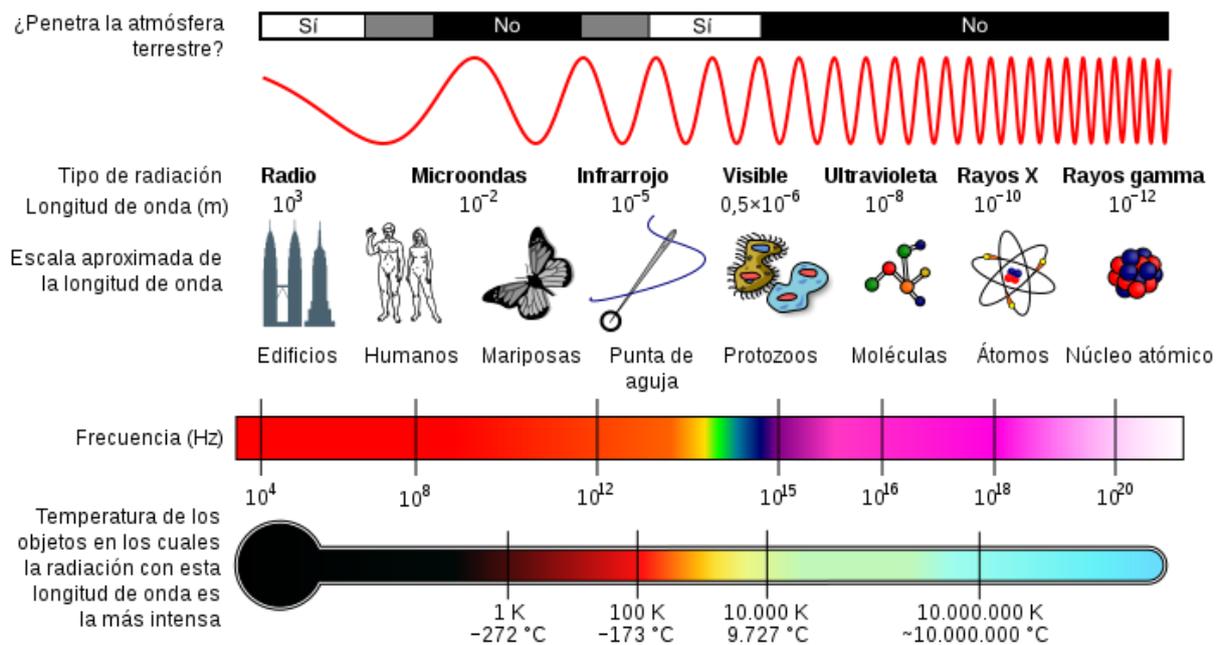


Fig 6. Diagrama del espectro electromagnético. Se muestra el tipo, longitud de onda (con ejemplos), frecuencia y la temperatura de emisión de un cuerpo negro. Diagrama adaptado de (NASA, 2007).

El espectro visible es aquella porción del espectro electromagnético la cual es percibida por el ojo humano, y comprende las emisiones radiantes de longitud de onda que van desde los 380 nm hasta los 780 nm aproximadamente. La luz blanca que es percibida por el ojo humano, es una mezcla de todas las longitudes de onda visibles. El espectro visible se puede descomponer en sus diferentes longitudes de onda mediante un prisma de cuarzo, que refracta selectivamente las distintas longitudes de onda. En las longitudes de onda corta encontramos a los colores azul y violeta, mientras que el rojo y el naranja corresponden a longitud de ondas largas, en el medio encontramos el verde y el amarillo. La radiación luminosa monocromática no se genera empíricamente y corresponde en teoría a lo que es una sola longitud de onda. Las fuentes de luz que más se asemejan a este tipo de emisión, por cubrir una banda mínima de longitudes de onda, son el láser y la lámpara de sodio baja presión (Sirlin, 2005).

Tanto los rayos ultravioletas (350 nm hasta 10 nm) como los infrarrojos (750 nm hasta 1 mm) no son detectados visualmente, pero pueden serlo fisiológicamente, pues provocan una sensación de calor o una cierta coloratura sobre la piel (bronceado). La radiación solar que llega

a la tierra cubre un espectro de ondas electromagnéticas con longitudes de onda que van desde los 290 nm a los 1700 nm. Radiaciones electromagnéticas de menor longitud de onda son absorbidas por la capa de ozono y las mayores son modificadas y absorbidas por el dióxido de carbono y el vapor de agua (Sirlin, 2005).

La palabra láser es un acrónimo de las palabras inglesas: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, es decir, Amplificación de Luz mediante Emisión Estimulada de Radiación y su uso radica en generar ondas electromagnéticas de la gama óptica, es decir, proporciona una forma de emisión de radiación luminosa de características especiales (Martínez, s.f.). La característica principal de la radiación láser es que su luz es monocromática por lo que presenta una sola longitud de onda y así logra aprovechar las características físicas y biológicas que posee la radiación de una longitud de onda determinada. Además, posee una gran direccionalidad y su utilidad radica en que puede concentrar un elevado número de fotones en áreas muy pequeñas. En las últimas décadas, los láseres han sustentado el desarrollo de tecnologías ópticas modernas como pinzas ópticas, imágenes de superresolución y tecnologías espectroscópicas avanzadas, las cuales nos han llevado a la expansión de nuestros conocimientos en las ciencias de la vida y el medio ambiente (Yuan *et al.*, 2018).

Todas las formas de vida estamos expuestas de manera constante a la radiación, dependiendo de diversos factores físicos, como la dosis, el modo y el tiempo de exposición, y diversos factores biológicos, como la especie, la vitalidad, la edad y el sexo se tiene mayor o menor sensibilidad a ésta. Las diferencias en la sensibilidad de la radiación también están asociadas con la eficiencia de los mecanismos relacionados con los sistemas de protección y reparación (Won *et al.*, 2014). La presencia de radiación ionizante en el medio ambiente proviene de fuentes tanto naturales como antropogénicas. Las fuentes naturales incluyen la radiación cósmica que se origina fuera del sistema solar y los radionucleidos primordiales que surgen de los procesos estelares (Smith y Beresford, 2005). La mayoría de los radionucleidos antropógenos en el medio ambiente se derivan de tres fuentes principales: pruebas de armas nucleares, desastres nucleares y descargas autorizadas de plantas de reprocesamiento nuclear (Aarkrog, 2003). Dependiendo de los niveles de exposición, se ha comprobado que la radiación ionizante generalmente tiene un efecto negativo en *Daphnia* causando mortalidad significativa (Fuma *et al.*, 2003), reducción en la movilidad, modificaciones en el crecimiento, así como

alteraciones significativas a nivel celular y molecular (Gomes *et al.*, 2018).

Cuando la radiación ionizante pasa a través de la materia, incluido el tejido vivo, deposita energía que finalmente produce ionización y excitación en la materia. La cantidad de energía depositada dividida por la masa de tejido expuesta se denomina dosis absorbida y generalmente se mide en unidades conocidas como miligrays (mG). El daño biológico causado por la radiación está estrechamente relacionado con la cantidad de energía depositada. Sin embargo, para estimar el efecto biológico potencial, se tiene en cuenta que los diferentes tipos de radiación tendrán por lo tanto diferentes efectos biológicos para la misma cantidad de energía depositada, así como el tipo de tejido, pues uno reaccionará de manera diferente a otro. Una cantidad ponderada llamada dosis efectiva se usa en la protección contra la radiación, y es el indicador más comúnmente utilizado de los efectos biológicos potenciales asociados con la exposición a la radiación ionizante en humanos (Knave, 2001)

4.2. Propiedades ópticas o básicas de la luz

Al hacer incidir un haz de luz láser sobre una muestra se presentan tres diferentes fenómenos, los cuales se describen a continuación.

4.2.1. Reflexión

La reflexión de la luz es el cambio de dirección que presenta un rayo luminoso cuando incide sobre la superficie de separación de dos medios distintos sin abandonar el medio por el cual se propaga. Este fenómeno ocurre cuando las ondas electromagnéticas se topan con una superficie que no absorbe energía radiante. La onda, llamada rayo incidente se refleja produciendo un haz de luz, denominado rayo reflejado (Sirlin, 2005). La reflexión de la luz puede ser dirigida o especular, difusa y mixta.

4.2.1.1. Reflexión dirigida

La reflexión dirigida o especular es aquella en la que un haz de rayos paralelos, una vez reflejados, continúan siendo paralelos. Este tipo de reflexión se da en superficies lisas, pulimentadas y totalmente no absorbente, como son las superficies de los espejos (Kane *et al.*, 2007).

4.2.1.2. Reflexión difusa

La reflexión difusa es aquella en la que un haz de rayos paralelos, al reflejarse siguen direcciones distintas. Este tipo de reflexión se da en superficies rugosas o pulimentadas como, por ejemplo, una pared o una tela; las irregularidades que presentan estas superficies hacen que el ángulo de incidencia de cada rayo dependa del punto en el que incide. Esto hace que el haz incidente de rayos paralelos, al reflejarse, dé lugar a un haz reflejado de rayos que no son paralelos entre ellos. La reflexión difusa de la luz permite ver los objetos que están a nuestro alrededor ya que los rayos de la luz que inciden sobre ellos son remitidos en todas direcciones llegando algunos de ellos hasta nuestros ojos (Kane *et al*, 2007).

4.2.1.3. Reflexión mixta

La reflexión mixta es una combinación de las dos reflexiones mencionadas anteriormente, esto es debido a que la mayor parte de los objetos presentan superficies que no son perfectamente especulares ni difusoras. Es por esto, que la luz que reflejan es mixta, y tienen una componente especular (brillo) y otra difusa (por la cual apreciamos el color, la textura, etc.) (Kane *et al*, 2007).

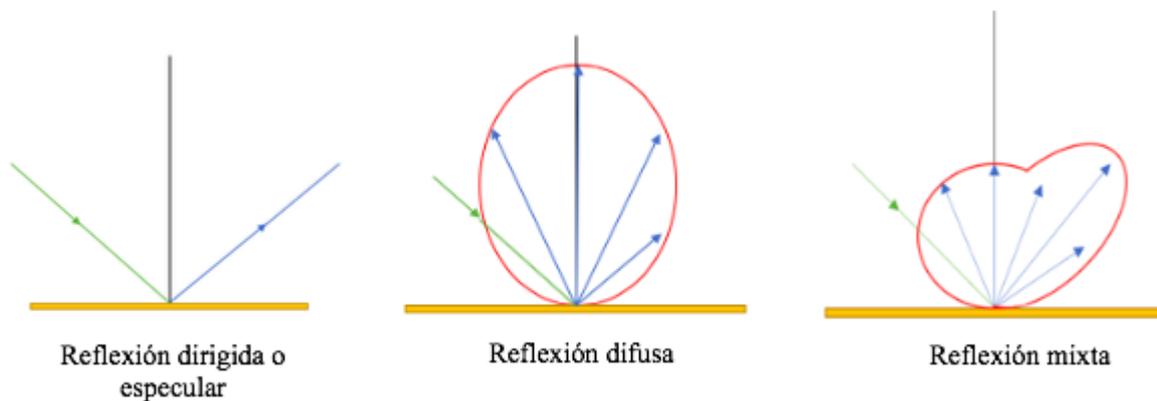


Fig 7. Reflexión de la luz.

4.2.2. Transmisión

La transmisión es un fenómeno de la luz que ocurre cuando la luz atraviesa una superficie u objeto, es decir, la luz transmitida. **cita** Se definen tres tipos de transmisión: directa, difusa y selectiva.

4.2.2.1. Transmisión directa

La luz es transmitida directamente cuando se desplaza a través de un objeto sin dispersarse, es decir, sin generar cambios de dirección o calidad de la luz. El vidrio o el aire son unos ejemplos clásicos (Cuevas, 2010).

4.2.2.2. Transmisión difusa

La luz tiene transmisión difusa cuando pasa a través de un objeto transparente o semitransparente con textura y es desviada en diversas direcciones. Algunos plásticos o el vidrio esmerilado son algunos ejemplos (Cuevas, 2010).

4.2.2.3. Transmisión selectiva

La luz es transmitida selectivamente cuando atraviesa un objeto de color. Parte de la luz será absorbida y parte será transmitida por ese objeto. Por ejemplo, un filtro color azul dejará pasar longitudes de onda azules y absorberá las longitudes de onda rojas y verdes. Muchos de los filtros fotográficos son usados con este fin (Cuevas, 2010).

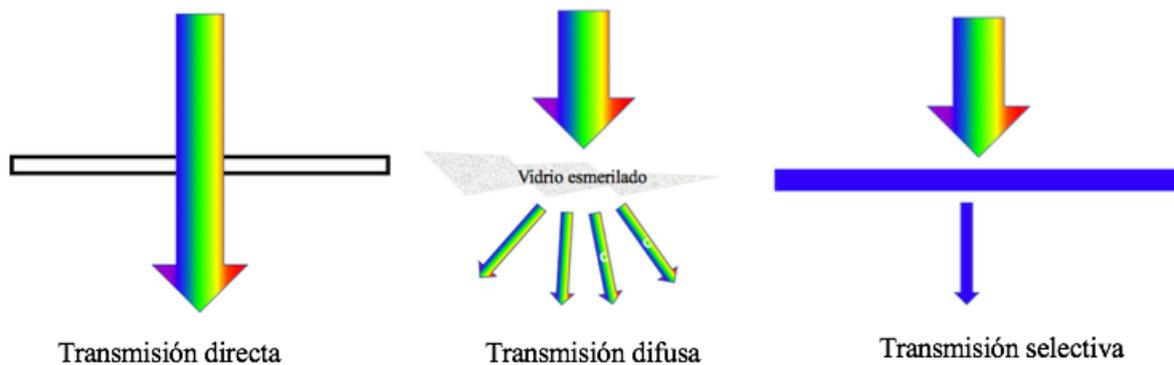


Fig 8. Transmisión de la luz: transmisión directa, transmisión difusa y transmisión selectiva.

4.2.3. Absorción

Se le llama absorción a la conversión de la luz en otra fuente de energía, regularmente en energía calórica, energía eléctrica, o energía química. También puede suceder que cambie a una radiación de diferente longitud de onda (como la fluorescencia) (Sirlin, 2005).

Cuando un rayo de luz atraviesa el vacío, este no pierde energía aun cuando se dispersa. Por otro lado, cuando el rayo de luz atraviesa medios materiales ocurren pérdidas de energía debido a efectos de absorción y difusión. Dicha pérdida está relacionada con el tipo de material, su transparencia u opacidad. Es debido a lo anterior que cada material tiene un coeficiente de

absorción, el cual varía para cada longitud de onda. El coeficiente de absorción será bajo cuando los materiales presenten una alta transparencia, sin embargo, para materiales con alta opacidad el coeficiente es tan bajo que la intensidad final es prácticamente cero, medida en distancias muy cortas. Por otra parte, el coeficiente de absorción en algunos materiales es notablemente diferente para las distintas longitudes de onda que presenta el espectro visible. Estos materiales modifican la distribución espectral de la luz que los atraviesa y son la base para los filtros de colores. Las superficies coloreadas funcionan como películas de absorción selectiva de determinadas longitudes de onda del espectro visible, reflejando otras (Sirlin, 2005).

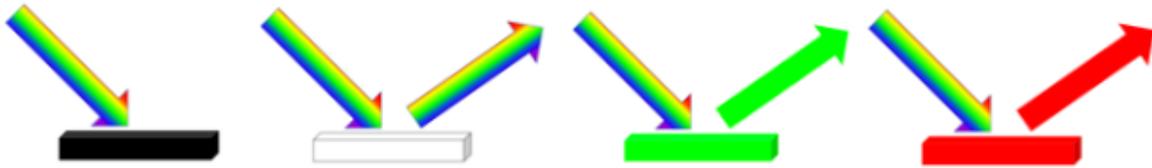


Fig 9. Absorción de la luz a diferentes longitudes de onda. El color negro absorbe todas las longitudes de onda visibles. El color blanco no absorbe ninguna longitud de onda. Tanto el color verde como el rojo dejan pasar su color y absorben las otras longitudes de onda.

4.2.4. Efectos de la absorción sobre tejidos biológicos

La magnitud relativa de cada uno de estos fenómenos depende de las condiciones fisicoquímicas implicadas durante el proceso de radiación láser y la preparación de las muestras irradiadas, sin embargo, la reflexión y la transmisión no tienen efectos apreciables sobre los tejidos biológicos, pero la absorción puede dañarlos causando alguno de los siguientes efectos.

4.2.4.1. Efectos Térmicos

Un estímulo de luz láser provoca la vibración de las moléculas del tejido biológico, lo cual puede incrementar la temperatura y generar calor en una vecindad de la región irradiada. El acoplamiento de la radiación se genera por la absorción de fotones que transfieren su energía a los electrones provocando que aumente su nivel energético. Los electrones volverán a su estado basal o de equilibrio y liberarán el exceso de energía en los tejidos. El daño al tejido podría

manifestarse como una desnaturalización de biomoléculas e incluso hasta la evaporación del tejido (Calderón, 2013).

4.2.4.2. Efectos Termoacústicos

Se presentan cuando la radiación láser se suministra con pulsos muy cortos de alta potencia y se debe a que una densidad de potencia grande en un instante corto de tiempo produce altas temperaturas. De forma similar que cuando un objeto cae sobre una superficie de agua y se generan ondas, cuando un láser pulsado deposita su energía sobre un tejido puede romper células y generar una onda de compresión mecánica. El láser pulsado además de producir quemaduras puede, por efecto de la presión, ocasionar daños colaterales a distancias del orden de centímetros dentro del tejido (Cuesta, 2011).

4.2.4.3. Efectos Fotoquímicos

Se producen cuando la longitud de onda de la radiación láser es capaz de excitar a las moléculas orgánicas provocando que se genere una reacción química entre ellas. La interacción de la radiación láser de baja potencia con los tejidos produce numerosos fenómenos bioquímicos. Localmente en los humanos, tienen lugar algunos, como la liberación de sustancias preformadas (histamina, serotonina y bradicinina), aumento del número de leucitos y de la actividad fagocitaria en los recuentos con las bacterias y de los materiales necróticos, aumento del número y labilidad de los lisosomas, estimulación de la mitosis y del deslizamiento de las células epiteliales de la síntesis de los polisacárido y de la proliferación fibroblástica, aumento del flujo hemático por vasodilatación capilar y arterial, acción fibrinolítica y antibacteriana, efecto bioquímico interfiriendo en algunos casos la producción de prostaglandina, así como el aumento de producción de ATP intracelular y el estímulo de la síntesis de ADN, síntesis proteica y enzimática (Calderón, 2013).

5. Desarrollo del experimento

5.1. Radiación

Para llevar a cabo la radiación se preparó un set experimental conformado por tres módulos:

- I. Fuente de luz. Conformado por un láser azul de estado sólido (405 nm) y potencia modulable Fermión II, una fibra óptica y diversos soportes conductores.
- II. Conductor del haz. Constituido por un arreglo óptico de lentes concavos, convexos, espejos y un divisor de haz

III. Irradiación. Habilitado con una cámara termorreguladora con soporte para colocación de las muestras, sensores de temperatura, tarjeta de adquisición de datos y computadora.

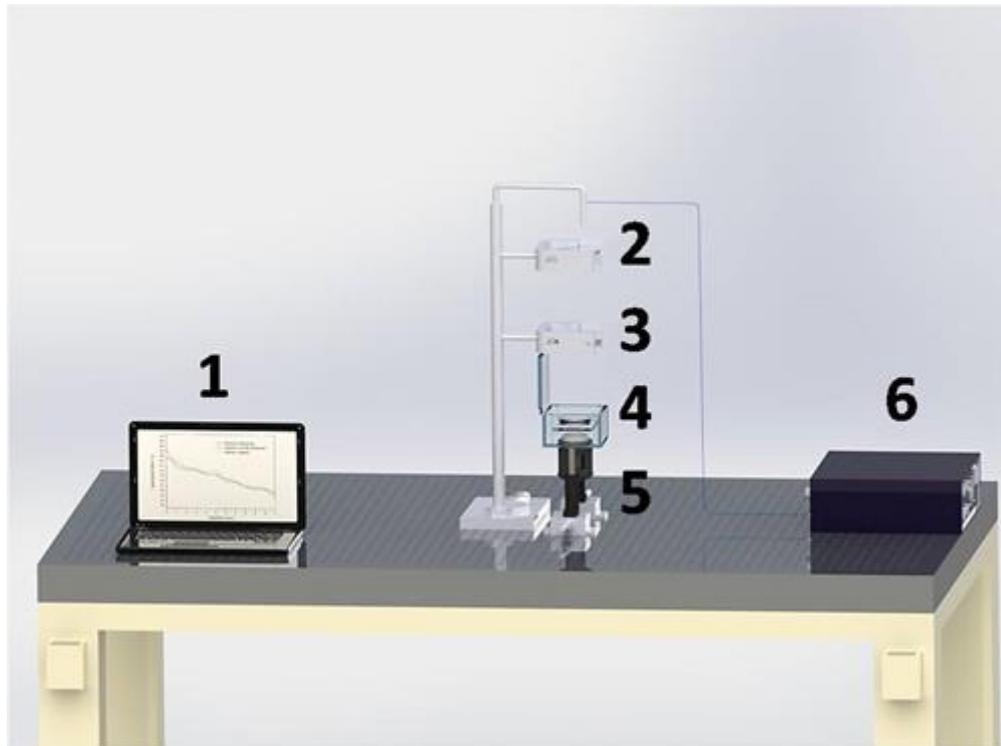


Fig 10. Set experimental. Las muestras de *Daphnia pulicaria* se colocaron dentro de una cámara de irradiación con control de temperatura (1 y 4), a través de una disposición óptica (2 y 3). Fueron irradiados con un láser azul de 405 nm (6). Las imágenes fueron capturadas usando una cámara adaptada a un microscopio (5).

5.2 Seguimiento del experimento

5.2.1. Condiciones de exposición

Neonatos con 24 hrs de nacidos de *Daphnia pulicaria* de la tercera camada en adelante, fueron separados aleatoriamente para obtener un grupo control y uno experimental. Durante la radiación, *D. pulicaria* se mantuvo en una caja petri de 3 cm de diámetro con 3 ml de agua dura reconstituida con 10 individuos en cada una. El grupo control no tratado se mantuvo en las mismas condiciones, pero sin radiación. La caja petri del grupo experimental se dispuso dentro de la cámara termorreguladora (10 cm x 7 cm x 7 cm) del set experimental y posteriormente se radiaron los ejemplares con un láser azul de estado sólido de potencia modulable Fermión II, a una longitud de onda de 405 nm por 25 minutos con una potencia de 40 mW y a una distancia

de 50 cm llevado a cabo en el Laboratorio de Nanotermodinámica y Sistemas Complejos de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México.

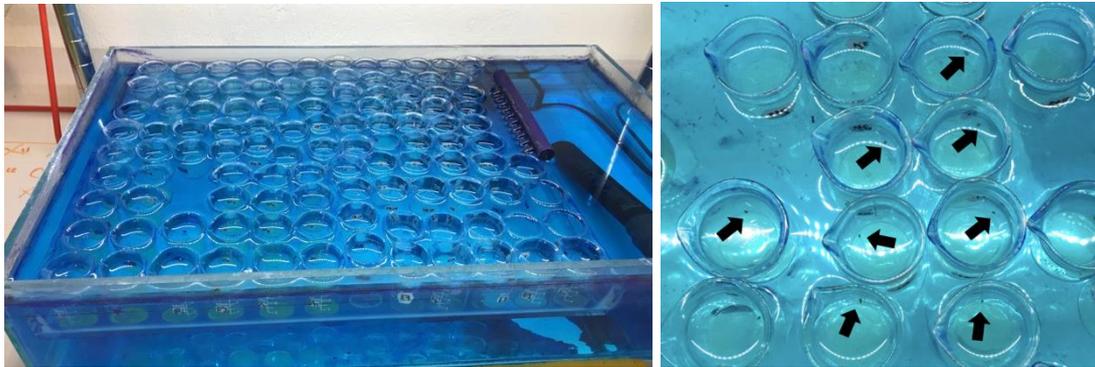


Fig 11. Cultivo de *Daphnia pulex*. a) Los clones del organismo se mantienen en la cámara bioclimática, b) En cada uno de los vasos de precipitados hay un clon del crustáceo señalados mediante las flechas negras.

5.2.2. Sobrevivencia y reproducción

El grupo control y el grupo irradiado de daphnias se mantuvieron individualmente, colocado un individuo por cada vaso de precipitados, con 10 mL de agua dura reconstituida. Las daphnias se revisaron 3 veces por semana hasta su muerte y los neonatos de cada una fueron removidos y contados. Se generó una base de datos por cada ejemplar en donde se registró la edad a la primera reproducción, el número de camadas, el número de neonatos por camada, los neonatos totales, así como la longevidad.

5.2.3. Morfología

Una vez que los ejemplares tanto del control como experimental murieron se les tomó una fotografía con ayuda de un microscopio óptico, así como a algunos neonatos de la cuarta y quinta camada para medir variables morfológicas (longitud total, longitud del cuerpo, longitud de la espina apical, longitud de las anténulas, ancho del cuerpo, forma del cuerpo, etc) (Tablas 2-7). Posteriormente se realizó una comparación estadística de dichas variables tanto del grupo control como del experimental.

5.2.4. Análisis de datos

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney aplicado a dos muestras independientes (control e irradiadas) debido a que el tamaño de la muestra fue pequeño y no simétrico.

6. Resultados y discusión

El objetivo de este trabajo fue examinar si la radiación con un láser azul (405 nm) de estado sólido a una dosis de 40 mW inducía efectos en dos generaciones (F0, F1) identificando cambios en la sobrevivencia, reproducción y morfología en *Daphnia pulicaria*. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.

6.1. Rango de sobrevivencia

En línea con el estudio de Sarapultseva *et al*, (2016) en donde se menciona que los efectos de radiación parental en las daphnias pueden manifestarse predominantemente durante el desarrollo temprano comprometiendo la sobrevivencia de los neonatos, en nuestro estudio el efecto de la radiación con láser azul es muy notorio en cuanto a la sobrevivencia de los ejemplares y puede observarse con la proporción de sobrevivientes con función del tiempo (Fig 12). Se identificó la dosis letal para el 70% de los individuos. Bajo condiciones normales, el grupo control presentó una tasa de sobrevivencia constante parecida a una curva tipo II (Stiling, 2014); en donde los individuos mueren a una razón constante de forma natural a todas las edades y el 80% alcanzó la madurez sexual. Las Daphnias irradiadas por su parte, presentan una curva de sobrevivencia tipo III, en este tipo de curva la tasa de pérdida de los juveniles es relativamente alta, y la curva de supervivencia se aplana para aquellos organismos que han evitado la muerte temprana (Stiling, 2014). En el experimento se puede observar una alta mortalidad en los primeros tres días después de la radiación, pero posteriormente los sobrevivientes logran avanzar hasta la edad adulta y alcanzar la reproducción.

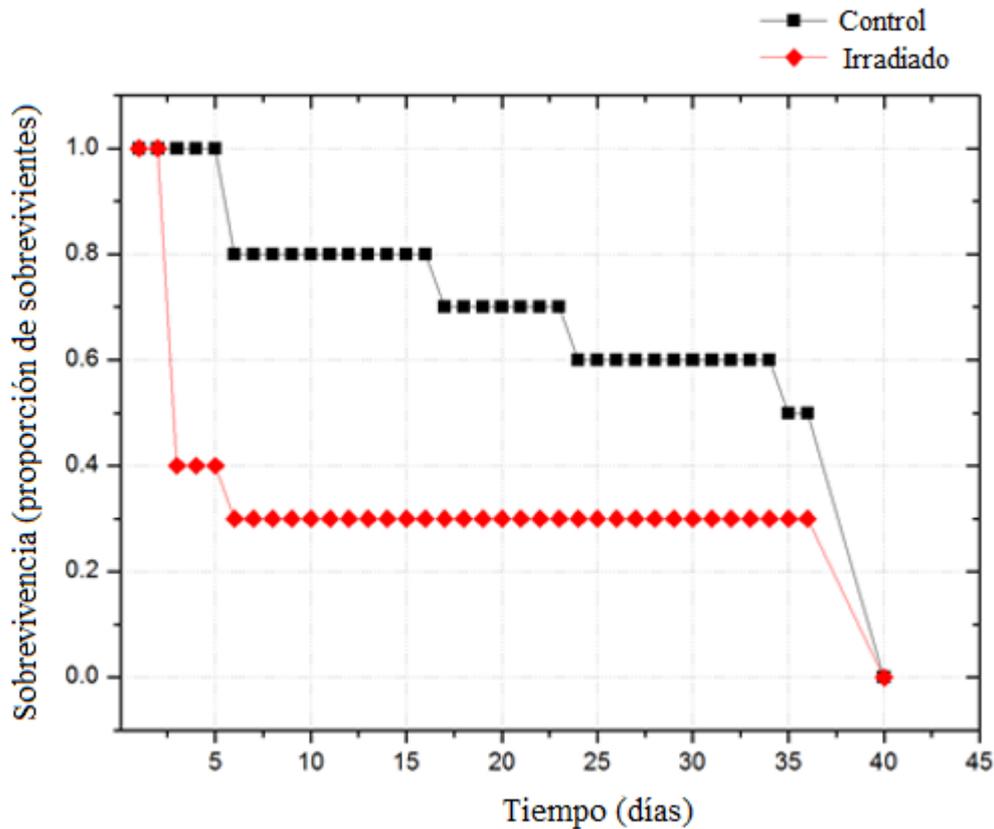


Fig 12. Curvas de sobrevivencia del grupo control y del grupo irradiado de *Daphnia pulex*.

6.2. Reproducción

En los individuos que alcanzaron la madurez sexual, la edad en su primera reproducción no presentó diferencias entre los individuos del grupo control y los radiados, pues todos tuvieron su primera camada a los 15 días después de nacer. Al evaluar el número total de crías, se encontró que este parámetro fue afectado por la radiación de forma negativa y significativa ($t=3.1$, $gl=6$ y $p=0.01$), el grupo control tuvo de 119-145 crías y el grupo irradiado de 102-115. Ambos grupos mostraron un pico en la producción de neonatos en los días 34, 36, 38 y 41 respectivamente. Nuestros resultados de este parámetro concuerdan con otros estudios realizados en *D. magna*. En el estudio de Parisot *et al*, (2015) este parámetro fue el más afectado entre los puntos finales a nivel organismo, en donde las daphnias mostraron un retraso creciente en la liberación de las crías y una reducción en el número de crías producidas durante generaciones.

6.3. Longevidad

El número total de días vividos fue de 41 a 43 en el grupo control, en el grupo experimental solo el 30% del total de la muestra alcanzaron 42 días sin variación. En esta variable no existieron diferencias significativas ($W=7.5$, $gl=5,3$ y $p=0.84$).

6.4. Morfología

Los cambios morfológicos fueron determinados en neonatos nacidos en las camadas 4ª y 5ª y de diferentes madres irradiadas en comparación con neonatos nacidos de madres control. Para evaluar la morfología se tomó en cuenta la longitud del cuerpo, la longitud de la espina apical, la longitud de las anténulas, el ángulo del rostro, el ancho de la base de la garra y la longitud de la garra (Fig.13).

La mediana de la longitud del cuerpo es significativamente diferente entre el grupo control y el grupo irradiado ($U=56.5$; $n_c=15$ $n_i=19$; $p<0.01$). Con lo anterior se rechaza la hipótesis nula, por lo que la longitud del cuerpo es mayor en el grupo control. En cuanto a la mediana de longitud de la espina, también hubo diferencia entre el grupo control y el grupo irradiado y estadísticamente es mayor en la del grupo irradiado ($U=51.5$; $n_c=14$ $n_i=19$; $p<0.01$). Por su parte, la mediana de la longitud de las anténulas es diferente entre el grupo control y el grupo irradiado ($U=4$; $n_c=9$ $n_i=6$; $p<0.01$). La mediana del ángulo del rostro entre el grupo control y el grupo irradiado no fue significativamente diferente ($U=42$; $n_c=10$ $n_i=10$; $p>0.05$), por lo que se acepta la hipótesis nula, es decir, que los ángulos de los rostros son iguales en ambos grupos. La mediana del ancho de la base de garra entre el grupo control y el grupo irradiado fue significativamente diferente ($U=18$; $n_c=11$ $n_i=8$; $p<0.05$) con lo cual interpretamos que el ancho de la base de la garra es mayor en el grupo control que en el grupo irradiado. Finalmente, la mediana de la longitud de la garra entre el grupo control y el grupo irradiado no fue significativamente diferente ($U=40$; $n_c=11$ $n_i=8$; $p>0.05$) (Fig. 14).

La conservación de los cambios morfológicos en la cuarta y quinta camada sugieren un posible cambio genético como lo proponen Andrewartha y Burggren (2012) y Burggren (2015 y 2016), ya que los efectos epigenéticos se lavan después de la tercera camada y si persisten, la probabilidad de que sean genéticos es muy alta (Fig 2). Lo anterior también lo mencionan

Sarapultseva *et al*, (2013) los cuales manifiestan que los efectos observados de larradiación pueden atribuirse a los cambios epigenéticos que se producen en la línea germinal de los padres expuestos y su posterior manifestación en la descendencia. Sin embargo, cabe señalar que los mecanismos subyacentes a los efectos intrageneracionales siguen siendo poco conocidos y es un área de oportunidad para la ciencia.

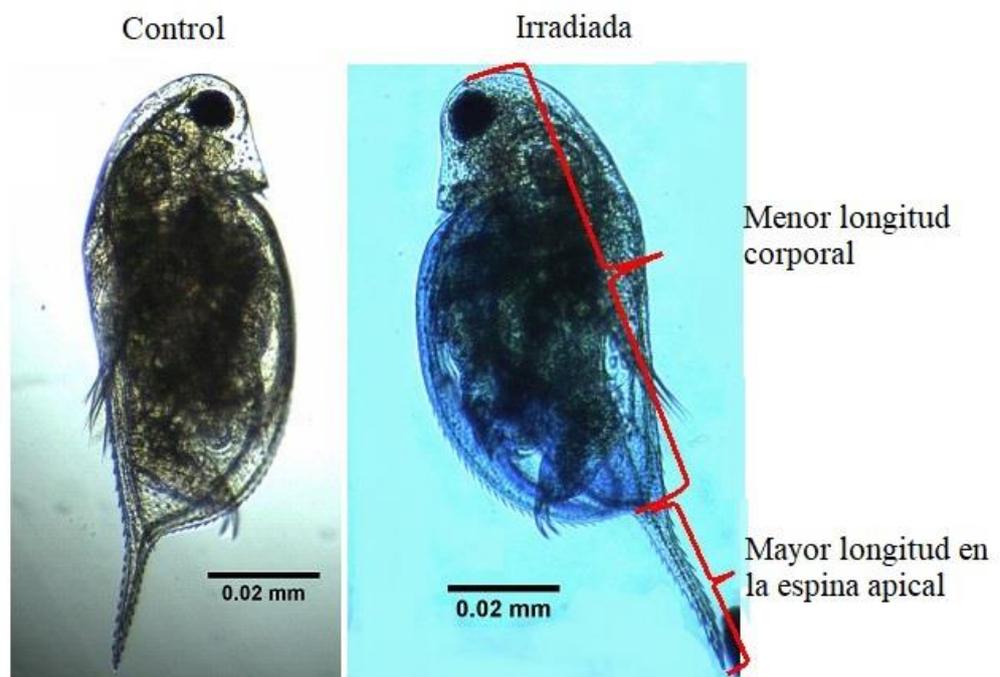


Fig 13. Imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico a 4X de neonatos del grupo control y neonatos irradiados de *Daphnia pulicaria*. Se muestran cambios en la morfología inducidos por radiación con láser azul.

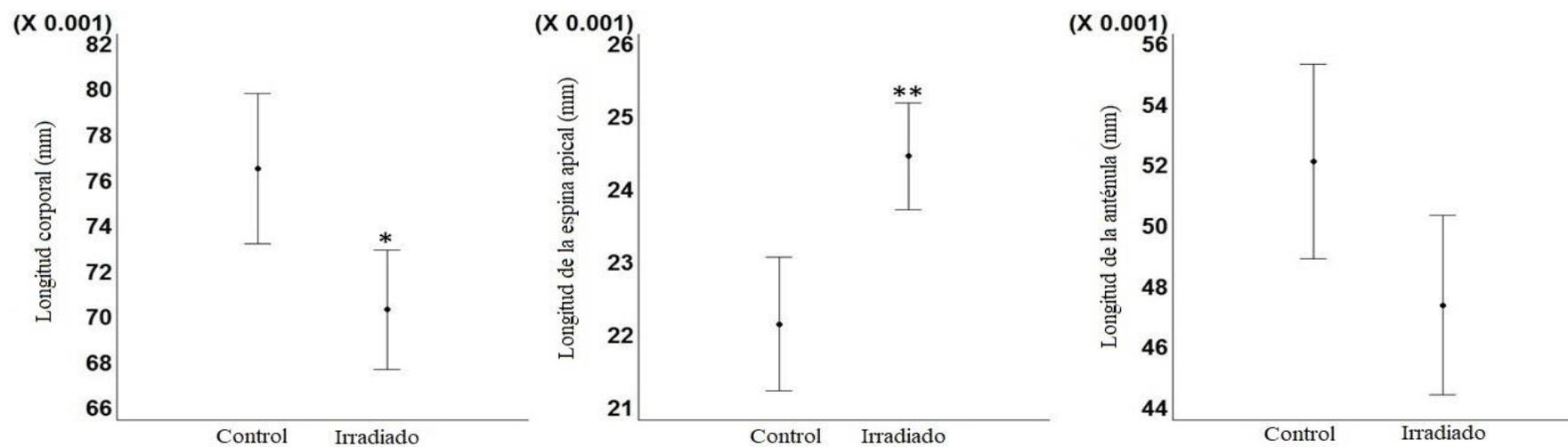


Fig 14. Comparaciones morfológicas de neonatos de la generación F1 obtenidos del grupo control de *Daphnia pulicaria* y de madres expuestas a la radiación con láser azul. Las líneas muestran intervalos de confianza del 95% y los puntos son el promedio del grupo. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, * significa $p < 0.05$ y ** significa $p < 0.01$

7. Conclusiones

El estudio llevado a cabo mostró que la irradiación con láser azul de estado sólido (longitud de onda de 405 nm) por un tiempo de 25 minutos y con una potencia de 40 mW produjo cambios significativos en la sobrevivencia, reproducción y morfología de *Daphnia pulicaria*.

La dosis suministrada fue letal para el 70% de los individuos irradiados y disminuyó el número total de crías de los individuos sobrevivientes; el grupo control tuvo de 119-145 crías y el grupo irradiado de 102-115 crías.

La morfología se vio afectada en los neonatos de la 4^a y 5^a camada de diferentes madres irradiadas en donde hubo una disminución en el tamaño del cuerpo, un incremento significativo en la espina apical y una tendencia en reducir el tamaño de las anténulas. Estos resultados sugieren un posible cambio genético ya que el efecto producido por el láser perduró hasta la cuarta y quinta camada y no se desvaneció a través de las reproducciones sucesivas producidas por la descendencia.

Se logró identificar el tipo de curva de sobrevivencia para *Daphnia pulicaria*. En condiciones normales el organismo presenta una curva tipo II en donde los individuos mueren a una razón constante de forma natural a todas las edades y el 80% alcanzó la madurez sexual. Por otro lado, cuando los organismos se radiaron con el láser de baja energía la curva de sobrevivencia cambió a una curva tipo III. En el experimento se puede observar una alta mortalidad en los primeros tres días después de la radiación, pero posteriormente los sobrevivientes logran avanzar hasta la edad adulta y alcanzar la reproducción.

Los resultados expuestos en este trabajo de tesis generan nuevas oportunidades de estudio para el organismo *Daphnia pulicaria*, pues proporciona un modelo experimental útil y muy sensible para el análisis de los efectos a corto y largo plazo a la exposición de un láser de baja energía.

9. Anexos

Tabla 2. Fotografías del cuerpo de *Daphnia pulicaria* adulta radiada después de su muerte.

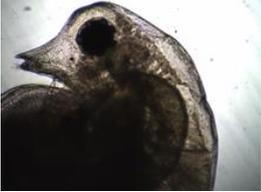
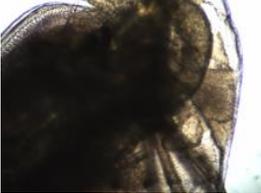
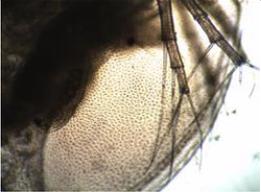
Tipo	Aumento	Descripción	Fotografía
Adulta Radiada	4X	Longevidad: 42 días Ojo compuesto, faringe, róstro	
Adulta Radiada	4X	Anténula, cuerpo	
Adulta Radiada	4X	Anténula, cuerpo	
Adulta Radiada	4X	Anténula, cuerpo	
Adulta Radiada	4X	Anténula, cuerpo	
Adulta Radiada	4X	Anténulas, postabdomen, espina apical	
Adulta Radiada	4X	Espina Apical	

Tabla 3. Fotografías del cuerpo de *Daphnia pulicaria* adulta radiada después de su muerte.

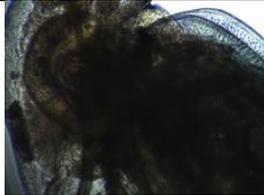
Tipo	Aumento	Descripción	Fotografía
Adulta Radiada	4X	Longevidad: 42 días Ojo compuesto, boca, faringe, róstrum.	
Adulta Radiada	4X	Intestino, corazón,	
Adulta Radiada	4X	Cuerpo	
Adulta Radiada	4X	Cuerpo	
Adulta Radiada	4X	Postabdomen, espina apical	
Adulta Radiada	4X	Espina Apical	

Tabla 4. Fotografías del cuerpo de *Daphnia pulicaria* adulta control después de su muerte.

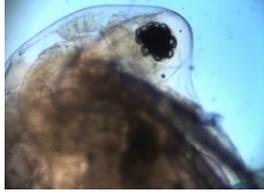
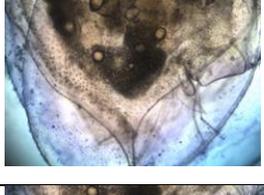
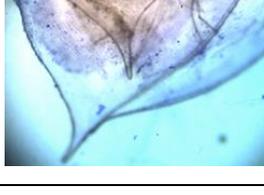
Tipo	Aumento	Descripción	Fotografía
Adulta Control	4X	Longevidad: 41 días Ojo compuesto, faringe, róstro	
Adulta Control	4X	Anténula	
Adulta Control	4X	Cuerpo	
Adulta Control	4X	Cuerpo	
Adulta Control	4X	Postabdomen	
Adulta Control	4X	Postabdomen, espina apical	
Adulta Control	4X	Espina Apical	

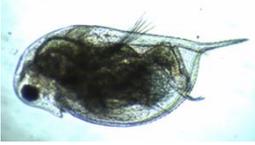
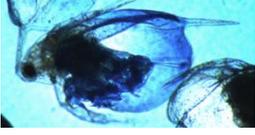
Tabla 5. Fotografías del cuerpo de *Daphnia pulicaria* adulta control después de su muerte.

Tipo	Aumento	Descripción	Fotografía
Adulta Control	4X	Longevidad: 34 días	
Adulta Control	4X	Cuerpo	
Adulta Control	4X	Postabdomen, espina apical	
Adulta Control	4X	Espina Apical	

Tabla 6. Fotografías de neonatos de madre radiada de *Daphnia pulicaria*.

Tipo	Aumento	Descripción	Fotografía
Neonato Radiado	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	
Neonato Radiado	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	
Neonato Radiado	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	
Neonato Radiado	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	
Neonato Radiado	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	
Neonato Radiado	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	
Neonato Radiado	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	

Tabla 7. Fotografías de neonatos de madre control de *Daphnia pulicaria*.

Tipo	Aumento	Descripción	Fotografía
Neonato Control	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	
Neonato Control	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	
Neonato Control	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	
Neonato Control	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	
Neonato Control	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	
Neonato Control	4X	Neonato de la 4 ^{ta} ó 5 ^{ta} camada	

10. Glosario de términos

anténula. Primer par de apéndices sensoriales de los crustáceos decápodos, situado en el centro de la región frontal.

Branchiopoda. Ver phyllopoda.

camada. Conjunto de animales procedentes del mismo parto.

cámara de cría. Espacio entre el tórax y el caparazón dorsal de Cladocera en el que termina el oviducto y se desarrollan los huevos. Está en contacto directo con el medio exterior.

caparazón. Concha dura de crustáceos.

Cladocera. Orden de la entomostraca. Tienen una concha de bivalvo que cubre el cuerpo, pero no la cabeza, cuatro a seis pares de patas y dos pares de antenas para nadar. Habitan mayormente en agua dulce. Ver también Entomostraca.

clon. Grupo de organismos que han surgido de una sola mujer por reproducción asexual y por lo tanto son genéticamente idénticos. Un clon a menudo se llama una línea iso-femenina.

crustáceos. artrópodos acuáticos caracterizados por la presencia de apéndices biramous y dos conjuntos de antenas. Los ejemplos incluyen cangrejos, langostas, copépodos, percebes, camarones y pulga de agua.

daño por radiación. cambios dañinos que sufren materiales inanimados y organismos vivos como resultado de la exposición a electrones energéticos, neutrones, fragmentos de fisión o radiación electromagnética de alta energía. En los materiales inanimados el daño puede estar causado por excitaciones electrónicas, ionización, transmutación o desplazamiento de átomos. En organismos vivos, estos mecanismos pueden causar cambios en las células que alteren su estructura genética, interferir en su división o matarlas.

Daphnia. Género de crustáceos planctónicos del orden Cladocera. Las especies de Daphnia tienen un caparazón transparente y una cabeza que protruye con un par de antenas muy ramificadas que le sirven para nadar, y un único ojo medio compuesto. Los cinco pares de apéndices torácicos forman un eficiente mecanismo de filtrado de los alimentos. La reproducción puede tener lugar sin apareamiento, es decir por partenogénesis.

descendencia. Conjunto de individuos que resultan de la reproducción sexual o asexual.

dosis. Término general que indica la energía depositada por la radiación en la materia

fotoperiodo. Parte del día en que un ser vivo está expuesto a la luz.

hábitat. El lugar de vida de una población, que se caracteriza por sus propiedades físicas, químicas y / o bióticas.

morfología. Parte de la biología que trata de la forma de los seres orgánicos y de las modificaciones o transformaciones que experimenta.

neonato. Recién nacido.

partenogénesis cíclica. Modo de reproducción en el que se alternan fases de reproducción partenogenética (asexual) y sexual. Varias generaciones asexuales pueden seguir una generación sexual. Se encuentra en Cladocera, Rotifera y áfidos.

partenogénesis. Desarrollo de un organismo a partir de un huevo no fertilizado. Ver también partenogénesis cíclica.

phyllopoda. Orden de Entomostraca que incluye un gran número de especies, la mayoría de las cuales viven en agua dulce. Tienen patas planas o de hojas, a menudo muy numerosas, que usan para nadar. También se llama Branchiopoda.

población. Grupo de individuos que se cruzan y sus descendientes. En especies asexuadas, esta definición no se puede aplicar; en este caso, una población es un grupo de individuos fenotípicamente coincidentes que viven en la misma área.

procesos abdominales. Procesos en el abdomen de Daphnia que cierran la cámara de cría.

radiación electromagnética. Energía en forma de ondas proveniente de la electricidad y el magnetismo, que según la energía que transporta recibe diferentes nombres: luz visible, ultravioletas, ondas de radio, microondas y otros. La partícula cuántica que constituye a estas ondas se llama fotón, y cuando tiene energías muy altas se le da el nombre de rayos X o rayos gamma.

radiación ionizante. Fotones o partículas cargadas emitidas por elementos radioactivos o en procesos atómicos u otros procesos que poseen energía suficiente como para ionizar átomos o moléculas.

reproducción asexual. Desarrollo o reproducción de seres vivos son la fusión de células sexuales, en la cual los descendientes tienen un solo progenitor.

reproducción sexual. Producción de una nueva generación de seres vivos; procreación que se caracteriza por la fusión de las células germinativas masculina y femenina (bisexual); implica división reduccional o meiosis, mediante la formación de células diploides a células haploides.

zooplancton. Componente animal de pequeños organismos acuáticos que principalmente se desplazan con movimientos de agua. Incluyen protozoos, pequeños crustáceos y, a principios del verano, las etapas larvarias de muchos organismos más grandes.

11. Referencias

1. Aarkrog, A. (2003). Input of anthropogenic radionuclides into the World Ocean. *Deep Sea Res. Part II: Top. Studies Oceanogr.* 50 (17), 2597-2606.
2. Alonzo, F., Gilbin, R., Zeman, F.A. & Garnier-Laplace, J. (2008a). Increased effects of international alpha radiation in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 87 (3), 146-156.
3. Alonzo, F., Hertel-Aas, T., Gilek, M., Gilbin, R., Oughton, D.H. & Garnier-Laplace, J. (2008b). Modelling the propagation of effects of chronic exposure to ionizing radiation from individuals to populations. *Journal of Environmental Radioactivity*, 99 (9), 1464-1473.
4. Andrewartha S. & Burggren, W. (2012). Transgenerational Variation in Metabolism and Life-History Traits Induced by Maternal Hypoxia in *Daphnia magna*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 85(6), 625–634.
5. Arzate-Cárdenas, M.A., Ortiz-Butrón, R. & Martínez-Jerónimo, F. (2011). Age effect on the antioxidant activity of *Daphnia magna* (Anomopoda: Daphniidae): Does younger mean more sensitivity?. *Journal of Environmental Biology*, 32, 481-487.
6. Burggren W. (2016). Epigenetic Inheritance and Its Role in Evolutionary Biology: Re-Evaluation and New Perspectives. *Biology*, 5(2), 24 doi:10.3390/biology5020024.
7. Burggren, W. (2012). Dynamics of epigenetic phenomena: intergenerational and intragenerational phenotype “washout”. *The Journal of Experimental Biology*, 218:80-
8. Calderón, E.M. (2013). *Eléctrica: Láser y Luz Pulsada*. San Vicente, Alicante: Club Universitario.
9. Cuesta, A. (2011). *Tecnología láser y sus aplicaciones industriales*, Primera edición. Barcelona, España: Marcombo.
10. Cuevas, J. (2010). *Fotografía y conocimiento: la imagen científica en la era electrónica*, Primera edición . Madrid, España: Editorial Complutense.
11. Dallas, L.J., Keith-Roach, M., Lyons, B.P., & Jha, A.N. (2012). Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates: a critical review, *Radiation Research*, 177 (5), 693-716.
12. Dubrova, Y.E. (2003). Radiation-induced transgenerational instability. *Oncogene*, 22, 7087–7093.
13. Ebert, D. (2005). *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia* [Internet]. Bethesda, MD: International Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.

14. Esterhuizen-Londt, M., von Schnehen, M., Kühn, S. y Pflugmacher, S. (2016). Oxidative stress responses in the animal model, *Daphnia pulex* exposed to a natural bloom extract versus artificial cyanotoxin mixtures. *Aquatic Toxicology*, 179, 151-157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.003>.
15. Fuma, S., Ishii, N., Takeda, H., Miyamoto, K., Yanagisawa, K., Ichimasa, Y., Saito, M., Kawabata, Z., & Polikarpov, G. (2003). Ecological effects of various toxic agents on the aquatic microcosm in comparison with acute ionizing radiation. *Journal of Environmental Radiology*, 67 (1):1-14.
16. García, R., Ayala, P.A., & Perdomo, S.A., (2012). Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Ciencias de la Salud*, 10 (1):59-71.
17. Gilbin R., Alonzo, F., & Garnier-Laplace, J. (2008). Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Radioactivity*, 99,13e145. doi:10.1016/j.jenvrad.2007.07.004.
18. Gomes, T., Song. Y., Brede. D., Xie. L., Gutzkow. K., Salbu. B., & Tollefsen. K. (2018). Gamma radiation induces dose-dependent oxidative stress and transcriptional alterations in the freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Science of the Total Environment*, 628-629, 206-216. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.02.039.
19. Gutiérrez, E., Suárez, E., Gutiérrez, M., Silva, M., Granados, J.G., & Garfias, T. (2008). Cladocera y Copepoda de las aguas continentales de México. Guía ilustrada. UNAM, ECOSUR, SEMARNAT-CONACYT, CONABIO. ISBN 978-970-32-4852-0. México, D.F. (1000 pp).
20. Harris, K. D., Bartlett, N. J. & Lloyd, V. K. (2012). *Daphnia* as an emerging epigenetic model organism. *Genet. Res. Int.* 147892.
21. ISO, 2000. Water quality-Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO 10706:2000. International Organization for Standardization.
22. Kane, J.W., & Sternheim, M.M. (2007). *Física*, Segunda edición. Barcelona, España: Reverté.
23. Knave. B. (2001). 49. Radiaciones no ionizantes: Campos eléctricos y magnéticos y consecuencias para la salud. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el trabajo*, 49.2.
24. Kushibiki, T., Hirasawa, T., Okawa, S., & Ishihara, M. (2013). Blue Laser Irradiation Generates Intracellular Reactive Oxygen Species in Various Types of Cells.

Photomedicine And Laser Surgery, 31(3), 95-104.
<http://dx.doi.org/10.1089/pho.2012.3361>.

25. Martínez-Jerónimo, F., Rodríguez-Estrada, J. & Martínez-Jerónimo, L. (2008). *Daphnia exilis* Herrick, 1895 (Crustacea: Cladocera). Una especie zooplanctónica potencialmente utilizable como organismo de prueba en bioensayos de toxicidad aguda en ambientes tropicales y subtropicales. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 24 (4): 153-159.
26. Martínez, F., Villaseñor, R., Espinosa, F., Ríos, G. & Ramírez, R. (1997). Metodología para la producción de neonatos de *Daphnia magna* (Anomopoda: Daphnidae), como organismo de prueba en toxicología acuática. *Zoología Informa*, Nums 36-37:59-81.
27. Martínez, M., & Sendra, F. Laser. (s.f.). Recuperado de: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-fis/laser_morrillo.pdf el 26 de Septiembre de 2018.
28. NASA. (2007). The Electromagnetic Spectrum. Recuperado de: https://myasadata.larc.nasa.gov/images/EM_Spectrum3-new.jpg el 2 de Octubre de 2018.
29. OECD, 2004. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline 202: *Daphnia sp.*, Acute Immobilization test.
30. OECD, 2008. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna*., Reproduction test.
31. Parisot, F., Bourdineaud, J.P., Plaire, D., Adam-Guillermin, C. & Alonzo, F. (2015). DNA alterations and effects on growth and reproduction in *Daphnia magna* during chronic exposure to gamma radiation over three successive generations. *Aquatic Toxicology*, 163, 27-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.03.002>.
32. Rauschert, E. (2010). Survivorship Curves. *Nature Education Knowledge*, 3(10):18.
33. Sarapultseva, E.I., & Dubrova, Y. (2016). The long-term effects of acute exposure to ionising radiation on survival and fertility in *Daphnia magna*. *Environmental Research*, 138-143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.046>.
34. Sarapultseva, E.I., Uskalova, D., Savina, N. & Ustenko, K. (2017). Medical-biological aspects of radiation effects in *Daphnia magna*. *Journal of Physics: Conference series*, 784, 012052.

35. Sarapultseva, E.I. & Gorski, A. (2013). Low-dose γ -irradiation affects the survival of exposed *Daphnia* and their offspring. *Dose-Response*, 11:475–483, DOI: 10.2203/dose-response.12-033.Sarapultseva.
36. Sarapultseva, E.I., & Malina, J.J. (2009). Change of *Daphnia magna* viability γ -irradiation at low doses. *Radiats Biol Radioecol*,49:82–84.
37. Secretaría de Economía. (2010). Norma Mexicana NMX-AA-087-scfi-2010. Análisis de agua - evaluación de toxicidad de agua con *Daphnia magna*, Straus (Crustacea - Cladocera) - Método de prueba (44 pp).
38. Sirlin, E. (2005). Manual de iluminación. Física de la luz. Universidad de Buenos Aires. INT. Recuperado de: http://www.elisirlin.com.ar/11_fisica%20de%20la%20luz.pdf el 28 de Septiembre de 2018.
39. Skinner, M.K. (2008). What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reprod. Toxicol*, 25, 2–6.
40. Smith, J.T., & Beresford, N.A. (2005). Chernobyl. In: Catastrophe and Consequences. Springer-Praxis, Chichester.
41. Stark, J.D., Banks, J.E., & Vargas, R. (2004). How risky is risk assessment: The role that life story strategies play in susceptibility of species to stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (3), 732-736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304903101>.
42. Stiling P. (2014). *Ecology: Global Insights & Investigations*, Second edition. New York: McGraw-Hill Science Engineering.
43. Uday Bhan, S., Ahluwalia, A.S., Sharma, C., Jindal, R. & Thakur, R.K. (2013). Planktonic indicators: A promising tool for monitoring water quality (early-warning signals). *Eco. Env. & Cons*, 19 (3), 793-800.
44. United States Environmental Protection Agency, 2016. Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.1010: Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids. US EPA (17 pp).
45. United States Environmental Protection Agency,1996. Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1300 Daphnid Chronic Toxicity Test. US EPA (12 pp).
46. UNSCEAR, (2008). UNSCEAR 2008 report Vol. II. Effects of ionizing radiation. Annex E. Effects of Ionising Radiation on Non-human Biota. New York: United Nations.

47. Vega, M.P. & Pizarro, R.A. (2000). Oxidative stress and defence mechanisms of the freshwater cladoceran *Daphnia longispina* exposed to UV radiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, 54,121–125.
48. Vorob'yeva, O.V., Filenko, O.F., Isakova, E.F., Vorobieva, N.N., Rybaltovskii, A.O., Yusupov, V.I. & Bagratashvili. (2015). Effects of He-Ne laser on *Daphnia magna Straus* manifested in subsequent generations. *Laser Physics Letters*, 12(11):115601.
49. Won, E.J., Lee, J.S. (2014). Gamma radiation induces growth retardation, impaired egg production, and oxidative stress in marine copepod *Paracyclopina nana*. *Aquatic Toxicology*, 150,17-26.
50. Yuan, X., Song, Y., Song. Y., Xu. J., Wu. Y., Glidle. A., Cusack. M., Ijaz. U.Z., Cooper. J.M., Huang. W.E. & Yin. H. (2018). Effect of Laser Irradiation on Cell Function and Its Implications in Raman Spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (8). doi: 10.1128/AEM.02508-17.