

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE



**EFFECTO DEL HERBICIDA ATRAZINA EN LA MORFOLOGÍA DE LOS
ERITROCITOS Y TESTÍCULOS DE *Lithobates spectabilis***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA:

KARLA HERNÁNDEZ PÉREZ

REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN DE

DRA. MARIBEL MÉNDEZ TEPEPA
DRA. LIBERTAD JUÁREZ SANTACRUZ

TUTORES

DR. HÉCTOR SANTOS LUNA ZENDEJAS
DRA. MAYVI ALVARADO OLIVARES



IXTACUIXTLA, TLAX., JULIO 2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Código: 505-RGE-04
Publicación: Diciembre 2020
Revisión: 9001:2015 04

C. KARLA HERNÁNDEZ PÉREZ

PRESENTE

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de evaluación de examen de grado ha revisado el trabajo de investigación titulado: "Efecto del herbicida atrazina en la morfología de los eritrocitos y testículos de *Lithobates spectabilis*", realizado bajo la dirección de la Dra. Libertad Juárez Santacruz y la Dra. Maribel Méndez Tepepa. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

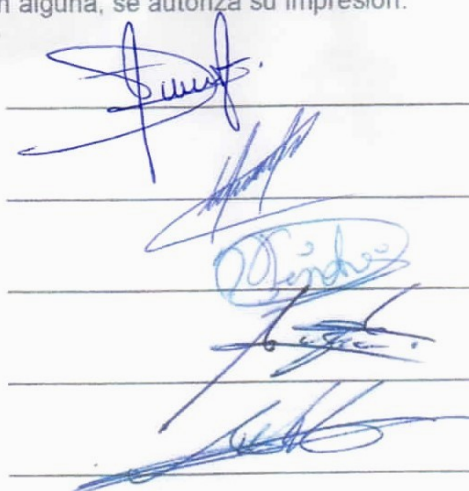
Dra. Arely Anaya Hernández

Dra. Mayvi Alvarado Olivarez

Dra. Maribel Méndez Tepepa

Dr. Héctor Santos Luna Zendejas

Dr. Aníbal Helios Díaz de la Vega Pérez



Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"

Ixtacuixtla, Tlax., 29 de julio de 2024.





DR. HÉCTOR SANTOS LUNA ZENDEJAS
COORDINADOR GENERAL DEL CIGV
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

c c.p. Expediente



Documento exclusivo para uso de la dependencia responsable o autoridad correspondiente

Agradecimientos

Yo Karla Agradezco:

Al Centro de Investigación en Genética y Ambiente por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A **CONAHCYT** por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto a través de la beca de maestría otorgada (2021-2023).

A mi comité tutorial por su valiosa orientación y apoyo a lo largo de este proceso. Sus conocimientos y consejos han sido fundamentales para la realización de esta investigación: mis directoras la **Dra. Maribel Méndez Tepepa** y la **Dra. Libertad Juárez Santacruz** y tutores el **Dr. Héctor Santos Luna Zendejas** y la **Dra. Mayvi Alvarado Olivarez**.

A todos los Dres. que me impartieron clase por compartir sus conocimientos y experiencia adquirida a lo largo de su trayectoria docente: Dra. Alba Mónica Montiel Rodríguez, Dr. José Luis Martínez y Pérez, Dra. Edelmira García Nieto, Dra. Arely Anaya Hernández, Dra. Libertad Juárez Santacruz, Dr. Cuauhtémoc Morales Cruz, Dra. Maribel Méndez Tepepa, Dra. Elizabeth García Gallegos, Dr. Ángel Lopantzi y la Mtra. Eunice Zamora Campos.

Especialmente a mis amigos: Karina, Juan y Zeferino, por que siempre han creído en mí.

Al Dr. Cuauhtémoc Morales Cruz, aunque no forma parte de mi comité tutorial. Su orientación, tiempo y consejos fueron de gran importancia para el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de generación: Dianet, Rebeca, Sandra, Danna, Rosa, Fernando y Miguel

Renato. Por todas las observaciones y aportes para mejorar día a día nuestros proyectos de investigación.

Infinitamente a Karina, Allison, Gabriel y Vero por siempre recibirme en su casa y hacerme sentir como parte de su familia.

A mi mamá por todo el apoyo que me ha brindado siempre.

Finalmente y más importante a mi hija **Arantza León Hernández**, cuyo amor, apoyo y paciencia han sido una fuente inagotable de inspiración durante este proceso. Gracias por tu comprensión en los momentos de ausencia y por tus palabras de aliento que me han motivado a seguir adelante, tu compañía y fortaleza han sido mi motor para culminar este proyecto, este logro también es tuyo.

Índice general

Agradecimientos	III
Índice general	V
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	VIII
Abreviaturas	IX
Resumen	X
Abstract	XI
I Introducción	1
I.1. Marco teórico	1
I.2. Herbicidas	1
I.2.1. Atrazina y sistemas acuáticos	2
I.3. Anfibios y su importancia en el ecosistema	4
I.4. <i>Lithobates spectabilis</i>	6
I.5. Eritrocitos de anuros y prueba de MNs	8
I.6. Testículo de anuros	10
I.6.1. Espermatogénesis	11
I.6.2. Mucopolisacáridos	14
I.7. Antecedentes	14
I.7.1. Atrazina y anomalías en los eritrocitos	14
I.7.2. Atrazina y testículo	15
I.7.3. Mucopolisacáridos	16
I.8. Preguntas de investigación	18
I.9. Hipótesis	19
I.10. Justificación	20
I.11. Objetivos	21
I.11.1. General	21
I.11.2. Específicos	21
II Metodología	22

II.1. Captura de individuos e instalación de terrarios	22
II.2. Aclimatación, exposición al herbicida atrazina y Eutanasia	23
II.3. Evaluación del efecto del HA en los eritrocitos	24
II.4. Procesamiento histológico del testículo	26
II.5. Efecto del Herbicida Atrazina en el Testículo de <i>L. Spectabilis</i>	27
II.6. Análisis estadístico	29
III Resultados	31
III.1. Efecto del herbicida atrazina en los eritrocitos de <i>L. spectabilis</i>	31
III.2. Efecto del herbicida atrazina en el testículo	33
IV Discusión	37
IV.1. Efecto del herbicida atrazina en los eritrocitos de <i>L. spectabilis</i>	37
IV.2. Efecto del herbicida atrazina en el testículo de <i>L. spectabilis</i>	39
V Conclusiones	42
VI Perspectivas	43
Referencias	44
Anexo	50
VII Anexos	50
VII.1.A. Parámetros de calidad del agua potable del CIGyA	50

Índice de figuras

1.	Transporte ambiental de la atrazina	4
2.	Clasificación de los anfibios	6
3.	<i>Lithobates spectabilis</i>	7
4.	Distribución de <i>Lithobates spectabilis</i>	8
5.	Sistema reproductivo de ranas	13
6.	Diagrama de las instalación de terrarios utilizados en el experimento	23
7.	Muestreo de frotis sanguíneo	25
8.	Muestreo utilizado para determinar el área de los túbulos seminíferos y área ocupada por espermatozoides.	29
9.	Presencia de los mucopolisacáridos	30
10.	Morfología de los eritrocitos de la rana macho <i>L. spectabilis</i>	31
11.	Efecto del HA en la morfología de los eritrocitos con ampolla en la membrana de <i>L. spectabilis</i>	32
12.	Efecto del HA en la morfología de los eritrocitos apoptóticos de la rana <i>L. spectabilis</i>	32
13.	Efecto del HA en la morfología de los eritrocitos necróticos de la rana <i>L. spectabilis</i>	32
14.	Células espermatogénicas del testículo de <i>L. spectabilis</i>	34
15.	Efecto del HA en el área de los túbulos seminíferos y área ocupada por espermatozoides de <i>L. spectabilis</i>	35
16.	Gráfica de área testicular de <i>L. spectabilis</i>	35
17.	Gráfica de área de los túbulos seminíferos de <i>L. spectabilis</i>	36
18.	Gráfica del área ocupada por espermatozoides	36
19.	Número de túbulos seminíferos con y sin mucopolisacáridos en el grupo control y HA	36
20.	Diagrama del efecto citotóxico del HA en los eritrocitos de <i>L. spectabilis</i>	39

Índice de tablas

1.	Propiedades fisicoquímicas de la atrazina	2
2.	Características morfológicas de los eritrocitos normales y con anormalidades nucleares y citoplasmáticas	25
3.	Análisis de los parámetros de calidad del agua utilizada en este experimento.	50

Abreviaturas

GAGs	Glicosaminoglicanos. 14 , 16
HA	herbicida atrazina. 23 , 24 , 29 , 31–33 , 35–39
LHC	longitud hocico cloaca. 7
m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar. 8
MNs	Micronúcleos. 9 , 15 , 25 , 31 , 37
MP	Mucopolisacáridos. 30 , 36
spp	especies. 4 , 5
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. 5
v/v	Volumen/volumen. 24

Resumen

La atrazina es un herbicida ampliamente utilizado en los agroecosistemas que, debido a sus características fisicoquímicas, puede ser transportado hacia los sistemas acuáticos, entrando en contacto con los organismos que ahí habitan, como los anuros. Esta sustancia es un disruptor endocrino y es genotóxico a concentraciones más altas que las detectadas en diferentes matrices acuáticas. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto subcrónico del herbicida atrazina utilizando una concentración de atrazina reportada en un sistema acuático de México (15 µg/L) en la morfología de los eritrocitos y en las características histomorfológicas del testículo de *Lithobates spectabilis*. Se evaluó el efecto del herbicida en la morfología de los eritrocitos mediante el ensayo de micronúcleos, y se empleó la tinción del ácido peryódico de Schiff para analizar el área testicular, el área ocupada por espermatozoides, el área de los túbulos seminíferos y el número de túbulos seminíferos con y sin mucopolisacáridos. Los resultados mostraron que la concentración de 15 µg/L de atrazina causa citotoxicidad en los eritrocitos, aumenta el área de los túbulos seminíferos, el área ocupada por los espermatozoides y el número de los túbulos seminíferos con mucopolisacáridos en comparación con el grupo control. El aumento de los eritrocitos con ampolla, apoptóticos y necróticos podría conllevar a enfermedades degenerativas, procesos inflamatorios, hipoxia o hipercapnia en los individuos. Además, la atrazina afecta el testículo de *L. spectabilis*, lo que sugiere que la atrazina podría alterar el proceso de espermatogénico de esta especie.

Abstract

Atrazine is a widely used herbicide in agroecosystems that, due to its physicochemical characteristics, can be transported to aquatic systems, coming into contact with the organisms that inhabit them, such as anurans. This substance is an endocrine disruptor and is genotoxic at higher concentrations than those detected in various aquatic matrices. The aim of this research was to determine the subchronic effect of the herbicide atrazine on the morphology of erythrocytes and the histological characteristics of the testis of *Lithobates spectabilis* using a concentration of atrazine reported in an aquatic system in Mexico. The effect of the herbicide on erythrocyte morphology was evaluated using the micronucleus assay, and the periodic acid-Schiff stain was employed to analyze the area occupied by spermatozoa, the area of the seminiferous tubules, and the presence of mucopolysaccharides. The results showed that the concentration of 15 µg/L of atrazine causes cytotoxicity in erythrocytes, increases the area of the seminiferous tubules, the area occupied by spermatozoa, and alters the presence of mucopolysaccharides compared to the control group. The increase in blistered, apoptotic, and necrotic erythrocytes could lead to degenerative diseases, inflammatory processes, hypoxemia, or hypercapnia in individuals. Additionally, atrazine affects the testis of *Lithobates spectabilis*, suggesting that atrazine could alter the spermatogenesis process in this species.

I Introducción

I.1 Marco Teórico

I.2 Herbicidas

Los herbicidas son un grupo de compuestos químicos empleados principalmente en el sector agrícola para eliminar o detener el crecimiento de plantas o malezas no deseadas en los agroecosistemas. La aplicación de estos compuestos mejora la producción y calidad de los productos agrícolas, por ende, el beneficio económico aumenta, haciendo que esta práctica sea aceptada y utilizada a nivel mundial (Lobo y Tibisay-Bolaños, [2014](#)). Desafortunadamente, el uso excesivo de estos productos químicos afecta indirectamente a los sistemas acuáticos ya que, pueden ser transportados por las lluvias a través de la escorrentía o la lixiviación, llegando a ríos, lagos y humedales provocando su contaminación (CEDRSSA, [2020](#)).

La biota que habita en los ecosistemas acuáticos contaminados está en riesgo debido a la presencia de estas sustancias tóxicas. Estos compuestos pueden provocar daño genético, neurotoxicidad, alteraciones endocrinas, malformaciones en el desarrollo, mortalidad, efectos negativos en el comportamiento reproductivo, entre otros. Además, causan diversos daños ecológicos, tales como contaminación, disminución de la biodiversidad, efectos tóxicos en organismos no objetivo, alteración en la calidad del suelo, bioacumulación y biomagnificación (Kadiru *et al.*, [2022](#)).

El impacto que tienen los herbicidas se debe a: 1) su aplicación en grandes volúmenes a diferentes cultivos, 2) el transporte por escorrentía superficial, rociado y lixiviación de áreas agrícolas (Battaglin *et al.*, [2000](#)), 3) la permanencia en el suelo y agua lo que incrementa a la vez la contaminación de los ecosistemas acuáticos y 4) la toxicidad y acumulación en los tejidos de los organismos (Regaldo *et al.*, [2017](#)). México se encuentra entre los 11 países de mayor consumo

de herbicidas pues el 66.9 % del consumo total anual de plaguicidas corresponde a herbicidas, siendo los más utilizados el glifosato, paraquat y atrazina (Albert, 2005).

1.2.1 Atrazina y Sistemas Acuáticos

El 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina, comúnmente conocido como atrazina, forma parte del grupo de las triazinas, está dentro de la categoría toxicológica IV y se considera altamente peligrosa, es utilizada en la formulación de varios herbicidas comerciales como Aatrex®, Aatram®, Atratol® y Gesaprim® (ATSDR, 2003). Sus características fisicoquímicas (Tabla 1) le confieren gran facilidad para ser transportada por el agua de lluvia, ya sea por lixiviación a mantos freáticos o escorrentía superficial a ríos y lagos (Hayes *et al.*, 2010). Los metabolitos de estas formulaciones son: diclorotriazinas, hidroxitriazinas y tris (alquil) aminotriazinas (ATSDR, 2003).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la atrazina (ATSDR, 2003)

Propiedad	Información
Color	Blanco
Peso molecular	215.69 g/mol
Solubilidad agua (22 °C)	34.7 mg/L
Densidad	1.23 g/cm ³
Log _{K_{ow}}	2.6
Log _{K_{oc}}	1.96
Constante de Henry (25 °C)	2.96x10 ⁻⁹ atm-m ³ /mol

Se ha estimado que anualmente se consumen de 70,000 a 90,000 t de atrazina en el mundo (Baxter *et al.*, 2015). China ha sido el principal productor y actualmente utiliza entre 1,000 y 1,500 t al año, incluso el área de suelo contaminado con atrazina excede $1.0 \times 10 \text{ km}^2$ (Ding *et al.*, 2008). En Estados Unidos, se emplea como el herbicida predominante aplicado en el cultivo de maíz, con una cantidad anual estimada de aproximadamente 82 millones de lb (Williams *et al.*, 2011). Algunos países de la Unión Europea y Australia han tomado la decisión de prohibir o restringir el uso de esta sustancia química debido a la contaminación prevalente de las fuentes de agua (Solomon *et al.*, 2013). Sin embargo, en México y en la mayoría de las naciones de América

Latina y el Caribe su uso está permitido sin regulación y sigue siendo ampliamente aplicado en cultivos como: maíz, cebada y trigo (Albert, 2005). En el país están autorizados 438 registros para producir herbicidas, de los cuales 92 son para atrazina y a pesar de que en 37 países está prohibido, en México se utiliza para 14 cultivos diferentes (Albert, 2005), sin considerar que la aplicación constituye un factor de riesgo de contaminación ambiental para diferentes taxones (Salazar-Ledesma *et al.*, 2018). Específicamente las ranas, peces y tortugas tienen una fuerte afinidad por los sistemas acuáticos (Murphy *et al.*, 2006) que pueden encontrarse contaminados con sustancias de origen antropogénico convirtiéndose en un riesgo potencial para estos animales.

Las principales fuentes de contaminación de atrazina a los sistemas acuáticos son: las aguas residuales domésticas, la industria y los agroecosistemas (Haseena *et al.*, 2017). Dependiendo de las características de la fuente de contaminación puede ser puntual (fábricas, termoeléctricas, minas, refinerías, etc.) o difusa (transportes) (Schweitzer y Noblet, 2018).

Los cuerpos de agua dulce albergan una amplia diversidad de organismos desde plantas sumergidas, emergentes y flotantes, algunos animales vertebrados por ejemplo: peces y anfibios, asimismo invertebrados y microorganismos (Sánchez *et al.*, 2007). Un ecosistema acuático se encuentra contaminado cuando existe presencia de compuestos o factores químicos, físicos o biológicos, que son capaces de modificar o deteriorar la calidad del agua (Schweitzer y Noblet, 2018). Tal es el caso del herbicida atrazina que es arrastrado por el agua de lluvia hacia lagos, ríos, mares y pozos transportándose a más de 1000 Km desde el punto de su aplicación (Figura 1), lo que implica el incremento de la contaminación de diversos hábitats en concentraciones superiores al límite permitido (3.0 µg/L) (Taverna *et al.*, 2018). Algunos estudios demuestran la presencia de atrazina en diferentes cuerpos de agua naturales (Ackerman, 2007): en ríos ubicados en áreas rurales (2.70 a 6.32 µg/L), en humedales (0.2 y 1000 µg/L), aguas subterráneas (2.51 µg/L a 20.5 µg/L) (Thorngren *et al.*, 2016), así como en agua potable (3 µg/L) (EPA, 2012). En

México existen escasos estudios que demuestran la contaminación por atrazina en los sistemas acuáticos, en agua superficial las concentraciones detectadas se encuentran entre 4.6 a 15.0 $\mu\text{g/L}$ (Hernández-Antonio y Hansen, 2011). En este sentido, la presencia de atrazina puede representar un riesgo potencial para los organismos localizados en los sistemas acuáticos. Principalmente porque durante la temporada de lluvias los niveles de atrazina son mayores y coinciden con los períodos de reproducción de muchas especies de anfibios (Lopes-Lima *et al.*, 2020), que se reproducen en hábitats acuáticos (Rastogi *et al.*, 2011).

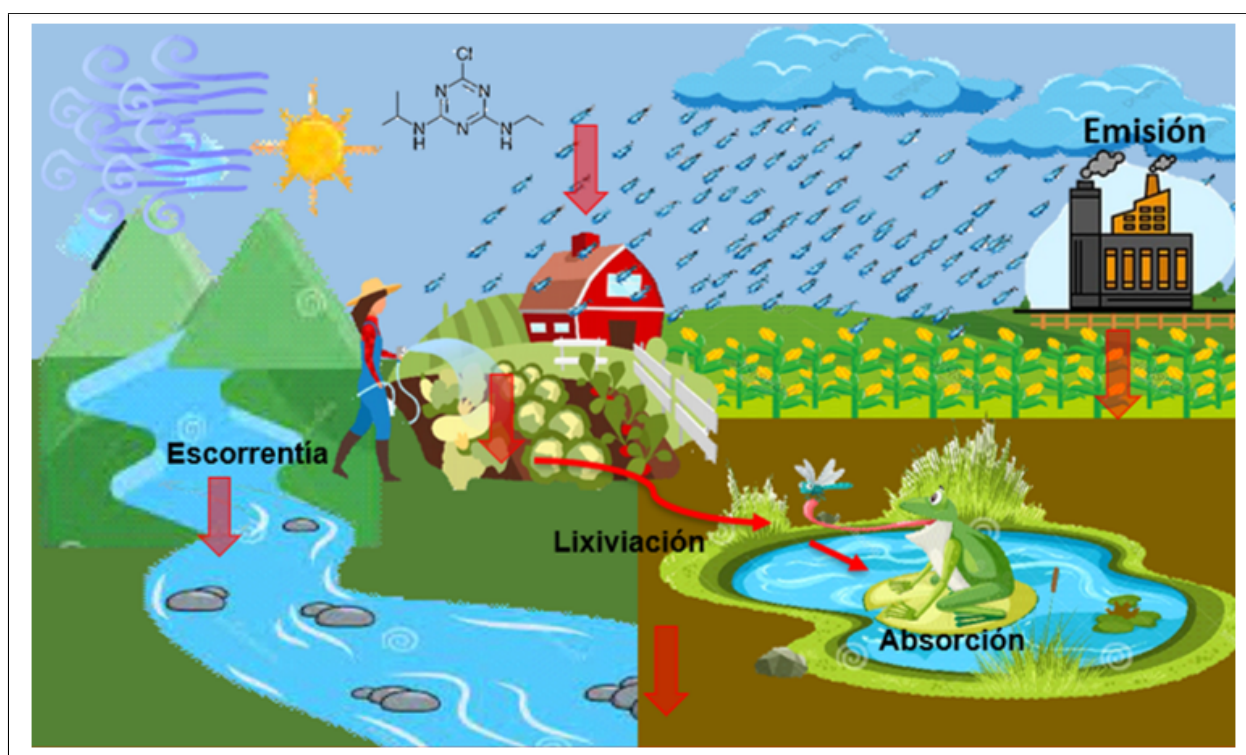


Figura 1. Transporte ambiental del herbicida atrazina. Al ser depositado en los agroecosistemas o en orillas de carreteras y vías férreas, este compuesto puede ser transportado por dos procesos: lixiviación (mantos acuíferos) y escorrentía (aguas superficiales), de este modo puede entrar en contacto con diversos organismos acuáticos como peces, sapos, ranas, entre otros. (Editado de ATSDR, 2003).

I.3 Anfibios y Su Importancia en el Ecosistema

Los anfibios son un amplio grupo taxonómico de vertebrados (Wake y Koo, 2018) con 8,601 especies (*spp*) descritas en el mundo hasta el momento (AmphibiaWeb, 2023; Wake y Koo,

2018). De manera general este grupo ha sido dividido en tres órdenes: las salamandras y tritones comprenden el grupo Caudata con 801 spp descritas, el orden Gymnophiona conocidos como cecilias con 216 spp y Anura que considera a las ranas y los sapos con 7,585 spp (AmphibiaWeb, 2023), morfológicamente los tres grupos son diferentes (Figura 2). Sin embargo, comparten características como tener una piel húmeda y permeable que funciona como órgano respiratorio principal que secreta sustancias las cuales le sirven de protección contra otros animales (Wake y Koo, 2018). Además, son considerados organismos ectotermos, es decir regulan su temperatura mediante el ambiente donde se encuentran (Harvey Pough, 2007).

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) determina que a nivel mundial los anfibios se encuentran dentro de la categoría de amenaza (Stuart *et al.*, 2004), ya que el 41 % de las especies están en peligro de extinción. Las principales causas del declive de estos organismos son: introducción de especies exóticas (11.02 %), la sobreexplotación, el cambio de uso de suelo (86.56 %), los cambios globales (aumento de la radiación ultravioleta y calentamiento global 9.68 %), la contaminación química (20.43 %) y las enfermedades infecciosas emergentes (23.29 %) (Harvey Pough, 2007). México ocupa el cuarto lugar en distribución de anfibios con 361 especies (SEMARNAT, 2012) distribuidas principalmente en los estados de Oaxaca (140 spp), Chiapas (100 spp) y Veracruz (96 spp).

La importancia de este grupo taxonómico radica principalmente en que brindan servicios ecosistémicos, algunas especies ampliamente estudiadas han sido utilizadas como modelos animales para experimentos de laboratorio. Además, proporcionan servicios de regulación controlando poblaciones de insectos considerados como plagas (Hocking y Babbitt, 2014).

Un servicio de soporte que brindan los anfibios es ayudar a mantener el equilibrio de la cadena trófica al ser presas de otros organismos (Hocking y Babbitt, 2014). Además, algunos anfibios en etapa juvenil son considerados bioturbadores de los ecosistemas, ya que participan



Figura 2. Clasificación de los anfibios. (A) orden Caudata, las Salamandras y tritones se caracterizan por tener cuerpos delgados y colas largas, (B) Gymnophiona, las cecilias físicamente parecen gusanos, debido a que carecen de extremidades, su cuerpo está marcado por anillos y tienen cabeza pequeña y (C) Anura, los anuros (ranas y sapos) tienen troncos cortos, cabezas anchas y planas y extremidades traseras largas que les permite dar saltos y en la etapa adulta carecen de cola (C)(Wake y Koo, 2018). Fotos: (A)*Salamandra salamandra* (mattbuckingham, 2014), (B) *Siphonops annulatus* (Rodríguez, 2020) y (C)*Agalychnis callidryas*(kiwikiu, 2021).

directa o indirectamente en el mantenimiento, modificación y creación de hábitats. Los anfibios depredadores participan en los servicios de regulación controlando las poblaciones de insectos que son considerados plagas y mosquitos vectores de enfermedades. Otra función de regulación en la que participan estos organismos es en la dispersión de semillas (Da Silva y De Britto-Pereira, 2006).

I.4 *Lithobates Spectabilis*.

Pertenece a la familia Rinadae, comúnmente es conocida como rana manchada debido a que posee manchas ovales de color café oscuro, tanto en el dorso como en como en las extremidades, Es un anuro que en etapa adulta se caracteriza por presentar cabeza corta y redondeada, pliegues dorsolaterales aplanados, anchos y generalmente bronceados, piernas

cortas y un extremo distal que no llega al hocico (Hillis y Frost, 1985), una de las peculiaridades de esta especie es que el dorso puede tener colores brillantes como verde mate o metálico e incluso amarillo (Arteaga-García, 2021). Tiene hábitos terrestres y semiacuáticos, es una rana de tamaño mediano que puede alcanzar una longitud hocico cloaca (LHC) de 46 mm hasta 60 mm . Sin embargo, se ha registrado que algunas hembras alcanzan una LHC de hasta 69 mm, en el caso de los machos no se han encontrado datos específicos (Arteaga-García, 2021; Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010), pero se caracterizan por poseer sacos vocales pequeños (Figura 3).



Figura 3. Individuo adulto de la especie *Lithobates spectabilis* localizado en un cuerpo de agua en la comunidad de Cuaxonacayo, Ixtacuixtla, Tlaxcala. (Fotografía: Méndez-Tepepa, M. 2021).

Su modo reproductivo es ovíparo, con desarrollo indirecto, es decir llevan a cabo metamorfosis y realizan amplexus en los meses de enero y julio (Arteaga-García, 2021), su dieta se basa principalmente en invertebrados como: coleópteros, hemípteros, dípteros e himenópteros (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010).

La distribución de la especie abarca varios estados del país como: Michoacán, Puebla, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo, Morelos, Veracruz y Oaxaca (Figura 4), el tipo de ecosistema en los que ha sido encontrado son: bosques (roble, pino, abeto, encino y sabino) y en pastizales de mezquite a una elevación de 500–3,200 **metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.)** (Hillis y Frost, 1985), estos animales tienen actividad tanto diurna como nocturna y durante todo el año (Arteaga-García, 2021). Comúnmente habita cerca de ríos, arroyos y lagunas (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010), debido a que requiere de los cuerpos de agua para depositar sus huevos donde algunas masas llegan a tener hasta 3000 embriones (Hillis y Frost, 1985).



Figura 4. Distribución de *Lithobates spectabilis*. Se encuentra en los estados de: Michoacán, Puebla, Tlaxcala, Estado de México, Hidalgo, Morelos, Veracruz y Oaxaca (UICN, 2023).

I.5 Eritrocitos de Anuros y Prueba de MNs

Los eritrocitos son las células predominantes en la sangre producidas principalmente por el bazo y tienen la función de transportar oxígeno y dióxido de carbono hacia y desde los tejidos (Zenklusen *et al.*, 2014). Los eritrocitos de anuros son considerados los más grandes del reino

animal, morfológicamente tienen núcleo, son ovalados o biconvexos y tienen una vida útil mayor a la de los eritrocitos de mamíferos y aves, que puede variar entre especies, por ejemplo, en el sapo *Bufo marino* estas células sanguíneas viven de 700 a 1400 días (Claver y Quaglia, 2009). Para que el eritrocito alcance la madurez debe pasar por 6 etapas de diferenciación: 1) proeritoblasto, 2) eritoblasto I, 3) eritoblasto II, 4) eritrocito joven I, 5) eritrocito joven II y 6) eritrocito maduro.

Estas células son los más utilizados para evaluar el potencial genotóxico de los contaminantes ambientales (Claver y Quaglia, 2009), la existencia del núcleo en los eritrocitos permite que se pueda evaluar la frecuencia de anomalías nucleares (Zenklusen *et al.*, 2014). Algunos bioensayos toxicológicos han utilizado diversas técnicas como el ensayo de Micronúcleos (MNs), la electroforesis alcalina en células individuales (Martínez González *et al.*, 2012) y la citometría de flujo (Freeman y Rayburn, 2004), utilizando como bioindicadores a diversas especies para evaluar el potencial genotóxico. La prueba de MNs es una de las técnicas más utilizadas para evidenciar la presencia de contaminantes ambientales (metales pesados, herbicidas, fármacos) con potencial genotóxico (Martínez González *et al.*, 2012), se han utilizado organismos en etapa larvaria (Freeman y Rayburn, 2004), renacuajos (Martínez González *et al.*, 2012) y durante la metamorfosis (Gonçalves *et al.*, 2017). Pérez-Iglesias y su grupo de investigadores han dedicado un poco más de una década en evaluar el potencial genotóxico a través de la prueba de MNs de algunos plaguicidas como: pirimicarb, imazetapir, glifosato y atrazina, a concentraciones agudas (48 y 96 h) y en escenarios distintos estos estudios han utilizado como bioindicadores diferentes especies de anuros (*Hypsiboas pulchellus*, *Leptodactylus latinasus*, *Boana pullchellus* *Rhinella schneideri*). Además, la mayoría de los trabajos realizados han sido en renacuajos. En anfibios adultos hay pocos estudios que evalúan la genotoxicidad causada por los contaminantes (Gonçalves *et al.*, 2017; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019).

I.6 Testículo de Anuros

Las gónadas masculinas en los anuros se localizan en la cavidad abdominal ventral, sobre los riñones (de Souza Santos y de Oliveira, 2008) y se encuentran unidos a los cuerpos grasos (Figura 5) (Sánchez-Ferreira *et al.*, 2021). Los testículos son órganos pares y generalmente tienen forma ovoide (Propper, 2011), su color está dado por la presencia de melanocitos y puede variar entre especies: observándose gónadas de color amarillo claro (Sánchez-Ferreira *et al.*, 2021), blanco lechoso (de Souza Santos y de Oliveira, 2008) e incluso colores más oscuros como marrón claro u oscuro. Dichos órganos se encuentran cubiertos externamente por una capa conocida como túnica albugínea, la cual está compuesta por colágeno y melanocitos principalmente. Internamente los testículos están constituidos por dos compartimentos: la región intersticial formada por tejido conectivo, vasos sanguíneos, linfáticos y células de Leydig las cuales secretan hormonas masculinas y la región germinal que está constituida por los túbulos seminíferos, los cuales están formados por la unión de las células de Sertoli. De esta manera se constituyen unos quistes en los cuales se encuentran agrupadas las células germinales (espermatogonias, espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides) en diferentes etapas de maduración (Méndez–Tepepa *et al.*, 2023). Los testículos realizan dos funciones: la producción de espermatozoides y la secreción de testosterona. Los espermatozoides son producidos por medio de un proceso biológico conocido como espermatogénesis (de Souza Santos y de Oliveira, 2008), mediante el cual las espermatogonias tienen diversos cambios hasta convertirse en células maduras aptas para realizar la fecundación (Yoshida, 2015). Mientras que las células de Leydig sintetizan principalmente testosterona y andrógenos que regulan las etapas finales de la espermiogénesis y espermiación, se piensa que estas hormonas también conducen al inicio de la espermatogénesis (Propper, 2011). Sin embargo, aunque los testículos de las ranas y sapos

comparten características anatómicas, somáticas y germinativas, su morfología cambia entre grupos y especies. Por ejemplo, los testículos de algunos anuros neotropicales presentan cambios en el grosor de la túnica albugínea, en el número, tamaño y forma de los túbulos seminíferos (Méndez-Tepepa *et al.*, 2023).

1.6.1 Espermatogénesis

Es un proceso de desarrollo perfectamente organizado, donde a partir de un número pequeño de espermatogonias diploides se forma un gran número de espermatozoides haploides altamente diferenciados (Yoshida, 2015), este proceso se lleva a cabo en los túbulos seminíferos o quistes (Figura 5) (Méndez-Tepepa *et al.*, 2023). Podría pensarse que todos los vertebrados llevan a cabo el proceso de espermatogénesis de igual manera, sin embargo, las diferencias entre grupos están en función de algunos factores como: 1) la organización del compartimento germinal, 2) la relación entre las células germinales y las células de Sertoli, 3) el tipo de fertilización interna o externa y 4) especie poiquiloterma u homeoterma (Sánchez-Ferreira *et al.*, 2021).

La espermatogénesis involucra las fases de expansión mitótica, divisiones meióticas y transformación de espermatidas haploides en espermatozoides (espermiogénesis) antes de que se liberen los espermatozoides maduros (espermiación) (Yoshida, 2015).

En los testículos se han identificado los siguientes tipos celulares dentro de los túbulos seminíferos:

Espermatogonias primarias: son las células más voluminosas del linaje espermatogénico, cuyos núcleos son irregulares y de aspecto multilobular (Figura 5), presentan granulaciones cromáticas, pueden estar asociadas a las células de Sertoli y generalmente se localizan cerca de la pared locular (de Souza Santos y de Oliveira, 2008). **Espermatogonias secundarias:** son células más pequeñas, irregulares y mayormente compactadas que las espermatogonias primarias,

normalmente se encuentran en los límites de los lóbulos, tienen un color más pronunciado y son más pequeños que las espermatogonias primarias (de Souza Santos y de Oliveira, [2008](#)).

Espermatocitos primarios y secundarios: son el resultado de la diferenciación de las espermatogonias secundarias. Los espermatocitos primarios tienen un menor tamaño que las espermatogonias primarias y secundarias y la cromatina del núcleo puede estar ligeramente condensada (Figura [5](#)). Los espermatocitos secundarios, son más pequeños que los espermatocitos primarios pero que se encuentran en mayor abundancia, estas células se pueden observar en diferentes etapas de la meiosis y el grado de compactación del material genético puede variar almacenándose dentro de los túbulos seminíferos hasta que comienza la época de reproducción (de Souza Santos y de Oliveira, [2008](#); Méndez-Tepepa *et al.*, [2023](#); Proper, [2011](#)).

Espermátidas primarias y secundarias: las primarias son células con forma redonda y un núcleo ligeramente compactado (Figura [5](#)), mientras que, las espermátidas secundarias presentan una forma ligeramente alargada y un núcleo más compactado y elongado (de Souza Santos y de Oliveira, [2008](#)).

Espermatozoides: se caracterizan por una pérdida importante de citoplasma y el núcleo o cabeza del espermatozoide presenta una gran compactación, cuando alcanzan la madurez total son liberados a la luz ocular (de Souza Santos y de Oliveira, [2008](#)), en los anuros se han descrito diversas formas en la cabeza de los espermatozoides (puntiaguda, media luna, hoz, forma de "s", sacacorchos y bastón) (Figura [5](#)) (Méndez-Tepepa *et al.*, [2023](#)).

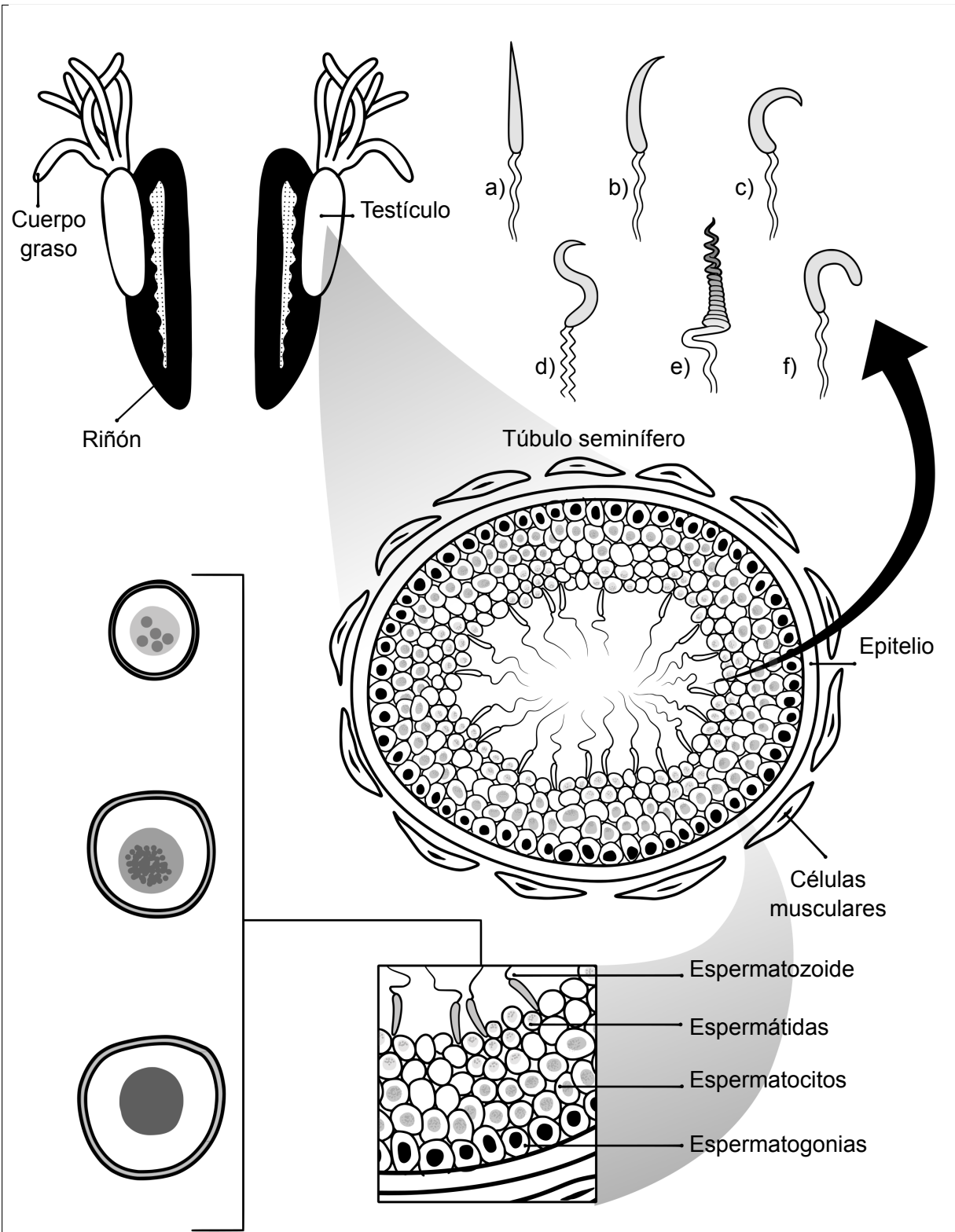


Figura 5. Sistema reproductivo de ranas. Los testículos se encuentran unidos a los cuerpos grasos. Las gónadas masculinas están formadas por los túbulos seminíferos, donde se lleva a cabo el proceso de la espermatogénesis. Este mecanismo consiste en la transformación de las espermatogonias a espermatocitos, espermatidas y finalmente en células maduras conocidas como espermatozoides. La morfología de los espermatozoides difiere entre las especies de ranas; (a) cabeza puntiaguda, (b) en forma de media luna, (c) cabeza en forma de hoz, (d) cabeza en forma de S, (e) cabeza en forma de sacacorchos, y (f) cabeza en forma de bastón. (Tomado de Mendez Tepepa *et al.*, 2023)

I.6.2 Mucopolisacáridos

También conocidos como [Glicosaminoglicanos \(GAGs\)](#), son moléculas de secuencias lineales de disacáridos que pueden o no estar sulfatados y unidos covalentemente a una proteína, que se encuentran en el cuerpo de los animales, incluidos los anfibios y participan en diversos procesos biológicos como la reproducción (Chakrabarti *et al.*, [1980](#)). Son compuestos importantes para los anfibios ya que cumplen diferentes funciones como: mantener la integridad estructural de la membrana basal y la pared vascular, mantener lubricada la piel, aporta propiedades mecánicas y elásticas al cartílago proporcionándole alta resistencia (Wang *et al.*, [2017](#)).

Los mucopolisacáridos más comunes en anfibios son: sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de queratán, heparán sulfato, heparina y ácido hialurónico (Wang *et al.*, [2017](#)). En los vertebrados estas biomoléculas están presentes en diferentes tejidos (piel, hueso, cartílago, paredes arteriales, cordón umbilical, córnea y testículos), fluidos conectivos (líquidos sinoviales) y membranas celulares (Chakrabarti *et al.*, [1980](#)). Se ha determinado el contenido de mucopolisacáridos en epitelio germinal de los testículos, túnica albugínea, túbulos seminíferos, las células de Sertoli y Leydig, vasos sanguíneos y espacio intersticial en mamíferos (Wang *et al.*, [2017](#)). Sin embargo, es relevante obtener la información enfocada en anfibios ya que en este grupo no se ha determinado en tejidos reproductivos (Schindelmeiser, [1986](#)).

I.7 Antecedentes

I.7.1 Atrazina y Anomalías en los Eritrocitos

La mayoría de las investigaciones que evalúan el potencial genotóxico de la atrazina y algunos herbicidas comerciales (Rasayanzine® y Gesaprim®) están realizadas en otros organismos, como los peces. (*Danio rerio*, *Channa punctatus*, *Oreochromis niloticus* y *Carassius auratus*) (Nwani *et al.*, [2010](#); Ventura *et al.*, [2008](#)).

Respecto a la formulación del herbicida Gesaprim® no se ha identificado algún estudio realizado en alguna especie de anfibio, en contraste se describen investigaciones relevantes con otras formulaciones comerciales a base de atrazina. Por ejemplo, el efecto mutagénico y genotóxico de Atanor 50 SC (50 % atrazina) se evaluó exponiendo a larvas de *Dendrosophus minutus* (1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, 48, 96 y 192 mg/L) durante 96 h. La concentración de 18 mg/L fue la que mostró un mayor incremento en la frecuencia de MNs para todas las etapas (premetamórfica, metamórfica y prometamórfica) (Gonçalves *et al.*, 2017). En renacuajos de *Rhinella schineideri* expuestos a Siptran 500SC® (50 % atrazina) a concentraciones de 1.5, 3.0, 6.0, 12.5, 19.0 y 25.0 mg/L durante 48 y 96 h, encontraron aumento en la frecuencia de MNs en los eritrocitos en todas las concentraciones a las 96 h, pero solo la concentración de 19.0 mg/L presentó diferencias significativas. Asimismo, la concentración de 19.0 mg/L fue la única que presentó un aumento en la frecuencia de MNs a las 48 h (Pérez-Iglesias *et al.*, 2019).

1.7.2 Atrazina y Testículo

La espermatogénesis es un proceso fisiológico fundamental para el éxito reproductivo en los organismos (Rastogi *et al.*, 2011) y ha sido estudiado en diferentes especies de anuros (Iruzubieta-Villagra *et al.*, 2012; Katarzyna *et al.*, 2017; Segatelli *et al.*, 2009). Sin embargo, son pocos los estudios que evalúan la exposición a la atrazina y su efecto en la espermatogénesis y reproducción (Orton *et al.*, 2006). En *Xenopus laevis* expuestos a 2.5 ppb de atrazina durante toda la etapa larvaria hasta 3 años después de la metamorfosis, determinaron que, un año posterior a la metamorfosis el número de los túbulos seminíferos con espermatozoides maduros disminuyó (Hayes *et al.*, 2010). Sin embargo, otro estudio realizado en *Rana pipiens* donde se compararon 4 tratamientos (control, nitrato, atrazina y combinación) se observó que la exposición subcrónica a 10 mg/L de atrazina durante etapas larvarias (0-12 semanas) no alteró significativamente la

frecuencia de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas (Orton *et al.*, 2006). Mientras que, en el proceso de diferenciación gonadal de renacuajos *Xenopus laevis* expuestos a 21 µg/L de atrazina durante 48 h se encontró una disminución significativamente del volumen testicular en el 57 % de los individuos tratados, el número de células germinales en el 70 % de los individuos tratados y las células nodrizas en el 74 % de los individuos tratados (Tavera-Mendoza *et al.*, 2002).

Otro estudio realizado en larvas de *Xenopus laevis* expuestas a diferentes concentraciones de atrazina grupo 1 (0.01, 0.1, 1.0, 10 y 25 ppb) y grupo 2 (0.1, 0.4, 0.8, 1.0, 25 y 200 ppb) durante toda la etapa larvaria y adultos recién metamorfoseados expuestos a 25 ppb durante 46 días, determinaron que la atrazina (1.0 ppb) causó hermafroditismo y anomalías gonadales 16-20 % de los individuos), presentando hasta 6 gónadas múltiples por individuo, además, la concentración de testosterona fue 10 veces menor en plasma para el grupo expuesto, demostrando el efecto de la atrazina sobre la esteroidogénesis (Hayes *et al.*, 2002).

1.7.3 Mucopolisacáridos

La mayoría de los trabajos referentes a mucopolisacáridos fueron realizados en anuros hembras y han determinado que los GAGs están involucrados en la reproducción y juegan un papel vital en el mantenimiento de la estructura y función del músculo del oviducto. En *Rana chensinensis* se ha encontrado una degradación de glicosaminoglicanos posiblemente involucrados en la preparación para el periodo reproductivo (Su *et al.*, 2018). Mientras que en el epitelio uterino de salamandra se han determinado mucosustancias neutras y ácidas con grupos carboxilo y sulfato. En machos existe poca información de estas moléculas, en salamandras el testículo contiene mucopolisacáridos ácidos y sulfatados (Schindelmeiser, 1986). Respecto a los análisis del efecto del herbicida atrazina y su efecto en los mucopolisacáridos de tejido reproductivo de anuros hasta ahora no hay información. Sin embargo, ya se ha determinado que el herbicida atrazina

modifica la abundancia de los mucopolisacáridos en el epitelio dorsal y glándulas de *L. spectabilis* (Méndez-Tepepa *et al.*, [2024](#)).

I.8 Preguntas de Investigación

1 ¿Cuál es el efecto de la exposición subcrónica del herbicida atrazina en la morfología de los eritrocitos de la rana *Lithobates spectabilis*?

2 ¿Cuál es el efecto de la exposición subcrónica del herbicida atrazina en la histomorfología y presencia de mucopolisacáridos en el testículo de la rana *Lithobates spectabilis*?

I.9 Hipótesis

1. La exposición subcrónica al herbicida atrazina aumenta el porcentaje de los eritrocitos con anormalidades nucleares y citoplasmáticas en la rana *Lithobates spectabilis*.
2. La exposición subcrónica al herbicida atrazina disminuye el área total del testículo, área de los túbulos seminíferos, área ocupada por espermatozoides y el número de túbulos seminíferos con mucopolisacáridos en la rana *Lithobates spectabilis*.

I.10 Justificación

La disminución de las poblaciones de los anfibios es un problema global que ha generado gran preocupación en el mundo. La contaminación es una de las causas principales que afecta a las especies de anfibios como a los ecosistemas en los que habitan. Los anfibios son uno de los grupos de vertebrados más sensibles a la contaminación debido a su piel permeable y su ciclo de vida que alterna entre ambientes acuáticos y terrestres. La atrazina es un herbicida ampliamente utilizado para controlar malezas en los cultivos. Su aplicación en agroecosistemas coincide con la etapa reproductiva de los anfibios. Los estudios previos han demostrado que concentraciones elevadas de atrazina afectan la morfología de los eritrocitos y algunos procesos reproductivos en diversas especies de anfibios. Los eritrocitos, aunque no tienen una conexión directa con los testículos, desempeñan un papel crucial en el transporte de oxígeno y en el mantenimiento del ambiente celular óptimo para la espermatogénesis, así como en la preservación de la barrera hemato-testicular. Este transporte de oxígeno es esencial para el metabolismo celular del tejido testicular, donde se producen los espermatozoides. Los mucopolisacáridos son fundamentales, durante el proceso de espermatogénesis ya que proporcionan estructura y soporte, además de participar en la regulación de factores de crecimiento, adhesión y comunicación celular. Sin embargo, hasta la fecha, no se han realizado estudios específicos que examinen el efecto de la atrazina en los mucopolisacáridos testiculares de los anuros en etapa adulta. Por lo tanto, es importante analizar el impacto del herbicida atrazina en la morfología de los eritrocitos, el área de los túbulos seminíferos, el área ocupada por espermatozoides y la presencia de mucopolisacáridos en el testículo de *Lithobates spectabilis*. Este estudio ampliará el conocimiento sobre los efectos de la atrazina en los eritrocitos y el testículo de los anuros en etapa adulta, además de conocer los efectos de la atrazina en la biología reproductiva de esta especie.

I.11 Objetivos

I.11.1 General

Determinar el efecto subcrónico del herbicida atrazina en la morfología de los eritrocitos, características hitomorfológicas del testículo y número de túbulos seminíferos con mucopolisacáridos en la rana *Lithobates spectabilis*

I.11.2 Específicos

1. Analizar el efecto subcrónico del herbicida atrazina mediante la cuantificación de los eritrocitos con anomalías nucleares y citoplasmáticas para determinar un daño citogenotóxico en la rana *Lithobates spectabilis*.

2. Determinar el efecto subcrónico del herbicida atrazina en el área total del testículo, área ocupada por espermatozoides, área de los túbulos seminíferos y número de túbulos seminíferos con mucopolisacáridos para determinar un daño histomorfológico en la rana *Lithobates spectabilis*.

II Metodología

II.1 Captura de Individuos E Instalación de Terrarios

Los organismos utilizados en el estudio se obtuvieron de un cuerpo de agua artificial ubicado en la localidad de Cuaxonacayo, Ixtacuixtla, Tlaxcala (19° 23' 60" N 98° 21' 53.99" O; 2919 m.s.n.m) entre agosto y septiembre de 2021. Con ayuda de una red entomológica se capturaron 12 ranas adultos de la especie *L. spectabilis* en etapa reproductiva, durante su periodo de actividad (18:00-20:00), inmediatamente se colocaron en recipientes con agua del sitio y se trasladaron al laboratorio de Toxicología y Química Ambiental (TyQA) ubicado en el Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (CIGyA-UATx). Es importante mencionar que esta especie no se encuentra en el listado de la NOM-059-SEMARNAT y se cuenta con permiso de recolecta (SGPA/DGVS/03662/2021) expedido por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). La identificación de la especie se realizó utilizando la descripción de Hillis y Frost (1985), mediante la comparación de sus caracteres morfológicos, se corroboró que se encontraran en estado saludable (sin malformaciones o amputaciones) (Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2010). Además, se determinó la masa corporal utilizando una balanza y la longitud hocico-cloaca con ayuda de un vernier en cada uno de los individuos.

Para simular el hábitat de *L. spectabilis* se acondicionó un terrario en una pecera de vidrio con capacidad de 40 L (medidas 51 x 29.5 x 26 cm) y se adecuaron las condiciones ambientales ideales para la supervivencia de la especie, la temperatura se mantuvo en un intervalo de 22.3-24.9 °C y la humedad relativa entre el 75-90 %. Para monitorear estos parámetros se colocó un sensor que emitió un registro las 24 h (programa Arduino-cloud), se programó un fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad con una lámpara adaptada y un temporizador digital. Se colocó una porción de pasto libre de contaminantes, un contenedor de vidrio de 3 cm de profundidad y 20

cm de diámetro y una cámara de video que grabó la actividad de los individuos las 24 h del día (Figura 6).

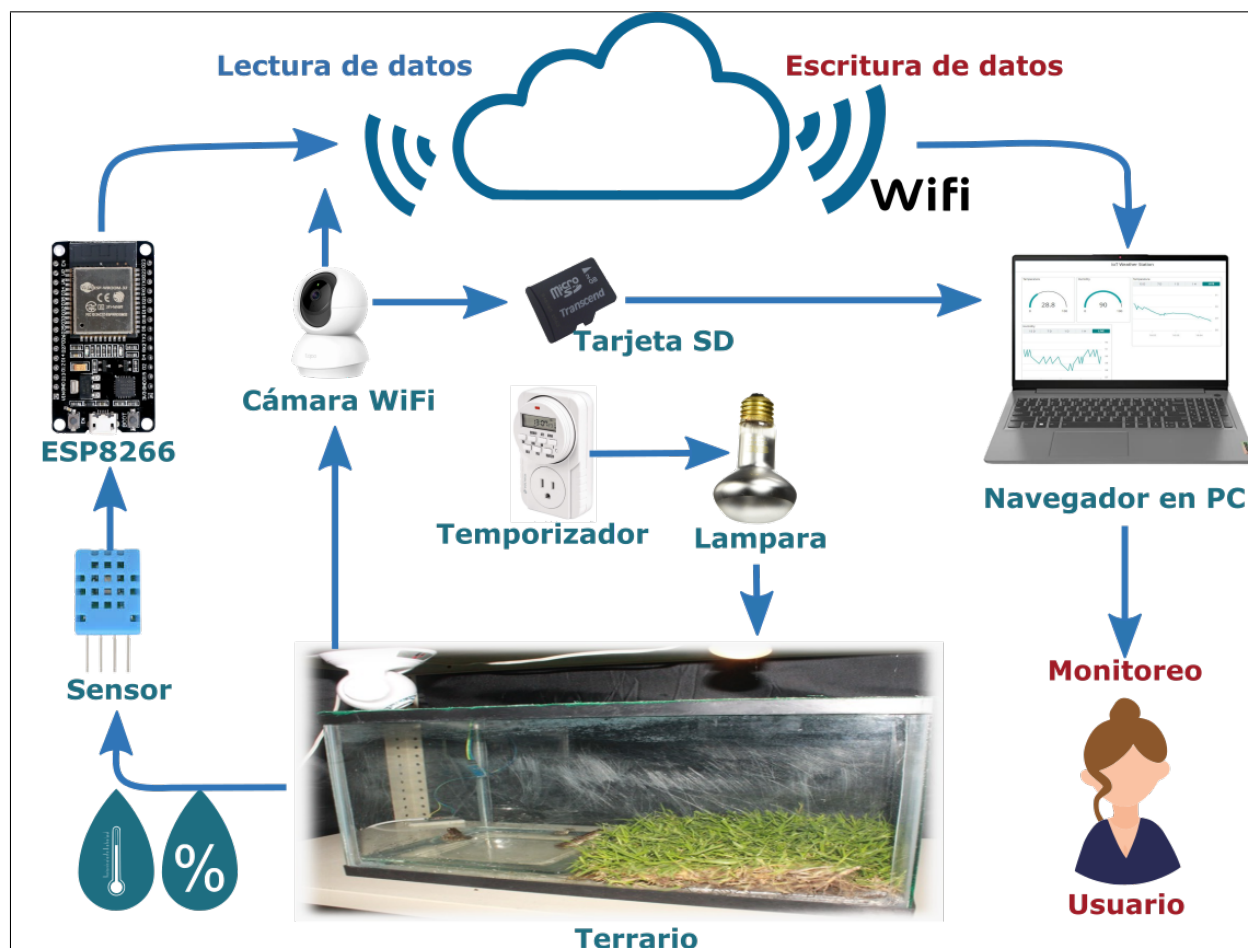


Figura 6. Diagrama de la instalación de los terrarios utilizados en el experimento. (Tomado de Méndez-Tepepa *et al.*, 2023)

II.2 Aclimatación, Exposición al Herbicida Atrazina y Eutanasia

Antes de colocar a los 12 individuos dentro del terrario se mantuvieron en observación durante 1 h. La aclimatación tuvo una duración de tres semanas (Pérez Iglesias *et al.*, 2018), se realizó diariamente la limpieza con la finalidad de evitar la acumulación de sustancias tóxicas (urea y heces) y residuos de alimento. Los individuos fueron alimentados diariamente con grillos vivos *ad libitum* de la marca Cricket® desde la etapa de aclimatación hasta la exposición al [herbicida atrazina \(HA\)](#). Para el experimento se utilizó agua potable, a la cual se le realizaron algunos análisis

físicoquímicos (Anexo [VII.1](#)).

Después de la etapa de aclimatación, se instaló un segundo terrario con las mismas características mencionadas anteriormente. Las 12 ranas se dividieron al azar en dos grupos de seis individuos cada uno. Al primer grupo, denominado [HA](#), se le adicionó diariamente 1 L de solución de 15 µg/L de atrazina al 90 % durante 90 días. La solución de atrazina fue colocada en un contenedor de agua dentro de la pecera, asimismo, se roció sobre el pasto y las ranas utilizando un atomizador para mantener la humedad. Al segundo grupo, denominado control, se le agregó únicamente 1 L agua potable diariamente.

Terminando la etapa de exposición, los individuos se mantuvieron en ayuno durante 12 h. Posteriormente se procedió con la eutanasia mediante una sobredosis por inmersión con una solución de metanosulfato de tricafina (200 mg/L; MS-222, Sigma-Aldrich), una vez que se comprobó que el anfibio ya no presentaba movimiento, inmediatamente con ayuda de una jeringa heparinizada mediante una punción al corazón se extrajo aproximadamente 5-10 µL de sangre y el testículo de cada una de las ranas.

II.3 Evaluación del Efecto del HA en los Eritrocitos

Sobre un portaobjetos previamente lavado con etanol, se realizó un frotis con una gota de sangre, dejándolo secar a temperatura ambiente durante 24 horas. La fijación de los eritrocitos se llevó a cabo mediante inmersión en frascos Coplin que contenían una solución de metanol-ácido acético (3:1, [Volumen/volumen \(v/v\)](#)) durante 1 minuto. Posteriormente, las laminillas se tiñeron con eosina y azul de metileno durante 30 s (Fraser *et al.*, [2010](#)). Finalmente, se enjuagaron con agua destilada para eliminar los restos de colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h.

Para realizar el conteo de los eritrocitos se tomaron varias microfotografías a 100x con ayuda de una cámara acoplada a un microscopio marca Leica modelo DM750, utilizando el programa LAS

EZ, del cuerpo y cola del frotis sanguíneo de cada uno de los individuos (Figura 7). Se contaron 1000 eritrocitos por cada individuo y solo se consideraron células bien teñidas, separadas, no dobladas y completas. Además de eritrocitos normales (N), también se cuantificaron las siguientes anomalías: eritrocitos con MNs, binucleadas (B), con muesca en el núcleo (NM), apoptóticos (A), necróticos (NR), eritrocitos con membrana ampollada (MA), en forma de gota (G), en forma de coma (K) y con muesca en la membrana (MM) (Harabawy y Mosleh, 2014; Zhelev *et al.*, 2022). Las características morfológicas de estos tipos celulares se resumen en la tabla 2.

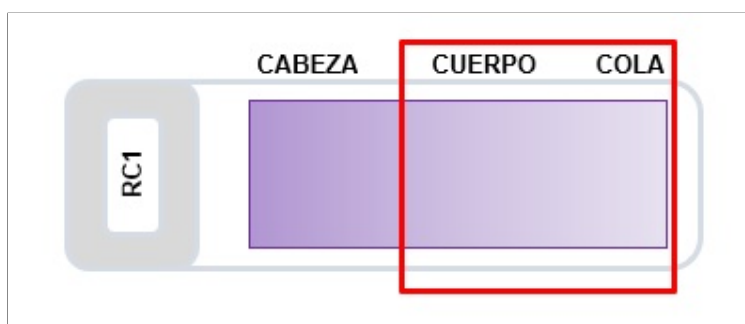


Figura 7. Partes del frotis sanguíneo. Se realizó un extendido de sangre considerando: cabeza cuerpo y cola, y para el conteo de los eritrocitos se consideró solamente cuerpo y cola del frotis sanguíneo. El rectángulo indica el área (cuerpo y cola) donde se tomaron las microfotografías para el conteo de los eritrocitos.

Tabla 2. Características morfológicas de los eritrocitos normales y con anomalías nucleares y citoplasmáticas (Harabawy y Mosleh, 2014; Zhelev *et al.*, 2022)

Eritrocito	Características
1. Normal (N)	*Membrana citoplasmática bien definida y núcleo redondo, centrado y perfectamente formado
Eritrocitos con ANs (genotoxicidad)	
	*Núcleo pequeño cercano al núcleo principal con tamaño de 1/16 a 1/3 del diámetro del núcleo principal.
2. Micronúcleos (MNs)	*Coloración similar o más intensa al núcleo principal. *Los MNs pueden tocar el núcleo principal pero no solaparse, el límite micronuclear debe distinguirse del límite nuclear.

Tabla 2 continua de la página anterior

3. Binucleadas (B)	*El eritrocito debe tener dos núcleos con tamaño y coloración similar. *Las membranas nucleares deben estar intactas y distinguirse entre sí. *La membrana citoplasmática debe ser claramente distinguible de las células adyacentes.
4. Muesca en el núcleo (NM)	*El núcleo presenta una hendidura generalmente en forma de v, dicha hendidura está delimitada por la membrana nuclear.
Eritrocitos con ACs y ANs (citotoxicidad)	
5. Apoptóticos (A)	*Presencia de condensación de cromatina dentro del núcleo, con límites citoplasmáticos y nucleares intactos. *Fragmentación nuclear con membrana citoplasmática intacta. *La intensidad de la coloración del núcleo, fragmentos nucleares y citoplasma es mayor que en las células viables.
6. Necróticos (NR)	*Citoplasma pálido y numerosas vacuolas (mayormente en el núcleo). *Pérdida del citoplasma (membrana dañada/irregular) y el material nuclear puede escapar del límite nuclear. *La intensidad de la coloración generalmente es menor a la que se observa en las células viables.
7. Membrana ampollada (MA)	*En la membrana plasmática aparecen evaginaciones con forma redonda de diferentes tamaño
8. Forma de gota (G)	*En la membrana plasmática aparecen evaginaciones con forma redonda de diferentes tamaños.
9. Forma de coma (K)	*Un extremo del eritrocito se deforma y se forma una espícula, toma una forma similar a una coma
10. Muesca en la membrana (MM)	*La membrana presenta una hendidura generalmente en forma de v, dicha hendidura está delimitada por la membrana citoplasmática.

II.4 Procesamiento Histológico del Testículo

Después de la eutanasia de los individuos se extrajo el testículo izquierdo en conjunto con el cuerpo graso (complejo cuerpo graso-testículo). El complejo cuerpo graso-testículo. fue pesado y colocado en una solución Bouin-Duboscq por 12 h. Posteriormente se llevó a cabo la

deshidratación con etanol a concentraciones ascendentes (60, 80, 96 y 100 %), enseguida se realizó la aclaración del tejido con xilol, posteriormente cada complejo cuerpo graso-testículo. fue incluido en parafina (Paraplast SIGMA-ALDRICH). Para obtener los cortes histológicos, se consideró todo el órgano, se realizaron cortes de forma transversal a 7 µm con ayuda de un micrótopo (Leica modelo RM 2125). Enseguida se colocaron 6 cortes en un baño flotante con gelatina de bovino (SIGMA ALDRICH) a 45°C para la extensión y fijación del tejido. Del total de los cortes seriados obtenidos del testículo se eligió una laminilla central por individuo de cada grupo para el análisis histológico. Desafortunadamente durante el proceso se perdieron algunos testículos, debido al menor tamaño, por lo que para este analisis solo se utilizó una n=3 por cada grupo.

Tinción ácido periódico de Schiff (PAS). Los cortes fueron desparafinados utilizando alcoholes y xileno. Posteriormente, se les añadió una solución de ácido peryódico al 5 % durante 5 minutos. Después de enjuagar con agua destilada, se aplicó el reactivo de Schiff de Coleman durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron con agua corriente tibia durante 10 minutos. Los núcleos fueron teñidos con hematoxilina de Harris durante 1 minuto. A continuación, los tejidos se rehidrataron con etanol en concentraciones ascendentes (60 %, 80 %, 96 % y 100 %). Finalmente, se fijaron con Cytoseal TM60 y un cubreobjetos para su posterior análisis.

II.5 Efecto del Herbicida Atrazina en el Testículo de *L. Spectabilis*

Área total del testículo. Se seleccionó un corte del tejido testicular tomando en cuenta que no estuviera roto, doblado o rayado, enseguida con un microscopio óptico marca Leica (modelo DM750) y con el programa LAS EZ se tomaron 6 microfotografías del testículo a un aumento de 4x y se realizó su reconstrucción para medir el área total del órgano con el programa Axio visión Rel. 4.8.

Área de los túbulos seminíferos. Para medir el área de los túbulos seminíferos se tomaron

microfotografías a 10x considerando cinco campos; cuatro en sentido de las manecillas del reloj y uno central (Figura 8). Para esto, se consideraron 100 túbulos seminíferos de un corte de tejido testicular por cada individuo y se midió el área de cada túbulo seminífero con el programa Axio visión Rel. 4.8 para ambos grupos.

Área ocupada por espermatozoides. Se selecciono un corte de tejido testicular de una laminilla por individuo. Se tomaron 40 microfotografías a 40x, utilizando la misma metodología de muestreo, como se ilustra en la Figura 8. Para determinar el área ocupada por espermatozoides de cada individuo se midieron todas las áreas en las que se observaron bucles de espermatozoides considerando las características descritas por de Campos Ventura et al., 2008. Para la medición se utilizó el programa Axio Vision Rel. 4.8. **Área ocupada por espermatozoides.** Se selecciono un corte de tejido testicular de una laminilla por individuo. Se tomaron 40 microfotografías a 40x, utilizando la misma metodología de muestreo, como se ilustra en la (Figura 8). Para determinar el área ocupada por espermatozoides de cada individuo se midieron todas las áreas en las que se observaron bucles de espermatozoides considerando las características descritas por de Campos Ventura *et al.*, 2008. Para la medición se utilizó el programa Axio Vision Rel. 4.8.

Evaluación de mucopolisacáridos en los túbulos seminíferos. Para evaluar la presencia de mucopolisacáridos, se tomaron microfotografías de los túbulos seminíferos a 10x con un microscopio óptico (Leica modelo RM 2125; programa LAS EZ). Se realizó una clasificación de dos categorías: túbulos seminíferos sin mucopolisacáridos y túbulos seminíferos con mucopolisacáridos. Los túbulos seminíferos sin mucopolisacáridos, fueron aquellos que no presentaron coloración rosa, mientras que los túbulos seminíferos con mucopolisacáridos, fueron aquellos que presentaron una coloración rosa (Méndez-Tepepa *et al.*, 2020) (Figura 9).

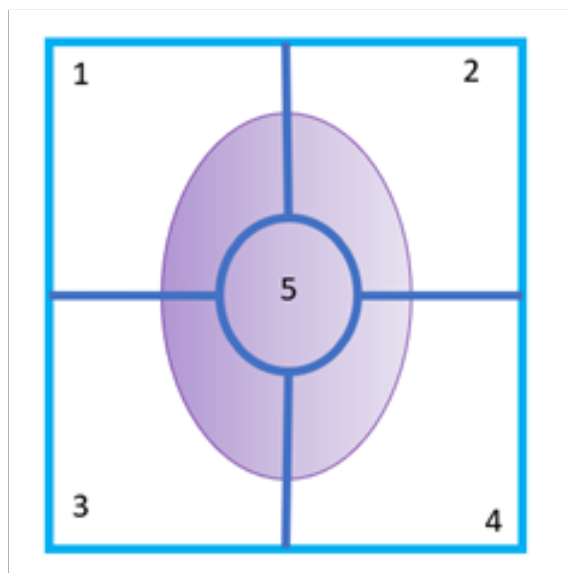


Figura 8. Muestreo utilizado para determinar el área de los túbulos seminíferos y área ocupada por espermatozoides, se consideraron 5 campos para la toma de microfotografías y respectivos análisis histológicos del testículo de *L. spectabilis*.

II.6 Análisis Estadístico

Para determinar las diferencias de los valores entre los grupos experimentales en los eritrocitos con membrana ampollada, apoptóticos y necróticos se llevó a cabo una t-Student. De acuerdo con los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas se determinaron las diferencias entre los grupos experimentales en los valores del área de los túbulos seminíferos y área testicular utilizamos una U-Mann-Whitney. Mientras que para determinar el área ocupada por los espermatozoides se consideró una prueba de t de Student. Todos los análisis estadísticos se realizaron en R studio versión 4.3.2 y GraphPad Prism versión 5.01. La significancia estadística se determinó cuando el valor de α fue ≤ 0.05 . Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar a menos que se indique lo contrario. Para determinar el número de los túbulos seminíferos con y sin mucopolisacáridos del grupo control y HA utilizamos una ANOVA de dos vías. Dado que el análisis de varianzas reveló que había diferencias entre los grupos, se implementó una prueba Dunn con ajuste de Bonferroni.

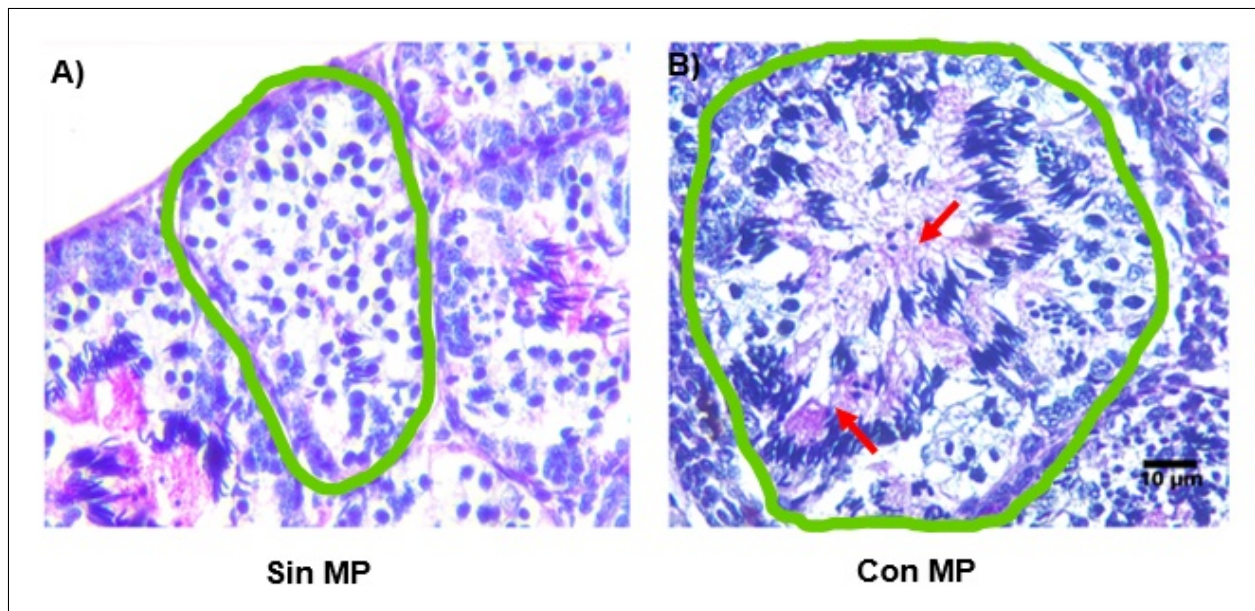


Figura 9. Túbulos seminíferos de *L. spectabilis*. A) túbulo seminífero sin mucopolisacáridos, B) túbulo seminífero con mucopolisacáridos. Línea verde indica la circunferencia del túbulo seminífero **Mucopolisacáridos (MP)**: mucopolosacáridos, flecha roja señala los **MP**. Escala 10μm.

III Resultados

III.1 Efecto del Herbicida Atrazina en los Eritrocitos de *L. Spectabilis*

En esta investigación se observaron todos los tipos celulares que se consideraron en la tabla 2: eritrocitos con morfología normal (esférica, biconvexa y elíptica), micronúcleos MNs, binucleados (B), con muesca en el nucleo (NM), con membrana ampollada (MA), con muesca en la membrana (MM), en forma de coma (K), en forma de gota (G), apoptóticos (A) y necróticos (NR) (Figura 10). Únicamente los tipos celulares que mostraron diferencias significativas entre grupos fueron los eritrocitos con ampolla, apoptóticos y necróticos. El HA aumentó el 1.7 % de eritrocitos con ampolla ($t = -2,44$, $gl = 10$, $p = 0,03$) (Figura 11), el 9.4 % de eritrocitos apoptóticos ($t = -2,96$, $gl = 10,162$, $p = 0,01$) (Figura 12) y el 12.8 % de eritrocitos necróticos ($t = -3,10$, $gl = 10$, $p = 0,01$) (Figura 13).

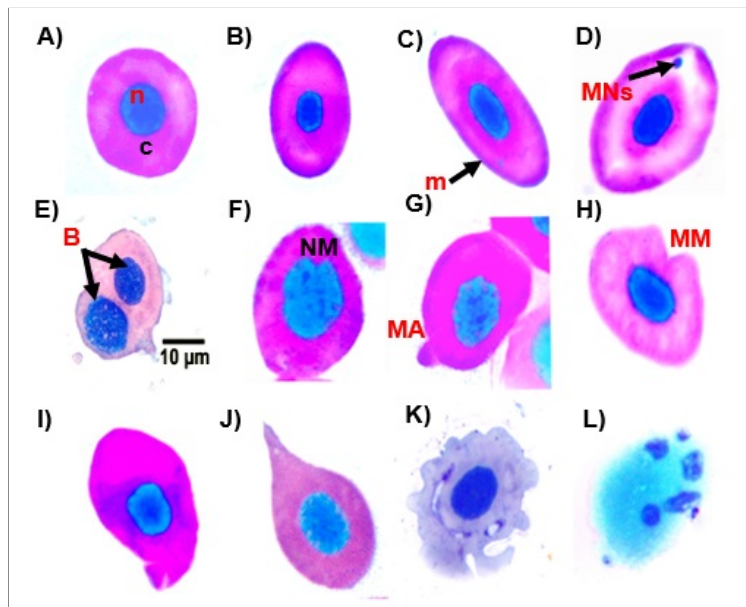


Figura 10. Morfología de los eritrocitos de la rana macho *L. spectabilis*. Eritrocitos con morfología normal: A) esférica, B) biconvexa, C) elíptica. Eritrocitos con anomalías morfológicas: D) Micronúcleo MNs, E) binucleado (B), F) núcleo con muesca (NM), G) Ampolla en la membrana (AM), H) membrana con muesca (MM), I) forma de coma (K), J) forma de gota (G), K) apoptosis y L) necrosis. n; núcleo, c; citoplasma; m; membrana. Tinción de Giemsa. Escala: 10 μ m.

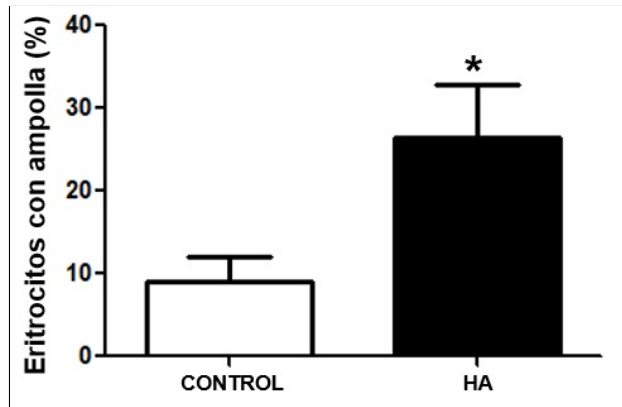


Figura 11. Efecto del HA en la morfología de los eritrocitos con ampolla en la membrana de *L. spectabilis*. El * indica diferencias significativas entre grupos.

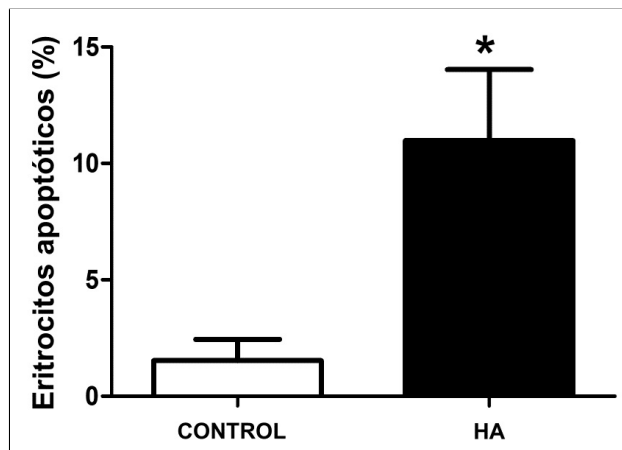


Figura 12. Efecto del HA en la morfología de los eritrocitos apoptóticos de la rana *L. spectabilis*. El * indica diferencias significativas entre grupos.

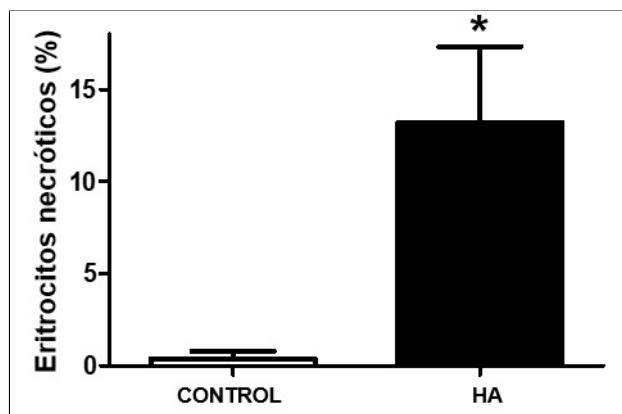


Figura 13. Efecto del HA en la morfología de los eritrocitos necróticos de la rana *L. spectabilis*. El * indica diferencias significativas entre grupos.

III.2 Efecto del Herbicida Atrazina en el Testículo

Los resultados del análisis histológico del testículo de *L. spectabilis* comprenden la descripción de la composición y el área testicular, área de los túbulos seminíferos, área ocupada por espermatozoides y el número de túbulos seminíferos con y sin mucopolisacáridos, los cuales se explican a continuación:

El testículo de *L. spectabilis* está constituido por túbulos seminíferos delimitados por la membrana tubular basal, los cuales a su vez contienen células espermáticas en diferentes estados de maduración: espermatogonias, espermatoцитos en meiosis II, espermátidas, y espermatozoides. Además, se identificó la presencia de mucopolisacáridos dentro de la mayoría de los túbulos seminíferos (Figura 14).

La evidencia histológica determinó una mayor área en los túbulos seminíferos y espermatozoides en el grupo expuesto al HA, respecto al grupo control (Figura 15). El área de los túbulos seminíferos pertenecientes al grupo HA fue mayor $732,3 \pm 49,8 \mu\text{m}^2$; U-Mann-Whitney: $W= 30386$, $P < 0,05$, en comparación con el grupo control $288,5 \pm 8,8 \mu\text{m}^2$ mostrando diferencias significativas entre grupos (Figura 17). Respecto al área ocupada por los espermatozoides $191,1 \pm 9,2 \mu\text{m}^2$, prueba t de Student: $t = -3,0774$, $P < 0,05$ que en el grupo control $159,8 \pm 3,3 \mu\text{m}^2$ (Figura 18). Mientras que el área testicular no mostró diferencia significativa, los valores obtenidos para el grupo HA fueron $6187,3 \pm 1934,5 \mu\text{m}^2$ y para el grupo control $14.266,8 \pm 8.762,8 \mu\text{m}^2$ (Figura 16).

Por último para el número de túbulos seminíferos con y sin mucopolisacáridos se determinaron diferencias significativas entre grupos para los túbulos seminíferos con mucopolisacáridos ($F=7.120$, $gl=1$, $p=0.02$) (poshoc: $p=0.04$), el grupo HA fue el que presentó un aumento (Figura 19).

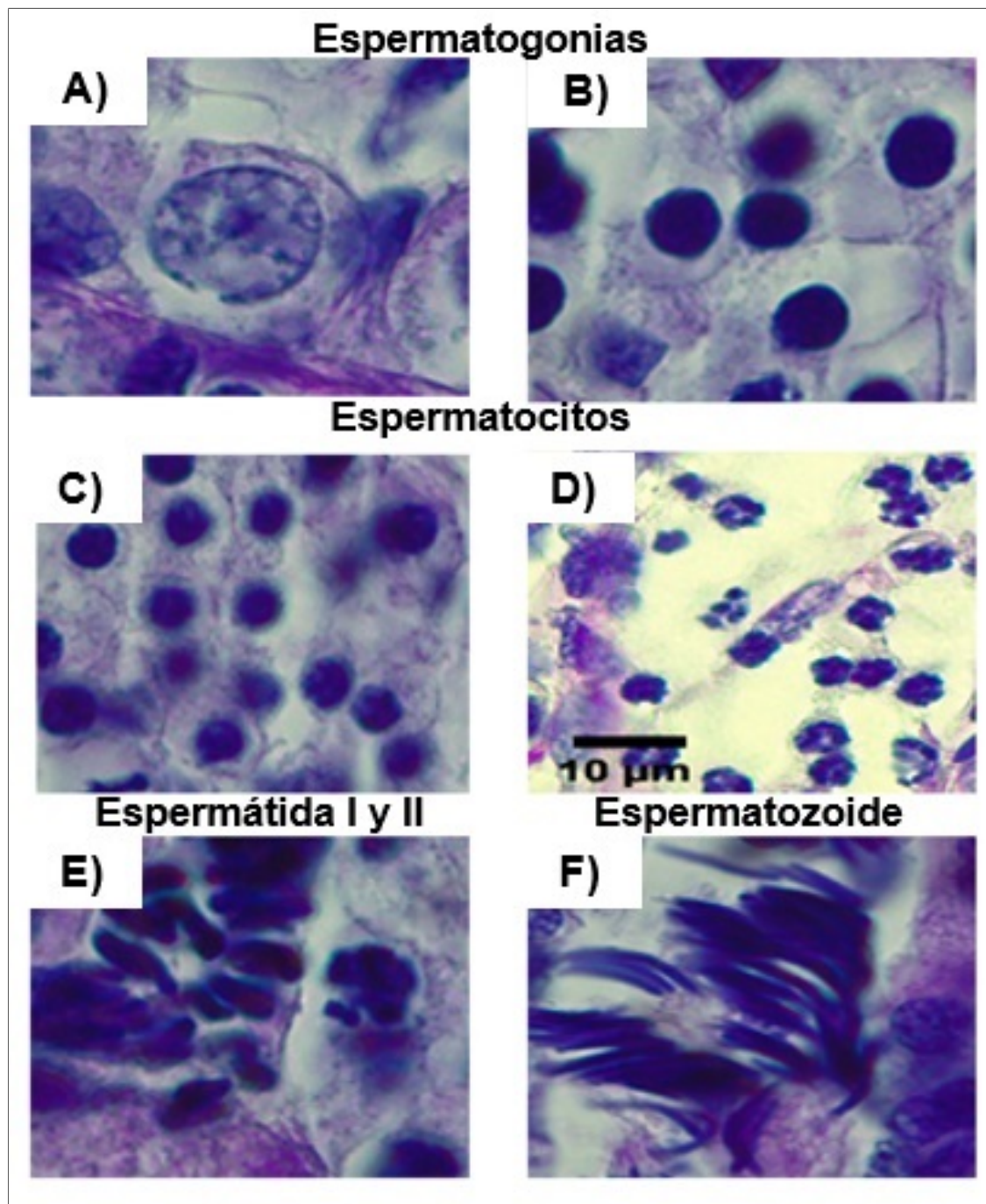


Figura 14. Células espermatogénicas del testículo de *L. spectabilis*: espermatogonias, espermatocitos en meiosis II, espermátidas y espermatozoides. Escala 10 µm, tinción PAS.

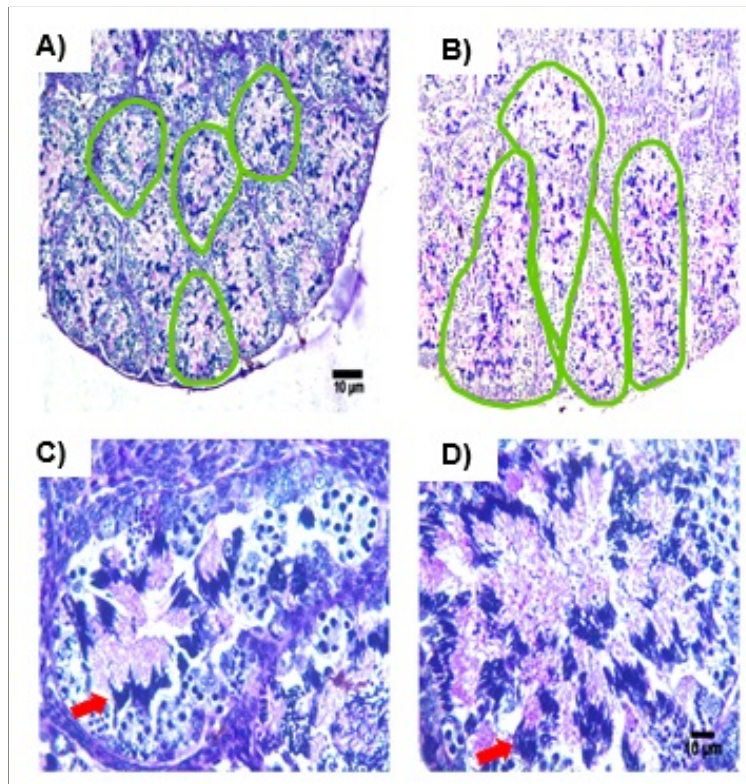


Figura 15. Efecto del HA en el área de los túbulos seminíferos y área ocupada por espermatozoides de *L. spectabilis*. A) Túbulos seminíferos con menor área (grupo control), B) túbulos seminíferos con mayor área (grupo HA); C) túbulo seminífero con menor área ocupada por espermatozoides; D) túbulo seminífero con mayor área ocupada por espermatozoides, flecha roja indica los espermatozoides. Escala 10 µm (A-B), Escala 20 µm (C-D). Tinción PAS.

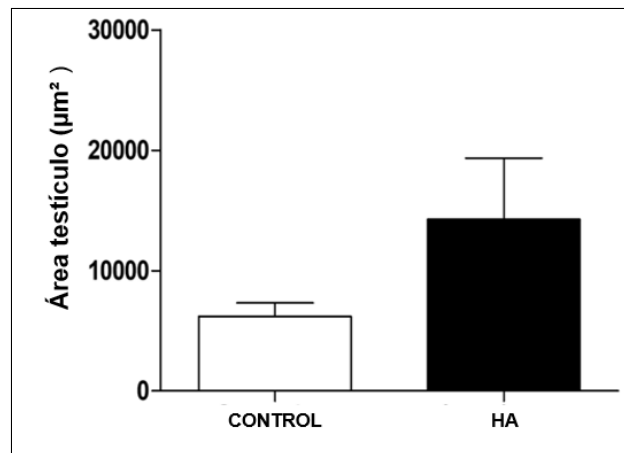


Figura 16. Efecto del HA en el área testicular de *L. spectabilis*

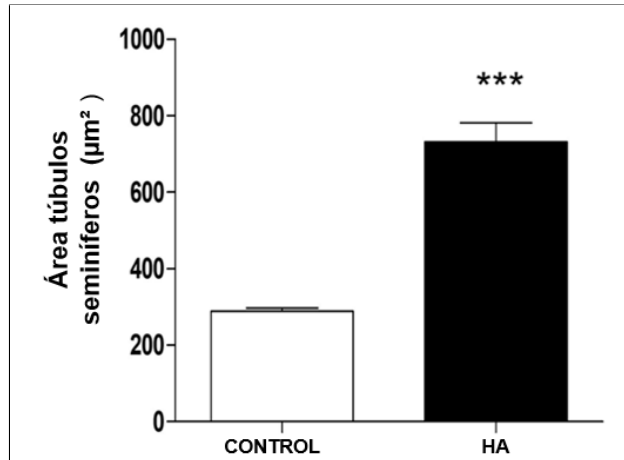


Figura 17. Efecto del HA en el área de los túbulos seminíferos del testículo de *L. spectabilis*. El * muestra diferencias significativas entre grupos.

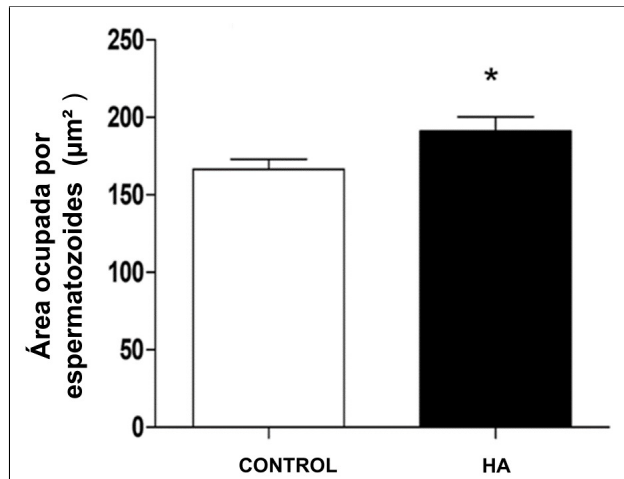


Figura 18. Efecto del HA en el área ocupada por espermatozoides en el testículo de *L. spectabilis*. El * muestra diferencias significativas entre grupos.

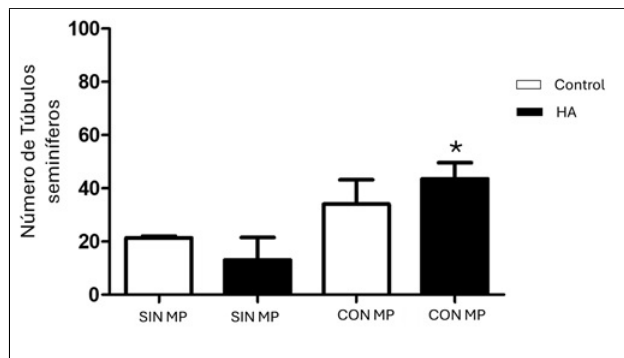


Figura 19. Número de túbulos seminíferos con y sin mucopolisacáridos en el grupo control y HA. MP: Mucopolisacáridos. El * muestra diferencias significativas entre grupos.

IV Discusión

IV.1 Efecto del Herbicida Atrazina en los Eritrocitos de *L. Spectabilis*

Genotoxicidad. Contrario a otros estudios, el HA no indujo la formación de MNs y ANs en los eritrocitos de *L. spectabilis*. Sin embargo, investigaciones previas han demostrado que la concentración de 15 µg/L del HA (97.7 % de pureza) sí induce la formación de MNs y ANs en otros organismos acuáticos como los peces (Cavas, 2011; de Campos Ventura *et al.*, 2008). Esto sugiere que el potencial genotóxico de la atrazina puede ser dependiente de la sensibilidad de la especie y también estar influenciado por la concentración y la pureza del compuesto. En estudios anteriores se ha demostrado que concentraciones mayores de atrazina (18 y 19 mg/L) aumentan la frecuencia de MNs y ANs en renacuajos (Gonçalves *et al.*, 2017; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019). Entonces, es posible que una mayor concentración (18 y 19 mg/L) del HA induzca la formación de MNs y otras ANs en los eritrocitos de *L. spectabilis*, como ya se ha reportado en otras especies acuáticas (Cavas, 2011; de Campos Ventura *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2017; Pérez-Iglesias *et al.*, 2019).

Se ha determinado que la formulación de Gesaprim® es genotóxica, pero la sustancia activa atrazina no lo es (Cavas, 2011). En esta investigación, los individuos no estuvieron expuestos únicamente a la atrazina, sino a una formulación comercial que incluye otras sustancias. Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que otras sustancias aditivas en la formulación comercial también puedan ser responsables de las anomalías encontradas en los eritrocitos. En la especie *Dendropsophus minutus* expuesta hasta 40 mg/L del herbicida Atanor 50 SC® se ha determinado que es mutagénico y genotóxico debido al incremento de la frecuencia de MNs (Gonçalves *et al.*, 2017). Sin embargo, los resultados de esta investigación no determinan un efecto genotóxico en los eritrocitos causado por Gesaprim® en *L. spectabilis*. A diferencia de este trabajo, se utilizó una

formulación comercial diferente y una concentración mucho menor. Por lo tanto, la genotoxicidad encontrada en otros trabajos podría deberse a la mayor concentración de atrazina que otras formulaciones comerciales contienen.

Citotoxicidad. Los resultados obtenidos sugieren que la exposición a 15 µg/L del HA, es la responsable del aumento de los eritrocitos con membrana ampollada, apoptóticos y necróticos. Se considera que el HA es una sustancia citotóxica, ya que, tiene la capacidad de alterar la morfología normal de los eritrocitos de *L. spectabilis* y el daño se observa, tanto en el núcleo, como en el citoplasma (Çelik, 2018). La exposición al HA puede inducir estrés oxidativo, osmótico o energético, estos desequilibrios en el ambiente celular desencadenan un aumento de la concentración intracelular de Ca^{+2} (Pretorius, 2018). Este daño a nivel celular es el estímulo clave para iniciar un proceso apoptótico o necrótico en el eritrocito (Restivo *et al.*, 2021).

El aumento de los eritrocitos necróticos en *L. spectabilis* podría estar asociado a diferentes factores desencadenado por la exposición al HA, se ha determinado que la atrazina es un inhibidor de la enzima calcio-ATPasa, esta inhibición podría causar un aumento en la concentración de calcio intracelular (Jaramillo Juárez *et al.*, 2006).

Respecto a la formación de ampollas en la membrana del eritrocito es la etapa casi final del proceso de eriptosis, estas vesículas se forman cuando la fosfatidilserina que se encuentra en la parte interna de la membrana celular, es desplazada hacia la parte externa de la membrana (Restivo *et al.*, 2021). Este proceso sucede cuando la enzima calpaína es activada y degrada a las proteínas presentes en el citoesqueleto especialmente el complejo anquirina R, asimismo la espectrina (alfa y beta) y actina. Por lo tanto el eritrocito pierde la estructura, integridad y simetría alterando drásticamente la vías de señalización facilitando la adhesión de las células dañadas con los macrófagos, Por otro lado las células con membrana ampollada pueden afectar el paso por capilares pequeños ya que han perdido la flexibilidad (Restivo *et al.*, 2021).

El aumento de los eritrocitos apoptóticos y necróticos conducen a una disminución de eritrocitos viables circulantes, lo que puede provocar una anemia. Además, podría provocar hipoxia o hipercapnia. Además, también implicaría una sobre carga al bazo e hígado que son los encargados de eliminar los eritrocitos dañados. Los eritrocitos necróticos pueden desencadenar un proceso inflamatorio y a su vez activar el sistema inmune (Burki y Lee, 2010; Lang *et al.*, 2012).

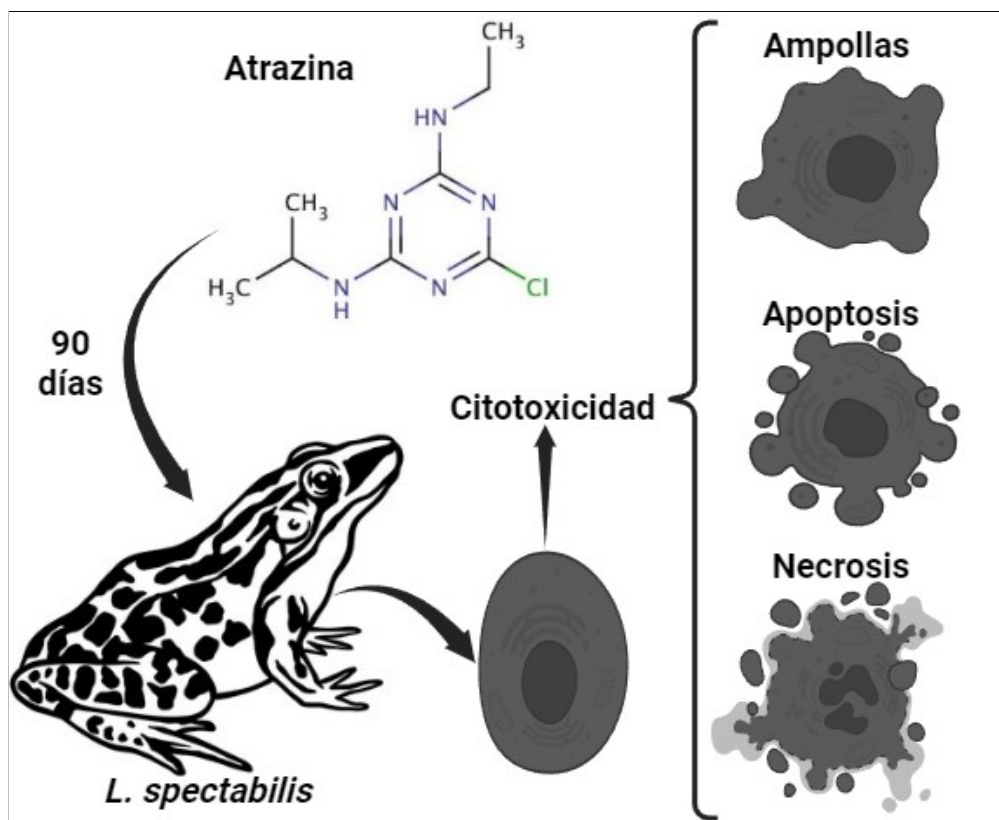


Figura 20. Diagrama del efecto citotóxico del HA en los eritrocitos de *L. spectabilis*. La exposición subcrónica al HA induce apoptosis y necrosis. Un efecto previo a la muerte celular observado es la formación de ampollas en la membrana plasmática.

IV.2 Efecto del Herbicida Atrazina en el Testículo de *L. Spectabilis*

La concentración utilizada del HA aumenta el área de los túbulos seminíferos, el área ocupada por espermatozoides y el número de los túbulos seminíferos con mucopolisacáridos en el testículo de *L. spectabilis*. El aumento del área de los túbulos seminíferos en *L. spectabilis* expuestos a atrazina podría indicar una respuesta adaptativa o patológica a la exposición al

herbicida. Este cambio puede deberse a una hiperplasia de las células germinales o una respuesta inflamatoria del tejido testicular. La hiperplasia podría ser un intento del organismo para mantener la homeostasis, mientras que una respuesta inflamatoria podría ser una indicación de daño tisular. Adicionalmente, la atrazina es conocida por sus efectos estrogénicos, los cuales pueden alterar el balance hormonal y provocar cambios en la estructura de los túbulos seminíferos (Haschek *et al.*, 2010). Este efecto adverso ha sido reportado en otros organismos: en *Coturnix japonica* provoca hiperplasia biliar (Hussain *et al.*, 2010), causa hiperplasia endometrial (Griffiths *et al.*, 2021). En *Caiman latirostris*, provoca hiperplasia folicular (Galoppo *et al.*, 2020) y en el cangrejo *Procambarus clarkii* causa hiperplasia en el testículo (Nassar *et al.*, 2022).

El incremento del área ocupada por los espermatozoides podría ser interpretado como un signo de una mayor producción de espermatozoides o una acumulación anormal debido a un defecto en la liberación de los mismos. Si bien un aumento en la producción de espermatozoides podría parecer positivo, la calidad de estos espermatozoides también es crucial. Estudios previos han demostrado que la atrazina puede afectar la morfología y movilidad de los espermatozoides, lo cual podría comprometer su capacidad de fertilización. Por lo tanto, aunque haya más espermatozoides presentes, es fundamental evaluar su funcionalidad (Kniewald *et al.*, 2000).

La presencia de mucopolisacáridos en los túbulos seminíferos puede ser un indicador de cambios estructurales y funcionales en el testículo. Los mucopolisacáridos son componentes importantes de la matriz extracelular y su acumulación podría reflejar una alteración en la homeostasis del tejido testicular (Visconti y Florman, 2010). En el contexto de la exposición a atrazina, esta acumulación podría ser el resultado de un proceso inflamatorio crónico o de una alteración en la síntesis y degradación de la matriz extracelular. La atrazina ha sido asociada con la inducción de estrés oxidativo y daños celulares, lo que podría explicar el aumento de mucopolisacáridos como una respuesta reparativa del tejido (Hussain *et al.*, 2010).

En conjunto, estos resultados sugieren que la exposición a la atrazina provoca una serie de respuestas complejas en los testículos de *Lithobates spectabilis*. Estos hallazgos resaltan la necesidad de una evaluación más profunda sobre la funcionalidad de los espermatozoides producidos y el impacto a largo plazo de la exposición a atrazina en la salud reproductiva de los anfibios. La capacidad del herbicida para alterar de manera significativa la morfología testicular y potencialmente comprometer la fertilidad, sugiere que la atrazina podría tener efectos disruptores endocrinos significativos, que podrían impactar en las poblaciones de los anfibios y su conservación.

La salud de los organismos vivos depende de la integridad de sus células y sistemas. Los eritrocitos, y los testículos desempeñan roles vitales en el individuo. El daño a los eritrocitos y a los testículos tiene consecuencias graves para la salud reproductiva y general de *L. spectabilis*. La concentración de atrazina en el medio ambiente es un factor crítico que puede tener un impacto ecológico significativo, afectando tanto a la biodiversidad como a la estabilidad de los ecosistemas. Es esencial gestionar adecuadamente y controlar los niveles de atrazina para proteger la salud de los organismos y la integridad de nuestros ecosistemas.

V Conclusiones

1. El herbicida atrazina es citotóxico pero no genotóxico para los eritrocitos de la rana *L. spectabilis*. La detección temprana de los eritrocitos con ampolla podría ser esencial para prevenir un estado apoptótico o necrótico de los anfibios. La apoptosis y necrosis de los eritrocitos podría causar un proceso degenerativo o inflamatorio del tejido sanguíneo en los individuos. Por lo que, consideramos la realización de más estudios hematológicos y de señalización celular que puedan dar explicación al efecto citotóxico de los eritrocitos en ranas expuestas al herbicida atrazina.

2. El aumento del área de los túbulos seminíferos y área ocupada por espermatozoides posiblemente se deba al efecto de la atrazina en las últimas etapas de la espermatogénesis. Dicha alteración en la espermatogénesis o en la morfología testicular y mucopolisacáridos podría afectar los mecanismos reproductivos de *L. spectabilis*. Consideramos fundamental realizar estudios endocrinos para determinar alteraciones en la espermatogénesis que afecten la reproducción en dicha especie.

VI Perspectivas

Eritrocitos:

1. Determinar el efecto subcrónico del herbicida atrazina en el área de los eritrocitos en *L. spectabilis*.
2. Determinar el efecto subcrónico del herbicida atrazina en proteínas involucradas en la apoptosis y necrosis de los eritrocitos en *L. spectabilis*.

Testículo:

1. Determinar el efecto subcrónico del herbicida atrazina en el área ocupada por las células testiculares: espermatogonias, espermatocitos y espermátidas en los túbulos seminíferos de *L. spectabilis*.
2. Determinar el efecto subcrónico del herbicida atrazina en las proteínas moduladoras del ciclo celular en *L. spectabilis*.

Referencias

- Ackerman, F. (2007). The Economics of Atrazine. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 13(4), 437-445. <https://doi.org/10.1179/oeh.2007.13.4.437>
- Albert, L. (2005). Panorama de los plaguicidas en México. *RETEL : Revista de Toxicología en Línea*.
- AmphibiaWeb. (2023). *University of California, Berkeley, CA, USA*. Consultado el 6 de julio de 2023, desde <https://amphibiaweb.org/>
- Arteaga-García, S. (2021). *Guía de campo para la identificación de anfibios y reptiles en el "Valle de Piedras encimadas", Zacatlán, Puebla* [Tesis Doctoral]. Universidad Autónoma de México.
- ATSDR. (2003). *Toxicological profile for atrazine*.
- Battaglin, W., Furlong, E., Burkhardt, M., Peter, C. (2000). Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Science of The Total Environment*, 248(2-3), 123-133. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00536-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00536-7)
- Baxter, L., Brain, R. A., Hosmer, A. J., Nema, M., Müller, K. M., Solomon, K. R., Hanson, M. L. (2015). Effects of atrazine on egg masses of the yellow-spotted salamander (*Ambystoma maculatum*) and its endosymbiotic alga (*Oophila amblystomatis*). *Environmental Pollution*, 206, 324-331. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.07.017>
- Burki, N. K., Lee, L.-Y. (2010). Mechanisms of Dyspnea. *Chest*, 138(5), 1196-1201. <https://doi.org/10.1378/chest.10-0534>
- Canseco-Márquez, L., Gutiérrez-Mayén, M. G. (2010). *Anfibios y reptiles del valle de Tehuacán-Cuicatlán*.
- Cavas, T. (2011). In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1431-1435. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.038>
- CEDRSSA. (2020). *Uso y regulación de herbicidas en México*.
- Çelik, T. A. (2018). Introductory Chapter: Cytotoxicity. En *Cytotoxicity*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77244>
- Chakrabarti, B., Woo, J. P., Stevens, E. S. (1980). Glycosaminoglycans: Structure and Interaction. *Critical Reviews in Biochemistry*, 8(3), 225-313. <https://doi.org/10.3109/10409238009102572>
- Claver, J., Quaglia, A. (2009). Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18, 87-97. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2009.04.006>
- Da Silva, H. R., De Britto-Pereira, M. C. (2006). How much fruit do fruit-eating frogs eat? An investigation on the diet of *Xenohyla truncata* (Lissamphibia: Anura: Hylidae). *Journal of Zoology*, 270(4), 692-698. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2006.00192.x>
- de Campos Ventura, B., de Franceschi de Angelis, D., Marin-Morales, M. A. (2008). Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90(1), 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.07.009>

- de Souza Santos, L. R., de Oliveira, C. (2008). Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron*, 39(8), 1266-1270. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.03.006>
- Ding, L., Snoeyink, V. L., Mariñas, B. J., Yue, Z., Economy, J. (2008). Effects of Powdered Activated Carbon Pore Size Distribution on the Competitive Adsorption of Aqueous Atrazine and Natural Organic Matter. *Environmental Science & Technology*, 42(4), 1227-1231. <https://doi.org/10.1021/es0710555>
- Fraser, S. T., Isern, J., Baron, M. H. (2010). Use of Transgenic Fluorescent Reporter Mouse Lines to Monitor Hematopoietic and Erythroid Development During Embryogenesis. En *Methods in Enzymology* (pp. 403-427). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(10\)76022-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(10)76022-5)
- Freeman, J., Rayburn, A. (2004). In vivo genotoxicity of atrazine to anuran larvae. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 560(1), 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.02.008>
- Gonçalves, M., Campos, C., Guerra Batista, V., da Cruz, A. D., De Marco Júnior, P., Bastos, R., Silva, D. d. M. (2017). Genotoxic and mutagenic effects of Atrazine Atanor 50 SC on *Dendropsophus minutus* Peters, 1872 (Anura: Hylidae) developmental larval stages. *Chemosphere*, 182. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.078>
- Griffiths, M. J., Winship, A. L., Stringer, J. M., Swindells, E. O., Harper, A. P., Finger, B. J., Hutt, K. J., Green, M. P. (2021). Prolonged atrazine exposure beginning *in utero* and adult uterine morphology in mice. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 13(1), 39-48. <https://doi.org/10.1017/s2040174421000106>
- Harabawy, A. S., Mosleh, Y. Y. (2014). The role of vitamins A, C, E and selenium as antioxidants against genotoxicity and cytotoxicity of cadmium, copper, lead and zinc on erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.02.015>
- Harvey Pough, F. (2007). Amphibian Biology and Husbandry. *ILAR Journal*, 48(3), 203-213.
- Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., Wallig, M. A. (2010). Manifestations of Toxic Cell Injury. En *Fundamentals of Toxicologic Pathology* (pp. 9-42). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-370469-6.00002-7>
- Haseena, M., Malik, M., Javed, A., Arshad, S., Asif, N., Zulfiqar, S., Hanif, J. (2017). Water pollution and human health. *Environmental Risk Assessment and Remediation*, 01. <https://doi.org/10.4066/2529-8046.100020>
- Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. A., Vonk, A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5476-5480. <https://doi.org/10.1073/pnas.082121499>
- Hayes, T. B., Khoury, V., Narayan, A., Nazir, M., Park, A., Brown, T., Adame, L., Chan, E., Buchholz, D., Stueve, T., Gallipeau, S. (2010). Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4612-4617. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909519107>
- Hernández-Antonio, A., Hansen, A. M. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista Internacional*

- de Contaminación Ambiental*, 27(2), 115-127. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=%20S0188-49992011000200003&lng=es&tlng=es
- Hillis, D. M., Frost, J. S. (1985). Three new species of leopard frogs (*Rana pipiens* complex) from the Mexican Plateau. *Occasional papers of the Museum of Natural History, the University of Kansas*, 117, 1-14.
- Hocking, D., Babbitt, K. (2014). Amphibian contributions to ecosystem services. *Herpetological Conservation and Biology*, 9, 1-17.
- Hussain, R., Mahmood, F., Khan, M. Z., Khan, A., Muhammad, F. (2010). Pathological and genotoxic effects of atrazine in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Ecotoxicology*, 20(1), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0515-y>
- Iruzubieta-Villagra, A. L., Cisint, S. B., Crespo, C. A., Medina, M. F., Ramos, I., Fernández, S. N. (2012). Spermatogenesis in *Leptodactylus chaquensis*. Histological study. *Zygote*, 22(3), 291-299. <https://doi.org/10.1017/s0967199412000494>
- Jaramillo Juárez, F., Rincón Sánchez, A. R., Posadas del Río, F. A. (2006). *Toxicología Básica*.
- Kadiru, S., Patil, S., D'Souza, R. (2022). Effect of pesticide toxicity in aquatic environments: A recent review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 10, 113-118. <https://doi.org/10.22271/fish.2022.v10.i3b.2679>
- Katarzyna, H., Beata, R.-K., Maria, O. (2017). Prespermatogenesis and early spermatogenesis in frogs. *Zoology*, 122, 63-79. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.zool.2017.01.003>
- Kniewald, J., Jakominić, M., Tomljenović, A., Šimić, B., Romac, P., Vranešić, Đ., Kniewald, Z. (2000). Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. *Journal of Applied Toxicology*, 20(1), 61-68. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1263\(200001/02\)20:1<61::aid-jat628>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1263(200001/02)20:1<61::aid-jat628>3.0.co;2-3)
- Lang, F., Lang, E., Föller, M. (2012). Physiology and Pathophysiology of Eryptosis. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 39(5), 308-314. <https://doi.org/10.1159/000342534>
- Lobo, M., Tibisay-Bolaños, A. (2014). Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*, 18, 18-26.
- Lopes-Lima, M., Hinzmann, M., Varandas, S., Froufe, E., Reis, J., Moreira, C., Araújo, S., Miranda, F., Gonçalves, D. V., Beja, P., Sousa, R., Teixeira, A. (2020). Setting the stage for new ecological indicator species: A holistic case study on the Iberian dolphin freshwater mussel *Unio delphinus* Spengler, 1793. *Ecological Indicators*, 111, 105987. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105987>
- Martínez González, S., Salgado, S., Escalera, F. (2012). La prueba de micronúcleos en sangre como bioindicador de genotóxicos (Micronucleus blood test as genotoxic biomarker).
- Méndez-Tepepa, M., Morales-Cruz, C., García-Nieto, E., Anaya-Hernández, A. (2023). A review of the reproductive system in anuran amphibians. *Zoological Letters*, 9(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40851-023-00201-0>
- Méndez-Tepepa, M., Hernández-Pérez, K., Juárez-Santacruz, L., Cruz-Lumbreras, S., García-Nieto, E., Anaya-Hernández, A., Morales-Cruz, C. (2023). Cytotoxic Effects of the Atrazine Herbicide on Erythrocytes and Liver Damage in *Lithobates spectabilis*. *Fishes*, 8(4), 207. <https://doi.org/10.3390/fishes8040207>
- Méndez-Tepepa, M., Medina-Bello, K. I., García-Nieto, E., Juárez-Santacruz, L., Ortiz-Ortiz, E., Pérez-Garzón, A., Limón-Delgado, R., Cruz-Lumbreras, S. R. (2024). The herbicide

- atrazine increases mucopolysaccharides and decreases the thickness of the epithelium of the frog *Lithobates spectabilis* (Ranidae). *Salamandra*, 60(1), 60-66.
- Méndez-Tepepa, M., Zepeda-Pérez, D., Espindola-Lozano, M., Rodríguez-Castelán, J., Arroyo-Helguera, O., Pacheco, P., Nicolás-Toledo, L., Cuevas-Romero, E. (2020). Hypothyroidism modifies differentially the content of lipids and glycogen, lipid receptors, and intraepithelial lymphocytes among oviductal regions of rabbits. *Reproductive Biology*, 20(2), 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.02.004>
- Murphy, M., Hecker, M., Coady, K., Tompsett, A., Jones, P., Du Preez, G., L.H. and Everson, Solomon, K., Carr, J., Smith, E., Kendall, R., Van Der Kraak, G., Giesy, J. (2006). Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. *Aquatic Toxicology*, 76(3), 230-245. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.010>
- Nassar, S. E., Mohamed, A. A., Said, R. M. (2022). Effects of herbicide atrazine on reproductive hormonal levels, Cytochrome P450, and gonadal structure of adult male and female crayfish, *Procambarus clarkii*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1539137/v1>
- Nwani, C., Nagpure, N., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, D. P., Lakra, W. (2010). Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31, 314-322. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.12.001>
- Orton, F., Carr, J. A., Handy, R. D. (2006). Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(1), 65-71. <https://doi.org/10.1897/05-136R.1>
- Pérez Iglesias, J., Natale, G., Soloneski, S., Larramendy, M. (2018). Are the damaging effects induced by the imazethapyr formulation Pivot® H in *Boana pulchella* (Anura) reversible upon ceasing exposure? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.009>
- Pérez-Iglesias, J. M., Franco-Belussi, L., Natale, G. S., de Oliveira, C. (2019). Biomarkers at different levels of organisation after atrazine formulation (SIPTRAN 500SC®) exposure in *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) Neotropical tadpoles. *Environmental Pollution*, 244, 733-746. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.073>
- Pretorius, E. (2018). Erythrocyte deformability and eryptosis during inflammation, and impaired blood rheology. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 69(4), 545-550. <https://doi.org/10.3233/ch-189205>
- Propper, C. R. (2011). Testicular Structure and Control of Sperm Development in Amphibians. En *Hormones and Reproduction of Vertebrates* (pp. 39-53). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374931-4.10003-3>
- Rastogi, R. K., Pinelli, C., Polese, G., D'Aniello, B., Chieffi-Baccari, G. (2011). Hormones and Reproductive Cycles in Anuran Amphibians. En *Hormones and Reproduction of Vertebrates* (pp. 171-186). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374931-4.10009-4>
- Regaldo, L., Gutierrez, M. F., Reno, U., Fernández, V., Gervasio, S., Repetti, M. R., Gagneten, A. M. (2017). Water and sediment quality assessment in the Colastiné-Corralito stream system (Santa Fe, Argentina): impact of industry and agriculture on aquatic ecosystems.

- Environmental Science and Pollution Research*, 25(7), 6951-6968. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0911-4>
- Restivo, I., Attanzio, A., Tesoriere, L., Allegra, M. (2021). Suicidal Erythrocyte Death in Metabolic Syndrome. *Antioxidants*, 10(2), 154. <https://doi.org/10.3390/antiox10020154>
- Salazar-Ledesma, M., Prado, B., Zamora, O., Siebe, C. (2018). Mobility of atrazine in soils of a wastewater irrigated maize field. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 255, 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.018>
- Sánchez, O., Herzig, M., Peters, E., Márquez Huitzil, R., Zambrano, L. (2007). *Perspectivas sobre conservación de ecosistemas acuáticos en México*.
- Sánchez-Ferreira, A., Rincón-Barón, E. J., Rueda-Solano, L. A. (2021). Histology and structure of the testicles in three species of Atelopus frogs (Anura: Bufonidae) endemic to the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 69(3), 811-828. <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i3.44727>
- Schindelmeiser, J. (1986). Light and electron microscopic study on complex carbohydrates in the testis of Salamandra salamandra L. (Amphibia, Urodela). *Acta Histochemica*, 78(2), 189-195. [https://doi.org/10.1016/s0065-1281\(86\)80053-8](https://doi.org/10.1016/s0065-1281(86)80053-8)
- Schweitzer, L., Noblet, J. (2018). Water Contamination and Pollution. En *Green Chemistry* (pp. 261-290). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809270-5.00011-x>
- Segatelli, T., Batlouni, S., França, L. (2009). Duration of spermatogenesis in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Theriogenology*, 72(7), 894-901. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.007>
- SEMARNAT. (2012). Biodiversidad. En *Informe de situación del Medio Ambiente*.
- Solomon, R., Kumar, A., Satheja Santhi, V. (2013). Atrazine biodegradation efficiency, metabolite detection, and trzD gene expression by enrichment bacterial cultures from agricultural soil. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 14(12), 1162-1172. <https://doi.org/10.1631/jzus.b1300001>
- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., Waller, R. W. (2004). Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science*, 306(5702), 1783-1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Su, H., Hangand Zhang, Wei, X., Pan, L., Daianand Jing, Zhao, D., Zhao, Y., Qi, B. (2018). Comparative Proteomic Analysis of Rana chensinensis Oviduct. *Molecules*, 23(6), 1384. <https://doi.org/10.3390/molecules23061384>
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D. (2002). Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to Atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 21, 527-31. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210309>
- Taverna, M. E., Busatto, C. A., Lescano, M. R., Nicolau, V. V., Zalazar, C. S., Meira, G. R., Estenoz, D. A. (2018). Microparticles based on ionic and organosolv lignins for the controlled release of atrazine. *Journal of Hazardous Materials*, 359, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.010>
- Thorngren, J. L., Harwood, A. D., Murphy, T. M., Huff Hartz, K. E., Fung, C. Y., Lydy, M. J. (2016). Fate and risk of atrazine and sulfentrazone to nontarget species at an agriculture site.

- Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(5), 1301-1310. <https://doi.org/10.1002/etc.3664>
- Ventura, B., Angelis, D., Marin-Morales, M. (2008). Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90, 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.07.009>
- Visconti, P. E., Florman, H. M. (2010). Mechanisms of Sperm-Egg Interactions: Between Sugars and Broken Bonds. *Science Signaling*, 3(142). <https://doi.org/10.1126/scisignal.3142pe35>
- Wake, D. B., Koo, M. S. (2018). Amphibians. *Current Biology*, 28(21), R1237-R1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.028>
- Wang, M., Liu, Z., Xiaoliand Lyu, Gu, H., Li, D., Hong, C. (2017). Glycosaminoglycans (GAGs) and GAG mimetics regulate the behavior of stem cell differentiation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.022>
- Williams, M. M., Boydston, R. A., Peachey, R. E., Robinson, D. (2011). Performance consistency of reduced atrazine use in sweet corn. *Field Crops Research*, 121(1), 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.11.020>
- Yoshida, S. (2015). From cyst to tubule: innovations in vertebrate spermatogenesis. *WIREs Developmental Biology*, 5(1), 119-131. <https://doi.org/10.1002/wdev.204>
- Zenklusen, C., Cristina, M., Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Peltzer, P., Junges, C. M. (2014). *Generalidades sobre la hematología de anfibios anuros* [Tesis Doctoral]. Museo Provisional de Ciencias Naturales Florentino Ameghino.
- Zhelev, Z., Arnaudova, D., Tsonev, S. (2022). ACTA ZOOLOGICA BULGARICA Genotoxicity and Erythrocyte Nuclear Abnormalities in *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) (Anura: Ranidae) in an Industrial Area in Southern Bulgaria: Evaluation as Biomarkers for Ecological Stress Assessment. *Acta Zoologica Bulgarica*, 74, 59-67.

VII Anexos

VII.1 A. Parámetros de Calidad del Agua Potable del CIGyA

Se determinaron algunos parámetros de calidad del agua potable que se utilizó para la aclimatación y exposición de los organismos. El parámetro de pH y temperatura (T) se obtuvo con un potenciómetro marca Denver Instrument Modelo 215, el color, cloruros, ácido cianúrico, nitratos, nitritos, así como fosforo se midieron con un medidor de DQO y fotómetro multiparámetro (HANNA instruments/HI-83099). Mientras que la alcalinidad y dureza se cuantificaron por el método volumétrico ácido-base y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO5) por el método de Winkler modificado (NMX-AA-028-SCFI-2001).

Los parámetros de pH, T y color se encuentran dentro de los valores permisibles de calidad de agua potable (NOM 127-SSA1-2001). Así mismo, los cloruros cumplieron con los parámetros establecidos en los criterios ecológicos de calidad del agua para la protección de la vida acuática (CE-CA, 1989). Mientras que la dureza y alcalinidad se encontraron ligeramente arriba de lo establecido en la normatividad oficial. Solo las concentraciones de nitratos y nitritos presentan valores superiores a lo establecido en la NOM 127-SSA1-2001, estos junto con la concentración de fosfatos indican contaminación por fertilizantes inorgánicos. En general el agua utilizada se consideró adecuada para realizar el ensayo con *L. spectabilis* sin riesgo aparente.

Tabla 3. Resultados del análisis de los parámetros de calidad del agua potable utilizada en este experimento.

Parámetros	Muestra	NOM 127-SSA1-2001 Límites permisibles de calidad de agua para uso y consumo humano	Criterios ecológicos de calidad de Agua (CE-CA Protección de vida acuática)
Ph	7.8	6.5 a 8.5	05-sep
T	25 °C		condiciones naturales
Color verdadero	9 UC	15 UC	

Tabla 3 continua de la página anterior

Cloruros	70.3 mg/L		250
Ácido cianúrico	0		
Nitrógeno de nitritos (N-NO ₂)	46 mg/L	0.90 mg/L	-
Nitrógeno de nitratos (N-NO ₃)	225 mg/L	11 mg/L	
Fosfato	0.5 mg/L		
Alcalinidad	448 mg/L		400
Dureza (CaCO ₃)	666 mg/L	500 mg/L	
DBO	3.42		
