



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Licenciatura en Biología

"Descripción del sistema muscular de *Adineta vaga* (Rotífero; Bdelloidea)"

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Biología

Presenta:

Eduardo Pedro Hernández Ortega

Dirigido por:

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Codirector:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Santiago de Querétaro, Oro. 2013

## Agradecimientos

Con amor, cariño y respeto agradezco a mi padre que me formo, a mi madre por su apoyo total y hermanos por todo lo que hacen por mí.

Gracias al Dr. Ataúlfo Martínez Torres, por el apoyo incondicional y paciencia en el desarrollo de esta tesis. Al Dr. Fausto Arellano Carbajal por creer en mí en todo momento. Al Dr. Marco Sánchez por los consejos de vida así como al Dr. Rubén Pineda por sus observaciones para mejorar el trabajo.

Gracias a todos mis amigos y compañeros en Querétaro y Celaya que han estado conmigo en este camino, por compartir buenos y malos momentos, por existir y vivir día a día a mi lado.

## Resumen

Los rotíferos son organismos multicelulares, pseudocelomados microscópicos. Reciben su nombre por poseer una corona ciliada en la parte apical de la cabeza, la palabra en latín "rota" que significa ruedas y "ferre" que significan portadores por lo cual su nombre se traduce en "Portadores de ruedas".

*Adineta vaga* es un rotífero de la clase bdelloidea sin reproducción sexual y con ciclo de vida corto. Esto lo coloca como un posible organismo modelo para muchos experimentos en diferentes áreas de estudio.

El sistema muscular de los rotíferos de la clase bdelloidea no ha sido descrito extensamente y es un elemento muy importante que se utiliza frecuentemente en la generación de árboles filogenéticos. Además, presenta retos importantes a futuro en el conocimiento del sistema locomotor de los rotíferos en general.

Con el fin de observar los detalles del sistema muscular de *A. vaga* se utilizó faloidina acoplada al indicador fluorescente rodamina la cual marcó la actina del citoesqueleto. Posteriormente se observó la muestra por medio de microscopía de epifluorescencia, se tomaron microfotografías y se analizaron las imágenes.

Después del procesamiento de las imágenes se realizaron las siguientes observaciones: los músculos de las fibras sensoriales de los bigotes localizados en la parte apical de la cabeza, lo que indica que en esta región también se encuentran fibras musculares, característica que no se había reportado previamente.

Posterior a estas se encontró el músculo del *rostrum*. Alrededor de toda la cabeza se encontró el músculo de la cabeza y en la parte media de la cabeza se encontró un par de músculos denominados músculos longitudinales de la cabeza, que llegan hasta la parte media del cuerpo.

En la parte ventral de la cabeza se lograron observar otro par de músculos del *rake*, los que podrían estar implicados en el movimiento de esta parte única en el género *Adineta*. También en la cabeza se encontró un par más de músculos

requeridos para la retracción de toda la cabeza: los músculos retractores de la cabeza.

En el tronco se logró observar el músculo con mayor actividad en todo el organismo, el músculo del mástax. También se observó un músculo no descrito hasta ahora: el anillo de la cloaca.

En el pie de *A.vaga* se encontraron dos pares de músculos el músculo retractor y el músculo longitudinal del pie. Los músculos del pie se limitaron a la parte ventral del organismo.

Los músculos más característicos de estos organismos son los músculos circulares que se observan a lo largo de todo el cuerpo. Se encontraron trece músculos que se extienden contralateralmente a lo largo de la sección dorsal del tronco, ninguno de estos se observó cerrado en la parte ventral.

En conclusión se hace una descripción general del sistema muscular del bdelloideo *A. vaga* el cual podría ser utilizado para fines de identificación, para colocarlo en árboles filogenéticos e incluso para estudios más detallados de las capacidades locomotoras de esta especie. También se desarrolló una metodología para su fijación y tinción siendo un primer trabajo para impulsar a *A.vaga* como organismo modelo en diversas áreas de estudio tales como las neurociencias, biología del desarrollo, evolución, etc.

## INDICE

Introducción .....	8
Generalidades de los rotíferos .....	8
Bdelloidea .....	11
Adineta vaga .....	14
Sistema muscular en el filo Rotífera .....	16
Sistema muscular en Bdelloideos .....	19
Objetivos .....	21
Materiales y Métodos .....	23
Cultivo .....	23
Preparación de ejemplares para histoquímica .....	23
Histoquímica .....	23
Observación .....	24
Análisis de las imágenes .....	24
Resultados .....	26
Cultivo y metodología .....	26
Fijación y Tinción .....	28
Estado "tun" .....	30
Cabeza .....	31
Tronco .....	35
Pie .....	40
Discusión .....	46
Conclusión .....	48
Abreviaturas .....	49
BIBLIOGRAFIA .....	51

## Índice de imágenes

- Fig. 1 Diversidad de mástax en los Rotíferos.
- Fig. 2 División anatómica de los Rotíferos
- Fig. 3 Mástax de los rotíferos
- Fig. 4 *Adineta vaga*
- Fig. 5 Proceso de relajamiento de *Adineta vaga*
- Fig. 6 *Adineta vaga* con el marcaje histoquímico
- Fig. 7 *Adineta vaga* en estado "tun"
- Fig. 8 Fibras sensoriales de los bigotes de *Adineta vaga*
- Fig. 9 Acercamiento a cabeza de *Adineta vaga*
- Fig. 10 Cilios y músculo del rake de *Adineta vaga*
- Fig. 11 Acercamiento del mástax de *Adineta vaga*
- Fig. 12 Anillo de la cloaca de *Adineta vaga*
- Fig. 13 Región ventral de *Adineta vaga*
- Fig. 14 Músculos circulares de *Adineta vaga*
- Fig. 15 Músculos longitudinales del pie de *Adineta vaga*
- Fig. 16 Músculos del pie de *Adineta vaga*

## Índice de tablas

- Tabla. 1 Diferencias musculares de los Rotíferos.
- Tabla. 2 Abreviatura del sistema muscular de *A. vaga*.

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

### Generalidades de los rotíferos

Los rotíferos son micrometazoos bilaterales (Remane, 1929), son cosmopólitas de vida libre aunque algunos son epizóicos y en menor número parásitos (May, 1989). Aunque hay autores que no están de acuerdo con su distribución cosmopólita ya que recientes trabajos muestran que existe una gran correlación espacial en comunidades locales pero en comunidades separadas hay mucha disimilitud, por lo tanto estos trabajos reportan que no son cosmopólitas si no existen muchas especies crípticas (Robeson et al., 2011).

Los rotíferos se dividen en tres clases; monogonontas con 1500 especies, bdelloideos con 400 especies y seisonidea con 3 especies (Sorensen, 2002). El tamaño de estos organismos varía desde 100  $\mu\text{m}$  en el caso del género *Brycella* (Wilts et al., 2010), hasta 2 mm en el caso del género *Asplanchna* (Ajah, 2008).

Los rotíferos poseen dos características diagnósticas: 1) la corona y 2) el mástax. La corona se encuentra en la parte apical de la cabeza, la cual utilizan en locomoción especialmente nado y generación de corrientes para atracción de su alimento, normalmente está compuesta por dos franjas del *trochus* (ruedas) y el cíngulo, que a su vez están rodeadas de cilios.

El mástax es una faringe compuesta por mandíbulas llamadas *trophi* que le ayudan a desgarrar y triturar el alimento (Figura 1), después el mismo mástax empuja el alimento al estómago del rotífero para su degradación. Existe una gran variedad de *trophi*, cuyas características dependen del tipo de alimento del organismo (Willem, 1998).

El organismo se divide anatómicamente en tres partes: 1) la cabeza y cuello ,2) el tronco o cuerpo y 3) el pie; aunque existe una gran diversidad de formas en estos organismos (Wallace, 2001) (Figura 2).

Los rotíferos han sido de utilidad como bioindicadores de aguas perturbadas (Arora, 1964) y de gran importancia en la industria acuícola como alimento básico de algunos peces y camarones. (Casé et al., 2008; Srivastava et al., 2012). La importancia de la descripción del sistema muscular en estos organismos es conocer y localizar cada músculo para entonces poder indagar y proyectar futuros trabajos sobre su locomoción, fisiología, desarrollo, hasta cosas más específicas como canales iónicos o conexiones neuromusculares. Siendo un trabajo puramente descriptivo se logró obtener la diversidad y localización muscular de *A.vaga*, también se logró una metodología para su tinción y fijación.

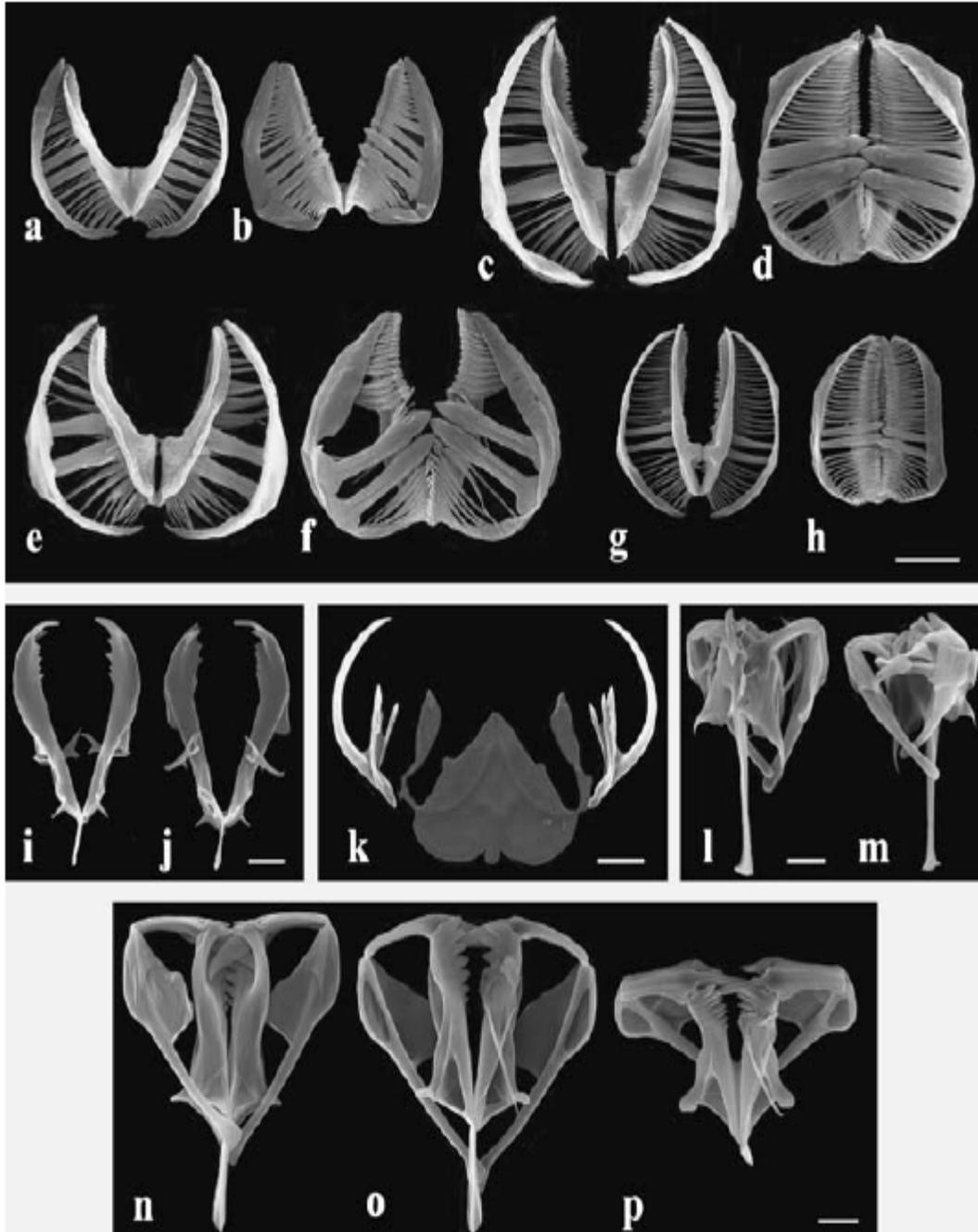


Fig. 1 Diversidad del mástax de los rotíferos, a-h; Bdelloideos, i-p Monogonontas. (Fontaneto y Melone, 2005).

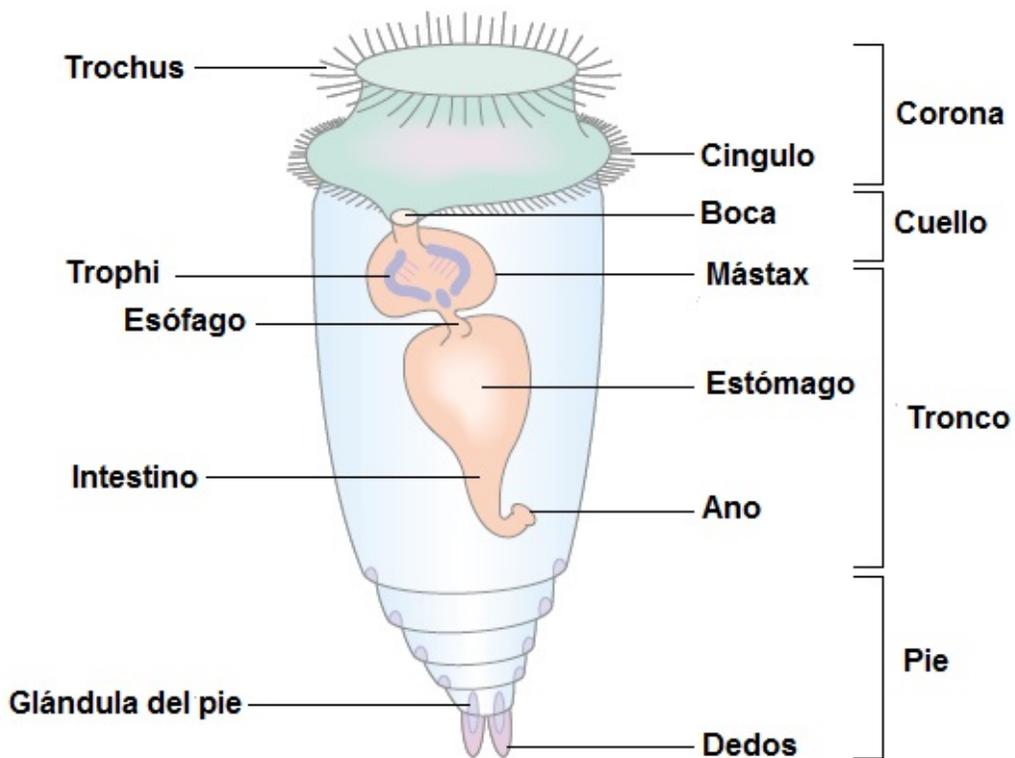


Fig. 2. División anatómica de los rotíferos. La corona y el cuello forman la cabeza, el tronco la parte media del organismo y el pie en la parte posterior. (Wallace, 2001).

## Bdelloidea

Los bdelloideos constituyen el segundo grupo más diverso de los rotíferos. Estos organismos tienen dos características autopomórficas; 1) Reproducción partenogenética obligada (Gilbert, 1983) y 2) Anhidrobiosis (Ricci, 1998) que más adelante se explicarán con mayor detalle. Los bdelloideos se dividen en tres familias: Philodina, Philodinavida y Adineta. En las cuales existen 19 géneros y cerca de 400 especies (Donner, 1965). Este taxón es el más amplio y diverso conocido sin reproducción sexual en el reino animal (Bell, 1982).

Muchos de estos organismos habitan en musgos y líquenes con poca agua, o en lagos con poca corriente, la mayoría puede nadar y fijarse a la superficie o al detritus del medio para su alimentación. La mayoría de los bdelloideos no pasan de las 700  $\mu$  de longitud a excepción de *Rotaria neptunia* que llega a medir más de 1 mm (Grinson *et al.*, 2010).

Todos los rotíferos poseen un *rostrum* apical con una estructura retráctil para reptar, una antena dorsal o lateral al parecer unida por fibras al ganglio cerebral, y una boca ventral rodeada de cilios, esta forma la corona y es diferente en las tres familias (Melone y Ricci, 1995). En algunos bdelloideos se pueden observar los ojos como pequeñas manchas rojas, localizadas en la parte dorsal del ganglio cerebral, estos órganos son fotosensibles muy importantes para el nado de los rotíferos aunque este sistema es muy primitivo (Clement, 1980).

En los bdelloideos el mástax tiene una morfología única, llamada "*ramate*", la cual es una estructura simétrica bilateral, con tres partes pareadas: "*manubrio*" que es la parte externa, "*unci*" que son los dientes y los "*ramis*" que conectan toda la estructura. (Fig. 3) (Melone *et al.*, 1998).

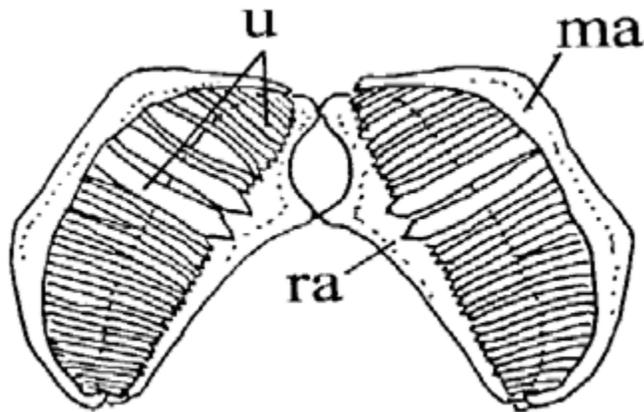


Fig. 3. Morfología única del mástax de los rotíferos bdelloideos, u; unci, ma; manubrio, ra; ramis. (Melone *et al.*, 1998).

En los bdelloideos existen dos características autopomórficas importantes, esto es características presentes únicamente en este taxón (Morrone, 2003), que han sido objeto de diversos trabajos.

Una de estas características es la reproducción asexual, lo que es poco común en los metazoarios y en todo el reino animal (Bell, 1982). Estas observaciones han llevado a pensar a algunos evolucionistas que aquellos organismos que abandonan la reproducción sexual, están destinados a la extinción y evolución limitada (Maynard, 1986) por lo cual diversos estudios han tratado de contestar la pregunta de cómo es que estos organismos adquieren diversidad genética ya que se ha visto que la producción del ovocito se da por división mitótica sin disminución cromosomal (Welch y Meselson, 2011). El registro fósil más antiguo de un bdelloideo es de 35 a 40 millones de años, y no presentaban reproducción sexual por lo que se le ha llamado "organismo ancestral asexual" (Poinar y Ricci, 1992)

Existen algunos trabajos donde queda de manifiesto la existencia de transposones de ADN en mayor cantidad en las regiones subteloméricas que en otros eucariotas (Arkhipova y Meselson, 2005), pero inesperadamente el genoma del bdelloideo *A. vaga* está compuesto de tan solo 3% de retrotransposones, que es el menor porcentaje descrito en los metazoarios secuenciados hasta el momento; en contraste el número de genes en esta especie sobrepasa el promedio de cualquier otro genoma conocido dentro de los metazoarios (Flot *et al* 2013).

La transmisión horizontal masiva de genes ha sido evidenciada en varios rotíferos incluyendo *A. vaga*. Este mecanismo estaba documentado sólo para procariotas y eucariotas unicelulares. La transferencia horizontal de genes es la adquisición de genes de un organismo a otro, que en el transcurso del tiempo son codificados y heredados, siendo este mecanismo una manera importante de adquirir diversidad genética (Meselson et al., 2008). El genoma de *A. vaga* revela que el 8% de este fue adquirido por transferencia horizontal (Flot et al 2013).

La anhidrobiosis es la segunda característica autopomórfica interesante en estos organismos y fue descrita por vez primera en el año de 1702 por el padre de la microbiología Anton Van Leeuwenhoek (Tunnacliffe y Lapinski, 2003). El termino anhidrobiosis fue introducido para describir el estado de animación suspendida al sufrir desecación (Giard, 1894). Se conoce la anhidrobiosis en tres diferentes organismos: en nemátodos, tardígrados y rotíferos. Esta característica es ampliamente estudiada para el desarrollo de misiones espaciales y órganos procesados para trasplantes y vacunas resistentes a desecación de importancia medica (Ricci y Boschetti, 2003. Pereira y Lopes-Cendes, 2009).

## *Adineta vaga*

Es un organismo de 200 a 700  $\mu\text{m}$  de largo, transparente, su *rostrum* es ligeramente ciliado, con bigotes de cilios cortos, en el género *Adineta* no existe corona ciliada retráctil y no puede nadar. Esta especie solo se puede arrastrar por el fondo, carece de *trochi* y tiene un campo ciliado ventral, parecido a un rastrillo ("rake"). La cabeza es ancha, el mástax es muy pequeño y cada *uncus* tiene dos dientes principales. El pie está bien desarrollado con dos espinas laterales. En la Fig.4 se muestra *A. vaga*, bajo microscopia de luz óptica.

Es muy activo y la mayoría de estos organismos viven en los sedimentos de agua y son muy comunes en musgos y líquenes (Ricci y Melone, 2000). Tiene un ciclo de vida de 17 días, el organismo desarrollado dentro del huevo tarda 2 días en eclosionar y son reproductivos durante toda su vida (Ricci, 1983).

Se han encontrado especies crípticas en el género *Adineta* siendo *A.vaga* una de las más globalmente encontrada, este trabajo se basó en análisis de la citocromo oxidasa I (COI) de DNA mitocondrial (Fontaneto et al., 2010). Se refiere como especie críptica a aquellas que son clasificadas como diferentes especies nominales pero son morfológicamente idénticas. Esto es importante en estudios de evolución y filogenia ya que se piensa que la diversificación de nuevas especies puede surgir sin cambios morfológicos (Bickford et al., 2006).

*A. vaga* es un candidato a organismo modelo por sus características y su fácil mantenimiento en laboratorio. Además de ser un candidato para estudiar cambios micro y macroevolutivos (Fussmann, 2011). El estado de anhidrobiosis o estado "tun" en *A.vaga* es difícil de evitar al tomar muestras para fijación y marcaje por lo que se desarrolló una metodología para poder obtener una mejor observación del sistema muscular.



Fig.4 *Adineta vaga* Microscopia óptica 320 μm.

## Sistema muscular en el filo Rotífera

Existen varias investigaciones que describen el sistema muscular en rotíferos. Por ejemplo el de *Asplachnopus multiceps*, un rotífero Monogononta depredador y nadador (Kutikova, 1970), en el que se encontraron cinco músculos circulares a lo largo de su cuerpo, y tres músculos retractores en la parte ventral, dorsal y lateral, en el pie se observó un par de músculos retractores y muchas fibras a través del cuerpo (Kotikova *et al.*, 2004).

Por otra parte, en *Acyclus inquietus* un rotífero que sufre diversos ciclos de metamorfosis, y que en estado adulto pierde la corona y pasa a ser sésil (Leidy, 1882), su sistema muscular consta de músculos circulares y longitudinales en todas las etapas de desarrollo. Cuatro de estos músculos pertenecen a la cabeza y son completos, mientras que los de la región ventral son incompletos. En cuanto a los músculos longitudinales se observaron dos en la región ventrales, cuatro laterales y dos dorsales, y la mayoría se encuentran adyacentes en el pie para su fijación al sustrato (Hochberg *et al.*, 2010).

En *Brachionus urceolaris* se encontraron cuatro músculos circulares completos alrededor de todo el organismo, están descritos tres pares de músculos retractores, uno en la cabeza y dos en el pie. También tres pares longitudinales, uno en la parte dorsal, uno lateral y uno ventral (Santo *et al.*, 2005).

En *Floscularia ringens* un organismo sésil que al igual que *Acyclus inquietus* forma tubos gelatinosos llamados colotecas y forman pequeñas torres en donde muchos organismos sobreviven (Wright, 1950), se encontraron cuatro lóbulos en la parte de la corona, con un grupo de músculos circulares de diferentes tamaños en la corona, con tres pares de músculos longitudinales de la cabeza al pie y sin músculos retractores (Santo *et al.*, 2005).

En *Hexarthra mira* se describieron dos bandas en forma de "C" alrededor de la corona y un musculo circular que se une con la boca, el cuerpo contiene seis apéndices dos en la parte dorso-ventral, dos antero-lateral y dos posterior-lateral. (Santo *et al.*, 2005). La morfología de este organismo es diferente a muchos otros rotíferos, su locomoción se considera nadadora-saltatorio, se piensa que estos apéndices se desarrollaron a partir de sus músculos circulares (Hyman, 1951).

En *Notommata glyphura* se encontró que la región ventral de la cabeza es ciliada, se definieron un par de músculos retractores de la cabeza, tres músculos

circulares en el tronco completos y cuatro pares de músculos longitudinales a través del cuerpo (Santo *et al.*, 2005).

En *Filinia novaezealandiae* otra especie que posee apéndices largos llamados espinas, que le ayudan a su locomoción (Wallace y Snell, 2001), se encontró solo un músculo circular detrás de la corona, y seis pares de músculos retractores; uno dorsal lateral, uno dorsal, uno lateral, uno ventral lateral, uno ventral medial y uno ventral posterior. También tres pares de músculos longitudinales: uno anterior, uno dorsal lateral y uno en el pie del organismo (Hochberg y Gurbuz, 2007).

En *Polyarthra vulgaris*, otra especie cuya locomoción es saltatoria, se encontraron alrededor de doce espinas que le ayudan a escapar de sus depredadores (Allen, 1968). Se observó solo un músculo circular debajo de la corona y seis pares de músculos longitudinales referentes a cada espina del organismo (Hochberg y Gurbuz, 2008).

En *Brachionus manjavacas* no se encontraron músculos retractores, pero se observaron cuatro músculos circulares incompletos alrededor del cuerpo y cinco pares longitudinales de los cuales su distribución fue un par dorsal, dos pares laterales y dos pares ventrales (Leasi *et al.*, 2010).

En *Epiphanes senta* se encontraron nueve músculos circulares por todo el cuerpo todos incompletos en la parte ventral, siete pares longitudinales que se distribuyen de la siguiente forma: tres pares dorsales, un par lateral y tres ventrales (Leasi *et al.*, 2010).

En otra investigación se encontraron en tres diferentes especies del género *Proales* los siguientes músculos. En *Proales daphnicola* cinco pares de músculos retractores comprendidos de la siguiente manera; dos en la cabeza, dos en el pie y uno lateral de la corona. Se encontraron cinco músculos circulares alrededor del organismo ninguno completo y solo un músculo longitudinal. En *Proales fallaciosa* se encontraron seis pares de músculos retractores, cuatro pares de músculos circulares y tres pares de músculos longitudinales. En *Proales reinhardti* se observaron cinco pares de músculos retractores, cuatro músculos circulares incompletos y tres pares de músculos longitudinales en el pie del organismo (Sorensen, 2005).

En *Brachionus quadridentatus* se tiene registrado la presencia de seis pares de músculos retractores de los cuales se separan en dos dorsales, dos laterales y dos ventrales; además de dos músculos circulares incompletos y un par de músculos laterales (Kotikova *et al.*, 2001).

En *Euchlanis dilatata unisetata* se registró que su sistema muscular está compuesto por cinco pares de músculos retractores que se dividen, antero ventral, antero dorsal, posterior ventral, posterior dorsal y lateral. No tiene músculos circulares y cuatro pares de músculos longitudinales de los cuales dos son dorsales y dos ventrales (Kotikova *et al.*, 2001).

En el único trabajo de la clase Seisonacea se tiene registrado el sistema muscular de dos de las tres especies descritas que son ectoparásitos de *Nebalia sp* (Koste, 1975). En *Seison nebaliae* cuatro músculos circulares solo en la parte de la cabeza y trece pares de músculos longitudinales repartidos de la siguiente forma; seis dorsal, cuatro ventral y tres lateral. Mientras que en *Paraseison annulatus* se encontraron ocho músculos circulares y 14 pares longitudinales distribuidos de la siguiente manera; seis dorsales, cuatro ventrales y cuatro laterales (Leasi *et al.*, 2012).

## Sistema muscular en Bdelloideos

El sistema muscular de los rotíferos de clase Bdelloidea está muy poco estudiado, se conocen tres diferentes sistemas musculares en diferentes especies. En una especie de *Philodina sp.* Se encontraron alrededor de 14-16 bandas musculares en el organismo de 1000  $\mu\text{m}$  de largo. Todas las bandas gruesas se observaron incompletas en forma de arcos. Dentro de los músculos interiores se localizaron dos tipos: retractores anteriores en la cabeza y posteriores en la parte del pie (Hochberg y Litvaitis, 2000).

En *Macrotrachela quadricornifera* se realizó un trabajo similar al mencionado anteriormente en *Philodina*, se observaron 13 anillos musculares alrededor de todo el cuerpo, la mayoría incompleta de la parte ventral, solo uno completo alrededor de la cabeza. En los músculos longitudinales, se encontraron 3 arreglos; dorsal, lateral y ventral, además se encontraron músculos en la antena dorsal. Y no se estudió a detalle la musculatura en el mástax.

En este mismo trabajo, realizaron el estudio en *Adineta ricciae*, en donde encontraron que poseía 11 anillos alrededor del cuerpo más gruesos en la parte ventral, ningún anillo es completo. En los músculos longitudinales se encontraron; dorsal lateral y ventral. Se identificaron pequeños músculos en la parte del *rostrum*, importantes en la parte ventral en forma de rastrillo (Leasi y Ricci, 2009).

En el presente trabajo se realizó un análisis detallado del sistema muscular de *A. vaga*. Este estudio podría utilizarse como complemento para identificar a este organismo, ya que por morfología simple no se puede determinar diferencias debido a la presencia de especies crípticas. Adicionalmente, se pretende impulsar a *A. vaga* como organismo modelo en varios campos de investigación, tales como la Biología del desarrollo, la Evolución Molecular y la Genética, siendo este trabajo un primer paso. Y por último se busca desarrollar una metodología útil para el marcaje de *A. vaga* evitando así su estado "tun" para la obtención de muestras que permitan la observación de distintos marcajes histoquímicos o inmunohistoquímicos.

# OBJETIVOS

## Objetivos

### Objetivo general:

- Establecer la distribución del sistema muscular del rotífero *A. vaga*.

### Objetivos particulares:

- Determinar un protocolo para la fijación y tinción de *A. vaga*.
- Identificar el sistema muscular del rotífero *A. vaga*, mediante la aplicación de faloidina-rodamina y su observación por epifluorescencia.
- Comparar el sistema muscular de *A.vaga* con los descritos hasta la fecha en los Rotíferos.
- Evidenciar ventajas y beneficios del cultivo y crecimiento en laboratorio de *A.vaga* para impulsarlo como modelo científico en investigaciones moleculares.

# METODOLOGÍA

## Materiales y Métodos

### Cultivo

*A.vaga* se cultivó en cajas Petri, que contenían agua destilada previamente esterilizada y se alimentó con *E.coli* (cepa M28) cada tercer día. Se mantuvieron a temperatura ambiente (t/a=18-24°C) dentro del laboratorio D-15 del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Para la descripción del sistema muscular se observaron alrededor de 40 individuos por muestra. En total se procesaron 5 muestras, lo que derivó en un total aproximado de 200 individuos. Se eligieron los que presentaban mayor información para la descripción de los 13 músculos que fueron consistentemente marcados por la faloidina-rodamina.

### Preparación de ejemplares para histoquímica

Los organismos se anestesiaron con MgCl<sub>2</sub> al 8% para evitar el estado "tun", y se introdujeron al congelador a -30 °C en el menor tiempo posible para mantenerlos relajados, por 24 h. Al mismo tiempo se le agregó 5 µl de ampicilina para eliminar las bacterias de la muestra.

### Histoquímica

Se utilizó faloidina acoplada al fluoróforo rodamina (λ550/580 nm) el contenido se disolvió en 1.5 ml de metanol para obtener una concentración final de 6.6%. Se colocaron 1.25 ml de la muestra con *A. vaga*. Se centrifugó la muestra a 13,000 rpm por 7 min. Se lavaron las muestras con PBS, y se realizaron tres pasos más de lavado y centrifugación.

Para la fijación se utilizó el método Stephanini (200 µl de formaldehído 2.0%, y 200 µl de ácido pícrico 15% a 0.1M en PBS) (Kotikova *et al.* 2001). La fijación fue realizada a t/a. La muestra previamente fijada se guardó por 24 h, a 4 °C. A continuación se lavaron las muestras con PBS 2 veces para quitar residuos del ácido pícrico. Al terminar los lavados cambiamos algunos detalles del método de fijación y obtuvimos mejores resultados; se le agregó 200 µl de sacarosa 20% dejándolo a 4 °C por 24 h. Al siguiente día se le agregó 200 µl de Tritón X-100 en PBS al 2 % y 200 µl BSA al 2 % (Bovine serum albumin) por 30 min para evitar la

unión inespecífica del marcador. Se volvió a lavar cada una de las muestras en PBS.

Se le agregó Faloidina/Rodamina [1:200] a excepción del control por 20 min, en un cuarto oscuro. Para finalizar se volvieron a lavar las muestras en 4 ocasiones para eliminar el residuo del marcador.

### **Observación**

Las muestras se colocaron en diferentes portaobjetos Thermo Scientific Superfrost plus de 25x75x1 mm para observar con epifluorescencia, fueron montadas en glicerol al 20 % y selladas con esmalte transparente para realizar preparaciones permanentes.

Para la observación se utilizó un Microscopio Olympus ckx41 invertido, con un iluminador vertical de fluorescencia en verde para excitar el fluoróforo.

### **Análisis de las imágenes**

Se utilizó el programa Adobe Photoshop CS6 para manejar los contrastes y brillos de las imágenes, sin modificar el contenido.

# RESULTADOS

## Resultados

### Cultivo y metodología:

*A. vaga* es un rotífero identificado en el laboratorio e inicialmente aislado en la Universidad de Harvard en el laboratorio de M. Meselson (Meselson et al., 2008). El tratamiento para la fijación se realizó con diferentes protocolos, obteniendo mejores resultados con una combinación de estos y detallado en la sección de métodos.

Un paso crítico es evitar el estado "tun" o ingreso en estado de anhidrobiosis del rotífero, por lo que se requiere mantenerlo relajado para poder visualizar el sistema muscular completo. Se obtuvieron mejores resultados al emplear  $MgCl_2$  para la relajación muscular (Fig 6-A; Hochberg, 2009)

El siguiente proceso fue someter a *A. vaga* a diferentes concentraciones de etanol (Wiltz et al., 2009); sin embargo, al marcarlos se observó deformación del organismo (Fig 6-B, C). Para evitar este proceso se agregó  $MgCl_2$  200  $\mu$ l para la relajación muscular e inmediatamente se colocó la muestra a  $-30$  °C, así se obtuvieron organismos estirados, adecuados para el marcaje con las moléculas fluorescentes (Fig 6-D).

Cabe mencionar que no todos los organismos se lograron mantener relajados para el siguiente proceso. En la Fig. 6 se muestran los resultados obtenidos con los diferentes protocolos.

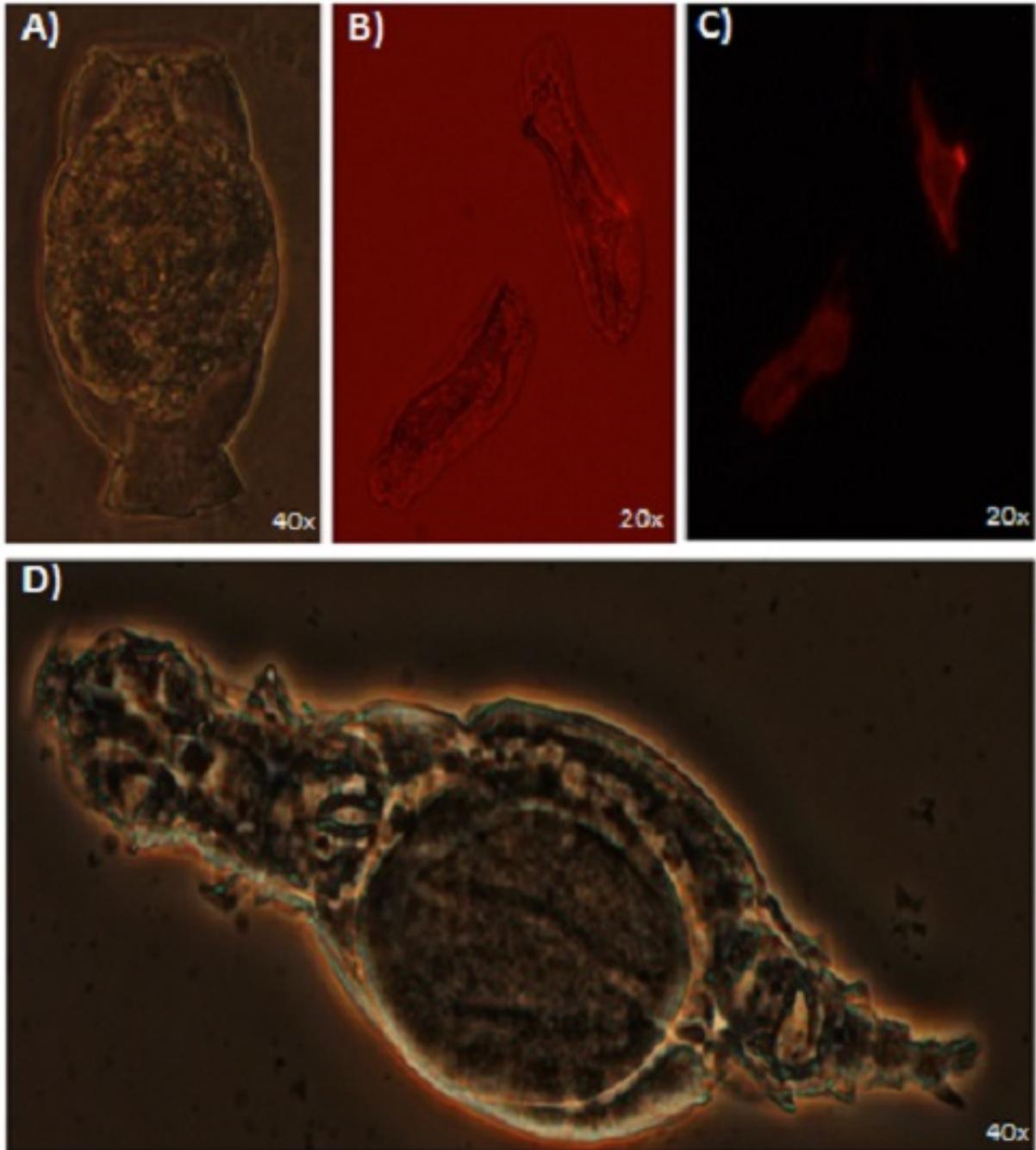


Fig. 6 Proceso de relajamiento de la muestra. **A**, estado "tun" de *A. vega* al agregar  $MgCl_2$ . **B**, deformación de *A. vega* al agregar diferentes concentraciones de etanol, 20X. **C**, Fluorescencia de *A. vega* al terminar el protocolo con etanol, 20X. **D**, *A. vega* al terminar el proceso con  $MgCl_2$  y mantenido a  $-30^{\circ}C$ , 40X.

## Fijación y Tinción

Se realizó primero el protocolo del marcador indicado por la casa comercial Invitrogen. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados ya que hubo una pérdida de especificidad de la faloidina (Fig. 7-A,C). Posteriormente se siguió la metodología Stephanini; sin embargo la emisión del fluoróforo no era suficiente para realizar observaciones detalladas al microscopio, imposibilitando la observación del sistema muscular (Fig. 7-B,D).

Se llevó a cabo un tercer protocolo donde se unieron los dos protocolos anteriores, más BSA y duplicando los últimos lavados de la muestra para evitar la inespecificidad del marcador. Además se cambió el permeabilizante celular, de acetona a Tritón X100 para buscar una mayor entrada del marcador al organismo previamente fijado (Fig. 7E,F).

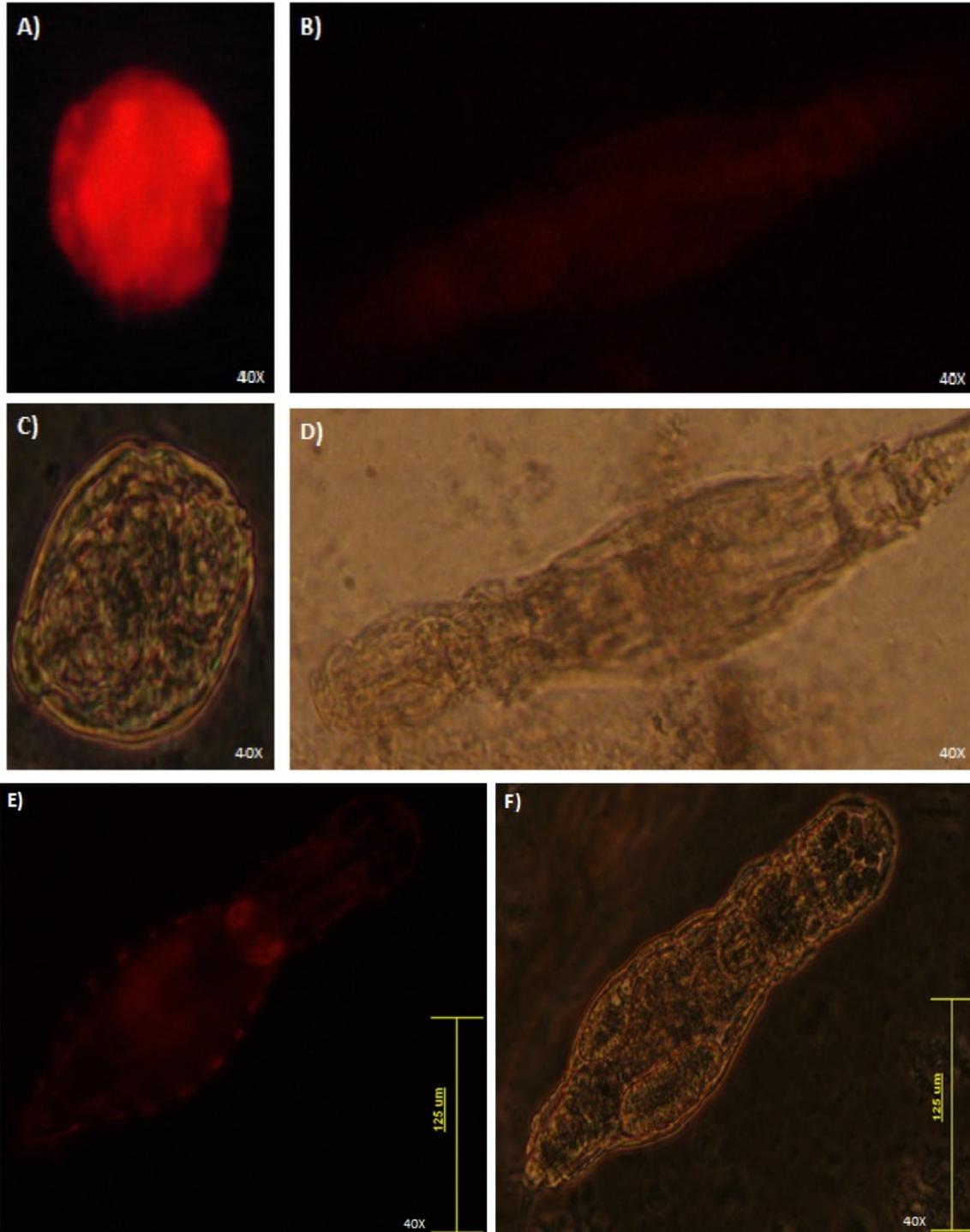


Fig. 7. Imagen de *A.vaga* con los diferentes protocolos usados en este trabajo. **A. C.**, *A.vaga* con inespecificidad del marcaje con rodamina. Epifluorescencia, 40X. **B. D.**, *A. vaga* marcado con el método Stephanini, con poca emisión del fluoróforo, 40X. **E. F.**, *A.vaga* con el protocolo realizado durante el trabajo, se cambió la acetona por el TritónX100 y se realizaron más lavados al final del protocolo, con fluorescencia y epifluorescencia, 40X.

## Descripción del sistema muscular

### Estado "tun"

En estado "tun" *A. vaga* se lograron observar cuatro *mc1-4* alrededor del cuerpo, también se puede observar *ac* en la parte posterior del organismo. Una parte importante que nos permite observar el estado "tun" es el musculo *MR1-2*, que estimula la función de los músculos *mrp1-2* y *mrc1-2*, lo que permite la salida del pie y la cabeza. Como se verá más adelante los músculos circulares en estado "tun" parecen juntarse para lograr este estado. En la Fig. 5 se observa el estado "tun" de *Adineta vaga*.

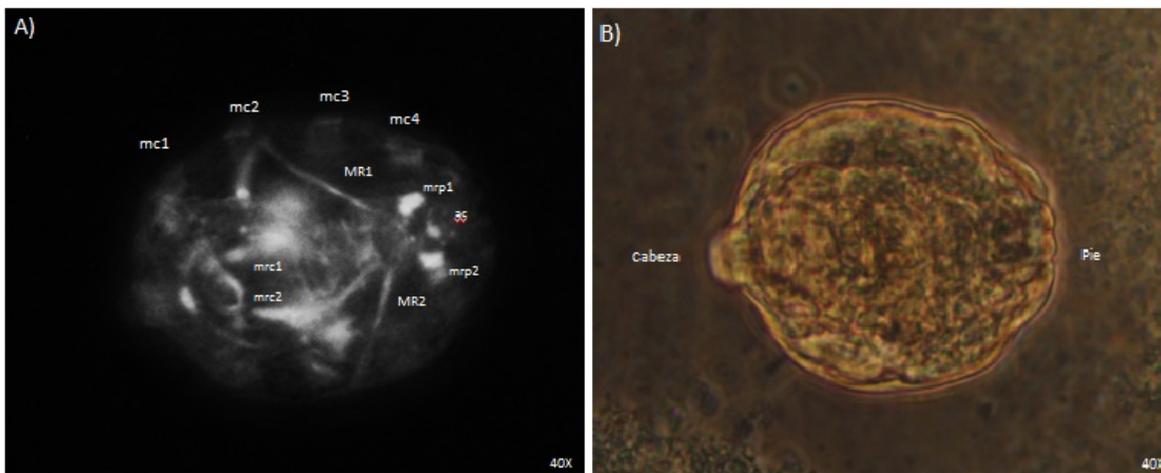


Fig. 8 *Adineta vaga* en estado "tun" **A)** se observa la tinción con faloidina-rodamina. Se pueden observar *mc1-4* alrededor del cuerpo, también se distingue *MR1-2* conectado con *mrp1-2* y *mrc1-2*, también se observa *ac* en la parte posterior. 40x **B)** *Adineta vaga* observado con microscopía óptica. 40x. *mc*; musculo circular, *mrc*; musculo retractor de la cabeza, *MR*; musculo retractor, *mrp*; musculo retractor del pie, *ac*; anillo circular.

## Cabeza

En la cabeza de *A. vaga* se pudieron distinguir diferentes músculos. En la parte apical, en el exterior de la cabeza se encontraron un par de fibras sensoriales llamadas bigotes (*fsb1-2*) (Figura 8). Posterior a los músculos de los bigotes, se encuentra el musculo del rostrum (*mr*), en la parte interior de la cabeza.

Hay dos músculos longitudinales que llegan hasta la cabeza, llamados músculos longitudinales de la cabeza (*m/c1-2*), son músculos largos que terminan en la cabeza y empiezan al finalizar el tronco. También existen dos músculos denominados músculos retractores de la cabeza (*mrc1-2*), su función es el de poder retraer o relajar la cabeza en el estado "tun" (Hochberg y Litvaitis, 2000). Terminan en la parte media de la cabeza he inician en el mástax. (Fig. 9).

Adicionalmente se localizó el músculo más grande de la cabeza, este músculo (*mcz*) rodea completamente la cabeza. Este músculo se puede observar en la parte ventral del organismo (Fig. 9).

Otros músculos que se lograron observar, fueron un par de músculos del "rake" o del rastrillo (*mrk*) en la parte ventral-posterior de la cabeza del organismo, cerca del cuello, estos músculos podrían ser únicos del género *Adineta*, debido a la ausencia de corona retráctil. Tienen un campo ventral ciliado único en los rotíferos conocidos (Fig. 10).

El cuerpo está completamente rodeado de músculos longitudinales o anillos musculares (*mc*). En la cabeza existen cuatro de los cuales ninguno es completo, sin embargo en la cabeza de *A.vaga* se encontró el *mc3* completo de la parte dorsal (Figura 11-C). Esta es una diferencia con *A. riccie* ya que en este rotífero se encontró *mc3-4* son completos dorsalmente y *mc1-2* completos ventralmente (Leasi y Ricci, 2009).

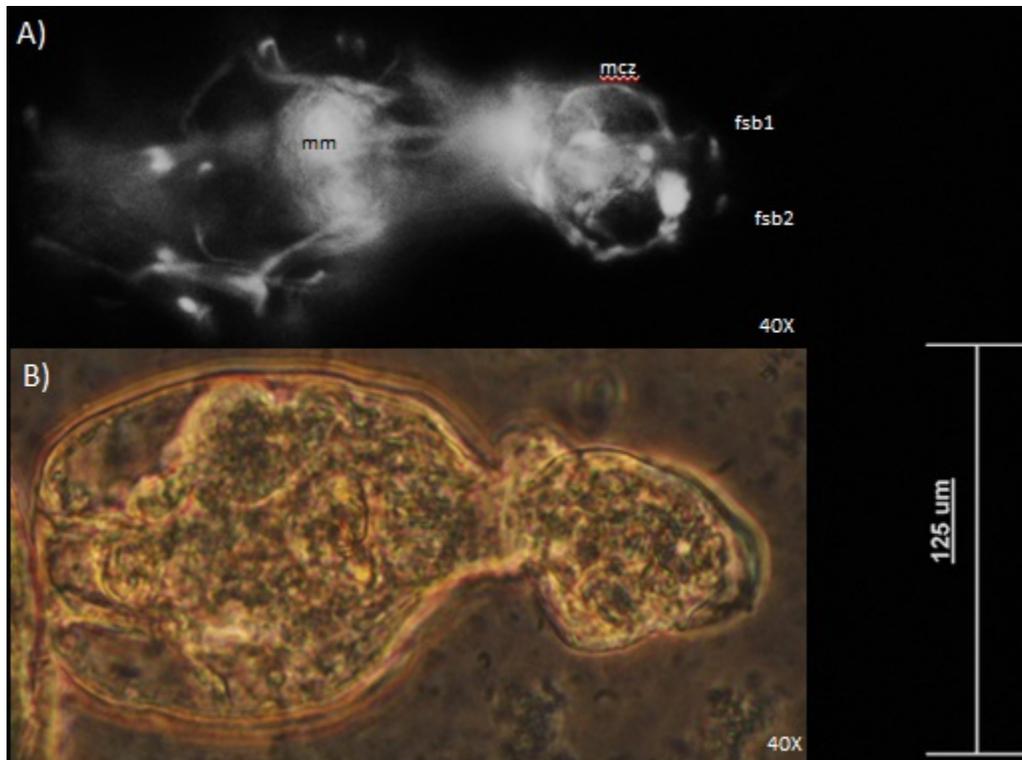


Fig. 8 **A)** Presencia de las fibras sensoriales del bigote, estas le ayudan a *A. vaga* a detectar comida, también se puede observar el músculo de la cabeza y el mástax marcado con *faloidina-rodamina*. **B)** *Adineta vaga* con microscopia óptica. *fsb1-2*; fibras sensoriales del bigote. *mcz*; músculo de la cabeza. *mm*; músculo del mastax.

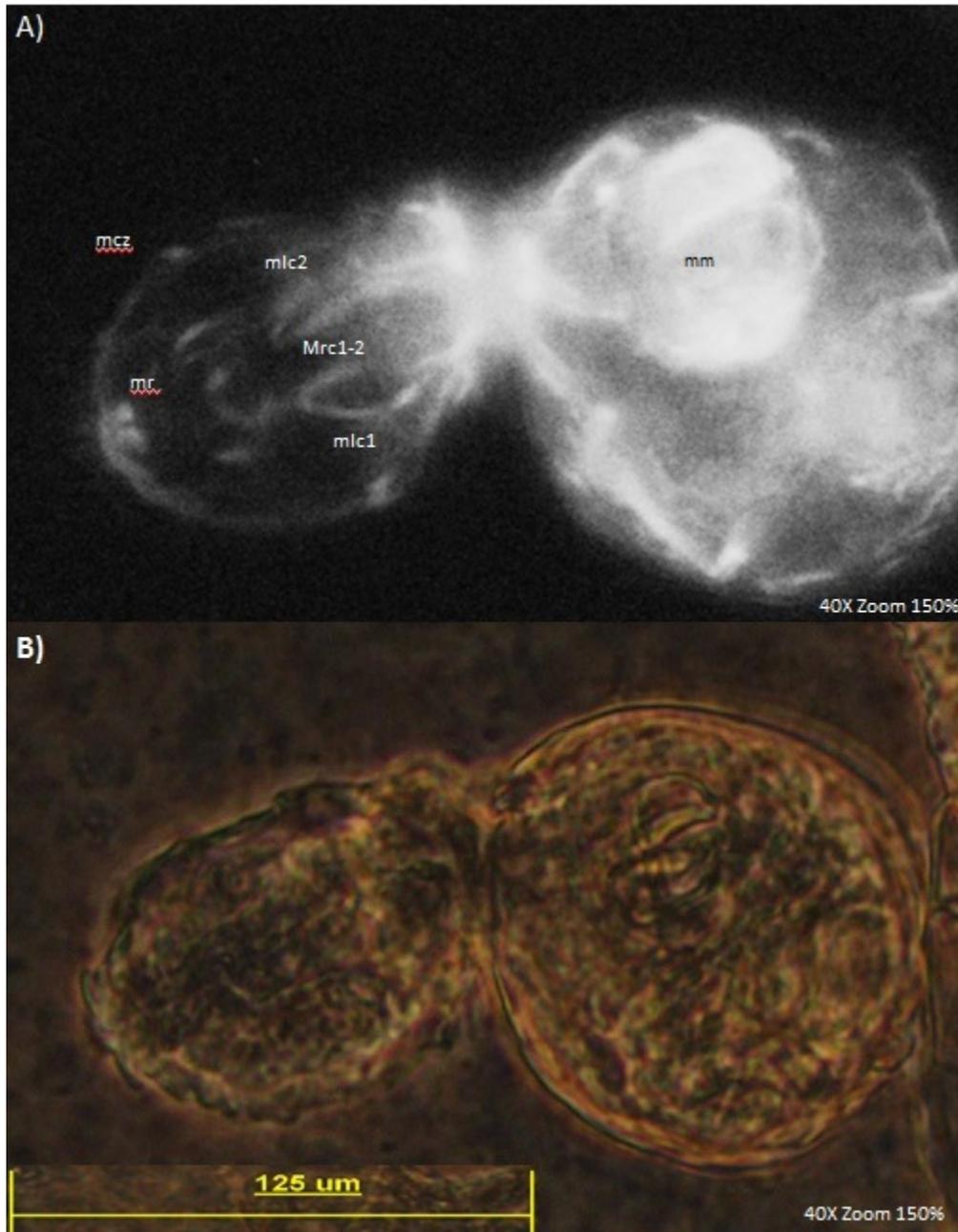


Fig. 9 **A)** Marcaje con faloidina-rodamina y los diferentes músculos de la cabeza. Estos músculos están involucrados en la retracción y relajación de la cabeza. **B)** *A.vaga* con microscopia de luz óptica 40X 150% aumento digital. *mcz*; musculo de la cabeza, *mr*; musculo del rostrum, *mrc1-2*; musculo longitudinal de la cabeza, *mrc1-2*; musculo retractor de la cabeza, *mm*; músculo del mastax.

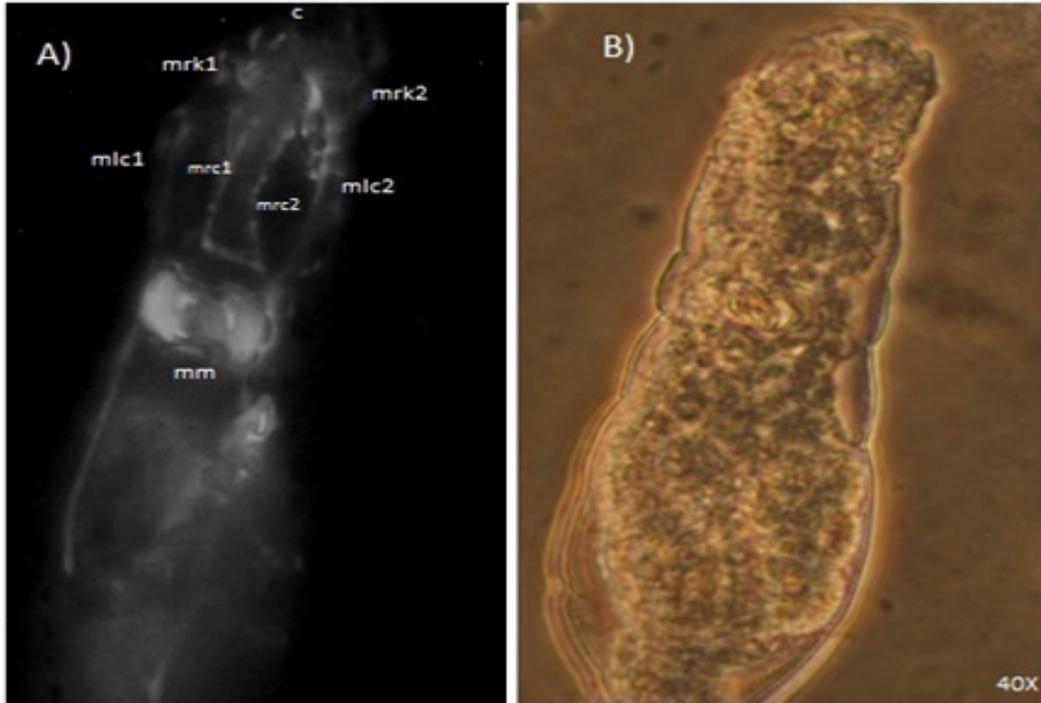


Fig. 10 **A)** *mrk1-2*, la longitud de *mrc1*, y algunos cilios de la parte apical de la cabeza de *A. vaga*. **B)** Mismo espécimen visto con microscopía óptica 40X. *mrk1-2*; Músculos del "rake", *mrc1-2*; músculos retractores de la cabeza, mm; musculo del mastax, c; cilios.

## Tronco

En el tronco el musculo más visible y con mayor actividad es el mástax. Órgano especializado para digerir y degradar el alimento, se pueden ver las dos partes que lo forman (Fig. 11).

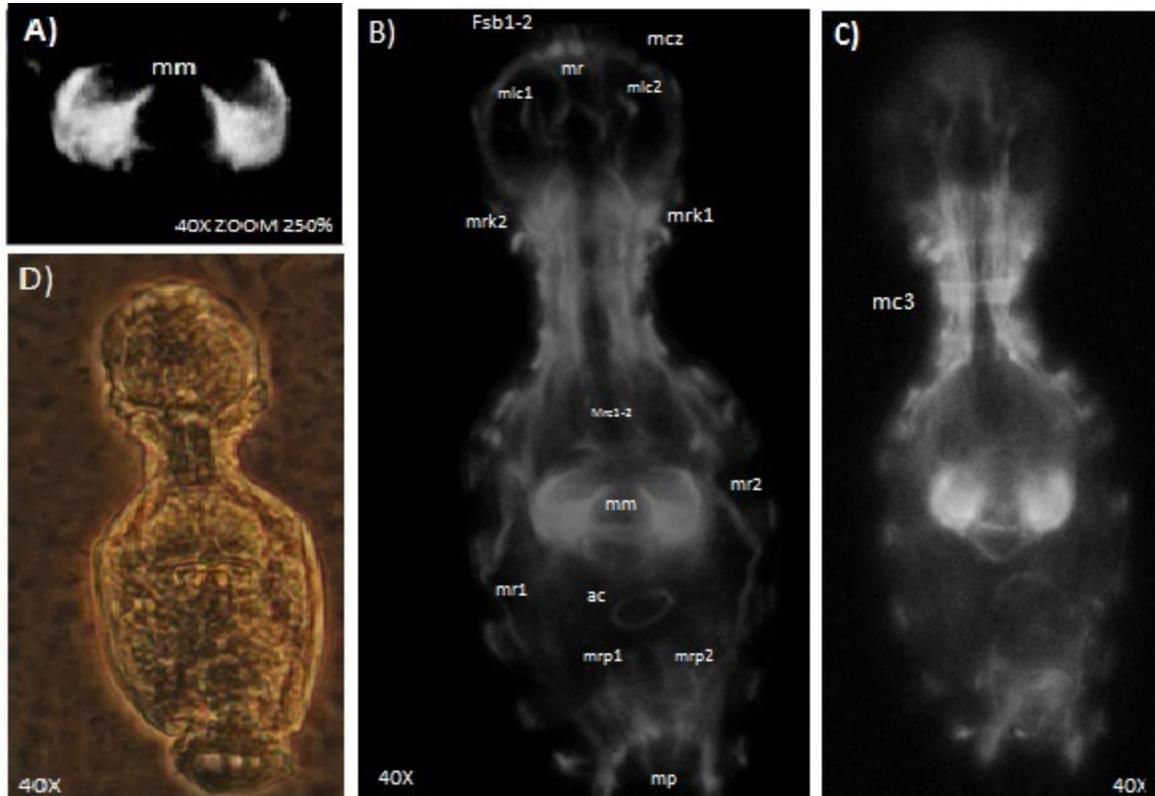


Fig. 11 **A)** Acercamiento de *mm* en *A. vaga*. Se puede observar la forma del par de manubrios y ramis. 40X 250% Zoom digital. **B)** *A. vaga* completo, se puede observar la presencia del *ac*, no descrito en ningún trabajo anterior. **C)** Se muestra *mc3* completo en la parte dorsal de *A. vaga*. **D)** *A. vaga* con luz óptica 40X. *mm*; musculo del mastax, *fsb1-2*; fibras sensoriales del bigote, *mcz*; musculo de la cabeza, *mr*, musculo del rostrum, *mlc1-2*; musculo longitudinal de la cabeza, *mrk1-2*; musculo del rake, *mrc1-2*; musculo retractor de la cabeza, *MR1-2*; musculo retractor, *ac*; anillo de la cloaca, *mrp1-2*; musculo retractor del pie, *mp*; musculo del pie, *mc3*; musculo circular #3.

En el tronco se encontró un músculo *ac* completamente circular y que constituye el músculo de la cloaca (Fig.11-B). En cuanto a los *mc* del cuerpo se pudieron detectar trece (Fig. 12), a diferencia de *A. riccie* donde la descripción encontrada fue de once músculos, y en *Philodina* de 14 a 16, en *A.vaga* ninguno fue completo en la parte ventral (Fig. 13), los *mc* tercero, octavo, noveno y décimo son completos en la parte dorsal (Fig. 14). La función de estos músculos es completamente locomotriz y de contracción, debido a su imposibilidad para nadar, el movimiento en el género *Adineta* se conoce como "reptar", y estos músculos les permiten arrastrarse por la superficie donde el organismo habita.

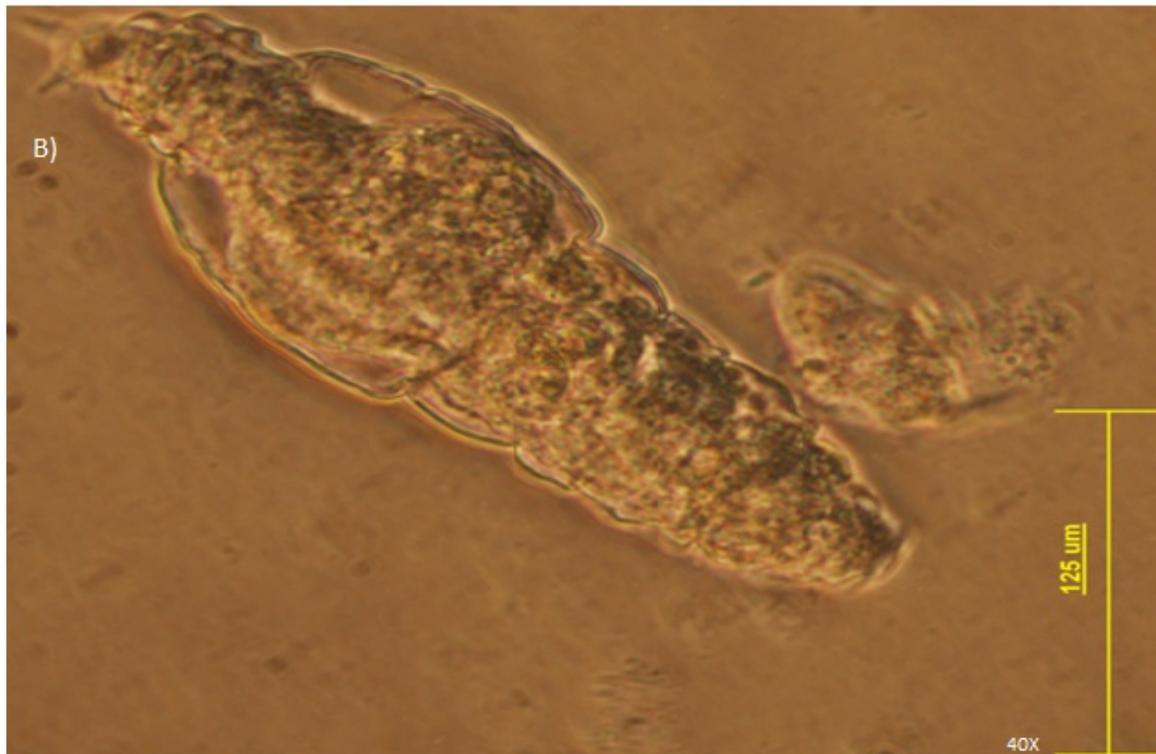
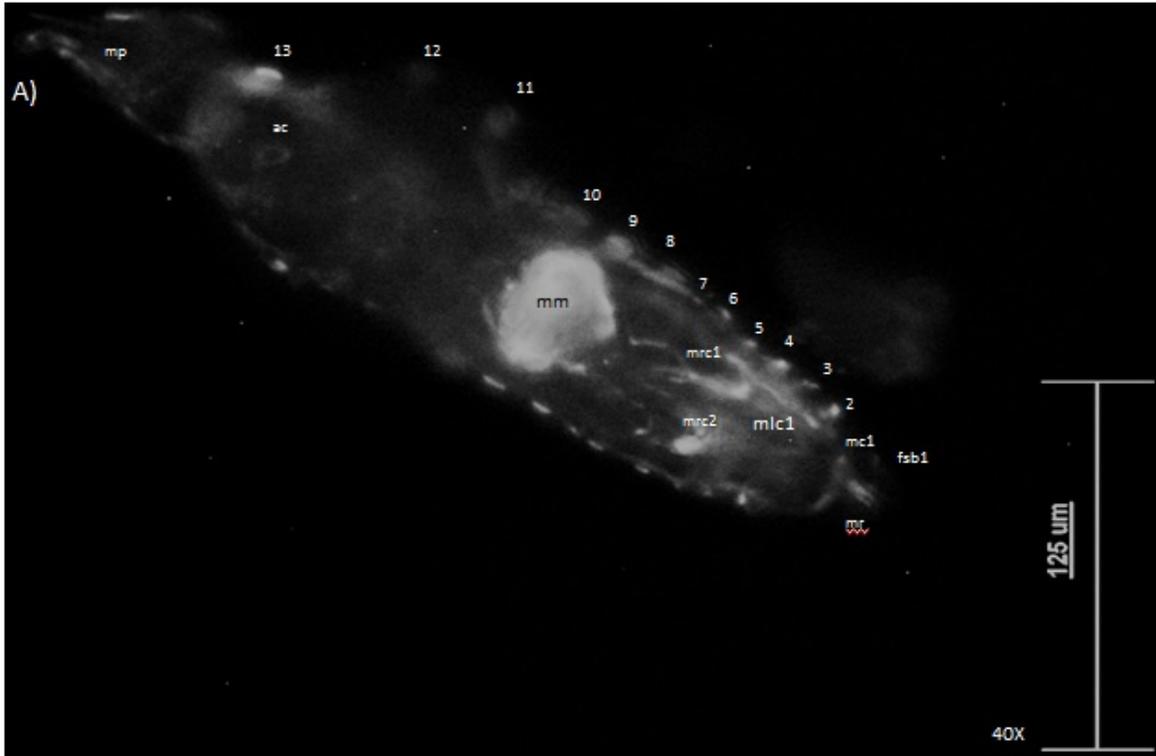


Fig. 12 **A)** Trece *mc*, y el *ac*. **B)** Mismo organismo visto con microscopía óptica 40X. *mc1-13*; musculo circular, *fsb1*; fibra sensorial del bigote, *mr*; musculo del rostrum, *mlc1*; musculo longitudinal de la cabeza, *ac*; anillo de la cloaca, *mm*; musculo del mastax, *mp*; músculos del pie.

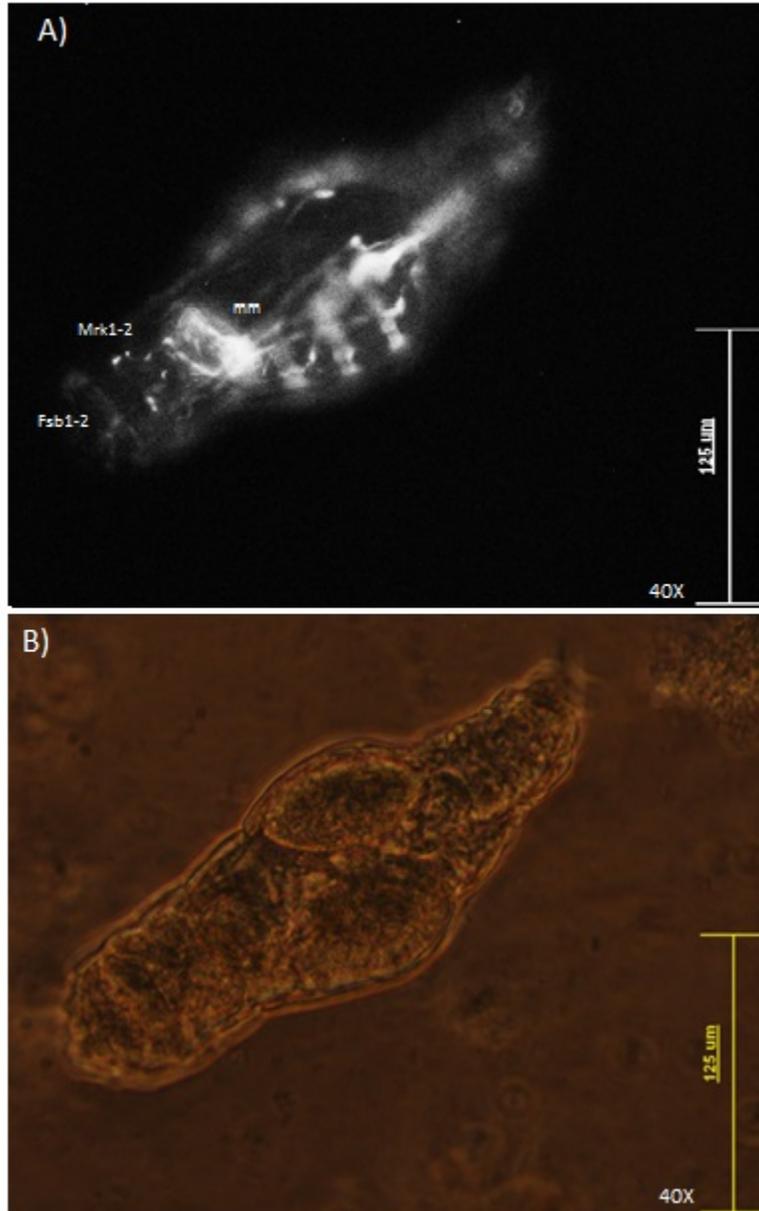


Fig. 13 **A)** *mc*, el cual ninguno es completo ventralmente. **B)** Microscopia de luz, 40X. *fsb1-2*; fibras sensoriales del bigote, *Mrk1-2*; musculo del rake, *mm*; musculo del mastax

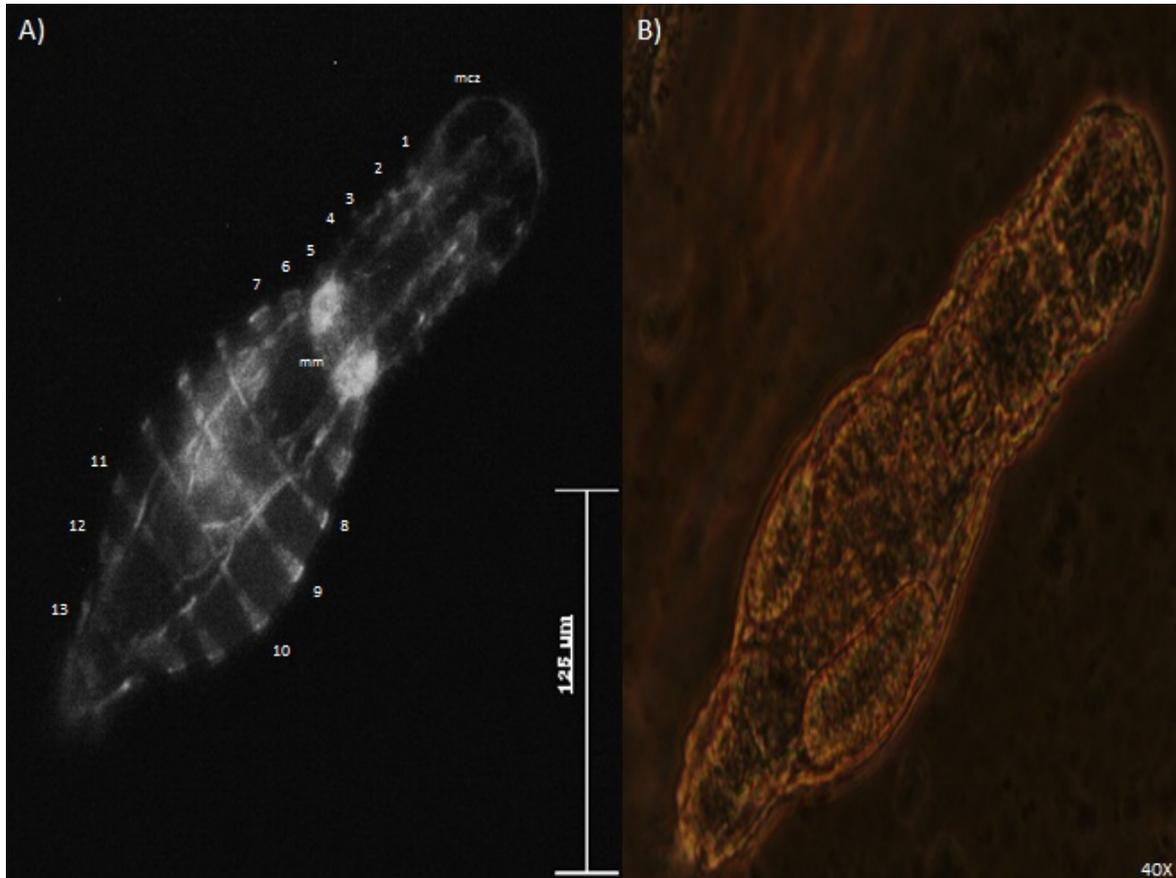


Fig. 14 **A)** Se indican los trece *mc*, dorsalmente completo el octavo, noveno y décimo. **B)** Mismo espécimen observado con microscopia de luz, 40X. *mc1-13*; musculo circular, *mcz*; musculo de la cabeza, *mm*; musculo del mástax.

## Pie

En el pie se encontró el par *MR1-2*, este músculo influye en la retracción tanto del pie como de la cabeza, al retraerse se contrae el pie o la cabeza, y lo contrario al estirarse pasa lo mismo con los músculos conectados que son los *mrc* y al *mrp* (Fig. 11B).

Existen otros músculos *mlp1-2*, estos se extienden longitudinalmente y están en la parte final del tronco. Están implicados en el movimiento del pie por la superficie y están conectados por toda la parte dorsal hasta los *mrc1-2* (Fig. 15).

Los *mrp* son músculos conectados a *MR1-2*, cuya función es la contracción específica del pie, al entrar en estado "tun", son pequeños en comparación con los *mrc*. Los *mp* son músculos implicados en la fijación del organismo al sustrato, al no poder nadar *A.vaga*, puede anclarse y mover su cuerpo 180°, esta parte es la que se esconde dentro del cuerpo en estado "tun", tiene forma de "V" (Fig. 16).

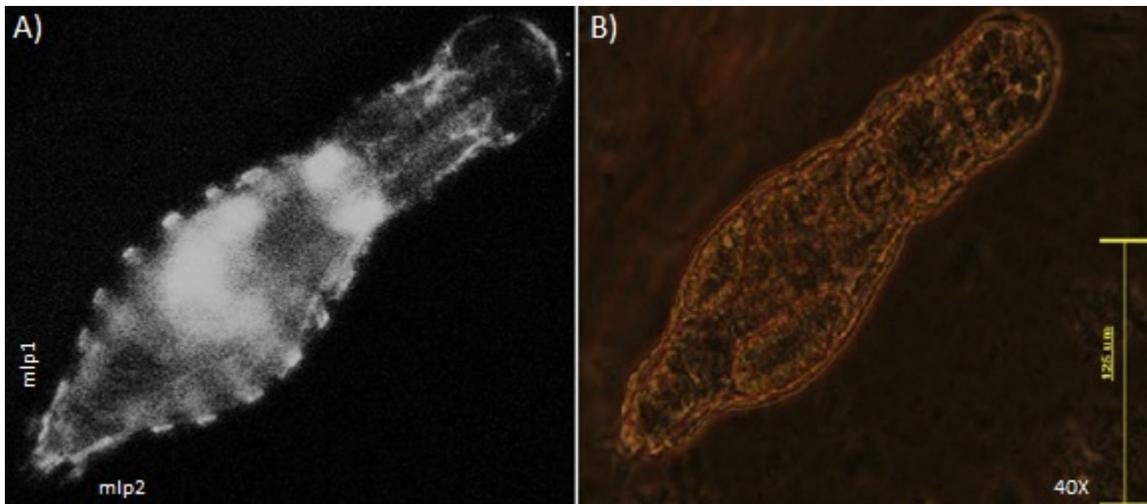


Fig. 15 **A)** Se observa la prolongación del *mlp1-2*. **B)** *A.vaga* con microscopia de luz, 40X. *mlp1-2*; musculo longitudinal del pie.

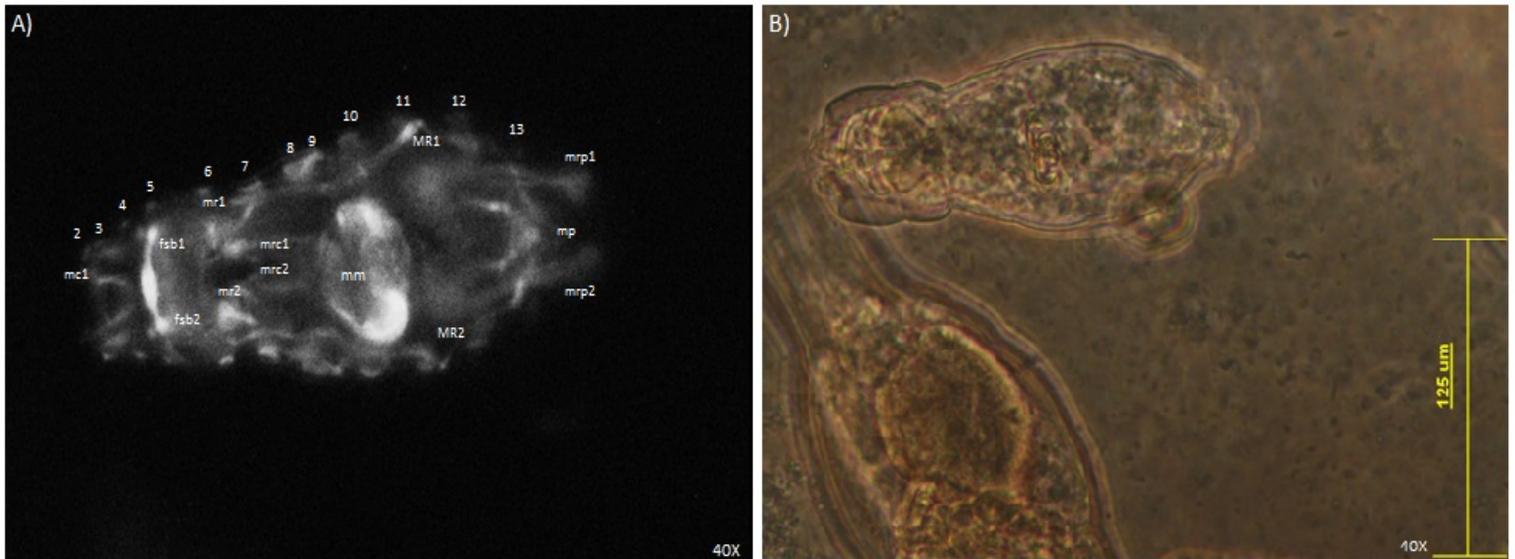


Fig. 16 **A)** Se indican los músculos de *A. vaga*, e incluyen aquellos involucrados en la retracción del pie. También la forma de "V" del *mp*. Los *mmp1-2* se conectan con *MR1-2*. Se observa con mayor emisión, *fsb1-2*. Al mismo tiempo los trece *mc* en *A.vaga*. **B)** *A.vaga* con microscopia de luz, 40X. *mc1-13*; musculo circular, *fsb1-2*; fibras sensoriales del bigote, *mr1-2*; musculo del rake, *mrc1-2*; musculo retractor de la cabeza, *mm*; musculo del mastax, *MR1-2*; musculo retractor, *mmp1-2*; musculo retractor del pie, *mp*; musculo del pie.

Aquí se presenta una comparación con los trabajos ya descritos hasta la fecha:

A diferencia de *A. riccie*, *Macrotrachella quadridentatus* y *Philodina sp* (Hochberg y Litvaitis, 2000. Leasi y Ricci, 2009) en *A. vaga* se encontró un musculo relacionado con la cloaca. Este musculo parece rodear este órgano en forma de anillo en la parte final del tronco. Otra diferencia con *A.riccie* fue la presencia de un músculo en la parte de los bigotes sensoriales (Leasi y Ricci, 2009). La presencia de estos músculos no ha sido registrada en otra especie de rotífero, por lo que se deberá indagar aún más sobre su papel en *A. vaga* y su presencia en diversas especies.

En cuanto al número de músculos circulares que rodean a *A.vaga* es diferente a *A.riccie* con trece y once respectivamente (Leasi y Ricci, 2009). Con *M. quadricornifera* y con *A. inquietus* coincide en número, aunque contrasta con el de *Philodina sp*, el cual tiene dieciséis (Hochberg y Litvaitis, 2000. Leasi y Ricci, 2009. Hochberg *et al.*, 2010). Todos los músculos circulares de *A.vaga* son incompletos en la parte ventral y en la cabeza solo el tercero es completo dorsalmente, mientras que en el tronco el octavo, noveno y décimo son dorsalmente completos.

Se encontraron dos músculos retractores en *A.vaga*, por lo que tiene el menor número en todo el filo Rotifera, excepto *Philodina sp* que también tiene dos (Hochberg y Litvaitis, 2000) y solo por arriba de aquellos que no tiene la capacidad de retraerse (*Acyclus inquietus*, *Floscularia ringens*, *Hexartra mira*, *Polyarthra vulgaris*, *Brachionus manjavacas*, *Epiphanes senta*, *Seison nebaliae* y *Paraseison annulatus*). (Hochberg *et al.*, 2010. Santo *et al.*, 2005. Hochberg y Gurbuz, 2008. Leasi *et al.*, 2010. Leasi *et al.*, 2012).

Existen semejanzas con *A. riccie* en la presencia de músculos del rostrum y del *rake* (Leasi y Ricci, 2009).

Los músculos longitudinales de *A.vaga* son solo dos, aunque es difícil caracterizar bien la posición por medio de microscopia de epifluorescencia. En contraste, con microscopia confocal, se podría determinar si *A.vaga* comparte el número de músculos con *A.riccie*, *A. inquietus* y *Philodina sp* (Leasi y Ricci, 2009. Hochberg *et al.*, 2010. Hochberg y Litvaitis, 2000). Otros rotíferos cuya morfología es diferente tienen una variación que va desde ausentes en *Asplachnopus multiceps* y catorce pares en *Paraseison annulatus* (Kotikova *et al.*, 2004. Leasi *et al.*, 2012).

En la tabla1. Se indican las diferencias y semejanzas del sistema muscular de varias especies del filo Rotífera.

Especies	Musculo (s) de la corona	Músculos retractores*	músculos circulares	músculos longitudinales*	Referencia
Clase Bdelloidea					
<i>Adineta vaga</i>	0	2	13	2	Este trabajo
<i>Adianta Ricci</i>	0	-	11	2	(Leasi y Ricci, 2009)
<i>Macrotrachella quadricornifera</i>	6	-	13	3	(Leasi y Ricci, 2009)
<i>Philodina sp.</i>	3	2	14 a 16	2	(Hochberg y Litvaitis, 2000)
Clase Monogononta					
<i>Acyclus inquietus</i>	0	0	12 a 13	2	(Hochberg et al., 2010)
<i>Asplachnopus multiceps</i>	2	3	5	0	(Kotikova et al., 2004)
<i>Brachionus manjavacas</i>	10	0	4	5	(Leasi et al., 2010)
<i>Brachionus quadridentatus</i>	4	6	2	1	(Kotikova et al., 2001)
<i>Brachionus urceolaris</i>	3	3	4	3	(Santo et al., 2005)
<i>Epiphanes senta</i>	2	0	9	7	(Leasi et al., 2010)

<i>Euchlanis dilatata unisetata</i>	6	5	0	4	(Kotikova et al., 2001)
<i>Filinia novaezealandiae</i>	2	6	1	3	(Hochberg y Gurbuz, 2007)
<i>Floscularia ringens</i>	4	0	1	3	(Santo et al., 2005)
<i>Hexartra mira</i>	2	0	0	1	(Santo et al., 2005)
<i>Notommata glyphura</i>	1	1	3	4	(Santo et al., 2005)
<i>Polyarthra vulgaris</i>	12	0	1	6	(Hochberg y Gurbuz, 2008)
<i>Proales daphnicola</i>	2	5	5	1	(Sorensen, 2005)
<i>Proales fallaciosa</i>	2	6	4	3	(Sorensen, 2005)
<i>Proales reinhardti</i>	4	5	4	3	(Sorensen, 2005)
Clase Seasonidea					
<i>Paraseison annulatus</i>	0	0	8	14	(Leasi et al., 2012)
<i>Seison nebaliae</i>	1	0	4	13	(Leasi et al., 2012)

Tabla 1. Presenta los trabajos realizados de sistema muscular en Rotíferos. Una comparación de los cuatro músculos abundantes en estos organismos, musculo (s) corona, músculos retractores, músculos circulares y músculos longitudinales. \* en pares, - no tiene el nombre de músculos retractores.

# Discusión

## Discusión

En este trabajo se describen varias características del sistema muscular del rotífero *A. vaga*, que lograrán ser utilizadas en futuros trabajos que podrían abordar el estudio de las uniones neuromusculares de estos organismos, la observación del desarrollo y diferenciación muscular y la definición de los elementos moleculares involucrados en estos procesos (Neves et al., 2009). Incluso las observaciones realizadas pueden utilizarse como punto de comparación complementando la información con diversas especies del filo Rotífera en análisis taxonómicos y filogenéticos (Leasi et al., 2010).

Asumimos que existen diferencias entre sistemas musculares debido a la gran variedad de hábitats y hábitos que el filo Rotífera presenta, así como la gran diversificación críptica encontrada en *A. vaga*, quizá podríamos aportar información para determinar y distinguir especies con base a su sistema muscular esto complementando información molecular, morfológica y ecológica. Aunque esta suposición merecería trabajos futuros más especializados que relacionen el sistema muscular con los aspectos ecológicos de los Rotíferos. La poca información taxonómica y anatómica existente en la clase Bdelloidea hace que esta información sea una primera fase para futuras conclusiones en base al sistema muscular de los Bdelloideos.

El protocolo utilizado en el trabajo tuvo que ser adaptado debido a las características específicas de la especie, ya que los protocolos en la literatura encontrada no fueron efectivos y/o eficientes. Será necesaria la implementación de metodologías alternas para obtener resultados más concisos e informativos.

Con la información generada en este trabajo y apoyado con la reciente publicación de la secuencia genómica de *A. vaga* (Flot et al 2013), se sugiere que esta especie podrá servir de modelo para futuras investigaciones, tanto de Biología básica, tales y como la definición de su sistema muscular y nervioso, su Evolución, los elementos que permiten la transferencia horizontal de genes y su Ecología; así como en ciencia aplicada, basados en las características de anhidrobiosis, resistencia a la radiación ionizante y los múltiples genes que permitirían innovaciones biotecnológicas, tales como las peculiares retrotranscriptasas y canales iónicos que presenta su genoma.

# CONCLUSIONES

## Conclusión

La presente contribución constituye el primer reporte de anatomía del rotífero *A. vaga*, usando faloidina marcada con rodamina y empleando microscopía de epifluorescencia.

El sistema muscular de *A. vaga* se caracterizó por tener trece músculos circulares ninguno de ellos completo en la parte ventral y solo cuatro completos en la parte dorsal del organismo.

Se detectó la presencia de músculos rodeando órganos sensoriales, tal y como los bigotes en la parte apical. Al mismo tiempo se determinó la presencia de un anillo muscular en el tronco que aparenta funcionar como musculo de la cloaca. También se pudo observar la existencia, ya descrita en *A. riccie*, de músculos del *rostrum* y del *rake*.

El presente estudio desarrolló una metodología para la tinción histoquímica en *A. vaga* para evitar así su estado "tun", y lograr una mejor visualización del sistema muscular.

También se logró aporta información complementaria sobre las diferencias entre especies crípticas como los son *A. vaga* y *A. riccie*. Este trabajo ayudara al mismo tiempo como referencia para la introducción de análisis filogenéticos en base en sistema muscular de rotíferos.

## Abreviaturas

Abreviatura	Nombre músculos
<b>ac</b>	anillo de la cloaca
<b>c</b>	cilios
<b>fsb</b>	fibras sensoriales del bigote
<b>mc</b>	músculo circular
<b>mcz</b>	músculo de la cabeza
<b>mlc</b>	músculo longitudinal de la cabeza
<b>mlp</b>	músculo longitudinal del pie
<b>mm</b>	músculo del mástax
<b>mp</b>	músculo del pie
<b>MR</b>	músculo retractor
<b>mr</b>	músculo del rostrum
<b>mrc</b>	músculo retractor de la cabeza
<b>mrk</b>	músculo del rake
<b>mrp</b>	músculo retractor del pie

Tabla. 2 Abreviaturas utilizadas en la descripción del sistema muscular de *A.vaga*.

# Bibliografía

## BIBLIOGRAFIA

Ajah P. O. 2008. Growth Characteristics of the Monogonont Rotifer *Asplanchna priodonta* (Gosse 1850) on Three Algae Species. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 8: 275-282.

Arora H. C. 1964. Rotifera as Indicators of Trophic Nature of Environments. CIPHERI Bull. 3; 4 : 24.

Arkhipova I. R. and Meselson M. 2005. "Diverse DNA transposons in rotifers of the class Bdelloidea". PNA vol.102, no.33, 11781-11786.

Bell G., 1982. *The Masterpiece of Nature: The Evolution and Genetics of Sexuality* Univ. of California Press, Berkeley, CA.

Bickford D., Lohman D., Sodhi N., Ng., P.K.L., Meier R., Winker K., Ingram K., Das I. 2006. "Cryptic species as a window on diversity and conservacion". TRENDS in Ecology and Evolution. Vol. 22, No. 3.

Casé M, Leça E.E, Leitão S.N, Sant Anna E.E, Schwamborn R, De Moraes Junior A.T. 2008. "Plankton community as an indicator of water quality in tropical shrimp culture ponds". Marine Pollution Bulletin Volume 56, Issue 7, Pages 1343–1352

Clement P., 1980. "Phylogenetic relationships of rotifers, as derived from photoreceptor morphology and other ultrastructural analyses", Hydrobiology 73, 93-117.

Donner, J., 1965. Ordnung Bdelloidea. Bestimmungsbücher zur Bodenfauna Europas. 6. 297 pp.

Flot Jean-Francois et al., 2013. "Genomic evidence for ameiotic evolution in the bdelloid rotifer *Adineta vaga*". Nature 12326.

Fontaneto D. and Melone G., 2005. Do rotifer jaws grow after hatching? Hydrobiology 546:213–221.

Fontaneto D., Iakovenko N., Eyres I., Kaya M., Wyman M., Barraclough T. G., 2011. Cryptic diversity in the genus *Adineta* Hudson & Gosse, 1886 (Rotifera: Bdelloidea: Adinetidae): a DNA taxonomy Approach. *Hydrobiology* 662:27–33

Fussmann G.F. 2011. "Rotifers: Excellent subjects for the study of macro- and microevolutionary change". *Hydrobiology* 662: 11-18.

Giard, A. 1894 L'anhydrobiose ou ralentissement des phenomenes vitaux. *C. R. Soc. Biol. Paris* 46, 497–500.

Gilbert, J. J., 1983. Rotifera. In Adiyodi K. G. & R. G. Adiyodi, Reproductive biology of invertebrates. Vol. I: oogenesis, oviposition and oosorption. Wiley & Sons: 181–209.

Grinson G., Sreeraj C.R. and Dam R. S., 2011. "Brachionnid rotifer diversity in Andaman waters. *Indian journal of Geo-Marine Sciencies*. Vol 40(3), pp 454-459.

Hochberg R., 2009. Three-Dimensional Reconstruction and Neural Map of the Serotonergic Brain of *Asplanchna brightwellii* (Rotifera, Monogononta). *Journal of morphology* 270:430–441.

Hochberg R., and Litvaitis M. K., 2000. Functional morphology of the muscles in *Philodina* sp. (Rotifera: Bdelloidea). *Hydrobiologia* 432: 57-64.

Hochberg R., Gurbuz O. A., 2007. Functional morphology of somatic muscles and anterolateral setae in *Filinia novaezealandiae* Shiel and Sanoamuang, 1993 (Rotifera). *Zoologischer Anzeiger* 246. 11–22.

Hochberg R., Gurbuz O. A., 2008. Comparative morphology of the somatic musculature in species of *Hexarthra* and *Polyarthra* (Rotifera, Monogononta): Its function in appendage movement and escape behavior. *Zoologischer Anzeiger* 247. 233–248.

Hochberg R., O'Brien S., and Puleo A., 2010. Behavior, metamorphosis, and muscular organization of the predatory rotifer *Acyclus inquietus* (Rotifera, Monogononta). *Invertebrate Biology* vol. 129, no. 3.

Hyman L. H., 1951. The Invertebrates Acanthocephala, Aschelminthes and Entoprocta. Volume III. McGraw-Hill, Inc. New York, 572 pp.

Koste W., 1975. Das Rädertier-Porträt. *Seison annulatus*, ein Ektoparasit des marinen Krebses *Nebalia*. *Mikrokosmos* 64:341–347.

Kotikova E. A., Raikova O. I., Reuter M., Gustafsson M.K.S, and Flyatchinskaya L. P., 2001. Rotifer muscles as revealed by phalloidin-TRITC staining and confocal scanning laser microscopy. *Acta Zoológica (Stockholm)* 82: 1–9.

Kotikova E.A., Raikova O.I., Reuter M., Gustafsson M.K.S., 2004. Musculature of an illoricate predatory rotifer *Asplanchnopus multiceps* as revealed by phalloidin fluorescence and confocal microscopy. *Tissue & Cell* 36. 189–195.

Kutikova, L.A., 1970. Rotifers of the USSR. Nauka, Leningrad, pp. 1–774.

Leasi F. and Ricci. C. 2010. Musculature of two bdelloid rotifers, *Adineta ricciae* and *Macrotrachela quadricornifera*: organization in a functional and evolutionary perspective. *J Zool Syst Evol Res.* 48(1), 33–39.

Leasi F., Fontaneto D., Melone G., 2010. Phylogenetic constraints in the muscular system of rotifer males: investigation on the musculature of males versus females of *Brachionus manjavacas* and *Epiphanes senta* (Rotifera, Monogononta). *Journal of Zoology* 282. 109–119.

Leasi F., Neves R. C., Worsaae K., Sorensen M. V., 2012. Musculature of *Seison nebaliae* Grube, 1861 and *Paraseison annulatus* (Claus, 1876) revealed with CLSM: a comparative study of the gnathiferan key taxon Seisonacea (Rotifera). *Zoomorphology* 131:185–195.

Leidy J., 1882. Rotifera without rotary organs (*Acyclus*). *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* 34: 243–250.

May L. 1989. Epizoic and parasitic rotifers. *Hydrobiologia* 186/187: 59-67.

Maynard S.J., 1986: Contemplating life without sex. *Nature.*, 324:300-30.

Melone, G. & C. Ricci, 1995. Rotatory apparatus in Bdelloids. *Hydrobiologia* 313/314: 91–98.

Melone, G., Ricci C. and Segers H. 1998. The trophi of Bdelloidea (Rotifera): a comparative study across the class. *Can. J. Zool.* 76: 1755–1765.

Meselson M., Gladyshev E.A., Arkhipova I. R., 2008 Massive Horizontal Gene Transfer in Bdelloid Rotifers. *Science.* Vol. 320 1210-1213.

Morrone J.J. 2003. El lenguaje de la cladística. Facultad de ciencias. Universidad Autónoma de México Pág. 19.

Neves, R.C., Kristensen, R.M., Wanninger, A. 2009. Three-Dimensional reconstruction of the musculature of various life cycles stages of the *Cycliophoran Symbion americanus*. *J.Morphol.* 270, 257- 270.

Pereira T.C., Lopes-Cendes I. 2009. Cryptic anhydrobiotic potential in man: implications in medicine. *Med Hypotheses.* Oct;73(4):506-7

Poinar Jr. G.O., Ricci C. 1992. Bdelloid rotifers in Dominican amber: Evidence for parthenogenetic continuity. *Experientia* volume 48. pp 408-410.

Remane A. 1929. Rotatoria. In: *Klassen und Ordnung des Tierreichs*, Vol. 4, Sect II. Book 1, Part 3. Bronn HG, ed., Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, Alemania. 596 pp.

Ricci C, 1983. Life histories of some species of Rotifera Bdelloidea. *Hydrobiologia* 104, 175-180.

Ricci C, Boschetti C. 2003 Bdelloid rotifers as model system to study developmental biology in space. *Adv Space Biol Med.* 2003;9:25-39.

Ricci C, and Melone G. 2000. Key to the identification of the genera of bdelloid rotifers. *Hydrobiologia* 418: 73–80.

Robeson M.S, King J. A., Freeman R.K., Birky, Jr. W.C., Martin P.A. and Schmidt K.S., 2011. "Soil rotifer communities are extremely diverse globally but spatially autocorrelated locally". *PNAS Microbiology.* Vol. 108 no. 11, 4406-4410.

Santo N., Fontaneto D., Fascio U., Melone G., Caprioli M., 2005. External morphology and muscle arrangement of *Brachionus urceolaris*, *Floscularia ringens*, *Hexarthra mira* and *Notommata glyphura* (Rotifera, Monogononta). *Hidrobiología* 546:223–229.

Srivastava A., Kristin H., Joachim S., Andreas N., 2012. A study on enrichment of the rotifer *Brachionus* "Cayman" with iodine from different sources. *Aquaculture* 334–337. 82–88.

Sorensen, M.V., 2002. On the evolution and morphology of the rotiferan trophi, with a cladistic analysis of Rotifera. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 40, 129–154.

Sorensen, M. V., 2005. Musculature in three species of Proales (Monogononta, Rotifera) stained with phalloidin-labeled fluorescent dye. *Zoomorphology* 124: 47–55.

Tunnacliffe A. and Lapinski J. 2003. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358, 1755–1771

Waggoner B. M. and Poinar Jr.G.O. , *Experientia* 49, 354 (1993).

Wallace, R.L., Snell, T.W., 2001. Phylum Rotifera. In: Thorp, J.H., Covich, A.P. (Eds.), *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*, second ed. Academic Press, New York, pp. 195–254.

Willem H. de Smet, 1998. Preparation of rotifer trophi for light and scanning electron microscopy. *Hydrobiologia* 387/388: 117–121, 1998

Wilts F. E., Arbizu P.M. and Wilko H.A., 2010. Description of *Bryceella perpusilla* n. sp. (Monogononta: Proalidae), a New Rotifer Species from Terrestrial Mosses, with Notes on the Ground Plan of *Bryceella* (Remane, 1929).

Wright, H. G. S., 1950. A contribution to the study of *Floscularia ringens*. *Journal of the Queckett Microscopical Club Series* 4, 3: 103–116.