



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Caracterización de las Colinesterasas en el músculo de la langosta
espinosa del Caribe (*Panulirus argus*) y el efecto de la temperatura en su
actividad

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

P R E S E N T A:

VIRIDIANA GÓMEZ VÁZQUEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ FUENTES

2015

México, D.F.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



El presente trabajo fue desarrollado en las instalaciones de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación en Sisal, Yucatán de la Facultad de Ciencias de la UNAM en el marco del proyecto PAPIIT IN2115113 Y CONACYT CB-131815, gracias por la beca para la realización de esta tesis.



*“El mar una vez que te hechiza,
te engancha en su maravillosa red por toda la eternidad”*

Jacques Yves Cousteau



Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de esta gran institución.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por abrirme las puertas en esta maravillosa carrera.

A la Unidad Académica Sisal por permitirme realizar esta gran aventura llamada tesis.

A la Dra. Gabriela Rodríguez por su enseñanza, paciencia, apoyo y tiempo. Por adoptarme, muchas gracias por compartir conmigo sus conocimientos para realizar este trabajo.

A la Dra. Cristina Pascual **por aceptarme y dejarme ser parte del "Equipo langosta"** por sus consejos, conocimientos y ser para nosotras como un gran apoyo durante nuestra estancia en Sisal.

Al Dr. Carlos Rosas por enseñarme a querer a los pulpos gracias por transmitirme todos sus conocimientos y ayudarme siempre en todo lo que necesitaba y por dejarme ser parte de esa gran familia.

A la M. en C. Karla Escalante por enseñarme todo lo que se de laboratorio apoyarme y tenerme mucha paciencia de verdad gracias Karlita.

Al Dr. José Luis Gómez Márquez por sus comentarios, por aceptar ser mi tutor interno. Gracias por su enseñanza y tiempo.

A los sinodales Cristóbal Galindo, Angélica González Schaff, Armando Cervantes por su apoyo y comentarios para la realización final de esta tesis.

Al equipo langosta Miri y Nataly por su apoyo por las desveladas y todo lo que pasamos para que las langostas estuvieran bien y poder realizar nuestro proyecto.

Al Club pulpito: Lupita, Clau, Kati, Sol, Fany, Estefy, Fer, Doña Silvia, Don Antonio porque siempre nos apoyamos en todo, gracias por todos los momentos que compartimos en esas largas horas mientras estábamos en experimento.

A los chicos Sisal: Dan, Dan Pastrana, Chuy, Ara, Johny, Ru, Hugo y Lety gracias por ser mi familia Sisaleña.



Dedicatoria:

A mis padres por todo su apoyo a lo largo de este camino por fin lo logre. Gracias por que sin ustedes no hubiera podido lograr este sueño.

A Kika y a Lili hermanas gracias por todo por estar ahí conmigo siempre las quiero mucho.

A mis niños Erikin, Renata y Naty porque son mi motor para seguir adelante los amo.

A Sergio por todo su apoyo siempre en todo lo que he necesitado.

A mis amigos que han estado en los momentos más especiales: Sonia, Cesar, Johanny, Nadis, Lupis y Miris.



ÍNDICE

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
Descripción de la especie.....	9
Ciclo de vida.....	10
Importancia pesquera.....	12
Colinesterasas: Clasificación, distribución y función.....	13
Efecto de la temperatura. Estrés térmico.....	17
III. JUSTIFICACIÓN.....	20
IV. HIPÓTESIS.....	20
V. OBJETIVOS.....	21
Objetivo General:.....	21
Objetivos específicos:.....	21
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
VI.1. Acondicionamiento de organismos.....	22
VI.4 Efecto de la temperatura.....	24
VII. RESULTADOS.....	28
VII.1 Caracterización de Colinesterasas en músculo de la langosta espinosa del Caribe (<i>Panulirus argus</i>).....	28
Preferencia de sustratos.....	28
Inhibidores Específicos.....	29
Supervivencia.....	33
Peso y talla de organismos expuestos a los tratamientos de temperatura.....	33
Actividad de AChE en músculo de <i>P. argus</i> expuestas a diferentes tratamientos de temperatura.....	35
Relación de los niveles de actividad con peso y talla.....	36
VIII. Discusión.....	37
IX. CONCLUSIONES.....	42
X. REFERENCIAS.....	43
XI. Anexos.....	51



RESUMEN

La langosta espinosa del Caribe (*Panulirus argus*) es la especie de mayor importancia económica en la región del Caribe, es por ello que se realizan diversos estudios para conservar este recurso.

En el presente trabajo se caracterizaron las Colinesterasas presentes en el músculo de la langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus*. Los resultados indicaron la presencia de ambas colinesterasas en el músculo: una Acetilcolinesterasa (AChE) en alta concentración que tiene preferencia por el sustrato acetilcolina (ASChI) se inhibe con BW284C51 y una Butirilcolinesterasa BChE que fue detectada con muy poca actividad.

Así mismo se determinaron las actividades de la AChE en el músculo de langosta espinosa del Caribe expuestos a diferentes tratamientos de temperatura (18°, 25°, 30° y 25°-30°C). Se determinó que no existe una correlación estadísticamente significativa entre la temperatura y la actividad de la AChE. No se encontraron diferencias en la actividad de la AChE entre el tamaño (peso y talla). En cuanto a la correlación del tamaño y el efecto de la temperatura no se registraron diferencias significativas.

Toda la información obtenida nos permite contribuir para estudios de biomonitorio en el Caribe Mexicano ante un panorama de cambio climático.



I. INTRODUCCIÓN

La Región del Gran Caribe es considerada como el mayor productor de langosta espinosa en todo el mundo representando el 17% de la producción mundial. La especie más importante es la langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus*, es por ello que se realizan varios estudios para poder conservarla, ya que su ciclo de vida es muy largo. (Cruz *et.al.*, 1995)

Se realizó este trabajo con el objetivo de investigar el efecto de la temperatura de aclimatación (18°, 25°, 30°C y una rampa de 25° a 30°C) sobre la actividad de las colinesterasas (ChE) en el músculo de *Panulirus argus*, como parte de un estudio más amplio para poder entender cómo se comportan los organismos expuestos hacia un estrés térmico como consecuencia del cambio climático global. Las colinesterasas se han utilizado tradicionalmente para evaluar el efecto tóxico de plaguicidas, en especial organofosforados y carbamatos. También han sido evaluadas como biomarcadores de estatus nutricional, hipotiroidismo, cáncer, procesos inflamatorios y otras condiciones, por lo cual pudiera ser un biomarcador interesante ante un evento de estrés térmico. (Rodríguez, 2005)

Sin embargo, para poder utilizar de forma confiable este biomarcador, es necesario primero caracterizarlas. Esto se debe a que se ha encontrado que un mismo organismo puede tener más de una ChE presente y de que su distribución en los tejidos varía entre las especies presentando diferente sensibilidad ante diferentes estresores.

El presente trabajo está dividido en dos partes: La primera consiste en la caracterización bioquímica de las colinesterasas presentes en el músculo de la langosta espinosa del Caribe, con base en su preferencia al sustrato y su sensibilidad a inhibidores específicos. En la segunda parte se determinó el efecto de la temperatura de aclimatación para establecer si hay una relación entre la actividad de colinesterasas y la temperatura. Esto puede ser muy importante y contribuir para el establecimiento de estudios de biomonitoreo futuro en el Caribe Mexicano ante un escenario de cambio climático.



II. ANTECEDENTES

La langosta espinosa del Caribe *Panulirus argus* (Latreille, 1804) está ampliamente distribuida desde el sur de EE.UU. a Brasil y todo el Caribe (Butler *et al.*, 2011). Son depredadores de varias especies bentónicas marinas y rapaces. Su gran tamaño y abundancia las hacen ecológicamente importantes como enlaces en las redes alimentarias de mares templados. Además, las langostas espinosas soportan algunas de las mayores pesquerías comerciales en el mundo siendo *Panulirus argus* el recurso pesquero más importante del Gran Caribe (Perera *et al.*, 2007). Debido a la intensa explotación de esta pesquería, muchas poblaciones están disminuyendo (Ehrhardt, 2005; Chávez, 2009).

Panulirus argus es la base de las pesquerías más importantes en el estado de Quintana Roo, de ella dependen en forma directa alrededor de 2 600 familias de pescadores. En ciertos lugares, como en Isla Contoy, al norte de Quintana Roo, las langostas presentan migraciones masivas con movimientos horizontales muy amplios (González-Cano, 1991). Por otro lado, las poblaciones de *P. argus* en la región del Gran Caribe tienen alta conectividad por medio de la dispersión durante su fase larvaria oceánica (5-9 meses), que es influenciada en gran medida por el sistema de corrientes marinas y por eventos esporádicos de gran escala, como los huracanes (Briones-Fourzán *et al.*, 2008; Ríos-Lara *et al.*, 2009; Ley-Copper *et al.*, 2013).

Descripción de la especie

Panulirus argus es un crustáceo decápodo pertenece a la familia Paniluridae. Tiene un cuerpo con cabeza tórax fusionados llamado cefalotórax y un abdomen, el cefalotórax está cubierto por espinas, resaltan dos prominentes cuernos las cuales cubren los ojos. También está conformado por 14 segmentos llamados somitas. Los ojos se encuentran asociados con la primer somita, la boca y sus estructuras de la tres a la nueve. De la somita 10 a la 14 se encuentran los pereiópodos o patas caminadoras (Phillips *et al.* 1980, Porter 2004). El abdomen es una estructura muscular que consiste de seis segmentos. Cuatro segmentos presentan un par de pleópodos o apéndices natatorios. El sexto segmento del



abdomen termina en un telson central que en cada lado cuenta con un par de urópodos. Esta especie también posee un característico par de largas antenas que están cubiertas por cortas espinas. (Fig. 1). (Huchin, 2013)



Figura. 1. Anatomía de *Panulirus argus* (Datos tomados de Ríos-Lara *et al* 2013)

Ciclo de vida

Tienen un ciclo de vida largo y complejo que involucra 5 estadios: huevo, larva (filosoma), postlarva (puerulo), juvenil y adulto (Lozano-Álvarez *et al.*, 2003). Los machos y hembras se aparean en hábitats arrecifales, las hembras incuban los huevos en zonas más profundas durante tres semanas (Fig. 2).

Una vez completo el desarrollo embrionario, los huevos eclosionan liberando las larvas. La etapa larval es oceánica y muy larga, pasan por once estadios de desarrollo que duran de 5 a 9 meses, tiempo en el cual son ampliamente distribuidas por las corrientes marinas (Briones *et al.*, 1997). En el undécimo estadio de filosoma, este sufre una metamorfosis hacia la postlarva denominada



puerulo. El puerulo retorna a la zona costera, se asienta en hábitats de vegetación sumergida como pastos marinos, macroalgas y manglares, lugar en donde continua su desarrollo y crecimiento adoptando hábitos bentónicos (Briones-Fourzán y Lozano- Álvarez, 2001).

La etapa juvenil está representada por tres fases ecológicas: juvenil temprano (5-14 mm, longitud de cefalotórax, LC), asociados a la vegetación sumergida de las zonas someras; juvenil tardío (15-44 mm LC), que se encuentran en aguas someras, ocupando principalmente pequeñas cavidades en rocas y comienzan a presentar comportamiento gregario con otras langostas, aparentemente debido a un aumento en el riesgo de ser depredados. La fase de subadulto (45-79 mm LC) con hábitos gregarios, ocupan una amplia zona de alimentación y se resguardan en hendiduras formadas en los arrecifes (Briones-Fourzán *et al.*, 2003). Los adultos (>80 mm LC), no requieren cohabitar con otros individuos, aunque este comportamiento no desaparece del todo. Estos organismos ocupan en el día las hendiduras de corales o fondos rocosos y por la noche pueden tener amplias excursiones alimenticias en el arrecife con la posibilidad de tener varios refugios en el complejo ambiente arrecifal (Briones-Fourzán *et al.*, 2003).

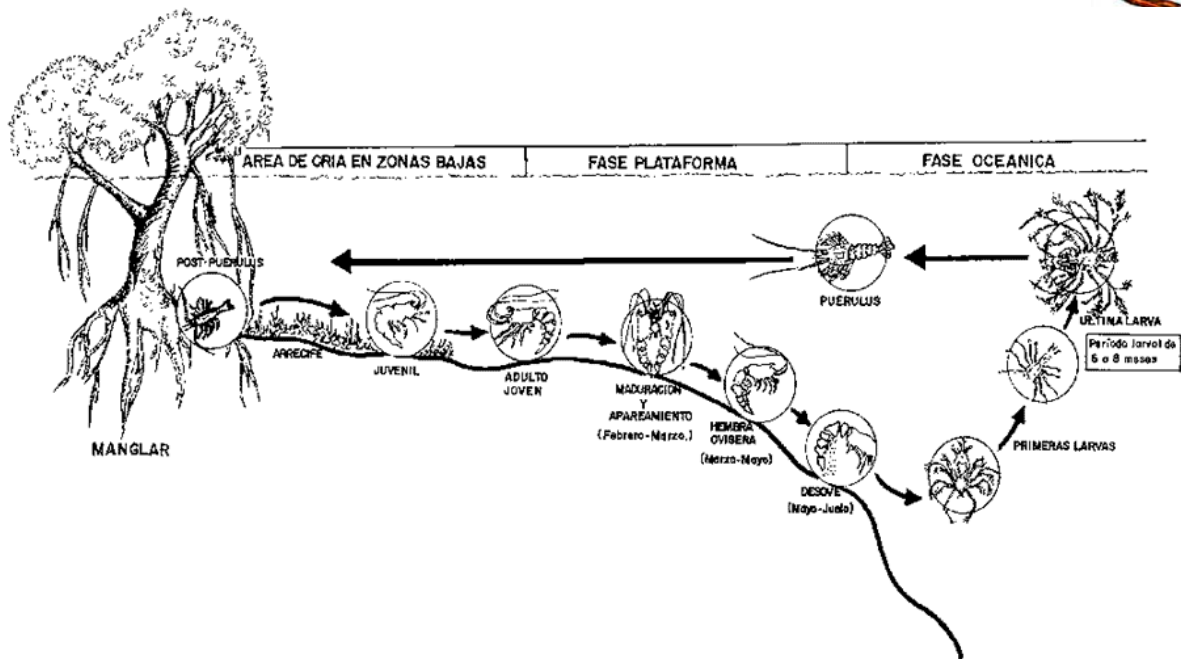


Figura 2. Ciclo de vida de *Panulirus argus* (Tomada de Huchin, 2013(Herrnkind, 1980, Butlery Herrnkind, 1997))

Tienen hábitos nocturnos omnívoros, se alimentan principalmente de crustáceos y moluscos, en menor proporción los equinodermos, algas coralinas, esponjas, ascidias y materia vegetal diversa (Colinas-Sánchez y Briones-Fourzán 1990, Briones-Fourzán *et al.*, 2003).

Importancia pesquera

Alrededor del 50% de la captura total mundial de langostas espinosas lo aporta la langosta espinosa *Panulirus argus* de ahí la importancia económica nacional de esta especie (Phillips y Melville-Smith 2006). Este valioso recurso se encuentra plenamente explotado y en algunos casos sobreexplotado (FAO 2006, Ehrhardt *et al.* 2010), a lo largo de las costas mexicanas, en Yucatán desde el año de 1970 y Quintana Roo desde 1955 son los principales estados de captura de *P. argus*, aportando el 33% de la producción nacional de langosta, con alrededor de 1,100 t anuales en peso vivo (Salas *et al.* 2005).

En ambos estados la producción histórica tuvo una etapa de madurez antes de la década de los 90's y posteriormente las capturas fueron disminuyendo hasta una etapa de estabilización.



La pesquería de *P. argus* ha sido regulada por el gobierno federal estableciendo una temporada de veda del 1 marzo al 30 junio, una talla mínima de captura de 13.5 cm de longitud abdominal equivalente a ~74 mm de longitud cefalotorácica y la prohibición de capturar hembras ovígeras. (Herrera, 2011)

La pesquería de langosta en la península de Yucatán se divide en 4 zonas: oriente, centro, Progreso y poniente. Se emplean diferentes métodos de pesca en cada zona, como el buceo libre, buceo con compresor, redes, trampas y casitas que son grandes refugios artificiales que pueden contener el rango de tamaño completo de las langostas, hechas de cemento y un lado abierto para que las langostas puedan entrar y salir del refugio. En el Caribe mexicano, al igual que en Cuba, las casitas han sido extensivamente usadas en la pesquería de langostas por más de cuatro décadas (Cruz y Phillips 2000). En la actualidad existen 17 cooperativas pesqueras dedicadas a la captura de langosta, en donde están implicados 525 embarcaciones menores, 25 mayores y más de 100 alijos con alrededor de 5,400 personas que participan de manera directa e indirecta en la pesquería del recurso (Salas *et al.*, 2005).

Colinesterasas: Clasificación, distribución y función

Las colinesterasas (ChE) son enzimas clasificadas en el grupo 3 (hidrolasas), clase 1 (hidrolasas que actúan sobre los enlaces éster), subclase 1 (hidrolasas de ésteres carboxílicos), que presenta dos grupos homólogos: la acetilcolinesterasa (AChE) EC 3.1.1.7 y la butirilcolinesterasa (BChE) EC 3.1.1.8, también llamada pseudocolinesterasa o colinesterasa no específica (Sturm *et al.*, 1999).

Es una familia de enzimas cruciales para la respuesta y la función nerviosa, catalizan la hidrólisis de la acetilcolina (Payne *et al.*, 1996) produce una colina y un grupo etilo, esto permite que una neurona colinérgica regrese a su estado de reposo después de la activación. Esta actividad ha sido utilizada como marcador de cambios neuronales en un organismo (Gomes *et al.*, 2014). Los cambios en los niveles de actividad enzimática provocan daño neuronal, así que dependiendo del grado de inactivación de las ChE se puede producir o no la muerte del organismo.



En estudios de ecotoxicología se han incluido la caracterización de ChE en diferentes órganos debido a que se ha encontrado que en el mismo organismo puede existir más de una ChE y presentan diferente sensibilidad a los contaminantes (Sturm *et al.*, 1999). La función de la colinesterasa en organismos acuáticos está relacionada con el neurotransmisor AChE. Mientras que se desconoce cuál es el sustrato natural de la BChE por lo cual su función en los diferentes tejidos aún está en estudio (Rodríguez, 2005)

Dentro de las colinesterasas la enzima acetilcolinesterasa (AChE) tiene un papel principal en el sistema nervioso ya que regulan la transmisión del impulso nervioso por la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en colina y ácido acético en vertebrados e invertebrados (Walker y Thompson, 1991). Su inhibición se relaciona directamente al mecanismo de acción tóxica de los plaguicidas organofosforados y carbámicos. Esta inhibición causa una acumulación de la acetilcolina dando por resultado un estímulo continuo y excesivo en las terminaciones nerviosas o en los músculos lo que lleva eventualmente a la muerte. Aunque se ha visto que la BChE es una enzima de apoyo a células u otros elementos no neuronales, se cree que actúa como una enzima de barrido en la desintoxicación de compuestos contaminantes ambientales en los sistemas acuáticos. Los programas de monitoreo de productos químicos neurotóxicos se basan principalmente en la medición del grado de inhibición de la actividad de la AChE, ya que es un útil y sensible biomarcador de efecto en organismos acuáticos, a pesar de la gran variación en sus propiedades bioquímicas, en la distribución en los tejidos y en su sensibilidad hacia los agentes anticolinesterásicos (Boquené *et al.*, 1990).

Los parámetros enzimáticos, constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}), proporcionan la información necesaria para clasificar a las ChEs. La V_{max} corresponde al valor máximo de velocidad al que tiende la curva experimental, y la K_m corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} , lo cual indica que entre menor K_m se tendrá una mayor afinidad por el sustrato (Lenhinger, 1978) (Fig. 3).

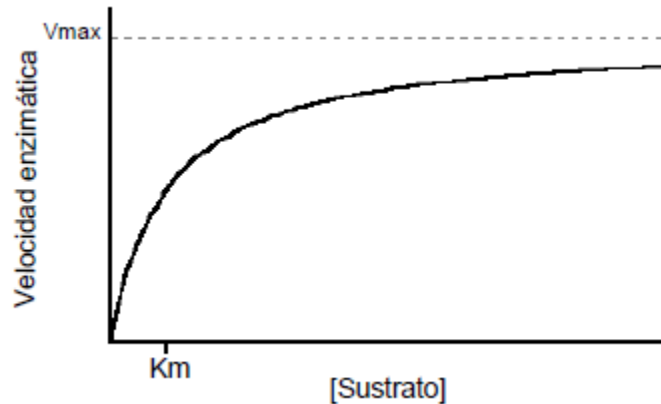


Figura 3. Representación gráfica de los parámetros de cinética enzimática de Michaelis-Menten K_m y velocidad máxima V_{max} (Tomada de Rodríguez, 2005)

Estas colinesterasas también pueden distinguirse por su susceptibilidad en inhibidores específicos (Gomes *et al.*, 2014). La sensibilidad de inhibidores específicos se ha utilizado para bioquímica y la farmacología (Pestana *et al.*, 2014), varían entre especie en vertebrados y poseen dos formas AChE y BChE dependiendo de la preferencia. AChE es preferentemente inhibida por BW284C51 (dibromo 1,5-bis (4 alildimetilamoniofenil) pentano-3-ona) y propidium, la BChE es inhibida por Iso-OMPA (tetrakisopropil pirofosfamida) y bambuterol, ambas enzimas son inhibidas por Eserina. Para determinar la sensibilidad de la enzima con los diferentes inhibidores se utiliza el valor de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) esta representa la concentración a la cual se inhibe el 50% de actividad (Fig. 4), entre menor sea la IC_{50} se tendrá una mayor sensibilidad al compuesto inhibidor (Rodríguez, 2005).

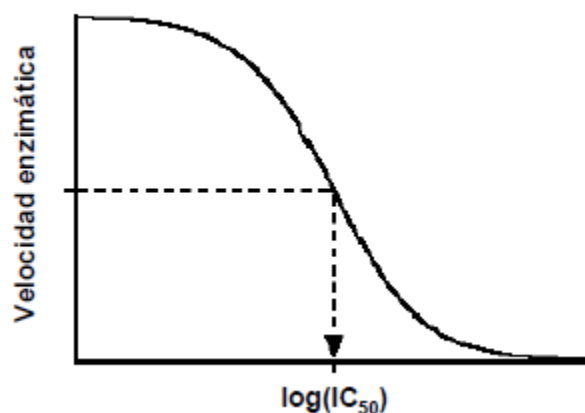


Figura 4. Representación gráfica de la concentración inhibitoria media IC_{50}
(Tomada de Rodríguez, 2005)

En vertebrados han sido identificadas dos enzimas la Acetilcolinesterasa (AChE) y la Butirilcolinesterasa (BChE) o Pseudocolinesterasa (Payne *et al.*, 1996). Estas se encuentran en órganos específicos, la AChE es la enzima asociada a la conducción del impulso nervioso y en tejidos como el músculo hidroliza la acetilcolina en las uniones sinápticas, mientras que la BChE se encuentra en plasma, hígado y otros tejidos (Rodríguez y Gold-Bouchot, 2004).

Por otra parte, varios estudios realizados en invertebrados han mostrado la colinesterasa con propiedades mixtas y en general los invertebrados tienen una diferencia significativa en la hidrólisis de ASChI y BSChI; en la mayoría de los estudios que hay en invertebrados ASChI es el sustrato preferido (Pestana *et al.*, 2014).

En *Mytilus edulis* se reporta una ChE en la fracción microsomal de las branquias que se inhibe con BW284C51, pero en menor proporción a lo que sucede en los vertebrados (Brown *et al.*, 2004).

Por otro lado, en el gasterópodo *Concholepas concholepas* (González *et al.*, 1990) y *Crassostrea rhizophorae* (Monserat *et al.*, 2002) se reporta una baja sensibilidad al Iso-OMPA. En todos estos casos la enzima quedó clasificada como una AChE.



Cacciatore *et al.*, (2013) trabajaron con un oligoqueto y un gasterópodo para evaluar la absorción y/o eliminación de plaguicidas o diferencias en la sensibilidad *in vitro* de ChE en ambos invertebrados. Se necesitó una concentración mayor para inhibir la actividad de ChE un 50% más en el gasterópodo que en el oligoqueto.

Se ha reportado en algunos moluscos, como por ejemplo en *Corbicula fluminea* (Mora *et al.*, 1999) y en el anélido *Hirudo medicinalis* (Principato *et al.*, 1981) la presencia de una propionilcolinesterasa (PChE) la que se caracteriza por presentar una mayor velocidad de hidrólisis con el sustrato PSChI y se propone denominarla ChE de invertebrados.

Srain y Rudolph, (2010) evaluaron la actividad de AChE en las defensas antioxidantes y la peroxidación lipídica en el bivalvos *Semele solida*, como bioindicadores del estrés en el medio ambiente en tres diferentes estuarios en el Pacífico sureste con diferentes grados de alteración, con el objeto de evaluar el efecto del estrés ambiental. Presentaron menor actividad en branquias de uno de los estuarios menos alterado.

En crustáceos, los resultados publicados presentan diferencias en la preferencia del sustrato por sus ChEs. Por ejemplo, en *Squilla mantis* (Principato *et al.*, 1988) se observó que la mayor V_{max} se obtiene al utilizar PSChI, esto también se reporta en el tejido de los ganglios del cangrejo *Callinectes sapidus* (Habig *et al.*, 1988). Por otro lado, en el camarón *Palaemonetes pugio* el sustrato preferido es ASChI (Key y Foulton 2002). En la langosta *Palinurus vulgaris* se encontró que las ChEs prefieren como sustrato BSChI (Talesa *et al.*, 1992).

Efecto de la temperatura. Estrés térmico

La temperatura es una de las variables más influyentes en los organismos, especialmente en la zona intermareal.

El papel de la temperatura y sus efectos sobre la frecuencia cardíaca de los crustáceos, pH interno y la actividad del sistema nervioso, se ha caracterizado, ya



sea que una especie actúe para buscar o evitar temperaturas particulares para optimizar un carácter fisiológico particular (Lewis y Ayers, 2014).

Los crustáceos son incapaces de regular la temperatura interna de su cuerpo y debe adaptarse para mantener la función corporal a pesar de las fluctuaciones en ambiente (Florey y Hoyle, 1976; Jeffries, 1966; Kivivuori, 1983; McLeese y Wilder, 1958; Young *et al.*, 2006).

Madeira *et al.*, (2012) tuvieron como objetivo probar la condición fisiológica, molecular y las diferencias en la tolerancia térmica del cangrejo *Pachygrapsus marmoratus*. Comparó el efecto del sexo tamaño y hábitat. La condición fisiológica se midió con la temperatura crítica máxima (TCMax) y la parte de molecular con la proteína de choque térmico (Hsp70).

Los resultados mostraron que valores TCMax y producción Hsp70 son más altos en las hembras debido al diferente uso de microhábitats y a la diferente regulación hormonal entre machos y hembras. Por lo tanto las reproductoras mostraron valores mayores para TCMax sin diferencias en Hsp70 pero con mayor variabilidad en las cantidades mostradas, esto se debe a la gran cantidad de energía que utilizan al estar en reproducción.

Anteriormente Serfling y Ford (1975) determinaron el efecto de las temperaturas 22 y 28°C y su potencial para la aceleración de las tasas de crecimiento naturales de juveniles de *P. interruptus* que se encuentran en el océano a una temperatura de 12° a 20°C. Estas tasas, respectivamente, son cerca de dos y tres veces mayor que las tasas de crecimiento estimadas en el sur de California. El crecimiento acelerado a temperaturas elevadas se asoció con una mayor cantidad de mudas.

Thomas *et al.*, (2000) investigaron el efecto de la temperatura de 18, 20, 22 y 24°C sobre el crecimiento, la alimentación y metabolismo de langostas post-puerulos, como parte de un estudio más amplio del potencial para el cultivo de la langosta de áreas templadas, *Jasus edwardsii*. No hubo diferencia significativa en el crecimiento a los 18, 20 o 22°C; sin embargo, el crecimiento disminuyó significativamente a los 24°C.



Dubber *et al.*, en el 2004, estudiaron la influencia de la temperatura y la dieta sobre el crecimiento de post-puerulos de *Jasus edwardsii*. En primer lugar, las post-puerulos fueron expuestas a temperaturas que abarcan 12-24°C durante un período de tiempo total de 77 días con una dieta de mejillón. En estas condiciones, el período de intermuda fue el más largo fue en los tratamientos de 12°C y 24°C y más corto en 18°C. Los incrementos de crecimiento eran grandes en 12-18.8°C, menor a los 21°C y negativa en 24.8°C. Por lo tanto, el crecimiento fue óptimo en 18°C, pero la supervivencia fue mayor en 12-16°C.

Perera *et al.* (2007) describe el comportamiento metabólico de juveniles de langosta *P. argus* en términos de consumo de oxígeno en relación con el peso corporal, la temperatura y la alimentación. El consumo de oxígeno aumentó con el peso y la temperatura; mientras que la respiración disminuyó, el consumo de oxígeno incrementó después de la ingestión.

Noyola *et al.* (2013) evaluaron los efectos de la temperatura en el balance de energía de los primeros juveniles de *Octopus maya* en un intento de determinar los mecanismos fisiológicos relacionados con la adaptación a temperaturas relativamente bajas (que son comunes en la península de Yucatán) en el crecimiento de esta especie. Se analizaron también ácidos grasos en un intento de entender cómo las temperaturas experimentales modulan el metabolismo de los lípidos de *O. maya*, para explorar si los perfiles de ácidos grasos se pueden utilizar como una herramienta para explicar los mecanismos fisiológicos que apoyan el crecimiento de este cefalópodo.



III. JUSTIFICACIÓN

La determinación de la actividad de las colinesterasas (AChE y BChE) es ampliamente estudiada y es utilizada como un biomarcador en especies acuáticas, en vertebrados e invertebrados; debido a que en un mismo organismo pueden llegar a existir ambas ChE, es necesario el uso de sustratos e inhibidores específicos que permitan caracterizarlas.

Existe evidencia de que la temperatura es un factor que produce cambios en la actividad de las ChE; por lo tanto, este estudio nos ayudará a determinar si la aclimatación a diferentes temperaturas tiene un efecto en la actividad de ChE de la langosta espinosa del Caribe, para de esta forma determinar si ante un escenario de cambio climático global, esta enzima, que tiene un importante papel en el sistema nervioso, podría verse afectada.

IV. HIPÓTESIS

Las dos colinesterasas existentes en los organismos estarán presentes en el músculo de la langosta espinosa del Caribe (*P. argus*).

Las condiciones de la temperatura de aclimatación, no tendrán un efecto en la actividad de las colinesterasas presentes en el músculo de la langosta espinosa del Caribe (*P. argus*).



V. OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar las colinesterasas presentes en el músculo de la langosta espinosa del Caribe y ver si existe un efecto de la temperatura de aclimatación.

Objetivos específicos:

- Caracterizar mediante el uso de sustratos e inhibidores específicos las colinesterasas presentes en el músculo de la langosta espinosa del Caribe.
- Determinar si el mantenimiento durante 60 días a 18°, 25°, 30° o en una rampa de temperatura de 25°- 30°C, afecta en la actividad de colinesterasas en músculo de la langosta espinosa del Caribe (*P. argus*).



VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1. Acondicionamiento de organismos

Las langostas de la especie *P. argus* necesarias para este estudio, fueron colectadas por medio de redes de enredo o enmalle en Isla Contoy localizada a 30 kilómetros de Isla Mujeres, Quintana Roo y llevadas a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación campus Sisal, Yucatán, donde se realizó el experimento en un sistema cerrado en tanques de recirculación con aireación constante a una temperatura de 24 a 25°C.

Los 105 organismos utilizados para el experimento cumplieron con un periodo de acondicionamiento de 60 días en estanques de 2 m largo x 1.40 m de ancho con una profundidad de 22 cm, la temperatura del agua de mar a $25 \pm 0.96^\circ\text{C}$, una salinidad de 37 UPS y aireación constante con una densidad de 8 organismos/ m^2 . En este sistema, el agua de mar fue recirculada a través de un tanque reservorio y filtrada con filtros de lecho profundo rellenos con antracita y un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h oscuridad, con el fin de mantener el fotoperiodo de su hábitat.

VI.2 Caracterización de las ChE en músculo

Utilizando las muestras de músculo de la cola de *P. argus*, acondicionado a 25°C se procedió a hacer la caracterización basada en su preferencia de sustrato y respuesta a inhibidores.

Se pesó aproximadamente 50 mg del músculo de la langosta, se homogeneizó en buffer Tris 0.05M pH 8.0 c (0.709g en 100ml de agua destilada) en una proporción de 200 mg/ ml de buffer utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem, hasta que el tejido quedó totalmente desbaratado, el contenedor del tejido/buffer se mantuvo en frío durante el proceso. Posteriormente el homogeneizado se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo eppendorf. Se congeló a -20°C hasta su uso. (Ellman, 1961)



Las colinesterasas presentes en el homogeneizado de músculo de la langosta espinosa del Caribe, fueron caracterizadas usando sustratos específicos; yoduro de acetiltiocolina (ASChI) y yoduro de butiriltiocolina (BSChI) para colinesterasas totales y BChE respectivamente. Se utilizaron concentraciones finales crecientes de 0.0001 a 10 mM de ASChI y concentraciones finales crecientes de 0.0001 a 1 mM de BSChI. Las diferentes concentraciones de los dos sustratos se prepararon el mismo día en que se corrieron las cinéticas. La determinación de la actividad enzimática de las colinesterasas se llevó a cabo con una modificación del método de Ellman et al. (1961), adaptada para una microplaca (Rodríguez Fuentes *et al.*, 2008)

Cada pozo contenía 10 μ l del homogeneizado más 180 μ l de buffer, el cual contenía 5.5' Ditiobis (2- ácido nitrobenzónico) (DTNB) 0.5 mM en buffer Tris pH 0.05 M. 7.4. La reacción inicia con la adición de 10 μ l de cualquiera de los sustratos. Se registró la velocidad de cambio de absorbancia por minuto a 405 nm durante 60 segundos con un retraso inicial de 10 segundos (usando un lector de microplacas Beckman Coulter).

VI.3 Inhibidores específicos

Las colinesterasas presentes en el homogeneizado del músculo de *P. argus* fueron caracterizadas usando inhibidores específicos (Sturm *et al.* 1999). Eserina con concentraciones finales crecientes de 0.019248 μ M a 19.248 μ M, BW284C51 con concentraciones finales crecientes de 0.009798 μ M a 9.7987 μ M e Iso-OMPA con concentraciones finales crecientes de 0.015625 μ M a 15.6625 μ M, Cada celda contenía 10 μ l del homogeneizado más 170 μ l de buffer de extracción, el cual contiene 5.5' Ditiobis (2- ácido nitrobenzónico) (DTNB), 0.5 mM en buffer Tris pH 7.4 0.05 M. Los homogeneizados fueron incubados con 10 μ l de las diferentes concentraciones del inhibidor por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción inició con la adición de 10 μ l de los dos sustratos ASChI y BSChI. La concentración de proteínas de los homogeneizados se



determinó por medio de la técnica de Bradford *et al.*, (1976) utilizando albumina sérica bovina fracción V como estándar.

Para la determinación de los parámetros de la ecuación de Michaelis-Menten, velocidad máxima (V_{max}) y constante de Michaelis-Menten (K_m) se calculó mediante regresión no lineal para los diferentes sustratos. La determinación del parámetro, IC_{50} se calculó mediante regresión no lineal utilizando GraphPad PRISM versión 6.00 (GraphPad Software, Inc., USA). VI.3.

VI.4 Efecto de la temperatura

Una vez transcurrido el periodo de acondicionamiento (60 días) los organismos fueron pesados y medidos para ser trasladados a los estanques del experimento e iniciar su aclimatación a cuatro condiciones de temperatura diferentes: 18°, 25°, 30° C. la tasa de cambio de temperatura de estos tratamientos fue de 1°C por día. Una vez alcanzada la temperatura experimental los organismos fueron mantenidos en ellas por 30 días. Para simular patrones de cambio de temperatura estacional se incluyó un tratamiento de incremento de 25 a 30 °C con una tasa de cambio de 1°C cada 5 días, por lo cual presentó un incremento constante de temperatura durante 30 días. Cada uno de los 4 tratamientos contó con 3 repeticiones con un valor promedio de 24 organismos por tratamiento.

Para mantener el agua a la temperatura de 30° C se utilizaron calentadores de vidrio Boyu de 300W, mientras que la temperatura de 25°C se mantuvo con ayuda del aire acondicionado. Las temperaturas de 18°C y 25-30°C (rampa) se utilizó un enfriador prime Chiller Current, para esta última temperatura el Chiller se programa para subir 5°C cada 5 días partiendo de 25°C hasta llegar a 30°C. Las temperaturas y el oxígeno disuelto se mantuvieron controladas durante el experimento con el sistema del reservorio del área de ecofisiología que incluye filtro Biopro (B-916 External Canister Filter) a su vez cada reservorio por tratamiento tenía un sistema conectado al tanque reservorio general del área y a un espumador y se monitorearon tres veces al día 8:00am, 12:00pm y 8:00 pm con el oxímetro YSI SS Dissolved. La elección de estas temperaturas se basó en



la amplia distribución de *P. argus* (Holthius 1991). Se distribuyeron los organismos por talla y peso en cada uno de los tratamientos teniendo 27 para los estanques de 18°, 26 para 25°, 28 para 30° y 24 para la rampa 25-30°; por cada tratamiento se utilizaron tres estanques con las siguientes medidas: 80 cm de largo, 40 cm de ancho y una altura de 25 cm con una densidad aproximada de 90 litros de agua de mar.

Los tanques estaban conectados a su respectivo reservorio el cual tenía un flujo constante, con un filtro Biopro (B-916 External Canister Filter) a su vez cada reservorio por tratamiento tenía un sistema conectado al tanque reservorio general del área de ecofisiología y a un espumador. Para poder medir todos los parámetros químicos como amonio, nitratos y pH se realizó la medición dos veces por semana durante todo el experimento con el kit para pruebas de agua salada LaMotte.

Cada uno de los estanques fue sifoneado y los organismos fueron alimentados dos veces al día, la dieta de las juveniles de langosta se basó en alimento seco peletizado (tabla 1), las porciones de alimento por tina fueron del 2% de la biomasa de cada una con un fotoperiodo de 12h luz y 12h oscuridad. A los organismos se les proporcionó como refugio 3 tubos de pvc por tina con un diámetro de 7cm.



Tabla 1. Componentes del alimento de *P. argus*

Ingredientes	Porcentaje por kilogramo
Músculo de calamar	229g
Jaiba fresca	178.2g
Harina de calamar	200g
Harina de pescado	165g
Harina de soya	165g
Vitamina A	1.8g
Vitamina D	37.5g
Booster	6.6g
BHT	0.02g
CMC (Carboximetilcelulosa)	20g
Calcio	1.498g
Grenetina	36.2g

Terminado el experimento de temperatura, se realizó el muestreo para la obtención de tejidos en los supervivientes. Se registró el número de organismos vivos al final del experimento.

Los organismos se llevaron al Laboratorio Central de la UMDI e inmediatamente se sacó una muestra de hemolinfa para otros análisis y se procedió a sacrificar a 7 organismos del tratamiento de 18°, 15 del tratamiento de 25°, 22 del tratamiento de 30° y 12 del tratamiento de 25-30°; cortando el cordón nervioso que se encuentra entre el cefalotórax y la cola. Se extrajeron tejidos como branquias, hepatopáncreas y músculo que es el tejido de nuestro interés, estas muestras se llevaron a tubos eppendorf de 2ml y fueron puestas en nitrógeno líquido para conservarlas y posteriormente se colocaron en el ultracongelador Revco a -80°C hasta ser utilizadas.



Las muestras de músculo se prepararon como se mencionó anteriormente y se procedió a cuantificar su actividad utilizando como sustrato ASChI a una concentración final de 1 mM

Se usó la prueba de Bartlett para evaluar la homogeneidad de varianza; para evaluar las diferencias entre tratamientos y la actividad de AChE se usó un análisis de varianza ANOVA de una vía y para la correlación de peso y talla con la actividad de AChE se utilizó el análisis de correlación de Pearson.



VII. RESULTADOS

Caracterización de Colinesterasas en músculo de la langosta espinosa del Caribe (*Panulirus argus*)

Preferencia de sustratos

En la figura 6 se presentan los resultados de las actividades de la ChE en músculo, utilizando los sustratos ASChI y BSChI. Se aprecia que existe hidrólisis para los dos sustratos. Sin embargo, existen diferencias entre ambos compuestos. Con ASChI existe una mayor actividad, se obtiene una V_{max} de 38.08 a 46.88 nmol/min/mg y una K_m de 0.2268 a 0.6317 μ M, mientras que BSChI la V_{max} fue 6.330 a 8.716 nmol/min/mg y K_m de 1.365 a 4.176 μ M. En la tabla 2 se presenta un resumen de los resultados de la cinética enzimática de Michaelis-Menten.

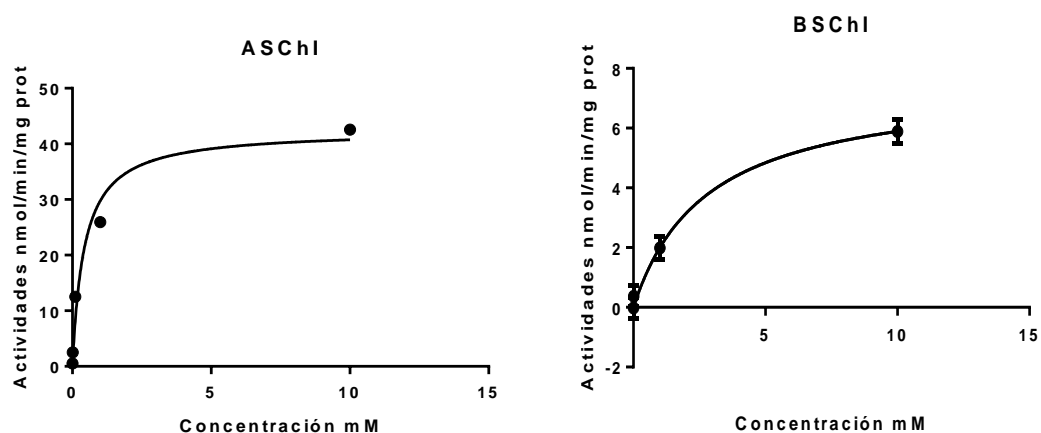


Figura 6. Representación gráfica de la cinética enzimática de Michaelis-Menten, de la actividad enzimática de las Colinesterasas (ChE) presentes en músculo de *P. argus*, utilizando como sustratos ASChI y BSChI.

Sustrato	V_{max} (nmol/min/mg/prot)	K_m (μ M)
ASChI	38.08 \pm 46.88	0.2268 \pm 0.6317
BSChI	6.330 \pm 8.716	1.365 \pm 4.176

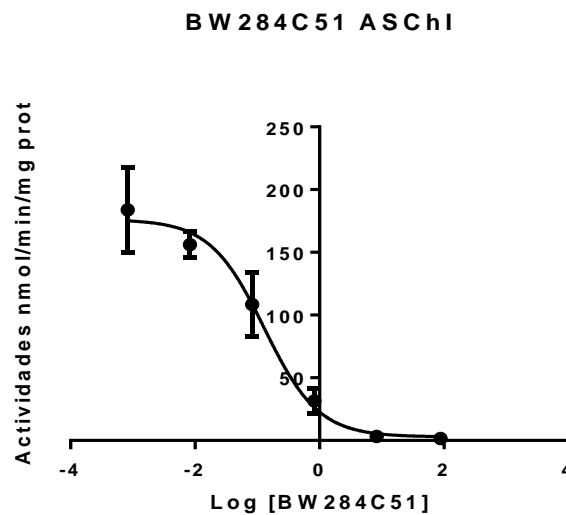
Tabla 2. Especificidad de sustrato en músculo de *P. argus*. Se muestra el valor de la media \pm la desviación estándar.



Inhibidores Específicos

Para caracterizar las ChE presentes en los diferentes tratamientos a los que fueron expuestas las langostas se utilizaron inhibidores específicos: Eserina (como inhibidor de las ChE), BW284C51 (como inhibidor específico de AChE) e Iso-OMPA (inhibidor específico de BChE).

Los resultados del uso de estos inhibidores en músculo se presentan en las figuras 4 y 5. Al utilizar inhibidores específicos en las muestras se observa que fueron sensibles a Eserina y a BW284C51; en cambio se aprecia una muy baja sensibilidad al inhibidor específico para BChE, Iso-OMPA. Los valores de IC_{50} obtenidas para cada uno de los inhibidores se muestran en la tabla 3 y 4. Este comportamiento se observó al emplear como sustrato tanto ASChI como BSChI.



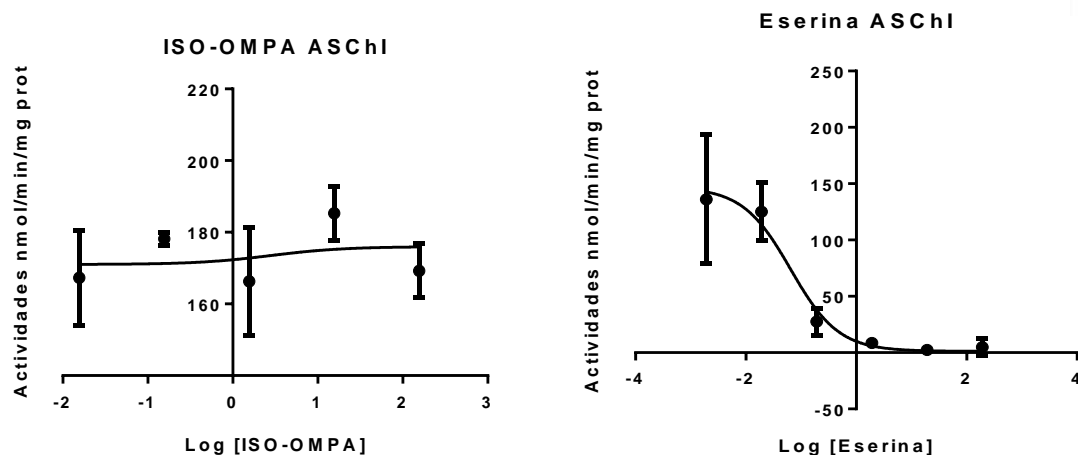


Figura 7. Actividad enzimática específica de colinesterasas (ChE) presentes en el músculo de *P. argus*, usando inhibidores específicos de Acetilcolinesterasas. Eserina, BW284C51, Iso-OMPA.

sustrato	Inhibidor	IC ₅₀ μM	R ²
ASChI	Eserine	0.06448 (0.01829- 0.2273)	0.8537
	Iso- OMPA	2.788 (1.686- 4.610)	0.03218
	BW284C51	0.1295 (0.06999- 0.2395)	0.9528

Tabla 3. Valores de IC₅₀ para el sustrato ASChI con inhibidores específicos en músculos de *P. argus*

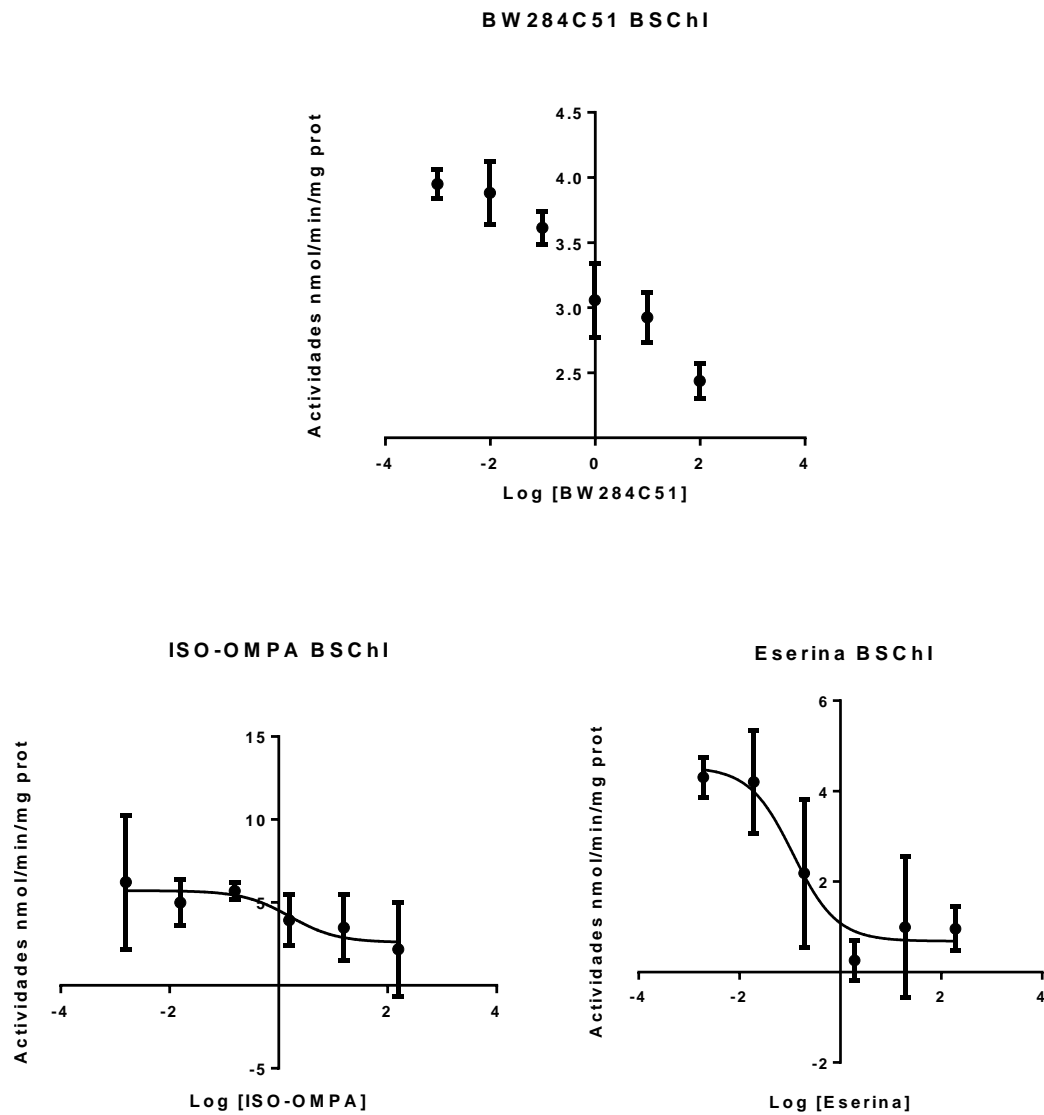


Figura 8. Actividad enzimática específica de colinesterasas (ChE) presentes en el músculo de *P. argus*, usando inhibidores específicos de Butirilcolinesterasas. Eserina, BW284C51 e Iso-OMPA



sustrato	Inhibidor	IC ₅₀ μ M	R ²
BSChI	Eserine	0.1155 (0.01905- 0.7004)	0.7664
	Iso-OMPA	1.613 (0.1509- 1.610)	0.2990
	BW284C51	0.4929 (0.02711- 9594)	0.8620

Tabla 4. Valores de IC₅₀ para el sustrato BSChI con inhibidores específicos en músculos de *P. argus*



Efecto de la temperatura

Supervivencia

Debido a la variable experimental es decir el efecto de la temperatura en la supervivencia, los 105 organismos al ser expuestos a los tratamientos de las diferentes temperaturas durante 60 días, se tuvo un porcentaje del 50% de supervivencia al final del experimento y solo se trabajó con 56 organismos, siendo el tratamiento de 30°C en el que hubo una menor supervivencia con el 25% de langostas, mientras que el tratamiento en el que hubo una mayor supervivencia fue el de 18°C con un 78.57% de organismos.

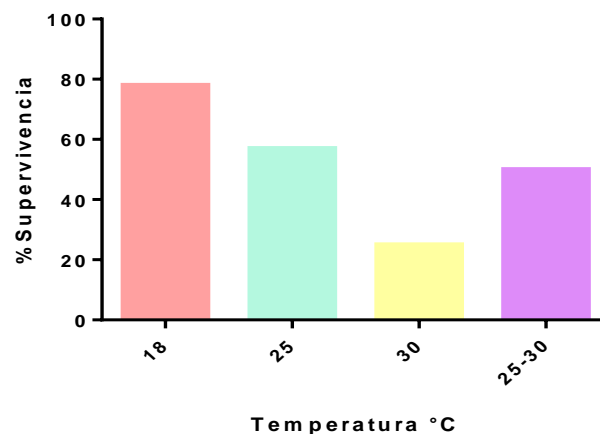


Figura 9. Porcentaje de Supervivencia de *P. argus* en los diferentes tratamientos de temperatura

Peso y talla de organismos expuestos a los tratamientos de temperatura

Para determinar si había una relación entre el peso y talla con la temperatura a la que se expusieron los organismos utilizamos la prueba de Bartlett para determinar la homogeneidad de las varianzas por lo tanto obtuvimos para peso una $B= 3.593$ y $p=0.3090$; para talla $B= 2.481$ y $p=0.4788$ (Fig.10) y (Fig. 11) por lo tanto no



encontramos diferencias significativas entre el peso y la talla respecto a la temperatura.

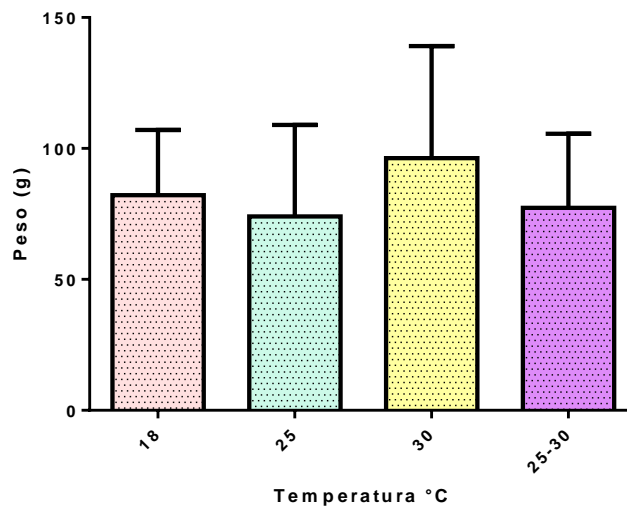


Figura 10. Pesos de *P. argus* expuestas a los diferentes tratamientos de temperatura los pesos están aproximadamente en la misma proporción vemos en el tratamiento de 30°C una mayor variabilidad.

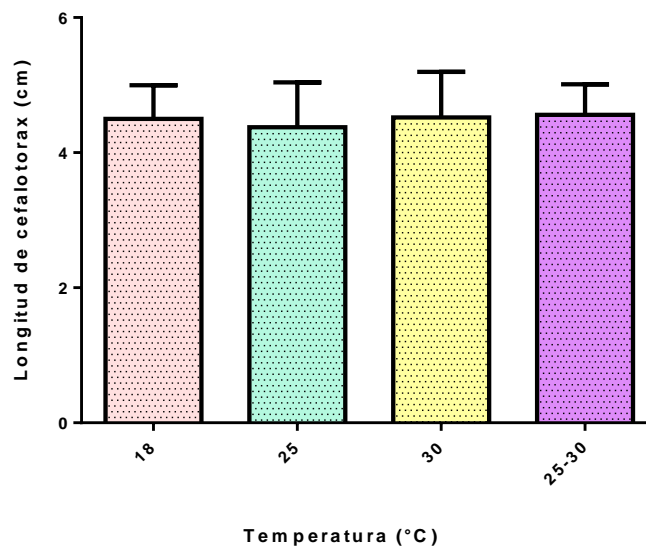


Figura 11. Longitud de cefalotórax de *P. argus* expuestas a los diferentes tratamientos de temperatura, se muestran que las tallas de los organismos estuvieron distribuidas uniformemente teniendo muy poca variabilidad en los tratamientos



Actividad de AChE en músculo de *P. argus* expuestas a diferentes tratamientos de temperatura

Debido a la baja actividad que se obtuvo con el sustrato BSChI, solo se utilizó el sustrato ASChI en cada una de las muestras de músculos de *P. argus* expuestas a los diferentes tratamientos de temperatura. Se realizó una ANOVA paramétrica, en la tabla 5 se muestra los intervalos de las actividades de AChE en cada uno de los tratamientos de temperatura a los que fueron expuestos los organismos. Al comparar los niveles de actividad en cada uno de los tratamientos no se encontró diferencia significativa ($p=0.4458$) y ($F= 0.9882$) (Fig. 12), aunque se registraron menores variaciones en la temperatura de 30°C con respecto a los otros tratamientos.

Tratamiento (°C)	Actividad de AChE (nmol/min/ml)
18	9.95068968-18.0694737
25	7.56260812-13.9234802
30	12.9823037-16.1117571
25-30	8.196725925-14.01151722

Tabla 5. Intervalos máximo y mínimo de la actividad de AChE en los diferentes tratamientos

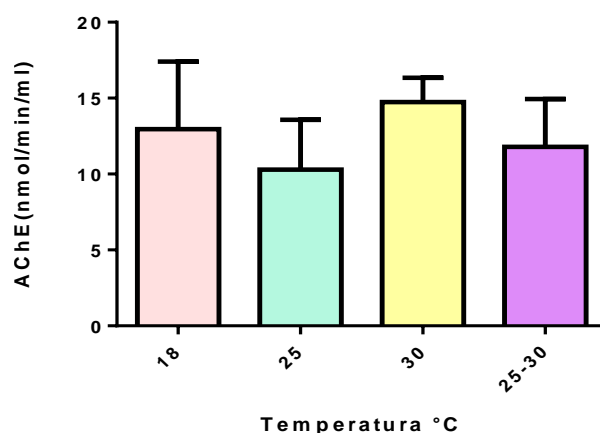


Figura 12. Actividad de AChE en músculo de *P. argus* expuestas a diferentes tratamientos de temperatura (18°, 25°, 30° y la rampa de 25°-30°C)



Relación de los niveles de actividad con peso y talla

La longitud del cefalotórax estuvo en un intervalo entre 2.8 cm a 5.3 cm y el peso de entre 20.05g a 147.32g. Por medio del análisis de correlación de Pearson se determinó que no hay una relación significativa entre el nivel de actividad de las AChE presentes en el músculo de la langosta espinosa del Caribe con la talla ($r = -0.06494$) y el peso ($r = -0.1382$) (Fig.13).

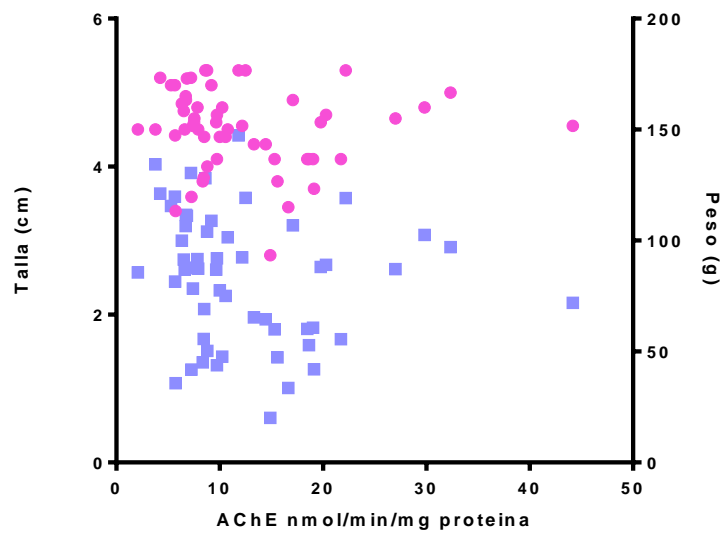


Figura 13. Análisis de Correlación entre peso y talla de *P. argus* con AChE expuestas a los tratamientos de diferentes temperaturas en azul talla y en rosa peso.



VIII. DISCUSIÓN

Al inicio del experimento de la temperatura se tenían 105 organismos con pesos y tallas similares; durante este periodo que se llevó a cabo en 60 días, los organismos fueron sometidos a diferentes tratamientos de temperatura (18°, 25°, 30° y una rampa de 25°-30°). Al término de este periodo se realizó el muestreo y solo se trabajó con los 56 (53%) organismos supervivientes. El tratamiento de 18°C con 22 organismos (78%) fue en el que tuvimos más supervivencia de al final del experimento y el tratamiento de 30°C el de menor supervivencia con solo 7 (25%) de organismos.

Las tasas de supervivencia indican que *P. argus* está adaptada a entornos tropicales y subtropicales se han encontrado varios trabajos con buenas respuestas de crecimiento y metabolismo en aguas de 30°C. Como se sabe, la temperatura es uno de los principales factores ambientales que afectan el crecimiento de crustáceos (Hartnoll, 1982). En algunos estudios se ha demostrado que la tasa de crecimiento aumenta con la temperatura a un máximo como lo mencionan Brito *et al.* (1991), ya que la óptima temperatura para las juveniles de *P. argus* está entre 29 y 30°C, mientras que Díaz Iglesias *et al.* (1991) informaron que la temperatura óptima para postlarvas de *P. argus* es de 28°C. Esto tiene el mayor potencial para el Caribe donde las temperaturas medias del mar oscilan entre los 26°C y 30°C, los resultados podrían ayudar en la evaluación de la necesidad de oxígeno disuelto para las langostas de acuerdo con la temperatura del mar. En estudios realizados con base en la supervivencia, Bunter y Westaway (1993) registraron la reducción de la supervivencia de langostas juveniles en 18°C en comparación con temperaturas ambiente en Tasmania.

La mayoría de los estudios en busca de ChE y otras esterasas se han llevado a cabo en agua dulce templada o fría. Por el contrario, no hay información disponible para organismos marinos, y menos aún para las especies marinas tropicales. Los crustáceos al ser organismos ectotermos o poiquilotermos no generan calor corporal y dependen de las fluctuaciones de la temperatura ambiental.



Las preferencias térmicas dependen de la etapa de desarrollo y la tasa de crecimiento es una función de la frecuencia de muda, además el incremento de peso y talla se eleva en cada muda y este efecto varía con la especie de langosta, así como en diversos crustáceos. Por ejemplo, Thomas *et.al.*, (2000) en un estudio con la langosta *Jasus edwardsii* dice que una reducción del periodo de muda se observa cuando la temperatura aumenta y en la caracterización de ChE en el músculo de *P. argus* resultó que existe hidrólisis para los dos sustratos; sin embargo, con ASChI se obtiene una mayor actividad, con una V_{max} de 38.08 a 46.88 nmol/min/mg y una K_m de 0.2268 a 0.6317 μM , mientras que con BSChI la V_{max} fue 6.330 a 8.716 nmol/min/mg y K_m de 1.365 a 4.176 μM .

Al utilizar el criterio de clasificación utilizando los parámetros de la cinética de Michaelis-Menten, los parámetros enzimáticos de la constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}), proporcionan la información necesaria para clasificar a las ChEs. La V_{max} corresponde al valor máximo de velocidad al que tiende la curva experimental, y la K_m corresponde a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} , lo cual indica que entre menor K_m se tendrá una mayor afinidad por el sustrato (Lenhinger, 1978). Se obtuvo que la ChE presente en el músculo tiene la mayor V_{max} y una menor K_m utilizando como sustrato ASChI, por lo cual, con base en su afinidad al sustrato la enzima quedaría clasificada como una AChE.

En cuanto al efecto de los inhibidores, ChE es fuertemente inhibida por Eserina, lo cual indica que la actividad medida es producida por una ChE y no por otro tipo de esterasa, al comparar las IC_{50} con los inhibidores específicos: BW284C51 e Iso-OMPA se tiene una mayor sensibilidad con el inhibidor de AChE (BW284C51). Toda esta información clasifica también a la ChE presente en músculo como una AChE.

Estudios realizados en crustáceos indican que hay marcadas diferencias en sus ChEs. Por ejemplo, AChE tiene una variación considerable con respecto a la



especificidad del sustrato e inhibición, los datos de ChE en invertebrados no son muy abundantes (Silver, 1974). En *Squilla mantis* (Principato *et al.*, 1988) se hidrolizó más BSChI e inhibió con Iso-OMPA. En el tejido de los ganglios del cangrejo *Callinectes sapidus* (Habig *et al.*, 1988) se tuvo una preferencia hacia a hidrolizar ASChI. En la tabla 5 se presenta un comparativo para diferentes AChE presentes en invertebrados, se observa en orden creciente que la especie *Squilla mantis* tiene menor actividad de AChE mientras que *Gammarus pulex* muestra una actividad mayor, *Panulirus argus* se encuentra con afinidad intermedia para esta enzima.

Enzima	especie	Km (μM)	Vmax (nmol/min/mg)	Referencia
AChE	<i>Squilla mantis</i>	0.0020 \pm 0.013	0.043 \pm 0.0006	Principato <i>et al.</i> , 1988
AChE	<i>Seriscrostoma vittatum</i>	0.061 \pm 0.0019	14.706 \pm 1.208	Pestana <i>et.al.</i> , 2014
AChE	<i>Cateta teleata</i>	0.19 \pm 0.02	33.69 \pm 5.5	Gomes <i>et. al.</i> , 2014
AChE	<i>Panulirus argus</i>	0,4292 \pm 0.9372	42.48 \pm 2.037	Este estudio
AChE	<i>Gammarus pulex</i>	106.5 \pm 11.6	50.8 \pm 1.2	Xuereb <i>et.al.</i> , 2007

Tabla 5: Comparación de AChE en diferentes especies de invertebrados con *P. argus*

Monserrat y Bianchini (2001) indican que el valor de IC₅₀ con Eserina también puede utilizarse como un índice de afinidad, a mayor IC₅₀ se tendrá una menor sensibilidad a los sustratos análogos. Al comparar los valores de la langosta con respecto a especies de invertebrados y peces (Tabla 6) se observa que *P. argus* se encuentra a la mitad de la tabla, lo cual implica que tiene una afinidad intermedia a los compuestos análogos como los plaguicidas, existiendo invertebrados con mayor sensibilidad como *Crassostrea rhizophorae* (molusco) y *Callinectes sapidus* (crustáceo) y el pez con menor sensibilidad *Odontesthes argentinensis*.



Organismo		órgano	IC ₅₀	referencia
<i>Callinectes sapidus</i>	Crustáceo	Completo	0.18 (0.16 – 0.21)	Montserrat y Bianchini (2000)
<i>Crassostrea Rhizophorae</i>	Molusco	Completo	0.85 (0.60 – 1.12)	Montserrat y Bianchini (2002)
<i>Panulirus argus</i>	Crustáceo	Músculo	0.06448 (0.01829-0.2273)	Este trabajo
<i>Odontesthes argentinensis</i>	Pez	Completo	0.009 (0.007– 0.01)	Montserrat y Bianchini (2000)

Tabla 6 Afinidad esperada a los plaguicidas de acuerdo al criterio de con los parámetros Km (Fournier y Muero, 1994) utilizando ASChI como sustrato y la IC₅₀ de Eserina (Montserrat y Bianchini, 2001) para diferentes especies crustáceos moluscos y peces.

Debido a la baja concentración con el sustrato BSChI solo se realizó el análisis con el sustrato ASChI para evaluar el efecto de la temperatura. En cuanto a la relación de la actividad de la AChE con la temperatura en cualquiera de los tratamientos (18°, 25°, 30° y 25°-30°) no se registraron diferencias estadísticamente significativas; esto cumple con la hipótesis de este trabajo.

La temperatura del medio ambiente puede tener un efecto significativo en las actividades de colinesterasa, en estudios con diferentes invertebrados como en *Palaemon serratus* (langostino común), se observó que hay una mayor actividad e AChE entre las temperaturas de 20 hasta 42°C; en este mismo estudio Bocquené *et.al.*, (1990) registraron que en el pez, mientras aumentaba la temperatura disminuía la actividad de AChE y concluyeron que la temperatura óptima para la relación con la actividad de AChE es de 20° a 34°C, temperaturas en las que se encuentran los tratamientos a los que fueron expuestos los organismos de *P. argus*. En otros trabajos se reporta que las alteraciones en la actividad varían inversamente con la temperatura de aclimatación (Baslow y Nigrelli, 1964). Por ejemplo, Hogan (1970) dice en su estudio con cerebro de *Lepomis macrochirus* que existe un aumento lineal de AChE según la temperatura del agua, ya que



cuando aumenta de 10 a 20°C, la actividad de AChE se incrementa en un 23%. En el presente trabajo no se registraron diferencias significativas en las actividades presentes en músculo, lo cual indicaría una estabilidad en la actividad de la AChE en las temperaturas estudiadas.

Estudios recientes han demostrado la importancia de caracterizar la actividad de la colinesterasa antes de usarla como un biomarcador debido a las diferencias en su distribución de órganos, el sexo y el tamaño (Flammarion *et al.*, 2002; Rodríguez-Fuentes y Gold Bouchot, 2004; Monserrat, 2006; Tortelli *et al.*, 2006). Por ejemplo, Flammarion *et al.* (2002) reportaron cambios estacionales significativos en la colinesterasa de los peces y también esta actividad se relaciona con la longitud del organismo y otros factores naturales. Mientras Chuiko *et al.* (2003) mencionan una correlación entre la actividad AChE y la longitud de los especímenes pertenecientes a varias especies de peces; en el presente estudio, dado que los organismos utilizados estaban en un intervalo parecido de talla 3.2 a 5.7 cm y peso de 45.2 g a 194.88 g inicial y que la temperatura de aclimatación no tuvo un efecto en estas variables ni en la actividad de AChE, no se observó correlación entre el tamaño y la actividad de la enzima

A pesar de lo anterior es indispensable considerar este tipo de análisis debido a que no se puede generalizar un mismo resultado para todas las especies ni para otras fases del desarrollo de *P. argus* como adultos larvas o puerulos. Esta falta de variación entre la actividad de la ChE con variables como el tamaño simplifica el uso de una especie como bioindicador.

Todo este estudio nos permite tener un panorama más amplio para la conservación del *Panulirus argus* ya que esta langosta representa una de las especies con mayor de importancia económica en el Caribe Mexicano y así poder establecer estudios de biomonitorio futuro ante un escenario de cambio climático.



IX. CONCLUSIONES

- En las juveniles de *P. argus* se observó la presencia una ChE con características típicas de una AChE, una gran afinidad por el sustrato ASChI y muy baja por el BSChI, esta fue inhibida por Eserina y tuvo mayor sensibilidad a BW284C51 sin ningún efecto inhibitorio con Iso-OMPA.
- En los tratamientos de temperatura se presentó una ligera variación en cuanto al peso y longitud de la langosta espinosa del Caribe, pero dichos cambios no fueron significativos entre las diferentes temperaturas de aclimatación.
- Respecto al efecto de la temperatura de aclimatación no se encontró diferencias significativas respecto a la actividad medible de la actividad de la AChE presente en músculo.
- En cuanto a la correlación del peso y la talla con respecto a AChE, no se observó una asociación significativa entre juveniles.



X. REFERENCIAS

Baslow, M.H., Nigrelli, R.F., 1964. The effect of thermal acclimation on brain cholinesterase activity of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Zoologica* 49, 41–51.

Boquené, G., F. Galgani, y P. Truquet, 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 30, 75-89.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.

Briones P, Lozano E, Cabrera M, Arceo P. (1997). Biología y ecología de las langostas (Crustácea: Decapoda: Palinuridae). En: Flores, D. Sánchez, P. Seijo, J y Arreguín, F (Eds.). Análisis y diagnóstico de los recursos pesqueros críticos del Golfo de México. EPOMEX Serie Científica 7, Universidad Autónoma de Campeche, Campeche, pp. 81–99.

Briones Fourzán, P. y Lozano-Álvarez, E. (2001). Effect of artificial shelters (casitas) on the abundance and biomass of juveniles spiny lobster *Panulirus argus* in a habitat-limited tropical reef lagoon. *Marine Ecology Progress Series* 221: 221-232.

Briones Fourzán, P., Castañeda-Fernández de Lara, V., Lozano-Álvarez, E., Estrada-Olivo, J. (2003). Feeding ecology of the three juvenile phases of the spiny lobster *Panulirus argus* in a tropical reef lagoon. *Marine Biology* 142: 855-865.

Briones Fourzán P, Candela J, Lozano-Álvarez E. (2008). Postlarval settlement of the spiny lobster *Panulirus argus* along the Caribbean coast of Mexico: Patterns, influence of physical factors, and possible sources of origin. *Limnol Oceanogr* 53: 970–985.

Brito, R., Diaz-Iglesias, E., Rodriguez, E., Conceicao, R.M., 1991. Metabolismo energético de postlarvas de langosta *Panulirus argus* sometidas a diferentes condiciones experimentales. *Rev. Investig. Mar.* 12 (1–3), 312–322.

Brown, M., Davies, I.M., Moffat, C.F., Redshaw, J. y Craft, J.A (2004). Characterization of cholinesterases and their tissue and subcellular distribution in mussel (*Mytilus edulis*). *Mar. Env. Res.* 57: 155-169.



Butler MJ, Paris C, Goldstein J, Matsuda K, Cowen R. (2011), Behavior constrains the dispersal of long-lived spiny lobster larvae. *Marine Ecology Progress Series* 422:223-37.

Bunter, O., Westaway, C., (1993). Growth rates of juvenile lobsters. *Austasia Aquaculture* 71: 46–49.

Cacciatore L.C., Verrengia G.N, Cochón A.C. (2013), Toxicocinética del metilazinfos e inhibición in vitro de la actividad colinesterásica por metilazinfos-oxón en los invertebrados *Biomphalaria glabrata* y *Lumbriculus variegatus*. *Revista Química Viva* Número 3, año 12: 261-273.

Chávez E.A., 2009, Potential production of the Caribbean spiny lobster (Decapoda, Palinura) fisheries. *Crustaceana* 82, 1393–1412.

Colinas-Sánchez F, Briones-Fourzán P. (1990). Alimentación de las langostas *Panulirus argus* y *P. guttatus* (Latreille, 1804) en el Caribe mexicano. *An. Inst. Cienc. Mar. y Limnol. Univ. Nac. Auton. Mex* .17: 89–109.

Cruz, R., M.E. de León y R. Puga. (1995). Prediction of comercial catches of the spiny lobster *Panulirus argus* in the Gulf of Batabanó. *Fourth International Workshop on Lobster Biology and Management, 1993. Crustaceana* 68 (2): 238-244.

Cruz R, Phillips B (2000). The artificial shelter (pesqueros) used for the spiny lobster (*Panulirus argus*) fisheries in Cuba. In: Phillips BF, Kittaka J (Eds). *Spiny lobsters: fisheries and culture*. Blackwell, Oxford. 400–419.

Díaz Iglesias, E., Brito, R., Báez-Hidalgo, M., (1991). Cría de postlarvas de langosta *Panulirus argus* en condiciones de laboratorio. *Rev. Investig. Mar.* 12 (1–3), 323–331.

Dubber G., Branch G., Atkinson L. (2004). The effects of temperature and diet on the survival, growth and food uptake of aquarium-held postpueruli of the rock lobster *Jasus lalandii*. *Aquaculture* 240: 249–266.

Ehrhardt N.M., (2005). Population dynamic characteristics and sustainability mechanisms in key western central Atlantic spiny lobster, *Panulirus argus*, fisheries. *Bull. Mar. Sci.* 76, 501–525.



Ehrhardt NM. (2008). Estimating growth of the Florida spiny lobster, *Panulirus argus*, from molt frequency and size increment data derived from tag and recapture experiments. Fisheries Research 93: 332-37.

Ehrhardt NM, Puga R, Butler MJ IV (2010). Large ecosystem dynamics and fishery management concepts: the Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, fisheries. In: Fanning L, Mahon R, McConney P (Eds). Towards a marine ecosystem-based management in the wider Caribbean. Amsterdam University Press, Amsterdam, pp. 157 -175.

Ellman, G., Courtney, K., Andres, J. y Featherstone, R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7: 88-95.

FAO. 2006. Informes nacionales presentados al quinto taller regional sobre la evaluación y la ordenación de la Langosta común del Caribe. 19-29 de septiembre 2006. Mérida, Yucatán, México. Informe de Pesca 826 fie/R826(Bi)

Flammarion, P., Noury, P., Garric, C. (2002). The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. Env.Pollut. 120(2):325-330.

Florey, E., Hoyle, G., (1976). The effects of temperature on a nerve-muscle system of the Hawaiian ghost crab, *Ocypode ceratophthalma* (Pallas). J. Comp. Physiol. A Neuroethol.Sens. Neural. Behav. Physiol. 110 (1), 51–64.

Fourier, D. y Muero, A. (1994) Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. Comp. Biochem. Physiol. 108C:19-31.

Gomes I.D.L., Lemos M. F. L., Soares A., Barata C., Faria M. (2014) The use of cholinesterase as potential biomarker: In vitro characterization in the polychaete *Capitella teleta*. Marine Pollution Bulletin 85:179–185.

González-Cano, J.M. (1991). Migration and refuge in the assessment and management of Spiny Lobster *Panulirus argus* in the Mexican Caribbean. Ph.D. Thesis. Imperial College. University of London. UK. 448pp.

González, M., Perelman, A., Fuentes, M., Castilla, J., Labarca, R., Brandan, E., González-Plaza, R., Inestriza, N. (1990). Neurotransmitter-related enzyme acetylcholinesterase in juveniles of *Choncholepas concholepas* (Mollusca; Gastropoda; Muricidae). J. Exp. Zool. 255: 1-18.

GraphPad PRISM versión 6.00 (GraphPad Software, Inc., USA). VI.3.



Habig, C., Di Giulio, R.T. y Abou-Donia, M., (1988). Comparative properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*) acetylcholinesterase. *Comp. Biochem. Physiol.* 91C: 293-300.

Hartnoll, R.G., (1982). Growth. In: *The Biology of Crustacea*. Bliss, D.E. _Ed., Embryology, Morphology and Genetics 2 Academic Press, pp. 111–196.

Herrera Coyac G. (2010). Caracterización de las colinesterasas presentes en diferentes etapas de desarrollo del pez cebrá (*Danio rerio*) y el efecto de los plaguicidas organofosforados Clorpirifos y Fentión. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas Departamento de Farmacia. 2

Herrera Salvatierra N. (2011). Caracterización del estado fisiológico-inmunológico de los juveniles de la langosta espinosa *Panulirus argus* infectados naturalmente con el virus PaV1. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México unidad Sisal, Yucatán. 1-3

Hogan, J.W., (1970). Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 5, 347–353.

Holthius, L. B. (1991). *Marine lobsters of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries known to date.* FAO Fish. Synopsis No. 125, Vol. 13. 292pp.

Huchin-Mian, J.P. (2013). Prevalencia de *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1) en el Caribe mexicano y evaluación del efecto patogénico, inmunológico y fisiológico en langostas *Panulirus argus*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional, unidad Mérida. Departamento de Recursos del Mar. 3-7.

Jeffries, H.P., (1966). Partitioning of the estuarine environment by two species of cancer. *Ecology* 47 (3): 477–481.

Key, P.B. y Fulton, M.H. (2002). Characterization of cholinesterase activity in tissues of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Pest. Biochem. Physiol.* 72: 186-192.

Kivivuori, L., (1983). Temperature acclimation of walking in the crayfish *Astacus astacus*. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* 75 (3): 375–378.

Lehninger, A. (1978) *Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular.* 2a edición. Ediciones Omega Barcelona 500 pp.



Leticia, A.G., Gerardo, G.B., 2008. Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71 (3), 787–797.

Lewis L. y Ayers J., (2014). Temperature preference and acclimation in the Jonah Crab, *Cancer boreali*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 455: 7–13.

Ley-Cooper K., De Lestang S., Phillips B. F., Lozano-Álvarez E. (2013). Estimates of exploitation rates of the spiny lobster fishery for *Panulirus argus* from tagging within the Bahía Espíritu Santo ‘Sian Ka’an’ Biosphere Reserve, Mexican Caribbean, *Marine Biology Research*, 9:1, 88-96.

Lozano Álvarez, E., Briones Fourzán, P. Ramos Aguilar, M. (2003). Distribution, shelter fidelity and movements of subadult spiny lobster (*Panulirus argus*) in areas with artificial shelters (casitas). *Journal of Shellfish Research*. 22(1):533-540.

Madeira D., Narciso L., Cabral H., Diniz M. S., Vinagre C. (2012). Thermal tolerance of the crab *Pachygrapsus marmoratus*: intraspecific differences at a physiological (CTMax) and molecular level (Hsp70). *Cell Stress and Chaperones* 17:707–716.

McLeese, D. y Wilder, D. (1958). The activity and catchability of the lobster (*Homarus americanus*) in relation to temperature. *J. Fish. Board Can.* 15(6), 1345–1354.

Montserrat, J.M. y Bianchini, A. (2000) Methodological and biological aspects to be considered in acetylcholinesterase reactivation assays using 2-PAM. *Env. Tox. Pharm.* 9:1-2:39-47.

Montserrat, J.M. y Bianchini, A.(2001) Anticholinesterase effect of eserine (Physostigmine) in fish and crustacean species. *Braz.Arch.Biol.Techn.* 44:63-68.

Montserrat, J.M., Bianchini, A., Bairy, A.C.D. (2002). Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Mar. Env. Res.* 54: 3-5: 781-785.

Montserrat, J. M.; Martínez, P. E.; Geracitano, L. A.; Amado, L L.; Martins, C. M. G.; Pinho, G. L. L.; Chaves, I. S.; Ferreira-Cravo, M.; Ventura-Lima, J.; Bianchini, A.(2006) Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146 221–234.



Mora, P., Fournier, D., Narbonne, J.F. (1999). Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller. Comp. Biochem. Physiol. 122C: 353-361.

Noyola J., Mascaro M., Cammal-Monsreal C., Noreña-Barroso E., Diaz F., Re D., Sánchez A., Rosas C. (2013). Effect of temperature on energetic balance and fatty acid composition of early juveniles of *Octopus maya*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 445: 156–165.

Payne, J., Mathieu, A; Melvin, W. y Fancey, L. (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future?. Field trials in association with two urban rivers and paper mill in Newfoundland. Mar. Poll. Bull. 32:2: 225-231.

Pestana J. L. T., Novais S. C., Lemos M. F. L., Soares A. (2014). Cholinesterase activity in the caddisfly *Sericostoma vittatum*: Biochemical enzyme characterization and in vitro effects of insecticides and psychiatric drugs. Ecotoxicology and Environmental Safety 104: 263–268.

Perera E., Diaz-Iglesias E., Fraga I., Galich G. (2007). Effect of body weight, temperature and feeding on the metabolic rate in the spiny lobster *Panulirus argus* (Latreille, 1804) Aquaculture 265: 261–270.

Phillips BF, Cobb JS, George RW. (1980). General biology. En: Cobb JS, Phillips BF (Eds). The biology and management of lobsters, Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 1–82.

Phillips BF, Melville-Smith R. (2006). *Panulirus* Species. En: Phillips BF (Ed). Lobsters: biology, management, aquaculture and fisheries. Blackwell, Oxford, pp. 359–384.

Porter L (2004). The microbiology and pathology of shell disease in the Florida spiny lobster, *Panulirus argus* with a comparison to shell disease in the American lobster, *Homarus americanus*. Ph.D. Dissertation. The Florida State University, Tallahassee, 133pp.

Principato, G.B., Ambrosini, M.V., Liotti, F.S. (1981). Propionylcholinesterase in *Hirudo medicinalis*: purification, partial characterization and comparative study with a mammalian acetylcholinesterase. Comp. Biochem. Physiol. 70C: 209-213.

Principato., G, Talesa, V., Giovanni, R., Pascolini, R., y Rosi, G. (1988). Characterization of the soluble cholinesterase from *Squilla mantis*. Comp. Biochem. Physiol. 90C: 413-420.



Ríos-Lara, G.V. (2009). Identificación del hábitat y de los factores que determinan la distribución espacial de langosta en la plataforma de Yucatán: Modelación y evaluación de la población. Tesis de Doctorado. CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida. IPN. México. 155p

Rodríguez Fuentes G., Gold-Bouchot G. (2004). Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Marine Environmental Research 58, 505-509.

Rodríguez Fuentes G. (2005). Caracterización de las colinesterasas en diferentes órganos de la tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*): Aplicación para Ecotoxicología. Tesis de Doctorado en Ciencias Marinas, Departamento de Recursos del Mar, Cinvestav Unidad Mérida. 3-17.

Rodríguez Fuentes, G., Armstrong, J., Schlenk, D., (2008). Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in southern California. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69 (3): 466–471.

Salas S, Bello-Pineda J, Ríos GV, Cabrera MA, Solís R, Santamaría A. (2005). Programa maestro del sistema producto de la pesquería de langosta en Yucatán. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca y Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, Mérida, Yucatán. 134pp.

Serfling S. A. y Ford R.F. (1975). Laboratory culture of juvenile stages of the California spiny lobster *Panulirus interruptus* (randall) at elevated temperatures. Aquaculture, 6: 377-367.

Silver, A. (1974). The biology of cholinesterases. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.

Srain B. y Rudolph A. (2010). Acetylcholinesterase activity, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the clam *Semele solida*: Can this species be used as a bioindicator? Revista de Biología Marina y Oceanografía 45,2: 227-233.

Sturm, A., da Silva de Assis, H.C., Hansen, P. D. (1999). Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. Mar. Env. Res. 47: 389-398.

Talesa, V., Contenti, S. Principato, G., Pascolini, R., Giovanni, E., Rosi, G. (1992) Cholinesterases from *Maia verrucosa* y *Palinurus vulgaris*: A comparative study. Comp.Biochem. Physiol. 101 C:499pp.



Thomas C.W., Crear B.J., Hart P.R., (2000). The effect of temperature on survival, growth, feeding and metabolic activity of the southern rock lobster, *Jasus edwardsii*. *Aquaculture* 185: 73–84.

Walker, C. H. y Thompson, H. M. (1991). Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases. In *Cholinestease-Inhibiting Insecticides, Chemicals in Agriculture, Vol. 2* (P. Mineau, ed.), pp. 1-17. Elsevier, Amsterdam.

Xuereb, B., Noury, P., Felten, V., Garric, J., Geffard, O. (2007). Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicology* 236, 178–189.

Young, J.S., Peck, L.S., Matheson, T., (2006). The effects of temperature on walking and righting in temperate and Antarctic crustaceans. *Polar Biol.* 29 (11), 978–987.



XI. Anexos

- **Determinación de Colinesterasas (método de Ellman, 1961)**

Preparación de Colinesterasas

Solución DNTB/Tris pH7.4

1. Pesar 0.758g de Buffer Tris pH7.4
2. Disolver en agua destilada y aforar a 100ml
3. Pesar 0.0099g de DTNB
4. Disolver en la solución Bufer Tris pH7.4 y aforar a 100ml

Solución de Ioduro de Acetilcolina (ASChI) 20mM

1. Pesar 0.0578g de ASChI
2. Disolver en agua destilada y aforar a 10ml

Solución de Ioduro de Butirilcolina (BSChI) 20mM

1. Pesar 0.0634g de BSChI
2. Disolver en agua destilada y aforar a 10ml

Método

1. Descongele el tubo que contiene el homogeneizado
2. Coloque en una placa de 96 pozos 180 μ l de la solución DTNB/Bufer Tris pH 7.4 o reactivo de Ellman, 10 μ l del homogeneizado
3. Agitar en una balanza de agitación para mezclar todo
4. Antes de iniciar la lectura agregar 10 μ l del sustrato
5. Leer la absorbancia en un lector de placas 405nm por 1 min utilizando el módulo de cinética. Obtener parámetro $\Delta A/min$



Preparación del buffer de homogeneización

1. Pesar 0.78 g de Trizma pre-set crystals pH 8.0 (Tris [hidroximetil] aminometano y Tris-HCl, con una concentración final de 0.05M (0.78 g en 100 ml de agua destilada) 2. Pesar 0.0292g de EDTA (1mM) 3. Disolver el Tris pH 8.0 en 80 ml de agua destilada 4. Agregar EDTA y esperar a completa disolución 5. Agregar 1 ml de Triton (1%) en agitación lenta 6. Dejar reposar la mezcla hasta desaparición de burbujas y aforar a 100 ml con agua destilada.

Preparación del buffer de Extracción

1. Pesar 1.895g de Tris [hidroximetil] aminometano pH 7.4 (0.05M). 2. Pesar 0.0248g de 5.5' Ditiobis (2- ácido nitrobenzónico) (DTNB) 3. Disolver y aforar el Tris pH 7.4 en 250 ml de agua destilada 4. Disolver 0.0248g de DTNB en el buffer Tris pH 7.4 con agitación lenta, agregar al matraz de buffer Tris y aforar con agua destilada si lo requiere.