



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

BIOMARCADORES EN MÚSCULO DE *Gambusia yucatanana* PARA LA EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS, EN CUERPOS DE AGUA DE YUCATÁN, MÉXICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
(Química Acuática)

PRESENTA:
QFB. Anita Arroyo Silva

Director de tesis: Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes.
Facultad de Química, Unidad de Química en Sisal, Yucatán

Comité Tutor:

Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez
Facultad de Ciencias, UNAM

Dra. Flor Árcega Cabrera
Facultad de Química, Unidad de Química en Sisal, Yucatán

Dr. Miguel Betancourt Lozano
CIAD, Mazatlán

Dra. Elsa Noreña Barroso
Facultad de Química, Unidad de Química en Sisal, Yucatán

Sisal, Yucatán, Febrero 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



BIOMARCADORES EN MÚSCULO DE *Gambusia yucatanana* PARA LA EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS, EN CUERPOS DE AGUA DE YUCATÁN, MÉXICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

(Química Acuática)

PRESENTA:

QFB. Anita Arroyo Silva

Director de tesis: Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes.
Facultad de Química, Unidad de Química en Sisal, Yucatán

Comité Tutor:

Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez
Facultad de Ciencias, UNAM

Dra. Flor Árcega Cabrera
Facultad de Química, Unidad de Química en Sisal, Yucatán

Dr. Miguel Betancourt Lozano
CIAD, Mazatlán

Dra. Elsa Noreña Barroso
Facultad de Química, Unidad de Química en Sisal, Yucatán

Sisal, Yucatán, Febrero 2018

“Life moves fast. As much as you
can learn from your history, you
have to move forward”

Eddie Vedder

A mí Padres

A mis hermanas

A mis sobrinos

A Óscar de Lázaro “Nos vemos en las olas”

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar quiero agradecer a la ilustre Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por otorgarme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

A los programas de apoyo UNAM-DGAPA-PAPIIT y PAIP de la Facultad de Química de la UNAM por el financiamiento del proyecto (IA 202416), en el cual se inserta el trabajo de investigación de esta Tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría.

A la Unidad de Química Sisal por otorgar el espacio, equipo y materiales requeridos durante el procesamiento y evaluaciones fisiológicas del presente trabajo de investigación.

Un reconocimiento especial a cada uno de los integrantes del jurado y a mi directora de Tesis, por enriquecer con sus conocimientos y enseñanzas a este proyecto y a mi formación académica, muchas gracias por guiarme en el camino correcto:

A la Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes, mi eterno y profundo agradecimiento por ser fuerte pilar en mi formación, por su guía y dirección para la elaboración de esta Tesis, así como por el enorme apoyo, confianza, invaluable consejos, por su infinita paciencia, conocimientos y experiencias compartidas, ha sido un gran honor.

A la Dra. Elsa Noreña Barroso por su apoyo y guía en el trabajo de laboratorio para la cuantificación de hidrocarburos poliaromáticos, así como por su tutoría, consejos y experiencias vividas, por preocuparse por todos en el laboratorio.

A la Dra. Flor Arcega Cabrera por el tiempo dedicado en tutorías, por su interés, por compartir sus conocimientos y enseñanzas para el enriquecimiento de esta Tesis de Maestría.

A la Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez por mostrar gran interés y disposición para orientar, corregir y aportar con sus conocimientos, la elaboración de esta Tesis.

Al Dr. Miguel Betancourt Lozano por la disposición, el tiempo, el interés, sus sugerencias y consejos durante la elaboración de mi Tesis.

A Fernando Mex e Ismael Ocegüera, por el apoyo dedicado en las salidas a campo.

Agradezco al Dr. Edlin Guerra Castro por brindarme asesoría y consejos en el uso de programas y análisis estadísticos. También a la M.C Karla Susana Escalante

Herrera, por facilitar el uso del laboratorio central para el análisis de biología molecular.

Mi agradecimiento especial a Óscar de Lázaro López por su infinito apoyo, por escucharme, animarme, por su paciencia, por enseñarme que la distancia no significa nada, por su amor y comprensión, por motivarme a ser mejor cada día y compartir tanto conmigo; gracias por mucho, por quedarte y ser mi cómplice, has cambiado mi mundo.

A mi familia Sisaleña en especial a Lily por su confianza y aceptar el reto de vivir con mi locura, a Andrés por tu apoyo, por la divertida convivencia y que a pesar de los esfuerzos por no querer ser amigos, hoy en día seguimos apoyándonos, a mi querido amigo Martín por llegar en el momento indicado, por cuidarme y apoyarme cuando lo necesite por las risas, lágrimas y tragos amargos.

A mis amigos que iniciaron este camino conmigo Jazmín Aristeo por siempre tener una sonrisa para todos y ser ejemplo de que cuando se quiere se puede, a Vladimir, Esteban, Vero, Pas y Mariana, gracias por tantas divertidas experiencias y abrirme las puertas de su vida.

A mi mejor amiga Yadira Esther, que a pesar de tener caminos tan distintos sigue estando presente en cada logro y paso que doy, por su infinito apoyo y consejos, gracias por tanto apoyo y cariño "Jacy".

A mis padres Gaspar y María de la Luz, por ser ejemplos, por darme las herramientas necesarias para defenderme en la vida, por darme valores y educación, por su enorme apoyo, por sacarnos adelante a pesar de las circunstancias, por su amor infinito.

A mis amadas hermanas Angie, Loli, Lety, Nay y mi hermano Gabriel, por la unidad, el apoyo y el cariño, por sus consejos, por las alegrías y por sacar adelante todos juntos eventos desafortunados que han ocurrido en nuestra familia.

A mis sobrinos, Joss, Vale, Angelito y Maty que no me olvidan aunque me encuentro lejos, por tener el poder de alegrar el día con sus sonrisas.

Jamás encontraré la forma de agradecer el constante apoyo y confianza que me han sido depositados, sólo espero que comprendan con estas breves palabras que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes.

"De momentos breves, nacen recuerdos infinitos"

RESUMEN

En la Península de Yucatán (PY) el agua subterránea es la principal fuente para consumo, actividades agrícolas y tûristicas. Las características kársticas del suelo contribuyen a la movilización de contaminantes desde el suelo hacia el acuífero, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) los cuales son altamente persistentes y con potencial carcinogénico. Este estudio, tuvo por objetivo evaluar la variación espacio-temporal de algunos biomarcadores y su relación con la presencia de PAHs medidos en agua y sedimento de cenotes ubicados a lo largo de PY para el año 2015. Se evaluaron biomarcadores de contaminación asociados a la biotransformación (actividad enzimática de glutati3n-S-Transferasa GST, expresi3n de CYP1A, contenido de glutati3n total (GSH)); al estr3s oxidante (contenido de lípidos peroxidados LPO) y de efecto neurotóxico (Acetilcolinesterasa AChE), en músculo de peces de la especie *Gambusia yucatanana*. En este análisis se determinó CYP1A mediante RT-PCR tiempo real, GST, AChE, contenido de Glutati3n y LPO por espectrofotometría; asimismo se determinó la concentraci3n de PAHs en agua y sedimento por extracci3n en fase s3lida medidas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Los resultados obtenidos clasificaron dos grupos de cenotes de acuerdo a sus variables ambientales (A: zona central, B: cenotes cercanos a la costa), los cenotes del grupo B presentaron mayor porcentaje de materia orgánica. Se presentó variaci3n espacio-temporal tanto en la concentraci3n de PAHs como en la respuesta de biomarcadores. La concentraci3n de PAHs en sedimento fue más alta en la época de secas (hasta 94.75ng/g; E22), mientras que PAHs en agua fue más alta en la época de lluvias (hasta 12.07ng/L; E10). PAHs de APM (alto peso molecular) predominaron en sedimentos en época de secas y PAHs de BPM (bajo peso molecular) predominaron en agua en época de lluvias. Se presentó una mayor inhibici3n de AChE, expresi3n de CYP1A, actividad de GST en secas, y para lluvias el contenido de GSH disminuyó y LPO aumentó. Con el análisis de respuesta integrada de biomarcadores (IBR), de componentes principales (PCA), redundancia (RDA) y de agrupamiento por similitud se estableció una diferencia espacio-temporal en la respuesta conjunta de biomarcadores, donde la temporada de secas tiene la mayor variaci3n, que es explicada por la respuesta de los biomarcadores CYP1A, LPO y AChE, principalmente dado por los cenotes E10 Y E22, con el RDA se determinó que los PAHs de BPM tienen una mayor relaci3n en la respuesta de los biomarcadores CYP1A, GST y GSH, el oxígeno disuelto presentó la misma respuesta con GST, AChE y LPO. Los grupos conformados en los dendogramas de acuerdo a su similitud en la respuesta de biomarcadores en relaci3n con PAHs y variables ambientales indican que E22 y E10 presentaron mayores condiciones desfavorables en la respuesta de sus biomarcadores en comparaci3n del resto. En conclusi3n, aquellos sitios que presentaron una mayor concentraci3n de PAHs totales (agua y sedimento) presentaron una mayor expresi3n de CYP1A, actividad enzimática de GST e inhibici3n de AChE y aunque no de forma significativa una tendencia al aumento en LPO y disminuci3n de GSH, lo que indica que las *Gambusias* de los cenotes E22 y E10 presentan un mayor efecto por PAHs, la temporalidad es un factor importante que incide en la respuesta de los organismos; para el resto de los cenotes la respuesta en sus biomarcadores se ve influenciada por la presencia de otros contaminantes y por las características fisicoquímicas de cada cuerpo de agua. Las diferentes respuestas de los biomarcadores en el espacio y el tiempo son evidentes en los diferentes cuerpos de agua, lo que significa que la contaminaci3n no es homogénea, esto refleja no sólo diferentes orígenes, sino diferentes intensidades y posibles interacciones de otros contaminantes. Con estos resultados se confirma al pez *G.yucatanana* como especie modelo para el monitoreo de contaminaci3n, así como el empleo del músculo para la determinaci3n de cada biomarcador, promoviendo el empleo de diversos tejidos para futuras evaluaciones de contaminaci3n.

Tabla de Contenido

I. INTRODUCCIÓN	13
II. ANTECEDENTES	16
II.1 ECOTOXICOLOGÍA.....	16
II.2 HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICÍCLICOS (PAHs).....	18
II.3 BIOMARCADORES.....	24
II.3.1 CITOCROMO P450 1A/ CYP1A.....	27
II.3.2 ESTRÉS OXIDANTE.....	33
II.3.4 COLINESTERASA.....	41
III. ZONA DE ESTUDIO	44
III.I Cenotes muestreados.....	47
IV. ORGANISMO DE ESTUDIO	51
V. JUSTIFICACIÓN	54
VI. HIPÓTESIS	55
VII. OBJETIVOS	56
VII.1 OBJETIVO GENERAL.....	56
VII.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	56
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Obtención de muestras.....	57
2. Determinación de Materia Orgánica.....	58
3. Granulometría.....	58
4. Determinación de la concentración de hidrocarburos en agua y sedimentos.....	59
4.1 Extracción de Hidrocarburos en sedimento por medio de fase sólida/ultrasonido.....	59
4.2 Hidrocarburos en Agua (Sistema vaccum para extracción en fase sólida).....	61
5. Determinación de Biomarcadores.....	63
5.1 Determinación de CYP1A.....	63
5.1.1 Extracción de RNA.....	63
5.1.3 Cuantificación de RNA.....	63
5.1.4 Retrotranscripción a cDNA.....	63
5.1.5 Q-PCR (PCR tiempo real).....	64
5.2 Determinación de Acetilcolinesterasa (AChE).....	65
5.3 Determinación de Glutatión -S- Transferasa (GST).....	66

5.4 Determinación de Glutación total.	66
5.5. Determinación de Lípidos Peroxidados (LPO).	68
6. Análisis Estadístico.....	70
IX. RESULTADOS	72
1. Variables Ambientales.....	72
2. Materia Orgánica y Granulometría.	76
3. Concentración de Hidrocarburos en sedimento.	78
3.1 Posible origen de PAHs.....	81
3.2 Hidrocarburos alifáticos en sedimentos.	85
4. Concentración de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en agua.	87
5. Correlaciones entre PAHs, materia orgánica y grano fino.....	90
6. Biomarcadores (Respuestas Biológicas)	91
6.1 Expresión de CYP1A	93
6.2 Actividad enzimática de GST	95
6.3 Contenido de Glutación total.....	96
6.4 Contenido de Lípidos peroxidados (LPO).....	97
6.5 Inhibición de AChE.	98
7. Análisis de Resultados	99
7.1. IBR (Respuesta integrada de biomarcadores)	99
7.2 Relación de variables ambientales, PAHs y respuestas bioquímicas en músculo de <i>Gambusia yucatan</i> a.....	105
7.3 Dendrogramas de similitud.....	107
X. DISCUSIÓN	109
XI. CONCLUSIONES	122
XII. RECOMENDACIONES	125
XIII. REFERENCIAS	126
XIV. ANEXOS	142
ANEXO I: Morfometría de peces colectados en los sitios de muestreo y grupo control. 142	
ANEXO II. Protocolo de Extracción de RNA con GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit #030M6040.....	145
ANEXO III. Protocolo para la Cuantificación de RNA mediante espectrofotómetro Nanodrop 2000c.....	146
ANEXO IV: Protocolo de retrotranscripción con cDNA síntesis iScript™ Kit de 170-8890. 147	

ANEXO V. Protocolo para determinar actividad AChE por método de Ellman.....	147
ANEXO VI. Protocolo contenido de proteínas por Bradford.....	148
ANEXO VII. Protocolo para actividad enzimática de GST (kit Sigma CS04).....	149
ANEXO VIII. Protocolo para determinar Glutación Total (kit Sigma CA0260).	150
ANEXO IX. Protocolo para determinar Lípidos Peroxidados por método FOX (kit peroxidetect Sigma).	152
ANEXO X. Curva de calibración de Sedimentos.....	154
ANEXO XI. Determinación de Materia orgánica por método Walkley-Black	157
ANEXO XII. Scatter Plots Correlacion de PAHs, MO y Granos finos.....	158
ANEXO XIII. Análisis de Grupo Control	160
ANEXO XIV. Análisis de Biomarcadores entre Sexo y Longitud.....	162
ANEXO XV. Análisis De Componentes Principales. (Biomarcadores)	169
ANEXO XVI. Análisis de variables ambientales, PAHs y respuestas bioquímicas en <i>G. yucatanana</i>	170
ANEXO XVII. Análisis de Redundancia (relaciones entre variables).....	175

Lista de Figuras.

FIGURA 1. ECOTOXICOLOGÍA. LA ECOTOXICOLOGÍA ESTUDIA EL DESTINO Y LOS EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES EN LOS ECOSISTEMAS, INTENTANDO EXPLICAR LAS CAUSAS Y PREVER LOS RIESGOS PROBABLES.....	17
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN DE PAH'S EN EL MEDIO AMBIENTE.....	19
FIGURA 3. RELACIÓN ENTRE LOS PRINCIPALES CONTAMINANTES Y BIOMARCADORES (ADAPTADO DE NARBONNE Y MICHEL, 1993).....	26
FIGURA 4. METABOLISMO DE UN XENOBIÓTICO AL INGRESAR A LA CÉLULA.	26
FIGURA 5. INDUCCIÓN GENERAL DE CYP1A1: LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALIZACIÓN AHR. BIOTRANSFORMACIÓN DE PAHs POR CYP1A1 (FASE I), CONJUGACIÓN (FASE II) MEDIADA POR GLUTATION- S- TRANSFERASA (GST).	31
FIGURA 6. ESQUEMA DE ÓXIDO- REDUCCIÓN DE UN XENOBIÓTICO.	34
FIGURA 7. SITIO DE ACCIÓN DE LAS PRINCIPALES DEFENSAS ANTIOXIDANTES Y PRINCIPALES CONSECUENCIAS TOXICOLÓGICAS.....	35
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA REGULACIÓN NRF2 Y KEAP1 BAJO CONDICIONES BASALES Y EN RESPUESTA A ESTRÉS OXIDANTE. TOMADO DE REGOLI, 2014	37
FIGURA 9. CONJUGACIÓN DE LA GLUTATIÓN CATALIZADA POR GST	38
FIGURA 10. METABOLISMO DE GLUTATIÓN: GENERADO EN CITOPLASMA.	39
FIGURA 11. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.	40
FIGURA 12. LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES DE ACETILCOLINA Y ESTOS SON HIDROLIZADOS POR LA ENZIMA AChE.....	42
FIGURA 13. BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA AChE, SE OBSERVA ACUMULACIÓN DE ACETILCOLINA.	42
FIGURA 14. MAPA DEL ESTDO DE YUCATÁN, CON SU UBICACIÓN EN LA REPÚBLICA MEXICANA, EN EL QUE SE SEÑALAN LOS CENOTES MUESTREADOS.	46
FIGURA 15. FOTOGRAFÍA DE CENOTE E6. A: TEMPORADA DE SECAS, B: TEMPORADA DE LLUVIAS.....	47
FIGURA 16. FOTOGRAFÍA DE CENOTE E9. A: TEMPORADA DE SECAS, B: TEMPORADA DE LLUVIAS.....	47
FIGURA 17. FOTOGRAFÍA DE CENOTE E10. A: TEMPORADA DE SECAS, B: TEMPORADA DE LLUVIAS.....	48
FIGURA 18. . FOTOGRAFÍA DE CENOTE E13. A: TEMPORADA DE SECAS, B: TEMPORADA DE LLUVIAS.....	48
FIGURA 19. FOTOGRAFÍA DE CENOTE E19. A: TEMPORADA DE SECAS, B: TEMPORADA DE LLUVIAS.....	49
FIGURA 20. FOTOGRAFÍA DE CENOTE E19. A: TEMPORADA DE SECAS, B: TEMPORADA DE LLUVIAS.....	49
FIGURA 21. FOTOGRAFÍA DE CENOTE E25. A: TEMPORADA DE SECAS, B: TEMPORADA DE LLUVIAS.....	50
FIGURA 22. GAMBUSIA YUCATANA "PEZ MOSQUITO"	51
FIGURA 23. GAMBUSIA YUCATANA: DIMORFISMO SEXUAL.....	52
FIGURA 24. DISTRIBUCIÓN DE GAMBUSIA YUCATANA	53
FIGURA 25. SISTEMA VACUMM PARA SPE	61
FIGURA 26. CARGA DE MUESTRAS DE AGUA EN EL SISTEMA DE VACÍO.....	62
FIGURA 27. ECUACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE AChE.	65
FIGURA 28. REACCIÓN ENZIMÁTICA DE LA GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA	66
FIGURA 29. ECUACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE GST. DONDE DIL= FACTOR DE DILUCIÓN DE LA MUESTRA Y E_{MM} ES EL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN DEL CDNB 9.6.Mm ..	66
FIGURA 30. REACCIÓN PARA LA FORMACIÓN DE TNB	67
FIGURA 31. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE GLUTATIÓN TOTAL A PARTIR DE CONCENTRACIONES CONOCIDAS. ECUACIÓN EMPLEADA PARA OBTENER LAS CONCENTRACIONES PARA MUESTRAS CON VALOR DE CORRELACIÓN R² DE 0.999.	67
FIGURA 32. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ESTÁNDAR TBOOH. ECUACIÓN EMPLEADA PARA OBTENER LOS NMOLES PRESENTES EN MUESTRAS CON VALOR DE CORRELACIÓN R² DE 0.99	68
FIGURA 33. DIAGRAMA DE TRABAJO PARA BIOMARCADORES.....	69

FIGURA 34. VARIACIÓN ESPACIO TEMPORAL DE VARIABLES AMBIENTALES REGISTRADAS EN LOS SITIOS MUESTREADOS, A: TEMPERATURA, B: PH, C: OXÍGENO DISUELTOS, D: POTENCIAL OXIDO-REDUCCIÓN, E: CONDUCTIVIDAD, F: SALINIDAD, G: SÓLIDOS DISUELTOS TOTALES.	74
FIGURA 35. A. MAPA DE YUCATÁN CON CENOTES DE ESTUDIO. B. DENDOGRAMAS DE CENOTES POR SUS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS. SECAS, LLUVIAS. GRUPO A: ZONA CENTRAL DE ANILLO DE CENOTES, GRUPO B: CENOTES CERCANOS A LA COSTA.	75
FIGURA 36. PORCENTAJE DE GRANO PARA SEDIMENTOS DE CENOTES MUESTREADOS EN LA PENÍNSULA YUCATÁN EN EL AÑO 2015.	76
FIGURA 37. VARIACION TEMPORAL DEL PORCENTAJE DE MATERIA ORGANICA TOTAL PRESENTE EN CENOTES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN EN EL AÑO 2015.	77
FIGURA 38. VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (NG/G) MEDIDOS EN SEDIMENTOS DE CENOTES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN EN 2015.	79
FIGURA 39. VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (NG/G). APM: ALTO PESO MOLECULAR, BPM: BAJO PESO MOLECULAR, MEDIDOS EN SEDIMENTOS DE CENOTES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN EN 2015.	80
FIGURA 40. ANILLO DE CENOTES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN, UBICACIÓN DE CENOTES MUESTREADOS EN ZONAS EN FUNCIÓN DEL APROVECHAMIENTO DEL AGUA Y GENERACIÓN DE DESCARGAS AL ACUÍFERO. MODIFICADO DE COTASMEY, 2012.	82
FIGURA 41. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE RELACIONES DEL ÍNDICE MOLECULAR. A: FLA/FLA+PYR CON BAA/BAA+CRIS. B: FLUOR/PYR CON CRIS/BAA; EN SEDIMENTOS DE CENOTES DE LA PY, PROMEDIO DE AMBAS TEMPORADAS, 2015.	84
FIGURA 42. VARIACIÓN ESPACIO TEMPORAL DE CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS TOTALES MEDIDOS EN SEDIMENTOS.	85
FIGURA 43. VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (NG/L) MEDIDOS EN AGUA DE CENOTES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN EN 2015.	88
FIGURA 44. VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (NG/L). APM: ALTO PESO MOLECULAR, BPM: BAJO PESO MOLECULAR, MEDIDOS EN AGUA DE CENOTES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN EN 2015.	89
FIGURA 45. MAPA DE CENOTES MUESTREADOS DONDE SE REPRESENTAN LOS SITIOS CON MAYOR CONCENTRACIÓN DE PAHs DE APM, BPM Y SU VARIACIÓN TEMPORAL PARA 2015. A: SECAS, B: LLUVIAS.	90
FIGURA 46. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%, DONDE SE PUEDE OBSERVAR DOS BANDAS DEFINIDAS EN MÚSCULO A: SECAS, B: LLUVIAS. MUESTRAS AL AZAR.	91
FIGURA 47. qPCR. CÁLCULO DE LA EFICIENCIA EN LA FASE EXPONENCIAL.	92
FIGURA 48 CURVA DE EFICIENCIA: SE CALCULÓ A PARTIR DE UNA SERIE DE DILUCIONES DE cDNA DE MÚSCULO. RELACIÓN LINEAL $R^2=0,978$ PARA CYP, Y $R^2=0,971$ PARA B-ACTINA.	92
FIGURA 49. CURVAS MELTING DE A: CYP1A, Y B: B-ACTINA.	93
FIGURA 50. qPCR Y CURVA MELTING DE CYP1A Y B-ACTINA OBTENIDAS PARA TODAS LAS ESTACIONES. NO SE OBSERVA FORMACIÓN DE DÍMEROS EN LAS CURVAS MELTING.	93
FIGURA 51. VARIACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE EXPRESIÓN RELATIVA DE CYP1A, USANDO B-ACTINA DE GEN DE REFERENCIA OBTENIDA PARA CENOTES DE LA PY EN 2015. GRÁFICO DE ESTRELLA PARA CYP1A, POR SITIO Y TEMPORADA (RESULTADO DE IBR). ANOVA PRESENTA MEDIANAS Y RANGOS INTERCUATILES, * DIFERENCIA SIGNIFICATIVA RESPECTO AL CONTROL ($P<0.05$).	94
FIGURA 52. VARIACIÓN ESPACIO TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD PROMEDIO DE LA ENZIMA GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA (UMOL/MIN/MG) EN <i>G. YUCATANA</i> , EN UN CICLO ANUAL (2015). GRÁFICO DE ESTRELLA PARA GST, POR SITIO Y TEMPORADA (RESULTADO DE IBR) INTERVALOS DE CONFIANZA DEL 95%. EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE CENOTES ($P<0.05$). * RESPECTO A TEMPORADA.	95

FIGURA 53. VARIACIÓN ESPACIO TEMPORAL DE GLUTATION TOTAL (NMOL/MG) EN <i>G. YUCATANA</i> , EN UN CICLO ANUAL (2015). GRÁFICO DE ESTRELLA PARA GT, POR SITIO Y TEMPORADA (RESULTADO DE IBR) INTERVALOS DE CONFIANZA DEL 95%.....	96
FIGURA 54. VARIACIÓN ESPACIO TEMPORAL DE LÍPIDOS PEROXIDADOS (NMOL/MG) EN <i>G. YUCATANA</i> , EN UN CICLO ANUAL (2015). GRÁFICO DE ESTRELLA PARA GT, POR SITIO Y TEMPORADA (RESULTADO DE IBR) INTERVALOS DE CONFIANZA DEL 95%. EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE CENOTES (P<0.05). * RESPECTO AL CONTROL.....	97
FIGURA 55. VARIACIÓN ESPACIO TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD PROMEDIO DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA (NMOL/MIN/MG) EN <i>G. YUCATANA</i> , EN UN CICLO ANUAL (2015). GRÁFICO DE ESTRELLA PARA AChE, POR SITIO Y TEMPORADA (AChE INVERTIDA PARA REFLEJAR SITIOS CON MAYOR INHIBICIÓN RESULTADO DE IBR) INTERVALOS DE CONFIANZA DEL 95%. EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE CENOTES (P<0.05). * RESPECTO AL CONTROL.....	98
FIGURA 56. RESPUESTA INTEGRADA DE BIOMARCADORES (IBR) EN UN CICLO ANUAL (2015), POR SITIOS DE ESTUDIO Y TEMPORADA: SECAS (MAY-15) Y LLUVIAS (OCT-15). (AChE INVERTIDA PARA REFLEJAR SITIOS CON MAYOR INHIBICIÓN).....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 57. CENOTES CON MAYOR RESPUESTA INTEGRADA DE BIOMARCADORES (IBR) EN LA PY (2015), POR TEMPORADA. A: SECAS (MAY-15), B: LLUVIAS (OCT-15).	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
FIGURA 56. RESPUESTA INTEGRADA DE BIOMARCADORES (IBR) EN UN CICLO ANUAL (2015), POR SITIOS DE ESTUDIO Y TEMPORADA: SECAS (MAY-15) Y LLUVIAS (OCT-15). (AChE INVERTIDA PARA REFLEJAR SITIOS CON MAYOR INHIBICIÓN).....	100
FIGURA 57. CENOTES CON MAYOR RESPUESTA INTEGRADA DE BIOMARCADORES (IBR) EN LA PY (2015), POR TEMPORADA. A: SECAS (MAY-15), B: LLUVIAS (OCT-15).	101
FIGURA 58. DIAGRAMA DE ORDENACIÓN OBTENIDO POR EL MÉTODO nMDS (NON METRIC MULTI-DIMENSIONAL SCALING) DE LOS 7 CENOTES MUESTREADOS EN LA PY EN FUNCIÓN DE LA RESPUESTA DE BIOMARCADORES EN MÚSCULO DE <i>G. YUCATANA</i>	102
FIGURA 59. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES PARA AMBAS TEMPORADAS Y POR SISTEMA: SEDIMENTO A: SECAS , B: LLUVIAS Y AGUA C: SECAS , D: LLUVIAS. PAHLSed= HIDROCARBUROS AROMÁTICOS LIGEROS EN SEDIMENTOS, PAHPsed= HIDROCARBUROS AROMÁTICOS PESADOS EN SEDIMENTOS, HA=HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS TOTALES, MO: MATERIA ORGÁNICA, GG: ARENAS GRUESAS, GF: ARENAS FINAS, AChE: ACETILCOLINESTERASA, GST: GLUTATIÓN-S-TRASNSFERASA, GSH: GLUTATIÓN TOTAL, CYP1A: CITOCROMO P450 1A, LPO: LÍPIDOS PEROXIDADOS.	104
FIGURA 60. ANÁLISIS DE REDUNDANCIA 2 TEMPORADAS DE UN CICLO ANUAL, SITIOS DE ESTUDIO (2015). HBPMs= HIDROCARBUROS AROMÁTICOS DE BAJO PESO MOLECULAR EN SEDIMENTO, HAPMs= HIDROCARBUROS AROMÁTICOS DE ALTO PESO MOLECULAR EN SEDIMENTO, HBPMa= HIDROCARBUROS AROMÁTICOS DE BAJO PESO MOLECULAR EN AGUA, HAPMa= HIDROCARBUROS AROMÁTICOS DE ALTO PESO MOLECULAR EN AGUA, M.O= MATERIA ORGANICA, T= TEMPERATURA, C= CONDUCTIVIDAD, TDS= SÓLIDOS DISUELTOS TOTALES, OD=OXÍGENO DISUELTO, ORP= POTENCIAL REDOX, %GF= PORCENTAJE DE GRANOS FINOS. AChE: ACETILCOLINESTERASA, GST: GLUTATIÓN-S-TRASNSFERASA, GSH: GLUTATIÓN TOTAL, CYP1A: CITOCROMO P450 1A, LPO: LÍPIDOS PEROXIDADOS.	106
FIGURA 61. DENDROGRAMA DE SIMILITUD ENTRE CENOTES DE LA PY SEGÚN LA RELACIÓN ENTRE BIOMARCADORES, HIDROCARBUROS Y VARIABLES AMBIENTALES. A: SECAS, B: LLUVIAS.....	108

Lista de Tablas.

TABLA 1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE 16 PAHS DE ACUERDO A LA EPA (1981).	20
TABLA 2. LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES PARA HIDROCARBUROS ESPECÍFICOS EN SUELOS SEGÚN LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM -138-SEMARNAT/SS-2003 (SEMARNAT, 2005).....	20
TABLA 3. NORMA CANADIENSE: ISQG: (INTERIM SEDIMENT QUALITY GUIDELINE) ESTÁNDAR INTERNO DE LA CALIDAD DE SEDIMENTO: CONCENTRACIÓN POR DEBAJO DE LA CUAL NO SE PRESENTA EFECTO BIOLÓGICO ADVERSO PEL: (PROBABLE EFFECT LEVEL) NIVEL DE EFECTO PROBABLE: CONCENTRACIÓN SOBRE LA CUAL SE ENCUENTRAN EFECTOS BIOLÓGICOS ADVERSOS CON FRECUENCIA.	21
TABLA 4. SUBFAMILIAS DEL CYP INVOLUCRADAS EN LA TRANSFORMACIÓN DE LOS XENOBIÓTICOS.	28
TABLA 5. PRINCIPALES FAMILIAS DE COMPUESTOS CAPACES DE INDUCIR CYP1A1. (MODIFICADO DE DELESCLUSE <i>ET AL</i> ; 2000).....	31
TABLA 6. UBICACIÓN DE CENOTES.	46
TABLA 7. CONCENTRACIONES DE ESTÁNDARES DENTRO DE LA CURVA.	60
TABLA 8. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs), TIEMPO DE RETENCIÓN Y IONES DETECTADOS.	60
TABLA 9. CONCENTRACIONES DE ESTÁNDARES DENTRO DE LA CURVA.	62
TABLA 10. CEBADORES EMPLEADOS CON SUS CARACTERÍSTICAS Y SECUENCIAS.	64
TABLA 11. REACTIVOS Y VOLÚMENES EMPLEADOS EN qPCR.	64
TABLA 12. PROGRAMA EMPLEADO PARA qPCR.	65
TABLA 13. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS REGISTRADOS PARA DOS TEMPORADAS EN UN CICLO ANUAL EN 7 CENOTES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.	72
TABLA 14. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN SEDIMENTOS DE CENOTES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN EN DOS TEMPORADAS (SECA Y LLUVIA) DURANTE EL AÑO 2015. (CONCENTRACIONES NG/G).....	78
TABLA 15. VALORES DE ÍNDICES MOLECULARES DISCRIMINANTES ENTRE EL ORIGEN PIROLÍTICO Y PETROGÉNICO DE LOS PAHs. NEGRITAS: ÍNDICES EMPLEADOS EN ESTE PROYECTO.	81
TABLA 16. ÍNDICES MOLECULARES Y ORIGEN DE PAHs PARA LOS 7 SITIOS DE CENOTES ESTUDIADOS DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.	83
TABLA 17. ORIGEN DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS EN SEDIMENTOS DE CENOTES DE LA PY, 2015	86
TABLA 18. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN AGUA DE CENOTES DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN EN DOS TEMPORADAS (SECA Y LLUVIA) DURANTE EL AÑO 2015. (CONCENTRACIONES NG/L)	87

I. INTRODUCCIÓN.

La península de Yucatán (PY), localizada en el sureste de México, está compuesta por los estados de Yucatán, Quintana Roo y parte de Campeche, toda la región es una plataforma formada por rocas calcáreas y evaporitas. La mayor parte de la península de Yucatán se caracteriza por ser una superficie cárstica; este término se refiere a todos aquellos fenómenos que se desarrollan por el paso o percolación de agua rica en CO₂ a través de rocas solubles, en especial las calizas. Los resultados de la carstificación son la formación escasa de suelos y la ausencia de corrientes superficiales, aunado al bajo relieve de la zona, da como resultado la formación de un acuífero regional conocido como cenote (Lugo *et al*; 1992). Muchos de los problemas que se presentan en las regiones cársticas, están relacionados con la alta permeabilidad, la escasez de corrientes superficiales y el uso inadecuado de la población sobre estos cuerpos de agua, ya que muchos cenotes son usados para la disposición de desechos. (Schmitter *et al*; 2002).

La población de la Península de Yucatán es de 4,103, 596 habitantes, de los cuales el 20% corresponde al estado de Campeche, el 32% a Quintana Roo y el 48% a Yucatán (INEGI, 2010). La ciudad más importante de la península es Mérida, aproximadamente cuenta con una población de 535,000 habitantes, la ciudad no cuenta con instalación de cañerías, el subsuelo recibe tanto escurrimientos superficiales como agua residual. La principal fuente de agua potable para la ciudad es el acuífero cárstico presente por debajo de la misma, el cual claramente es vulnerable a problemas de contaminación (Doehring y Butler, 1974; Escolero *et al*; 2002; Perry *et al*; 2002). Incluso, algunas veces, tanto las aguas residuales como los desechos sólidos son depositados sin tratamiento apropiado en cuevas y cenotes abandonados (Graniel *et al*; 1999). Las prácticas inadecuadas en el manejo de las aguas residuales han contribuido al incremento de reportes relacionados con los contaminantes en el acuífero de la Península. Por ejemplo, existen estudios de la cuantificación de hidrocarburos, metales, plaguicidas y productos de cuidado personal y farmacéuticos que se han relacionado con las actividades antropogénicas (Pacheco *et al*; 1996, Pacheco *et al*; 2004, Delgado *et al*; 2010, Metcalfe *et al*; 2011, Kiel-Martínez, 2012). Sin embargo, resulta difícil relacionar las concentraciones de contaminantes encontradas en el agua con el efecto que tienen en los organismos y determinar si constituyen o no un riesgo ecológico.

Actualmente en estudios de riesgo ambiental, el uso de biomarcadores ayuda a interrelacionar los efectos con la concentración de diferentes contaminantes y también proporciona información de su capacidad de introducirse, transformarse o acumularse en los organismos, siendo uno de los mejores mecanismos para evaluar la biodisponibilidad de los contaminantes, ya que éstos toman en cuenta procesos de absorción y distribución, así como del metabolismo que ocurre en los organismos (Chambers *et al*; 2002).

Los biomarcadores son respuestas o alteraciones bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e histopatológicas de los organismos ocasionadas por la exposición a contaminantes o xenobióticos; en general estas respuestas son rápidas, sensibles, y útiles para diseñar parámetros cuantitativos con la

capacidad de dar información acerca de la exposición a xenobióticos. Los biomarcadores deben ser validados antes de aplicarlos, lo que significa que debe determinarse la relación entre el biomarcador, la exposición y el estado de salud (Botello, 2006).

Sin embargo y con excepción de pocos contaminantes, todo efecto tóxico inicia con su interacción con una o más biomoléculas, de ahí el efecto va escalando hasta llegar a afectar a los ecosistemas. Por lo tanto, el entender los efectos a nivel subcelular puede proporcionar importante información del origen de los efectos vistos a niveles más complejos (Newman, 1998). Los biomarcadores más utilizados corresponden a la cuantificación de enzimas de biotransformación, parámetros de estrés oxidante, proteínas de estrés y resistencia multixenobiótica, así como parámetros hematológicos, inmunológicos, reproductivos y neurológicos. La elección de biomarcadores durante el monitoreo de cuerpos de agua es muy importante. Se deberán seleccionar aquellos biomarcadores que nos aporten una mayor información y que estén directamente relacionados a la presencia de contaminantes.

Entre los compuestos químicos más relevantes en el ambiente acuático por su persistencia y elevada toxicidad, se encuentran los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs). Dado su carácter mutagénico/carcinogénico, los PAHs y sus efectos biológicos deben ser monitoreados regularmente en el ambiente, ya que proceden principalmente de la combustión así como de procesos industriales, su proceso de degradación es muy lento y pueden ser divididos en dos grupos según su peso molecular: los de bajo peso molecular formados por los PAHs de 2 a 3 anillos, y los de alto peso molecular formados por aquellos PAHs que contienen en su estructura más de 3 anillos, son los componentes más peligrosos en los derrames de petróleo, suelen depositarse en sedimentos y suelos debido a sus baja solubilidad en agua, aunque existen excepciones (Botello y Calva 1998, Bzduzek y Christensen 2004).

La evaluación de la toxicidad del agua de diversos cuerpos en la PY utilizando biomarcadores se realizó recientemente (Rodríguez-Fuentes *et al*; 2012). Para determinar el efecto a la exposición a contaminantes orgánicos se analizó la expresión de los genes de vitelogenina (VTG) y citocromo p4501A (CYP1A) en peces cebra enjaulados y se comparó con los niveles presentes en los organismos que se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio, se encontró en 8% de los puntos muestreados sobre-expresión del gen CYP1A. Los resultados indicaron que hay cuerpos de agua que presentaron efectos producidos por las actividades humanas. El estudio utilizó un organismo modelo, que no está presente en la PY, debido al desconocimiento de la información genética de enzimas involucradas en la desintoxicación o defensa ante la presencia de contaminantes en especies locales. Sin embargo, dado que existe la necesidad de determinar si los contaminantes encontrados en cuerpos de agua de la PY representan un riesgo ecológico, es necesario elegir algunos organismos locales en los que se hagan las evaluaciones. Las características deseables del organismo elegido son: gran abundancia, amplia distribución y facilidad de captura. El género *Gambusia* es el más abundante y frecuente en la ictiofauna de la PY. Este género incluye peces de talla pequeña, ampliamente distribuidos

en México y Centroamérica. Son vivíparos y efectúan su reproducción interna mediante un órgano copulador o gonopodio el cual es indispensable para la identificación de la mayoría de las especies (Pérez-León y Schmitter-Soto, 2007). *G. yucatanana* o bien conocido como el guayacón yucateco, se distribuye desde Veracruz hasta Guatemala, Belice y toda la PY, incluso en cenotes tierra adentro, aunque, tiende a ser costero. Nada en cardúmenes bajo la superficie, cerca del mangle, para refugiarse. Es la especie más eurihalina del género y existen incluso poblaciones marinas. En la PY está presente en la cuenca del río Hondo, tributarios de la Laguna de Términos, río Champotón y la región de los petenes (Pérez-León y Schmitter-Soto, 2007). Para este proyecto se propone utilizar a *Gambusia yucatanana* que es el pez que predominantemente habita en la zona del anillo de cenotes de la PY.

II. ANTECEDENTES

II.1 ECOTOXICOLOGÍA

El medio ambiente continuamente se ve afectado con la exposición a productos químicos (xenobióticos) liberados por las comunidades urbanas y las industrias. En el siglo XX, miles de contaminantes traza orgánicos, tales como los bifenilos policlorados (PCBs), plaguicidas organoclorados (OCPs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), dibenzofuranos policlorados (PCDFs) y dibenzo-p-dioxinas (PCDD) se han producido y, en parte, liberado en el medio ambiente (Van der Oost, *et al*; 2003). Desde principios de los años sesenta la humanidad ha tomado conciencia del potencial a largo plazo efectos adversos de estos productos químicos en general y sus riesgos potenciales para los ecosistemas acuáticos y terrestres en particular. El sumidero final para muchos de estos contaminantes es el medio acuático, ya sea debido a descargas directas o indirectas, siendo los organismos susceptibles a múltiples daños por la acumulación de estas sustancias. En la actualidad se ha generado información sobre los efectos biológicos de los contaminantes al producir un daño o efecto nocivo, en los organismos (toxicidad). La toxicidad de un contaminante esta en función del nivel que alcance en los tejidos del organismo, estos niveles se relacionan con la concentración del compuesto en el medio, lo cual depende tanto del tipo de contaminante como del organismo y también del tiempo de exposición (Botello, *et al*; 2006).

Muchos de los compuestos químicos y sus metabolitos, que contaminan los ecosistemas acuáticos, aún no se han identificado y su impacto en la vida acuática aún no se ha determinado. Por lo tanto, los efectos de la exposición y destino de los contaminantes en el ecosistema acuático son ampliamente estudiados por los toxicólogos ambientales.

La búsqueda de efectos nocivos de forma cuantitativa a nivel celular y subcelular en relación al impacto de los contaminantes es el objetivo más importante de la ecotoxicología; debido al conocimiento que se tiene sobre la toxicidad inducida por diferentes sustancias químicas tiene su origen en la interrupción de la secuencias de eventos bioquímicos que abarcan tanto procesos fisiológicos fundamentales del animal, como sus sistemas de control. Dichos procesos fisiológicos comprenden el crecimiento, la reproducción, la osmoregulación y el balance energético. Los sistemas de control incluyen los sistemas nervioso y endocrino (Figura 1).

Cuando se trata de la protección de los organismos acuáticos, es necesario conocer el efecto de los tóxicos sobre las especies más sensibles, así como los estadios más sensibles en su ciclo de vida, Botello (2016) destaca que estas especies son las más adecuadas para detectar las primeras etapas del deterioro en un ecosistema.

Dentro de las investigaciones ecotoxicológicas, las respuestas bioquímicas y moleculares han sido consideradas como indicadores tempranos del deterioro ambiental ya que son las primeras que se desencadenan por efecto de los estresores ambientales, incluidos los tóxicos (Wedemeyer y McLeay, 1981).

La entrada de los tóxicos en la sangre de los organismos acuáticos puede tener lugar a través de la piel, las branquias y el tubo digestivo; enseguida pasan a las células de los órganos blancos por difusión simple o mediante mecanismos especiales que requieren energía. Al igual que en los humanos, en los organismos acuáticos el hígado metaboliza dichos compuestos y el riñón los concentra para

poder ser eliminados vía renal, mientras que el tejido adiposo almacena principalmente los compuestos orgánicos lipofílicos y el tejido óseo los inorgánicos. Las sustancias tóxicas más fácilmente retenidas son las liposolubles, éstas se transforman en hidrosolubles y se eliminan por orina. Las reacciones químicas subyacentes a estos procesos de transformación son mediadas por enzimas, las de fase I son catalizadas por enzimas citocromo P450 oxidasa, que comprenden las enzimas NADPH citocromo c-reductasa y citocromo p450 (Botello; 2006). La complejidad de los ecosistemas acuáticos junto con su alta variabilidad inherente y la influencia de múltiples estresantes sugiere que, la medición de una sola o pocas variables, sea adecuada para estimar los efectos sobre la biota de múltiples factores con el fin de establecer las bases de estos efectos.

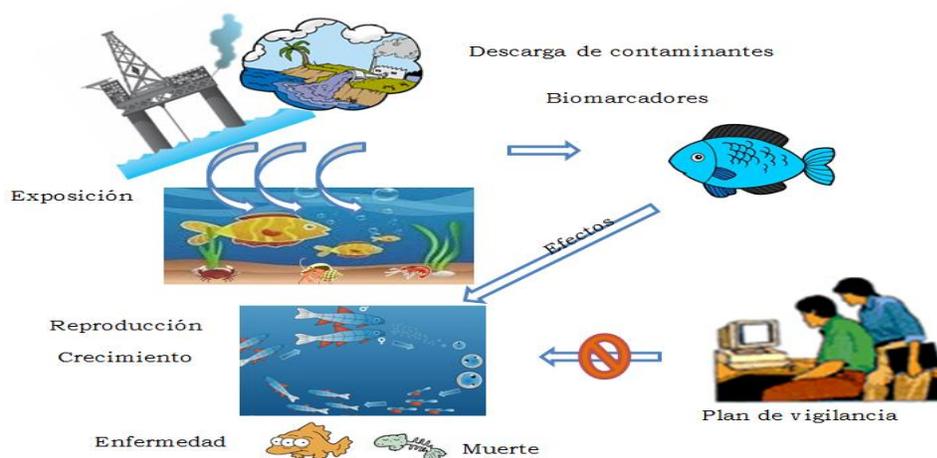


Figura 1. Ecotoxicología. La ecotoxicología estudia el destino y los efectos de los contaminantes en los ecosistemas, intentando explicar las causas y prever los riesgos probables.

Se han estudiado las enzimas relacionadas con alteraciones metabólicas para evaluar el efecto tóxico de contaminantes, en estudios de laboratorio y de campo. Usualmente las pruebas en el laboratorio involucran la administración de un compuesto a una población de una especie particular en condiciones controladas, en este tipo de ensayos la población en estudio es aislada de las interacciones con otros organismos, compuestos y factores ambientales, por lo que no es sencillo extrapolar los resultados obtenidos a las condiciones que se presentan en la naturaleza. Es por ello que para una mayor aproximación a las condiciones reales, los organismos son expuestos a muestras ambientales o extractos de las mismas o bien emplear organismos de vida silvestre. En los estudios de campo se evalúan los impactos de los contaminantes sobre los organismos en varios niveles tróficos (posición del organismo en la cadena alimenticia) en el ecosistema, bajo las condiciones reales que se presentan en el ambiente. Se considera por lo tanto el efecto de todas las sustancias presentes y sus interacciones aditivas, sinérgicas o antagónicas, así como los efectos de los factores climáticos y abióticos, tales como la temperatura, contenido de oxígeno, pH, humedad, aireación, salinidad, radiación solar, etc. En estos estudios se miden los cambios en las poblaciones que se desvían de la normalidad; no obstante, en muchos casos es difícil conocer con exactitud cuál es la variación natural que se presenta en estas poblaciones, tanto

en el tiempo como en el espacio. Entre las respuestas que pueden evaluarse en los estudios de campo se encuentran: la reducción en la productividad o generación de biomasa, la disminución de la abundancia y distribución de especies, los cambios en la estructura trófica, etcétera (Cajaraville et al; 2000).

II.2 HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICÍCLICOS (PAHs)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) se encuentran entre los grupos de contaminantes orgánicos más ampliamente distribuidos en el ambiente, están clasificados en cuatro grupos de acuerdo a Cutz y Rendón (2010):

- 1) Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Petrogénicos (HAPPT). Están relacionados con el petróleo crudo y los subproductos refinados de éste.
- 2) Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Biogénicos (HAPB). Generados por procesos biológicos o, por las primeras etapas de la diagénesis de sedimentos marinos. Por ejemplo, el perileno.
- 3) Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Pirogénicos (HAPP). Generados por la combustión de combustibles fósiles o material orgánico reciente, como la madera o cualquier combustible. Los PAH relacionados con los procesos de combustión son una mezcla en la que predominan los compuestos de 3,4 y 5 anillos. El fluoranteno y el pireno son usualmente los más abundantes.
- 4) Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de producción industrial. Solo algunos de estos compuestos son utilizados en la producción de medicinas y para la producción de tintas, plásticos y plaguicidas. El naftaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno y pireno son algunos ejemplos de este tipo de compuestos.

Son considerados contaminantes de amplio interés ambiental debido a las propiedades mutagénicas y carcinogénicas de algunos de sus compuestos (Farrington, 1991), en diversos ensayos de experimentación con animales y resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*, demuestran que las características estructurales de los PAHs se relacionan con su potencial carcinogénico

Las características fisicoquímicas de estos compuestos varían con el peso molecular. A mayor masa se incrementa su resistencia a la oxidación, reducción, vaporización e hidrosolubilidad (Salazar 2008), Los PAHs son sustancias lipofílicas, tendencia que se incrementa con el aumento de su masa molecular, pertenecen al grupo de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) ya que, de acuerdo con el protocolo de Contaminantes Orgánicos Persistentes firmado el 24 de junio de 1998 en Dinamarca, reúnen las cinco características fundamentales: ser tóxicos, persistentes, bioacumulables, ser transportados a través del aire y depositados a largas distancias, y causar efectos negativos sobre la salud y el medio ambiente tanto cerca, como lejos de su fuente emisora (Chahin, 2008).

Se considera que las actividades antropogénicas son la fuente principal de contaminación por hidrocarburos, y que éstas pueden ser puntuales como las descargas de agua residuales, o no puntuales como el transporte atmosférico, el cual llega a ser tan importante que puede explicar la presencia de PAHs en suelos

y sedimentos de sitios alejados de las fuentes puntuales. A nivel mundial hay estudios que revelan su presencia en aire (Wild y Jones 1995), agua (Botello y Calva 1998), suelos (Bzduzek y Christensen 2004) y alimentos (Mottier *et al*; 2000); (Figura 2). En la década de 1980, la Comunidad Europea puso especial interés y atención hacia la calidad de las aguas al emitir una lista de contaminantes orgánicos, que coincide con la lista de la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos de América, misma que consta de 129 agentes (Soniassy *et al*; 1994) y en la que se encuentran incluidos 16 tipos de PAHs (Tabla 1), los dos más comunes son el benzo (a) pireno y el naftaleno (Quinn, 2012). Actualmente en México, la Comisión Nacional del Agua establece límites máximos permitidos para agua potable de acenafteno y fluoranteno, 0.02 y 0.04 mg/L respectivamente, en agua (CNA 1998).



Figura 2. Distribución de PAH's en el medio ambiente

Los PAHs mayormente se presentan como mezclas complejas en el ambiente, constituyen una familia de más de 100 compuestos orgánicos diferentes formados por dos o más anillos bencénicos y en algunos casos un anillo pentagonal, con o sin sustituyentes sobre sus átomos de carbono e hidrógeno y pesos moleculares de 128 a 278 g/mol. Los valores de solubilidad varían desde altamente insolubles (ej., Benzo(g,h,i)perileno) a débilmente solubles (ej., naftaleno), mostrando un rango logarítmico de coeficientes de partición de 3.37-7.66 (Tabla 1) como consecuencia tienden a asociarse rápidamente con partículas suspendidas en la columna de agua y depositarse en los sedimentos, siendo un reservorio importante de estos compuestos que pueden dar lugar a fenómenos de bioacumulación en organismos. La abundancia de estos compuestos en el medio ambiente, unido a su carcinogenicidad, los ha situado en las listas de contaminantes orgánicos prioritarios.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de 16 PAHs de acuerdo a la EPA (1981).

Compuesto	PM	Punto Fusión (°C)	Punto Ebull.(°C)	Solubilidad agua(mg.L ⁻¹)	Log kow	Log koc
Naftaleno	128	80	218	30,0	3,37	3,1
Acenaftileno	152	92	265	16,1	4,07	ND
Acenafteno	154	96	279	3,47	4,33	3,8
Fluoreno	166	116	298	1,8	4,18	3,9
Fenantreno	178	101	340	1,29	4,46	4,1
Antraceno	178	218	342	0,073	4,45	4,3
Fluoranteno	202	110	375	0,260	5,33	4,3
Pireno	202	150	404	0165	5,32	4,8
Benz(a)antraeno	228	159	435	0,014	5,61	4,8
Criseno	228	256	448	0,0006	5,86	4,9
Benzo(b)fluoranteno	252	168	ND	0,0012	6,57	6,2
Benzo(k)fluoranteno	252	217	480	0.00055	6,84	5,6
Benzo(a)pireno	252	179	495	0,0038	6,04	5,3
Dibenzo(a,h)antraceno	278	267	524	0,0005	6,75	6,3
Benzo(q,h,i)perileno	276	278	ND	0,00026	7,23	ND
Indeno(1,2,3-cd) pireno	276	162	ND	0,062	7,66	6,2

Considerando que no existen para estos contaminantes, límites máximos permisibles en sedimentos (marinos, de ríos, lagos, lagunas costeras) afectados por hidrocarburos, se tomó en consideración la normatividad establecida para suelos en México, Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (uso: agrícola, forestal, recreativo y de conservación-residencial y comercial) (Tabla 2).

Tabla 2. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelos según la norma oficial mexicana NOM -138-SEMARNAT/SS-2003 (SEMARNAT, 2005)

PAHs	Uso de suelo predominante (mg/kg base seca)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Bezo(a)pireno	2	2	10
Dibenzo(a,h)antraceno	2	2	10
Benzo(a)antraceno	2	2	10
Benzo(b)fluoranteno	2	2	10
Benzo(k)fluoranteno	8	8	80
Indeno(1,2,3-cd) pireno	2	2	10

La UNESCO en 1976 encontró que la concentración promedio normal es de 10µg/L de hidrocarburos totales para aguas costeras no contaminadas con hidrocarburos en el Gran Caribe, que incluye al Golfo de México; en cuanto a los PAHs, el programa National Status and Trends de la Administración Nacional Oceánica y

Atmosférica (NOAA, por sus siglas en inglés) estableció valores de guía o de referencia, que proponen un valor de la calidad del agua y sedimento, el cual corresponde a 3.9 µg/g como concentración alta para sedimentos (Legorreta, et al; 2005).

Los niveles guía de calidad de sedimentos para la protección de la biota acuática sugerido por la Agencia de Protección Ambiental de Canadá establecen como límite permisible de PAHs totales 31,9 ng/g, asimismo indican el nivel de efecto más probable, CQG, 2002 (Tabla 3).

Tabla 3. Norma Canadiense: ISQG: (Interim Sediment Quality Guideline) Estándar interno de la calidad de sedimento: concentración por debajo de la cual no se presenta efecto biológico adverso PEL: (Probable Effect Level) Nivel de efecto probable: Concentración sobre la cual se encuentran efectos biológicos adversos con frecuencia.

PAH sedimentos	ISQG (mg/kg)	PEL (mg/kg)
Naftaleno	0,0346	0,391
Acenaftileno	0,00587	0,128
Fluoreno	0,00212	0,014
Fenantreno	0,0419	0,515
Pireno	0,053	0,875
Benzo(a)antraceno	0,0317	0,385
Criseno	0,0571	0,862

La OMS (2003) reportó que concentraciones de PAHs en aguas subterráneas sin contaminar suelen oscilar entre 0.1 y 5 ng/L; las concentraciones en aguas subterráneas contaminadas pueden superar los 10,000 ng/L; el intervalo habitual de la suma de las concentraciones en el agua de consumo de un conjunto de PAHs representativos seleccionados es de 1 ng/L a 11,000 ng/L, aproximadamente.

Los principales procesos de transformación o degradación ambiental de PAHs en sistemas acuáticos son la fotooxidación, la oxidación química y la transformación de éstos por bacterias y hongos, aunque la mayoría de los PAHs se ligan a los compuestos orgánicos en los sedimentos, volviéndose más resistentes a la degradación bacteriana (Salazar 2008). Los PAHs que tienden a fraccionarse en la materia orgánica, que resisten a la degradación y que persisten en el medio acuático poseen un mayor potencial para afectar la vida silvestre. Los PAHs presentan de baja a moderada volatilidad y varía su vida media de 1 semana a 2 meses para ambientes acuáticos, de 2 meses a 2 años en suelos y de 8 meses a 6 años en sedimentos (Kalf *et al*; 1997).

Las fuentes de ingreso de estos compuestos al medio ambiente pueden ser de origen natural como los incendios forestales, de pastizales, erupciones volcánicas, filtraciones de petróleo, etc; así como de origen antropogénico por ejemplo la quema de combustibles fósiles, la incineración de residuos sólidos urbanos, madera, los derrames y descargas de petróleo (Haritash y Kaushik, 2009).

La biotransformación de PAHs por organismos acuáticos se da principalmente por el sistema enzimático del citocromo p-450, responsable de iniciar el metabolismo de varios compuestos orgánicos con el fin de hacerlos más solubles en agua para

facilitar su excreción. El metabolismo de los PAHs ha sido muy estudiado en peces ya que son contaminantes comúnmente encontrados en ambientes acuáticos y por potencial carcinogénico (Schlenk *et al*; 2008). La tasa de absorción de los PAHs en el tracto gastro-intestinal depende, por una parte, de la especie animal de que se trate, y por otra de las características físicoquímicas del compuesto, tales como su peso molecular, coeficiente de reparto octanol-agua o capacidad de adsorción a la materia orgánica.

La capacidad de metabolización de los PAHs está ampliamente distribuida en el reino animal, pero suele ser mayor en los organismos superiores. El principal objetivo de la metabolización de los PAHs, consiste en aumentar la polaridad de estos compuestos para convertirlos en sustancias más hidrosolubles y más fáciles de excretar. Aunque este metabolismo produce en su mayor parte una desintoxicación, hay algunos PAHs que se activan a especies más reactivas que pueden llegar a unirse al ADN provocando mutaciones genéticas.

Las rutas metabólicas de los xenobioticos lipofílicos (incluidos los PAHs), se pueden dividir en dos categorías principales: reacciones de fase uno (biotransformación) y reacciones de fase dos (conjugación). Las reacciones de fase uno incluyen oxidaciones, hidroxilaciones, y reducciones, en las que se introduce un nuevo grupo funcional, haciendo la molécula más polar y, por lo tanto, excretable con mayor facilidad. En este proceso intervienen un grupo de enzimas que pertenecen al grupo citocromo P-450 (CYP 450). Actualmente se conocen en los seres vivos 18 familias y 42 subfamilias de CYP 450, la mayoría de ellas localizadas en el hígado aunque existen isoformas extrahepáticas en numerosos tejidos como en el intestino, riñón, cerebro, linfocitos, etc. De hecho, hay estudios que verifican que especialmente los PAHs con elevado peso molecular, y para facilitar su absorción a nivel intestinal, son previamente metabolizados en esta mucosa intestinal, es decir, que ya pasan al torrente sanguíneo como metabolitos. Las reacciones de fase dos consisten en la síntesis de conjugados, mediante la adición enzimática de nuevos grupos, como ácido sulfúrico o ácido glucurónico, a un grupo funcional ya presente en la molécula o a uno puesto en la fase I. Para ello intervienen las enzimas glutatión-S-transferasa o la sulfotransferasa, localizadas principalmente en el hígado.

La acumulación de sustancias químicas por organismos en los ambientes acuáticos se basa en la interacción de diferentes características físicas, químicas, biológicas y los procesos de interacción entre éstas. La presencia de PAHs en tejidos de diferentes organismos se ve favorecida por la liposolubilidad de estos compuestos. La bioacumulación de PAHs por varios organismos marinos ha sido revisada por Meador (1995). Los valores van desde $0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ PAHs para anguila (Van der Oost *et al*; 1991) a $10 \mu\text{g g}^{-1}$ para fenantreno en bagre (Baumann y Harshbarger, 1995). La biotransformación de los PAHs se produce en muchos organismos acuáticos, siendo más efectiva en el hígado, es decir se metabolizan más fácilmente por las enzimas de la fase I de la función del sistema MFO; algunos de los PAHs pueden ser excretados directamente como metabolitos polares no conjugados en la bilis, pero la mayoría de los PAHs son excretados después de la conjugación con enzimas de fase II (Vermeulen *et al*; 1992).

Es importante mencionar aquellos estudios mexicanos donde se han considerado a los organismos como medio para valorar la carga de estos xenobioticos,

particularmente en el litoral del Golfo de México se han evaluado diversas especies de moluscos bivalvos; la mayoría de ellos sobre el ostión *Crassostrea virginica* como indicador de posibles problemas de contaminación por petróleo. Resalta el hecho de que los ostiones provenientes de los sistemas costeros de Tabasco fueron los que presentaron los niveles de PAHs más altos entre 34 y 45 $\mu\text{g g}^{-1}$ mientras que los de las lagunas de Tamiahua y Términos tuvieron concentraciones equiparables, contrastando el tipo de escurrimientos que llegan a estos estuarios ya que en el primero, en el Norte de Veracruz, existe una central termoeléctrica que basa su funcionamiento en el combustóleo, además de los asentamientos humanos presentes en los márgenes del sistema acuático, situación compartida con la laguna de Términos aunado a que este sistema lagunar está sometido a la influencia de la zona de plataformas petroleras marinas ubicadas a 80 km de distancia y que por las corrientes costeras pueden transportar sus desechos hasta la zona costera adyacente (Ponce y Botello,2005)

Estudios anteriores en la bahía de Chetumal revelaron la presencia de PAHs en sitios alejados de la zona urbana causado principalmente por la descarga de aguas residuales en el drenaje pluvial y a las filtraciones de las fosas sépticas al manto freático (Noreña Barroso *et al.*, 1998). La otra fuente de contaminantes es el río Hondo que desemboca al sur de la bahía, en el que se ha reportado la presencia de plaguicidas organoclorados en sedimentos, debido a la actividad agrícola que se desarrolla en las riberas de México y Belice. En 1996, la investigación de la muerte masiva de bagres de la especie *Ariopsis assimilis*, demostró la presencia de PAHs en el hígado de los bagres y en los sedimentos (Ortiz, Sáenz y Zavala, 1997).

En general, los estudios sobre contaminantes orgánicos en ecosistemas costeros son escasos, pese a la relevancia que presentan, en particular de hidrocarburos del petróleo, en el Pacífico Mexicano se tiene el de Botello,(1995) en el que se evaluaron PAHs en sedimentos y organismos en el Puerto de Salina Cruz, Oax. En el Golfo de México, es en donde se tiene una mayor concentración de trabajos, (Gold-Bouchot *et al*; 1995; Botello y Calva, 1998; Botello *et al*; 2001; Calva *et al*; 2005; entre otros). En Quintana Roo citándose a Noreña y colaboradores (1998), a Alvarez y Sáenz (2005) en la Bahía de Chetumal y en Yucatán el trabajo de Valenzuela(2005) en la Laguna de Chelem y Pto. Progreso. En cenotes ubicados en Cancún y Playa del Carmen se han podido determinar concentraciones de PAHs tales como el fenantreno y naftaleno (Medina *et al*; 2014). En nuestro país la normatividad correspondiente a PAHs en sistemas costeros es mínima, por lo que no hay límites máximos permisibles. En cuanto a la contaminación antropogénica para la península de Yucatán los diversos contaminantes identificados en el agua subterránea son: plaguicidas, nitratos, coliformes fecales, PAHs, metales pesados, PCPs, (Pacheco *et al*; 2004, Delgado *et al*; 2010, Metcalfe *et al*; 2011, Kiel-Martínez, 2012); en las zonas urbanas.

II.3 BIOMARCADORES.

Los primeros estudios toxicológicos remontan a principios del siglo XX, en la década de los 80 la contaminación por metales pesados relacionados con la minería, prácticas agroquímicas, desastres como el de Chernóbil, dominaban el tema de estudio, para la década de los 90 comenzó el desarrollo de los biomarcadores, principalmente se realizaron estudios de alteraciones endocrinas con anfibios y reptiles, retos actuales incluyen la necesidad de estimar y predecir la exposición y los efectos de actividades antropogénicas relacionadas con sustancias químicas en la vida silvestre y su hábitat (Hoffman, 2003).

La complejidad de los ecosistemas acuáticos y el impacto que pueden tener diversos estresores sobre los mismos, ha llevado a la búsqueda de herramientas bioanalíticas para el diagnóstico ambiental; el desarrollo y aplicación de dichas herramientas ha cobrado importancia en la última década. La Directiva del Marco del Agua de la UE (Unión Europea) (DMA) gestiona sobre la protección del medio acuático en su totalidad, pone énfasis en la necesidad de evaluar el riesgo ambiental y ofrece la posibilidad de la incorporación de medidas hacia los efectos biológicos, sugiriendo el uso de biomarcadores, denominando así al conjunto de modificaciones a nivel celular y molecular que indica la presencia de contaminantes.

Los biomarcadores, no solo reflejan la exposición química, si no que tienen la capacidad de integrar muchos de los factores físicos, químicos y biológicos que operan en el sistema acuático.

En la zona costera los organismos se encuentran expuestos a una mezcla compleja de sustancias químicas, por lo que los análisis químicos solo dan información de lo que uno está determinando y, obviamente, esto es solo una pequeña parte de la gran complejidad de todos los compuestos químicos que existen en el ambiente.

Un biomarcador es útil para diseñar parámetros cuantitativos con la capacidad de dar información acerca de la exposición a xenobióticos, inducción de efectos por sustancias químicas sobre sistemas biológicos y la susceptibilidad del sistema a la exposición del tóxico; en general, estas respuestas son rápidas, sensibles y, en ocasiones, son reacciones específicas de los organismos a los contaminantes (Bucheli y Fent, 1995).

Las características deseables de un biomarcador validado son:

1. Ser medible
2. Reflejar la interacción (cualitativa o cuantitativa) del organismo con la sustancia química de interés, que sea específico y sensible.
3. Ser común en individuos dentro de una población o subgrupo con variabilidad (estacional, temperatura, sexo, peso y manipulación) definida dentro de lo normal en poblaciones no expuestas
4. Ser común entre especies.

En general, hay tres clases de biomarcadores reconocidos (Schlenk, 2005).

a) Biomarcador de exposición: medición de una sustancia exógena o su metabolito, o el producto de una interacción entre un xenóbiotico y algunas moléculas o células blanco dentro de un organismo, es decir, pueden proporcionar estimaciones cuantitativas y cualitativas de la exposición a diversos compuestos (PCB, PAHs, Pb, Cd, DDT, etc).

b) Biomarcador de efecto: medición bioquímica fisiológica, comportamiento u otra alteración dentro de un organismo, están asociados específicamente con el mecanismo de acción de la sustancia tóxica, asociada a alguna enfermedad (actividades enzimáticas de Fase I y II, (EROD), acetilcolinesterasas (AChE), aductos en el ADN, metabolitos en bilis, micronúcleos, vitelogenina, etc).

c) Biomarcador de susceptibilidad: indicativo de una capacidad adquirida o inherente de un organismo para responder a cambios de exposición a un xenóbiotico específico (fenotipo y polimorfismo genético).

Además de elegir al biomarcador adecuado, la selección de los organismos es una etapa importante, ya que el organismo puede presentar algunas ventajas y desventajas que pudieran no dar los resultados adecuados. Debido a lo anterior se sugiere que los organismos seleccionados estén considerados dentro de los organismos estandarizados por agencias internacionales; sin embargo, cuando se realizan estudios en campo es conveniente que se obtenga información de los organismos tanto en laboratorio (*in vivo*) como en campo (*in situ*). De cualquier forma que se realice el trabajo, es preciso conocer la bioquímica y fisiología del organismo, establecer el tamaño y estado reproductivo, que sea de fácil muestreo, que esté disponible en número suficiente y edades, conocer su nivel trófico y, principalmente, que tenga importancia social y ecológica (Mayer *et al*; 1992).

Se han desarrollado una variedad de biomarcadores, para diferentes tipos de contaminantes (Figura 3). En los estudios ecotoxicológicos el concepto de estrés es inherente. Bayne *et al.* (1976) definen estrés como “una alteración medible del estado estable fisiológico (bioquímico, celular o conductual) inducido por un cambio ambiental que hace al individuo (población o comunidad) más vulnerable a nuevos cambios ambientales”.

Algunos de los más usados en estudios costeros y marinos para la evaluación de contaminantes son las metalotioneínas, citocromo p450 (CYP), etoxiresorfurin O-dietilasa (EROD), aril Hidroxilasa (AHH), glutatión reducido y oxidado (GSH), glutatión S- transferasa (GST), colinesterasas.

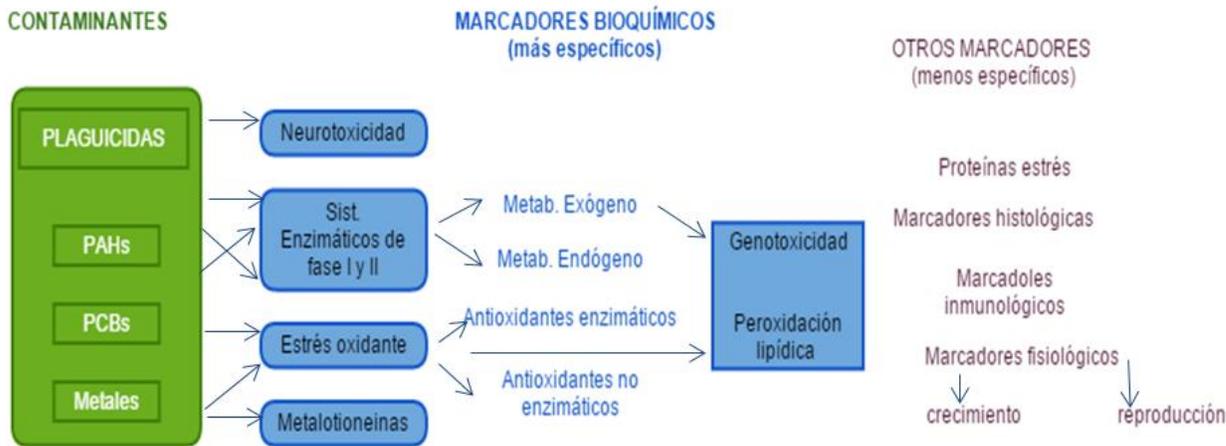


Figura 3. Relación entre los principales contaminantes y biomarcadores (adaptado de Narbonne y Michel, 1993).

El mecanismo de acción que siguen la mayoría de los xenobióticos es el siguiente: el xenobiótico es reconocido por la célula como una señal exógena mediante diversos mecanismos de recepción y entra a la célula por difusión pasiva o mediante transportadores activos. Una vez dentro actúan las enzimas de la fase I (principalmente el sistema CYP450), luego las enzimas de la fase II son las encargadas de la conjugación de los metabolitos producidos por los primeros, entre las que se encuentran por ejemplo la enzima GST, cuando la conjugación es con GSH (Glutacion reducido), formando productos más solubles en agua, los cuales luego serán excretados desde la célula al medio extracelular (Figura 4).

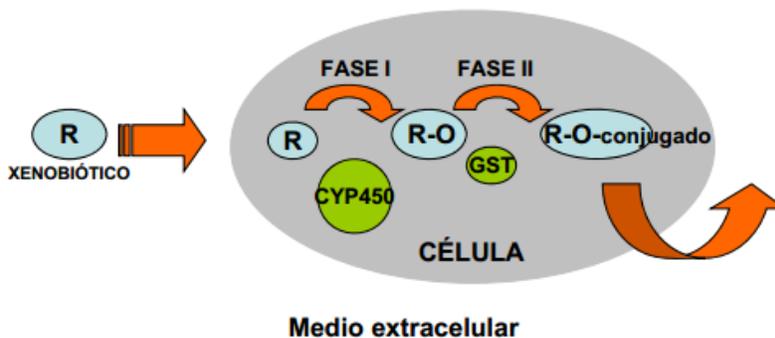


Figura 4. Metabolismo de un xenobiótico al ingresar a la célula.

Para los objetivos del presente proyecto se utilizó músculo para la evaluación de cada biomarcador, debido a que el organismo de estudio es de talla pequeña, el empleo de músculo permite evaluar distintos biomarcadores. A continuación se mencionan las características más importantes de los biomarcadores que se van a utilizar y el por qué de su uso en este proyecto de investigación.

II.3.1 CITOCROMO P450 1A/ CYP1A

La palabra citocromo significa “sustancia coloreada”, la propiedad de adquirir color se la confieren los electrones externos de elementos de transición como el hierro; el término “p-450” hace referencia a un pigmento rojizo cuyo pico principal de absorción en cromatografía aparece aproximadamente a los 450 nm. Es un grupo de hemoproteínas que generalmente se encuentran unidas a la membrana del retículo endoplásmico, tienen un tamaño que oscila entre los 48 y los 60 kDa y está conformado por aproximadamente 500 aminoácidos (Nebert y González, 1987). La función principal de este sistema enzimático es la transformación de compuestos endógenos y exógenos mediante una serie de reacciones de oxido-reducción generalmente denominadas Reacciones de Fase I.

Las reacciones llevadas a cabo por el sistema enzimático CYP son las siguientes:

- Oxidación –Las reacciones de oxidación catalizadas por el sistema CYP son, la hidroxilación de alifáticos, alquenos e hidrocarburos aromáticos, la epoxidación, la O-desalquilación, la N-desalquilación, la deshalogenación y la formación de N-óxidos.
- Hidrólisis -Las reacciones de hidrólisis son generalmente llevadas a cabo en el hígado de peces, donde las enzimas involucradas en la reacción son diversas; sin embargo, en general los ésteres, amidas y epóxidos son los tipos de compuestos que sufren este tipo de transformación.
- Reducción -Los compuestos organoclorados y un gran número de xenobióticos que contienen grupos funcionales como aldehídos, cetonas y alcoholes son susceptibles a la reducción.

De todas las reacciones llevadas a cabo por el CYP, la reacción más común para la degradación de los xenobióticos es la oxidación, que hace que muchos compuestos lipofílicos se hagan más solubles en agua, facilitando su excreción del organismo (Dhainaut y Scaps, 2001).

Dentro de los compuestos endógenos que pueden ser transformados por el CYP, se encuentran los ácidos grasos, los esteroides, las prostaglandinas, así como las cetonas; mientras que dentro de los compuestos exógenos podemos mencionar a una gran variedad de fármacos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs) y dioxinas.

Aunque la mayoría de los compuestos anteriormente mencionados son diferentes, los mecanismos básicos de oxidación de los diferentes sustratos son idénticos para todas las isoenzimas, en donde en general las reacciones de mono-oxigenación llevadas a cabo por el CYP son:



En este ejemplo, el sustrato lipofílico (RH) es convertido a un producto más polar y más soluble (ROH) después de la incorporación de un átomo de oxígeno que proviene del oxígeno molecular (Guengerich, 1999).

Generalmente, estas enzimas del CYP no actúan solas, existen otras enzimas involucradas en el ciclo redox del CYP como la NADPH-citocromo P450 reductasa y la NADH-citocromo β_5 reductasa.

Se ha observado que el citocromo P450 juega un papel importante en el metabolismo oxidativo y de biotransformación de hidrocarburos aromáticos y compuestos clorados (Livingstone, 1993), aunque la ruta metabólica puede ser modulada significativamente por factores tales como temperatura, condición fisiológica y estado nutricional y reproductivo del organismo, la determinación del citocromo P450 es muy útil en programas de monitoreo. Por ejemplo, en la laguna Orbetello, al sureste de la costa de Toscana, Italia, la actividad del P450 en el goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fue dos veces más alta en peces colectados cerca de una planta de tratamiento que en los peces de la misma cuenca pero de sitios diferentes (Corsi *et al*; 2003).

Hasta el momento se han caracterizado un total de 74 subfamilias de genes de CYP en diferentes organismos). Del total sólo 14 han sido identificadas en mamíferos, sin embargo, de todas las subfamilias encontradas en mamíferos sólo 4 están involucradas en la transformación de los xenobióticos. En la Tabla 4, se muestran algunos ejemplos de las isoformas del CYP, así como los compuestos a los que pueden transformar y el sustrato ideal para medir la actividad de cada isoforma (Nelson *et al*, 1996).

Tabla 4. Subfamilias del CYP involucradas en la transformación de los xenobióticos.

Subfamilia	Inductores Típicos	Sustratos Comunes
CYP1A	PAH, BNF, PCBs, dioxinas y furanos	PAH, etoxiresorufina
CYP2B	Barbitúricos, PCBs, DDT	Barbitúricos, esteroides, etilenmorfinas
CYP2E	Etanol, cetonas, bencenos, diabetes	Etanol, Aquilnitrosamina
CYP3A	Glucocorticoides	Esteroides
CYP4A	Clofibratos y Ftalatos	Ac. Láurico, Ac. Araquidónico

En el caso particular de los mamíferos, solo contienen subfamilias CYP1A y CYP1B, mientras que el CYPC ha sido detectado en invertebrados; sin embargo; en los peces, diferentes subfamilias del CYP han sido aisladas e identificadas en diferentes órganos como: hígado, riñón, intestino y ovario. Hasta la fecha, se han caracterizado más de 12 diferentes CYP en la especie *Oncorhynchus mykiss*, 5 en la especie *Stenostomus chrysops* y en la *Perca fluviatilis* y 4 en *Gadus morhua*, mientras que para la tilapia *Oreochromis niloticus* sólo se han descrito dos subfamilias del CYP (Zapata-Pérez *et al*; 2002). La familia CYP1 en los peces consiste en cuatro subfamilias: CYP1A, CYP1B, CYP1C y CYP1D. La mas relevante de estas

subfamilias es la CYP1A, que tiene un papel importante en el metabolismo y la activación de la carcinogénesis y se utiliza como un biomarcador para evaluar la contaminación del medio acuático (Brammell *et al*; 2010; Goksøyr, 1995; Jung *et al*; 2011; Nilsen *et al*; 1998). El ADNc que codifican enzimas CYP1A se ha aislado de varias especies de peces especies como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Rabergh *et al*; 2000), *Fundulus heteroclitus* (Morrison *et al*; 1998), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Stien *et al*; 1998), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Arukwe, 2002), medaka japonés (*Oryzias latipes*) (Kim *et al*; 2004), bagre amarillo (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Kim *et al*; 2008), el carpín (*Carassius auratus*) (Fu *et al*; 2011) y los peces hermafroditas, (*Rivulus marmoratus*) (Lee *et al*; 2005).

De las cuatro subfamilias de genes de CYP involucradas en la transformación de los xenobióticos tanto en mamíferos como en peces, el gen de la subfamilia CYP1A ha mostrado ser un sensible indicador de efecto a ciertos tipos de contaminantes orgánicos. En los organismos acuáticos, la inducción del gen CYP1A (medida generalmente por la actividad de la enzima Ethoxiresorufin-O-deethylasa (EROD), es comúnmente utilizada como un biomarcador para evaluar el impacto ambiental, causado por algunos contaminantes como PAHs, plaguicidas, dioxinas y PCBs (Bucheli y Fent, 1995). La subfamilia CYP1A, comprende dos genes, CYP1A1 y CYP1A2 (Goksøyr y Förlin, 1992).

La inducción de las enzimas de CYP en el hígado de los peces fue vista por primera vez como un indicador de contaminación acuática en la década de 1970, en un transecto contaminado por hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en la bahía de Galveston (Texas, EUA), con concentraciones de 68 a >1,000 ng/g en sedimento, se observó una inducción en la actividad de la CYP1A1 en corvina (*Micropogon undulatus*), por lo que actualmente se considera la inducción de este biomarcador para programas de monitoreo a nivel mundial, es probablemente el biomarcador más utilizado en ecotoxicología marina e indica exposición a sustancias que interactúan con el receptor aril hidrocarburo (AhR).

Los PAHs son agonistas de los receptores de hidrocarburos aromáticos (AhR), el receptor de AhR es un factor de transcripción citoplasmático perteneciente a la familia de los factores de transcripción con dominio bHLH-PAS (*basic helix loop helix*-PER ARNT-SIM). Esta familia de proteínas desempeña un papel importante en diversos procesos celulares como desarrollo, adaptación a hipoxia, control del ciclo circadiano y metabolismo de xenobióticos Delescluse, *et al*; 2000).

En la Figura 5 se muestra como estos contaminantes inducen la expresión de CYP1A a través de un ligando que se une al receptor AhR, después de su interacción con las sustancias xenobióticas, se lleva a el núcleo donde causa una mayor expresión de genes para CYP1A y, posteriormente, un aumento de la síntesis de las proteínas del citocromo, en algunas situaciones, la expresión de CYP puede ser activada sin ninguna exposición a ligandos exógenos, como condiciones de estrés como hiperoxia (Delescluse, *et al*; 2000).

Los genes CYP1A están regulados por el receptor AhR, el cual es activado por un ligando, como los PAH. En estudios en mamíferos, se informó un solo gen de receptor AhR a diferencia de los peces en los que se encontraron dos genes de receptor AhR en el *Fundulus heteroclitus* (Hahn; 2002) en el pez cebra (Anderson

et al; 2003), en medaka y en dos especies de pez globo (*Takifugu rubripes* y *Tetraodon fluviatilis*) (Hahn, 2002).

El receptor AhR en estado latente (sin un ligando unido) se localiza predominantemente anclado en el citoplasma de la célula como parte de un complejo heterodimérico 9S. Este complejo está formado por un dímero de la proteína de choque térmico 90 (Hsp90), una proteína de choque térmico con un peso de 23 KDa (p23) y una proteína de interacción con AhR. La activación del receptor AhR se caracteriza por su translocación al núcleo y la disociación del complejo al cual está unido. Una vez en el núcleo, el AhR, formará un heterodímero con la proteína translocador nuclear del receptor de arilos (ARNT). Este heterodímero AhR/ARNT interaccionará con proteínas acetil transferasas de histonas y factores remodeladores de cromatina, lo que resulta en la unión del complejo AhR/ARNT a una secuencia de ADN consenso (GCGTGA) conocida como elemento de respuesta a xenobióticos o elementos de respuesta a dioxinas (XRE, DRE). Dentro de estos genes se incluyen aquellos que codifican enzimas de la fase I del metabolismo de xenobióticos, representada por citocromos P450 (CYP450) y de la fase II la cual incluye a las glutatión S-transferasas (GST) y las UDP glucuronil transferasas (UGT). Los genes de la fase I, regulados por el AhR/ARNT, sólo incluyen a los miembros de la familia CYP1 de los CYP450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) (Puga *et al;* 2009). Van Veld y cols (1997) señalan una diferente ruta de expresión celular de CYPA1 después de la exposición de peces a determinados hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzopireno, directamente en el agua o por vía trófica, ya que detectaron una mayor inducción de CYPA1 a nivel de branquias, hígado y sistema vascular y una inmunoreacción a nivel intestinal cuando la exposición al contaminante fue por vía trófica. Una característica común de los compuestos inductores es la estructura planar y aromática que resulta en la unión a AhR, lo cual genera un aumento de mRNA, proteínas y actividad catalítica CYP1A (Goksøyr, 1995).

Con base en el gran número de estudios de campo realizados en los últimos 15 años, se ha demostrado claramente, que la expresión de CYPA1 está a menudo elevada en peces procedentes de aguas contaminadas con xenobióticos inductores de isoenzimas catalizadas por CYPs (Fu *et al;* 2010)

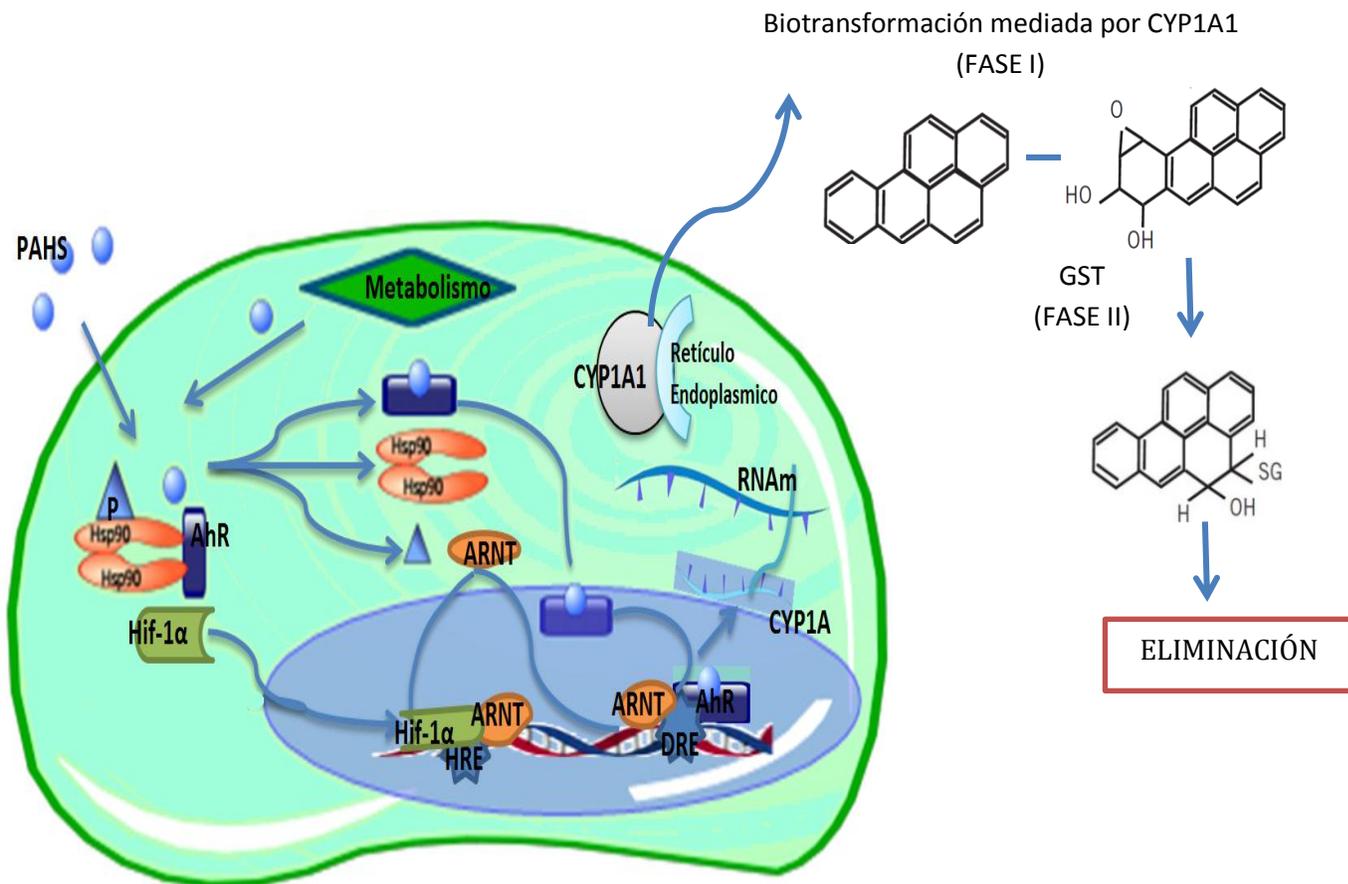
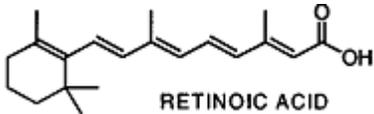
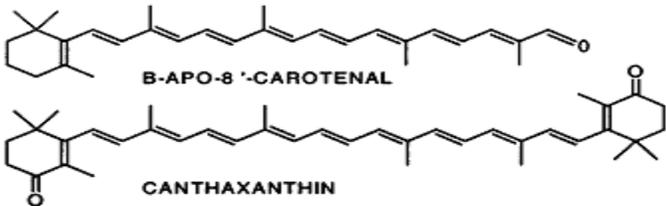
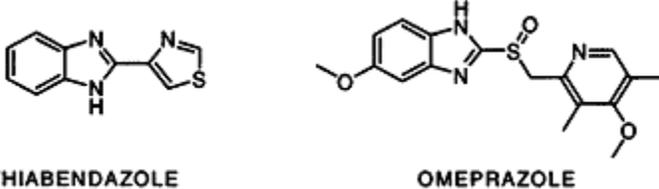
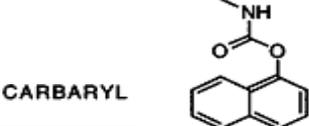
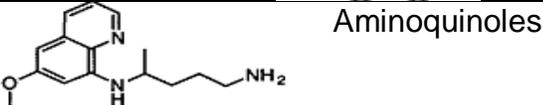


Figura 5. Inducción general de CYP1A1: la vía de transducción de señalización AhR. Biotransformación de PAHs por CYP1A1 (Fase I), conjugación (Fase II) mediada por Glutathion- S- Transferasa (GST).

Algunas moléculas capaces de inducir la expresión de CYP1A1, se muestran en la Tabla 5, las cuáles actúan como ligandos al receptor AhR.

Tabla 5. Principales familias de compuestos capaces de inducir CYP1A1. (Modificado de Delescluse *et al*; 2000)

PAHs y dioxinas	
<chem>Clc1cc(Cl)c2c(c1)oc3cc(Cl)c(Cl)cc3o2</chem>	<chem>Cc1ccc2ccc3ccccc3cc2c1</chem>
2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO- <i>p</i> -DIOXIN	3-METHYLCHOLANTHRENE
Compuestos de tiazol	
<chem>CC(C)OC(=O)C(=S)S1C=NC=C1S</chem>	

Retinoides	 <p>RETINOIC ACID</p>
Carotenoides	 <p>B-APO-8'-CAROTENAL</p> <p>CANTHAXANTHIN</p>
Benzimidazoles	 <p>THIABENDAZOLE</p> <p>OMEPRAZOLE</p>
Carbamatos	 <p>CARBARYL</p>
PRIMAQUINE	 <p>Aminoquinoles</p>

El contenido y la actividad de CYP1A inducida en peces está relacionada con niveles de PAHs en el ambiente (Stegeman y Lech, 1991; Stegeman y Hahn, 1994). En general, las características estructurales asociadas con la inducción CYP1A en peces son similares a las de mamíferos (Stegeman y Hahn, 1994).

El sistema CYP1A además de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena como drogas, plaguicidas, procarcinógenos, anestésicos, solventes orgánicos, entre muchos otros, también participa en el metabolismo de sustratos endógenos de importancia biológica como colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroidales y ácidos grasos. En cuanto a la distribución tejido específica, la mayoría de los estudios sobre su inducción en peces se han enfocado principalmente en hígado, siendo desconocido el rol comparativo que cumplen los diferentes órganos en el metabolismo a xenobioticos, Rees y cols (2003; 2005) demostraron que CYP1A es inducible por β -naftoflavona (bNF) en tejidos de trucha arcoiris (como branquias, riñón, hígado y cerebro), y en juveniles de salmón del Atlántico (mediante biopsias de branquias); Barrientos por su parte en el 2009 encuentra inducción de CYP1A, CYP3A y GST en diferentes tejidos (hígado, branquias y músculo) de trucha arcoiris, ante el tratamiento con Benzoato de

Emamectina (EMB) administrado vía oral, mostrando así que la expresión de CYP1A puede observarse no solo en tejido hepático.

Hassanin (2009) informó que el benzo (α) pireno (100 mg/kg) induce la expresión de CYP1A en el intestino y el hígado de tilapia, sin ninguna expresión detectable en branquias y riñón; resultados similares encontró Nelson 1996 que encontró un alto nivel de expresión de CYP1A en el intestino de peces expuestos a hidrocarburos policíclicos. Se observó un incremento en la expresión de CYP1A en intestino de medakas en respuesta a su alimentación de aceite contaminado con combustible, seguido de músculo, branquias e hígado; la inducción de CYP1A en el intestino puede reflejar funciones asociadas con la función del órgano en la absorción de nutrientes y el procesamiento de productos de desecho. Los niveles de expresión de CYP1A también aumentaron cuando la salinidad disminuyó, estos resultados mostraron que los genes CYP1A expresados en los tejidos analizados fueron regulados por los medakas (Tuan, *et al*; 2014). Varias investigaciones han demostrado que la actividad del CYP puede variar con el sexo, la etapa de madurez sexual, la disponibilidad de alimentos, temperatura y ambiente.

Aunque el hígado es el órgano más importante para la determinación de la expresión de CYP1A, se han reportado la presencia de CYP1A en otros tejidos, como en el estudio realizado en el río Willamette (Oregon, EUA), que mostró una buena respuesta del biomarcador en tejidos extra hepáticos y concentraciones elevadas de TCDF en músculo de carpa (Curtis *et al*; 1993).

Con las diversas técnicas que se han empleado para el estudio de la subfamilia CYP1A como hibridación *in situ*, PCR, Western blot, métodos enzimáticos e inmunohistoquímica, se ha demostrado que CYP1A se encuentra en diversos órganos como intestino (Sanden y Olsvik, 2009), branquias (Rees *et al.*, 2003), hígado, corazón y riñón (Sarasquete, 2000). A nivel celular, en un estudio de exposición a β -naftoflavona en *Gadus morhua* se comprobó que el mayor sitio de inducción de CYP1A fue en el tejido endotelial (Husøy *et al*; 1994).

Zapata y colaboradores en 2002 sugirieron que los niveles CYP1A aumentaron drásticamente en peces expuestos a altas concentraciones de PAHs, y como resultado se encontró una alta concentración de pireno en la bilis.

II.3.2 ESTRÉS OXIDANTE

Se entiende por estrés oxidante a la alteración generada por un desequilibrio entre la producción de radicales libres o agentes pro-oxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante o la capacidad antioxidante de un organismo. El proceso de estrés oxidante se ha considerado un mecanismo de toxicidad significativo sobre los organismos a los que afecta y ha permitido su uso como herramienta de diagnóstico, con capacidad predictiva de evidenciar el impacto de los contaminantes sobre los organismos (Corrales *et al*; 2012).

La generación endógena de especies reactivas de oxígeno (ERO) es parte normal del metabolismo de todo ser vivo, bajo condiciones fisiológicas normales se generan

cantidades significativas de especies reactivas de oxígeno, que juegan un rol fisiológicamente importante, son esenciales para la producción de energía, síntesis de compuestos biológicamente esenciales, en la fagocitosis y en la transducción de señales, lo cual es importante para la comunicación y función de los organismos. (Papas, 1999).

En condiciones normales existe una continua formación de ciertas especies reactivas de oxígeno, las cuales son producto del proceso de respiración celular (generación de ATP, fosforilación oxidativa). En células sanas las EROS, o agentes prooxidantes, son detoxificados por defensas antioxidantes, incluyendo atrapadores de bajo peso molecular (no enzimáticos) de radicales libres y enzimas antioxidantes específicas; sin embargo, cuando hay una marcada producción de dichas especies reactivas el sistema de defensa puede resultar insuficiente, lo que lleva a un incremento en el daño a macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, alterando diversos procesos celulares (Bartozs, 2009).

Un xenobiótico es capaz de inducir estrés oxidante como resultado de un proceso cíclico de oxidación reducción (ciclo redox) en el cual, al ser biotransformado, sufre la reducción por un electrón donado por el NADPH, transformándose luego en un intermediario o especie reactiva que puede ser un radical libre (Figura 6). Esta especie reactiva, al intentar recuperar su configuración original, busca transferir o donar su electrón no apareado al oxígeno (O_2). Así el O_2 se reduce transformándose en el anión superóxido (O_2^-); el O_2^- reacciona a su vez con otras moléculas o consigo mismo y genera el radical hidroxilo ($OH\cdot$) que mediante una serie de reacciones en cadena y la capacidad de oxidar macromoléculas puede ocasionar la muerte celular (Ochoa, 2008)

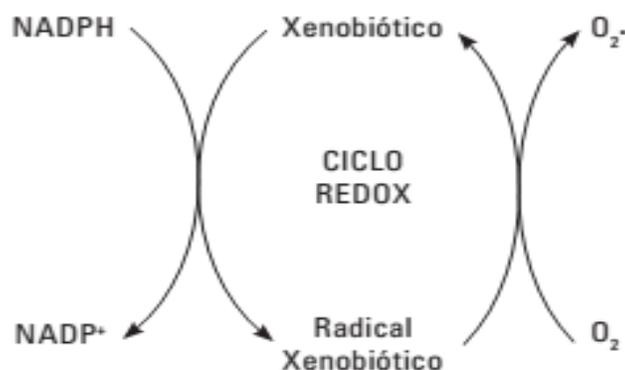


Figura 6. Esquema de óxido- reducción de un xenobiótico.
(Tomado de Ochoa DM, 2008)

Los peces exhiben respuestas celulares muy similares ante el estrés oxidante (Fraga *et al*; 1996); no obstante, el grado de variación en los niveles basales de dichas actividades entre especies de peces y en diferentes tejidos es evidente, peces de agua dulce expuestos a diferentes clases de contaminantes como insecticidas organofosforados (diclorvos, azinfosmetil), herbicidas, piretroides (deltametrina) o hidrocarburos aromáticos policíclicos (fenantreno), mostraron daño tisular por estrés oxidante en exposiciones crónicas, así como alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes, con tendencia al aumento, principalmente en hígado y branquias, en exposiciones agudas. Sin embargo, con altos niveles de

contaminación la concentración de dichas enzimas puede verse reducida (Dorval; 2003).

Tres de las principales fuentes antioxidantes son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX); sin embargo, debe tenerse en cuenta otra serie de enzimas especializadas con funciones indirectamente antioxidantes, como es el caso de la glutatión reductasa (GR) cuya función es regenerar el glutatión a su forma reducida (GSH) y la glutatión-S-transferasa (GST) que participa en el transporte y la eliminación de componentes reactivos y en el sistema de transporte de conjugados con el glutatión (Figura 7), estas enzimas antioxidantes han sido propuestas como biomarcadores de contaminación mediada por estrés oxidante y su inducción como una respuesta específica ante la exposición a contaminantes (Van der Oost *et al*; 2003).

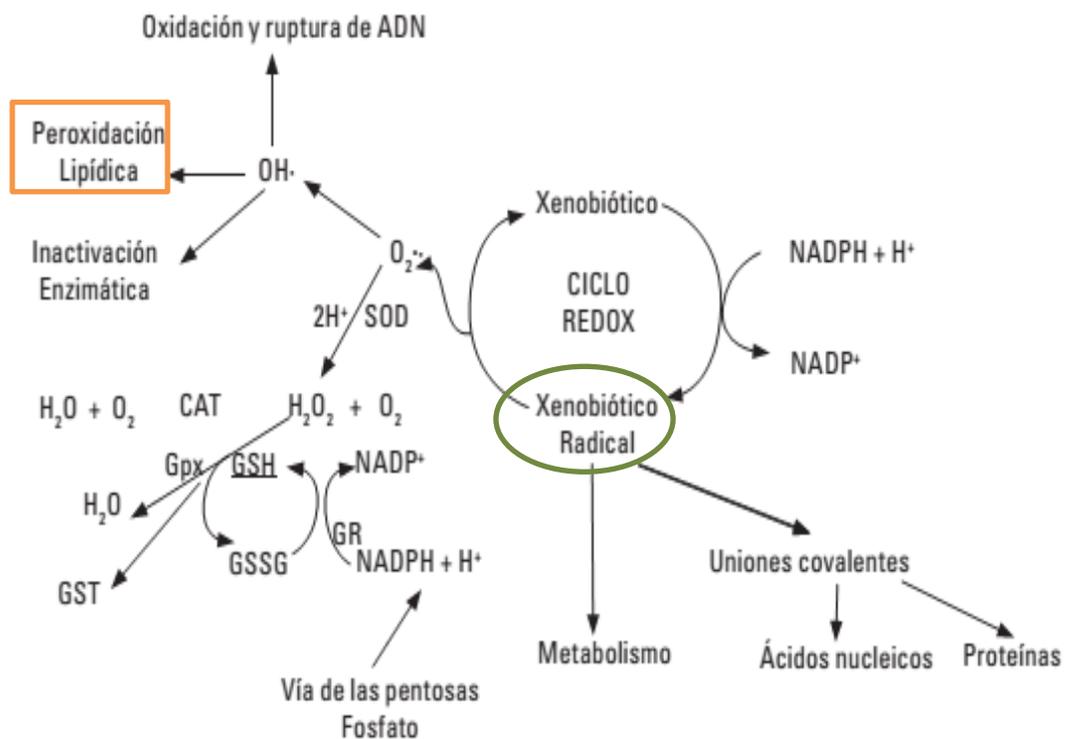


Figura 7. Sitio de acción de las principales defensas antioxidantes y principales consecuencias toxicológicas.

La GR cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) usando el NADPH + H⁺ como donador de hidrógenos; por esta razón la glutatión reductasa es la responsable del mantenimiento de las concentraciones intracelulares del glutatión reducido (GSH).

En estudios con *Oreochromis niloticus* se observó un descenso en la actividad de esta enzima cuando se realizaron muestreos de sitios contaminados (Diaz, 1996). En *Cyprinus carpio* e *Ictalurus nebulosus* se encontró una inhibición de la GR en ambas especies directamente proporcional con la oxidación del GSH (Ozcan *et al*; 2004); dichos resultados concuerdan con los realizados con el mismo plaguicida y el metabolismo del GSH en el que la administración de precursores del GSH favorecen directamente los niveles de la GR. La GST es una familia de enzimas de

la fase II de biotransformación, su uso como biomarcador de exposición a xenobióticos que generan estrés oxidante ha sido reportado en *Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio* y *Channa punctatus* (Ochoa, 2008).

El glutatión (L-g-glutamil-L-cisteinil-glicina) es un tripéptido hidrosoluble formado por los aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina. Esta molécula es un antioxidante celular esencial, que está presente en todos los órganos y tejidos, especialmente en el hígado, donde se encuentran las mayores concentraciones, la molécula se encuentra libre y unida a proteínas. La concentración total de glutatión (GSht) es la suma de la fracción de glutatión libre y la fracción de glutatión unida a proteínas. A su vez, la fracción libre está integrada por la forma tiol reducida llamada glutatión reducido (GSH) y la forma oxidada o disulfuro llamada glutatión oxidado (GSSG). La forma reducida GSH es la forma activa de la molécula, es la más abundante y se la encuentra en el interior de las células (Andrea *et al*; 2013).

La síntesis del GSH se produce en el citosol de todas la células a partir de sus aminoácidos precursores: glicina, cisteína y ácido glutámico por la acción consecutiva de dos enzimas: glutamato cisteína ligasa y glutatión sintetasa. En una primera reacción, la enzima glutamato cisteína ligasa (GCL) usa como sustratos a los aminoácidos glutamato y cisteína y forma el dipéptido g-L-glutamilcisteína que en un segunda reacción es combinado con glicina en la reacción catalizada por la enzima glutatión sintetasa formando GSH. El ATP (adenosintrifosfato) actúa como co-sustrato para ambas enzimas.

La síntesis de GSH sólo ocurre en el citoplasma, sin embargo en las células eucariotas, el GSH se encuentra en casi todos los compartimentos celulares, incluyendo al núcleo. El transporte entre los diferentes compartimentos celulares es fundamental para la regulación de la proliferación celular. Dentro de las células, el GSH se encuentra predominantemente en su forma reducida, excepto en el lumen del retículo endoplásmico donde existe sólo en su forma oxidada (GSSG). Entre un 10 a un 15% del GSH intracelular se encuentra en la mitocondria donde alcanza una concentración de 10 a 12 mM en tanto que en el citosol la concentración es de 7 mM. Esta diferencia de concentración se debe a que en el interior de la mitocondria no se encuentra la enzima catalasa, por lo tanto, GSH es el encargado de inactivar el peróxido de hidrógeno generado durante los procesos oxidativos que ocurren en la matriz mitocondrial (Andrea *et al*; 2013).

La síntesis enzimática de GSH está controlada a través de la inducción de los genes *Gclc* y *Gclm* que conducen a la síntesis de las subunidades de la enzima GCL, estos genes son estimulados principalmente cuando la célula debe aumentar sus sistemas de defensa ante el estrés oxidativo, ya que poseen en su promotor un sitio de reconocimiento común para los factores de transcripción kappa β (NF-kB), Sp-1, AP-1 AP-2, respuesta antioxidante (ARE) y elementos de respuesta electrofílica (EpRE) (Figura 8) (Regoli, *et al*; 2014).

El GSH es muy importante en la defensa celular pues puede actuar como sustrato para algunas enzimas antioxidantes, como un atrapador independiente de radicales libres; manteniendo el estado reducido de los grupos tioles de las proteínas o participando en la desintoxicación de muchos xenobióticos con centros

electrofílicos, también es capaz de recuperar la vitamina C, la cual a su vez es capaz de regenerar la vitamina E de su estado oxidado.

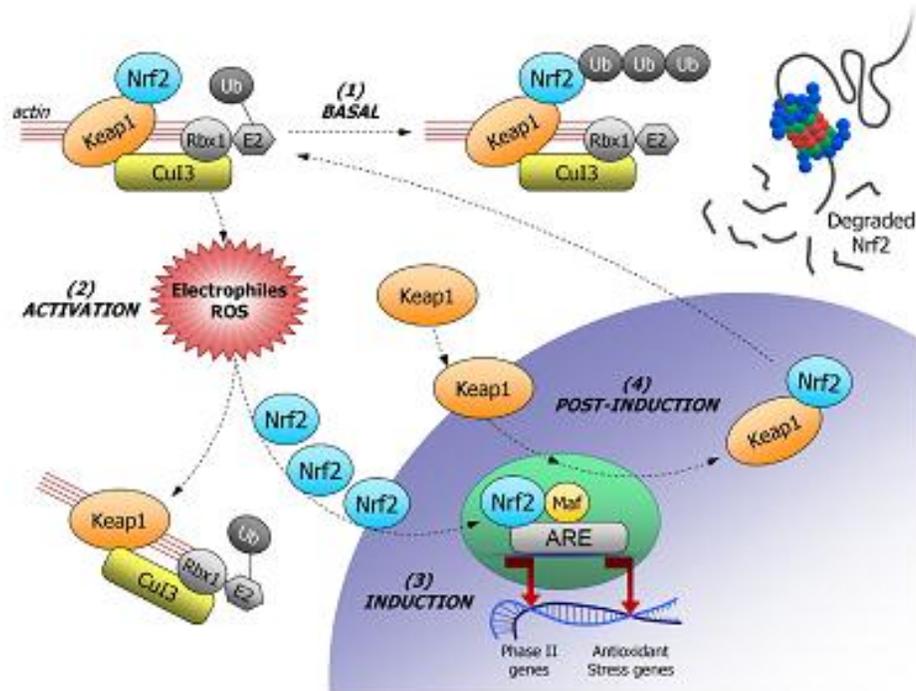


Figura 8. Representación esquemática de la regulación Nrf2 y Keap1 bajo condiciones basales y en respuesta a estrés oxidante. Tomado de Regoli, 2014

La conjugación con glutatión está catalizada por la glutatión γ -S-transferasa (GST), enzima de la que se conocen seis isoformas que difieren en cuanto a la especificidad por el sustrato y su distribución tisular. La enzima usa directamente GSH, formando tioéteres. Los conjugados con glutatión son eliminados directamente por la bilis, y en menor medida por la orina. En este último caso, antes de ser excretado, el conjugado con GSH sufre un proceso metabólico por el que secuencialmente es eliminado el resto γ -glutámico, la glicina, de la molécula de GSH y finalmente es acetilado el grupo amino de la cisteína, dando origen a derivados del ácido mercaptúrico que son los metabolitos que finalmente aparecen en la orina (Figura 9). El glutamato y la cisteína se unen para formar el dipéptido γ -glutamilcisteína a través de la γ -glutamilcisteína sintetasa, posteriormente se adiciona glicina para formar GSH en una reacción catalizada por GSH sintetasa, la célula puede disponer del GSH formado ya sea en reacciones redox o en otros procesos de desintoxicación al conjugarse con los xenobióticos mediante la glutatión-S-transferasa (GST) y así ser transportados al exterior de la célula; el glutatión reducido también puede salir de la célula mediante los transportadores MRP 1 y 2 (proteína de resistencia múltiple), proceso que requiere de energía en forma de ATP, y así llegar al espacio extracelular en donde se metaboliza por la γ -glutamil transpeptidasa (γ -GT) para generar cisteinilglicina la cual puede ser fragmentada por dipeptidasas generando cisteína y glicina, que junto con el glutamato pueden entrar nuevamente a la célula mediante co-transportadores y comenzar nuevamente el ciclo; el glutatión reducido, utilizado en los diversos

organelos es transportado en forma de GSSG hacia el citosol donde puede iniciar el ciclo de reducción y generar GSH. Todo el GSH que se encuentra dentro de las células es sintetizado a partir de sus aminoácidos precursores, para los cuales hay sistemas de transporte hacia el interior celular. Por lo tanto, entran aminoácidos precursores y se exporta GSH, GSSG y conjugados de GSH. Los aminoácidos cisteína y glicina ingresan tanto al hepatocito como al eritrocito a través del transportador ACS dependiente de Na⁺. El aminoácido glicina también puede ingresar por el transportador Gly dependiente de Na⁺ y Cl⁻ (Figura 10). Existe actividad GST en aquellos tejidos que están en contacto con el O₂, o bien en los que existe un metabolismo oxidante importante; el glutatión pertenece a las reacciones de biotransformación de la fase II, es decir, donde el xenobiótico o un metabolito derivado de la fase I es covalentemente enlazado a una molécula endógena. La actividad de GST depende de un suministro constante de GSH, así como la acción de transportadores específicos para eliminar los conjugados de GSH a partir de la célula, por lo que la función principal de las GST es desintoxicar xenobióticos, catalizando el ataque nucleofílico por el GSH en el carbono electrófilo, azufre, o átomos de nitrógeno de dichos sustratos xenobióticos no polares, evitando de este modo su interacción con proteínas celulares esenciales y ácidos nucleicos. En concreto, la función de GST en este papel es doble: a unirse tanto el sustrato a la enzima hidrófobo sitio H y GSH en el sitio G hidrófila adyacente, que en conjunto forman el sitio activo de la enzima, y, posteriormente, para activar el grupo tiol de GSH, lo que permite el ataque nucleófilo sobre el sustrato (Wu *et al*; 2014).

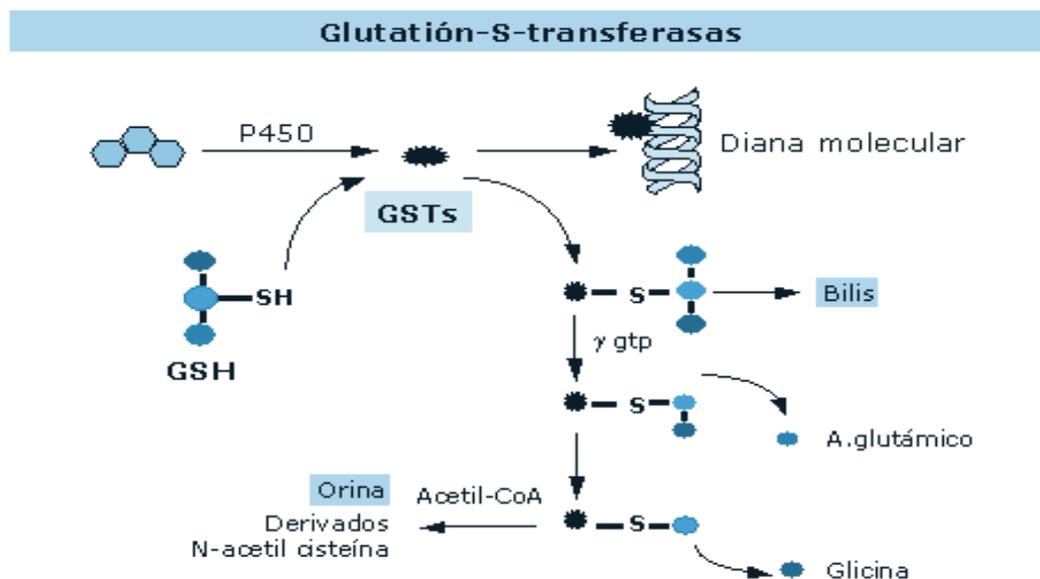


Figura 9. Conjugación de la glutatión catalizada por GST

Se ha observado que la actividad de la GST se induce en diferentes especies por contaminantes tales como metales (Ahner *et al*; 2002), PAHs (An-Ping *et al*; 2003), PCBs (Kamohara *et al*; 1984) y plaguicidas (Almli *et al*; 2002). Sin embargo, en otras especies los mismos compuestos pueden ocasionar una inhibición de esta enzima. Esto se puede deber a diferencias en las formas presentes en los diversos tejidos o entre especies. Aún con los factores de confusión mencionados, la GST ha sido usada como biomarcador de exposición a xenobióticos electrofílicos (Hodge *et al*;

2000). En mamíferos se clasifican en tres superfamilias, GSTs citosólicas, GSTs mitocondriales y GSTs microsomales o MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism) (McIlwain *et al*; 2006).

Los substratos para GST comparten tres características en común: pueden ser hidrofóbicos en algún grado, deben contener un átomo de carbono electrofílico y deben reaccionar no-enzimáticamente con la glutatión a una tasa medible; las branquias o hígado son los tejidos más idóneos para la determinación de la GST. (Sipes y Gandolfi, 1991).

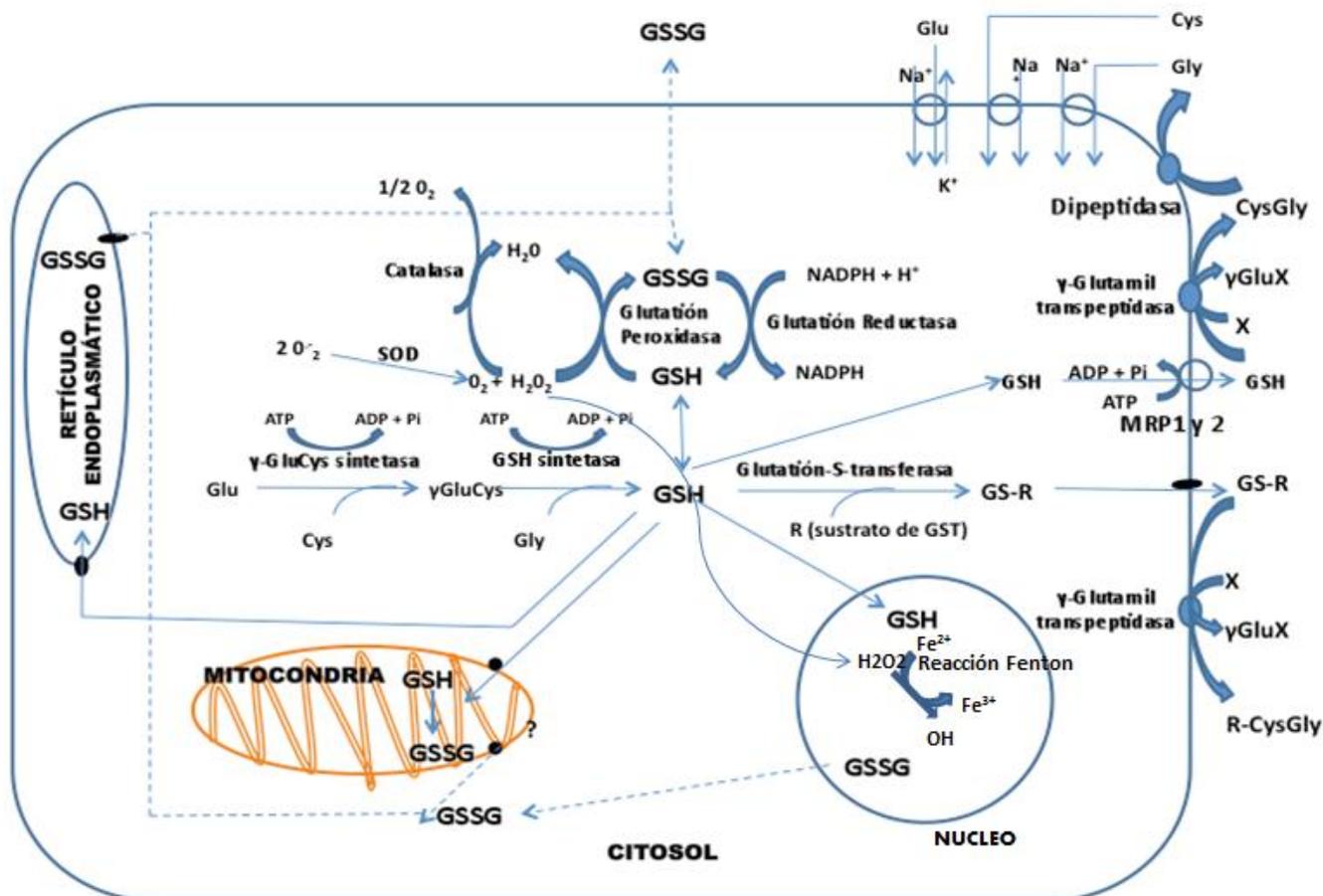


Figura 10. Metabolismo de Glutatión: generado en citoplasma.

La expresión de GST en peces no está extensamente caracterizada, como en mamíferos e insectos; sin embargo, la inducción de la actividad de GST hepática, medida por conjugación con CDNB, se ha observado en varias especies de peces (George, 1994), se ha observado también un aumento en la actividad de GST en varios estudios después de la exposición de los peces a xenobióticos como PAHs, PCBs, etcétera. Cárcamo y colaboradores (2014) examinaron el comportamiento de enzimas de biotransformación CYP1A1, FMO y GST como representantes de las fases I y II del metabolismo en respuesta a EMB en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), donde la actividad de GST en branquias e intestino mostró un aumento. El aumento de la actividad de GST en el hígado y branquias de tilapias (*Oreochromis niloticus*) de Río Monjolinho es inducido para neutralizar la toxicidad

de los contaminantes presentes. Sin embargo, la actividad de GST disminuyó en músculo, la inducción de GST se produce en varios tejidos en diferentes períodos de exposición a inductores, dependiendo del tipo de tejido y la naturaleza del inductor (Carvalho *et al*; 2012).

Dentro de las principales lesiones asociadas con el ataque de estos radicales se encuentra la oxidación de las membranas lipídicas (peroxidación lipídica), oxidación a proteínas, oxidación a ácidos nucleicos y alteración del estatus celular redox (Fraga *et al*, 1996).

La peroxidación lipídica (LPO) se ha reportado como uno de los efectos de la acción tóxica de contaminantes ambientales, que conduce a pérdida de función celular bajo condiciones de estrés oxidativo. La peroxidación lipídica puede darse en los lípidos que se encuentran en la membrana celular, hecho que puede alterar la cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica, además de conducir a una inestabilidad de la membrana y consecuente daño y muerte celular (Oakes *et al*; 2003). La peroxidación lipídica proviene de una reacción en cadena cuyos productos secundarios son capaces de inactivar enzimas, reaccionar con grupos específicos de proteínas e incluso interactuar con el ADN celular. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son un sustrato afín para la peroxidación lipídica y su susceptibilidad aumenta a medida que se eleva el número de enlaces insaturados. La peroxidación lipídica se inicia por la sustracción de un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH₂-) en el ácido graso poliinsaturado (LH) generando el radical lipídico (L·) (Figura 11) Posteriormente se genera un dieno conjugado que reacciona rápidamente con el O₂ para dar origen a un radical peroxilo (LOO·) y se forma un hidroperóxido lipídico (LOOH) y un nuevo L. Los hidroperóxidos lipídicos pueden reaccionar con algunos complejos de metales de transición para dar origen a los radicales alcoxilo (LO·). Adicionalmente el LOOH puede ser descompuesto en varias especies reactivas incluyendo aldehídos como el malondialdehído (MDA), alcanos, epóxidos lipídicos y alcoholes, la mayoría de los cuales son tóxicos y mutágenos activos (Figura 11).

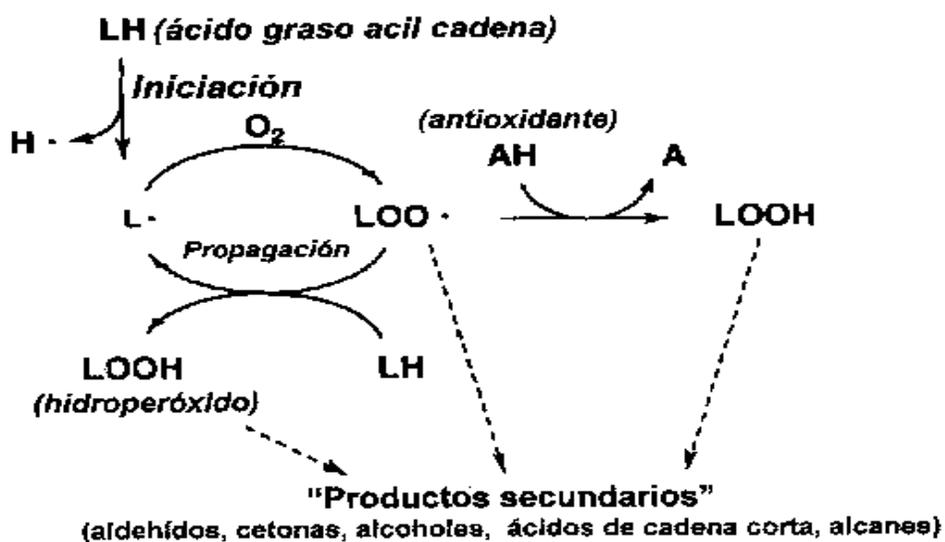


Figura 11. Peroxidación lipídica.

Una de las técnicas más comúnmente utilizadas en peces para medir los niveles de peroxidación lipídica es el empleo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que cuantifica los niveles de producción de malondialdehído (MDA). En *Catostomus comersoni* proveniente de diferentes partes de un río contaminado con descargas de la industria del papel se demostraron aumentos en los niveles de TBARS tanto hepático como gonadal. La inducción de la peroxidación lipídica se ha observado en peces expuestos a organofosforados como el clorpirifos en *Gambusia affinis* (Gluszczak *et al*; 2006), igualmente se han encontrado efectos de peroxidación lipídica en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y yamú (*Brycon amazonicus*) expuestos a una concentración subletal del herbicida comercial Roundup (Abele y Puntarulo, 2004).

Al proceso de estrés oxidante se le ha encontrado gran aporte significativo cuando es relacionado con diferentes tipos de contaminantes ambientales que ingresan al agua y causan efectos en los organismos acuáticos. Se ha hallado que los peces son organismos sensibles ante los cambios provocados por agentes inductores de estrés oxidante. El entendimiento de los mecanismos por los cuales el estrés oxidante genera sus efectos es un tema de gran importancia al momento de identificar posibles biomarcadores que indiquen los efectos de la exposición de los organismos acuáticos ante contaminantes.

II.3.4 COLINESTERASA

La actividad de la colinesterasa (ChE) ha sido extensamente usada para estimar la exposición a plaguicidas organofosforados (OFs) y carbámicos (CBs) tanto en humanos como en vida silvestre. Las colinesterasas son una familia de enzimas las cuales fueron clasificadas en tres clases: esterasas A, B y C basadas en su comportamiento hacia los compuestos OFs. Las esterasas A hidrolizan a los oxones y otros triesteres OFs. Las esterasas B son un gran grupo de serina hidrolasas las cuales son inhibidas por los OFs, e incluye el grupo de las colinesterasas. Las C esterasas no interactúan con los OFs (von Osten, 2005). Las colinesterasas se dividen en acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BChE).

La AChE es la responsable del rompimiento del neurotransmisor acetilcolina dentro de la sinapsis colinérgica durante la transmisión del impulso nervioso, esta enzima actúa hidrolizando la Aceticolina. Existen diversas formas moleculares definidas de la enzima, y la actividad de la misma parece localizarse en las membranas presináptica y posináptica y en la lámina basal de la unión neuromuscular. Tanto nervio como músculo tienen la propiedad de sintetizar AChE, y la AChE sináptica se sintetiza en ambos tejidos (Figura 12).

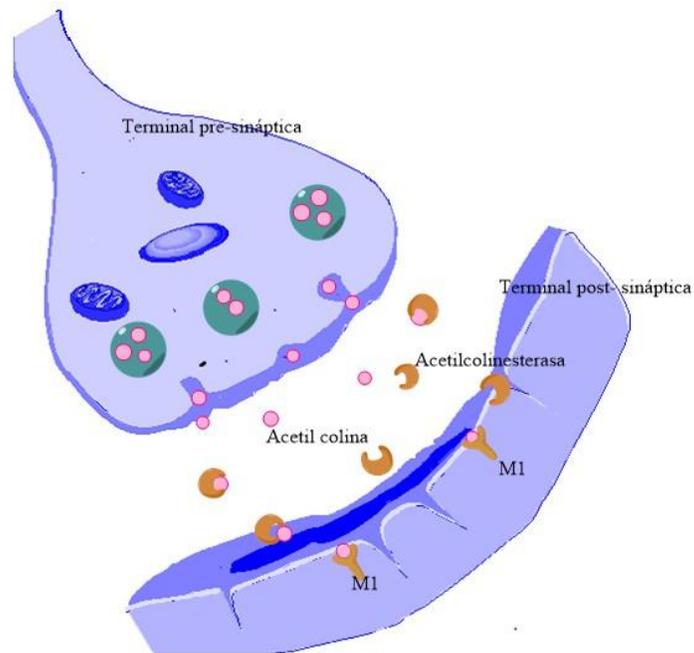


Figura 12. Liberación de neurotransmisores de acetilcolina y estos son hidrolizados por la enzima AChE.

La inhibición de esta enzima resulta en la acumulación del neurotransmisor en la abertura sináptica originando una estimulación continua de los receptores localizados en la membrana post-sináptica que puede conducir a la muerte generalmente debido a fallo respiratorio (WHO, 1986) (Figura13).

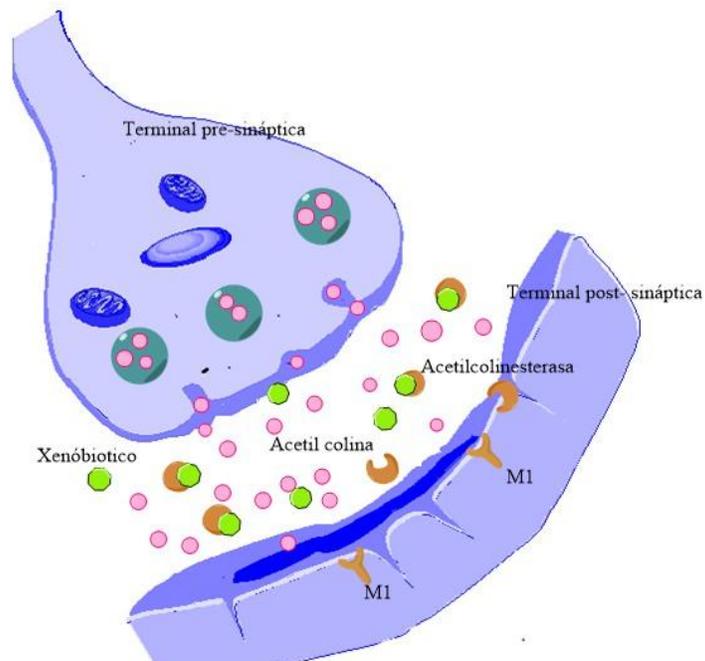


Figura 13. Bloqueo de la actividad de la enzima AChE, se observa acumulación de acetilcolina.

En peces expuestos a plaguicidas organofosforados y carbámicos se ha observado la inhibición de la acetilcolinesterasa de músculo más que en cerebro, lo cual puede ser un efecto protector del organismo. Este fenómeno se ha observado en peces (*Carassius auratus*) expuestos a 0.5 mg L⁻¹ de Carbofuran (Bretaud *et al*; 2000), así como en gambusias (*Gambusia affinis*) expuestas a Clorpirifos (Carr *et al*; 1997). Existe una mayor actividad de AChE en cerebro que en músculo en tiburón azul en respuesta a clorpirifos (Alves *et al*; 2015).

Vinagre y colaboradores (2012) seleccionaron tejido muscular de nueve especies de peces, mayormente teleósteos en los cuáles se midieron la actividad de ChE y la peroxidación de lípidos como marcadores de exposición de productos químicos neurotóxicos.

Además de los plaguicidas, existen otros compuestos con la capacidad de inhabilitar la capacidad hidrolítica de esta enzima, por ejemplo algunos metales como sodio, zinc, cobre y plomo y algunos compuestos orgánicos entre los que destacan aminonitrilos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Cikcikoglu, 2014).

Rodríguez-Fuentes y Gold- Bouchot (2000) determinaron una alta correlación entre el contenido de PAHs en sedimentos y la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa en el cerebro de la mojarra tilapia en dos lagunas de Tabasco.

III. ZONA DE ESTUDIO

La Península de Yucatán (PY), está integrada por los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán, y se ubica al sureste de la República Mexicana. La superficie total de los estados de la Península de Yucatán, equivale a 141,523 km² de los cuales el 37% corresponde a Campeche, el 36% a Quintana Roo y el 28% a Yucatán (Figura 14). Queda comprendido entre los paralelos 19° 15' y 21° 37' L.N. y los meridianos 87° 30' y 90° 26' L.O. En la Península de Yucatán no se tienen montañas, ni grandes elevaciones de terreno ni escurrimientos superficiales de importancia, se describe como una superficie plana y de baja altitud; su principal rasgo fisiográfico es la Sierrita de Ticul. La precipitación media en la región península de Yucatán, se estima en 1,157 mm anuales; y de acuerdo con los registros de lluvias puntuales varía desde los 458 mm en la costa norte de Yucatán, a los 1,615 mm en la cuenca del río Chumpán, en el sur de Campeche; observándose que la precipitación media anual de la Región es superior a la media nacional (772 mm); mientras que las medias estatales son de: 1,232 mm en Campeche, 1,232 mm en Quintana Roo y 1,006 mm en Yucatán (CCPY, 2012). El clima comprende tres temporadas que lo caracterizan: cálida – seca (Marzo-Mayo), invierno con lluvias cortas ocasionales (Noviembre- Febrero) y lluviosa (Junio-Octubre). La temperatura media anual del aire es de 26.1°C con un mínimo de 5°C y un máximo de 42.5°C, las precipitaciones anuales varían desde 760 mm/año a 1198 mm/año en la zona norte y de 1138 mm/año a 1440 mm/año en la parte sur, recibiendo así un promedio de 172158 x10⁶m³ de agua de lluvia por año, alrededor del 85% de la precipitación es evapotranspirada (Schmitter-Soto, *et al*; 2002). La evaporación potencial media anual es de 2255 mm, con una variación mensual entre 136 mm en diciembre a 264 mm en el mes de mayo; y la humedad relativa alcanza 80% en los litorales y 72% en el interior (INEGI, 2012).

La característica más notoria del estado es la ausencia de corrientes superficiales, ya que la mayor parte del agua llovida se evapora o es absorbida por plantas y suelos, el resto satura al terreno y se infiltra en el subsuelo, dando origen a las aguas subterráneas.

El acuífero de la región se ve favorecido por la recarga del agua de lluvia, sin embargo es altamente vulnerable a la contaminación antropogénica, debido a la fracturación, la porosidad de la roca calcárea y la presencia de oquedades, que contribuyen a una alta permeabilidad y gran conductividad hidráulica, lo cual facilita la entrada de contaminantes y su rápida propagación. En general, en la Península de Yucatán, el agua dulce se encuentra rodeada por agua salada marina, donde por diferencia de densidades, las aguas de recarga natural con menores contenidos de sales flotan sobre el agua salobre o salina con mayor concentración de sales.

Bajo este contexto, el agua subterránea de la región se encuentra distribuida de manera discontinua, debido por una parte al origen y a la conformación fisiográfica de la Península y por la otra, a su estructura litológica; de aquí se deriva que la zona de recarga y a su vez de mayor precipitación, se ubica en la parte sur y central de la Región, donde precisamente se localizan las elevaciones topográficas más prominentes.

Por tanto, como resultado de la permeabilidad y la solubilidad del sustrato, la PY registra numerosas formaciones de terreno derivadas de la roca caliza, entre las que destacan las cavernas y los cenotes, estos son uno de los múltiples reclamos turísticos de la zona, ya que muchos se han habilitado para bucear o bañarse (SECTUR, 2012); también son una vía libre para la contaminación.

El origen de los cenotes se debe al proceso geomorfológico denominado karst, que consiste en la combinación de los mecanismos de disolución, colapso y construcción de la caliza, se estima que existen entre 7,000 y 8,000 (Beddows *et al*; 2007). Los cenotes se clasifican de acuerdo con su morfología, (abiertos o cerrados) y por sus características hidrogeoquímicas, como jóvenes (lóticos), que se conectan libremente con el acuífero a través de los túneles de las cuevas, el flujo del agua es horizontal y el tiempo de residencia del agua es corto, y viejos (lénticos) que presentan un bloqueo de la conexión principal con el acuífero, debido al colapso del techo o las paredes y la sedimentación, con lo cual el intercambio con el agua subterránea es restringido y el recambio del agua es más lento. En ambos tipos de cenote existe una estratificación térmica durante las temporadas de lluvias y secas, mientras que la columna de agua se mantiene mezclada durante invierno (Herrera y Comín; 2000). La temperatura promedio del agua en cenotes es de 24° - 29° C, el pH también es homogéneo y estable en cenotes lóticos con valores < 7 mientras que en cenotes lénticos hay un gradiente de pH a lo largo de la columna, por lo que el rango de pH va de 6.7 a 8 (Alcocer *et al.*, 1998).

Los sólidos disueltos totales en el agua de lluvia se concentran por evapotranspiración y, en combinación con la disolución de minerales que se encuentran en los suelos contribuyen a aumentar su cantidad, en cenotes se tiene una concentración uniforme (<3 g/L), mientras que la conductividad oscila entre 42.5 y 7390 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Schmitter-Soto *et al*; 2002).

El agua de los cenotes acumula materia orgánica disuelta, particulada, detrito orgánico y organismos vivientes, donde la materia orgánica particulada y el detrito se remineralizan en nutrientes por vía microbiana, modificando las características fisicoquímicas del agua y reflejadas en el pH, la turbidez y el contenido de oxígeno disuelto; sin embargo, el tamaño de la apertura del cenote puede influir en la cantidad de materia orgánica que puede introducirse desde los terrenos adyacentes del suelo en épocas de lluvia, así mismo la concentración de materia orgánica comúnmente se incrementa conforme disminuye el tamaño de grano del sedimento y por lo tanto, las concentraciones de materia orgánica son mayores en las áreas más profundas de los cuerpos de agua, donde los sedimentos finos se depositan más lentamente que en las zonas someras donde se acumulan los sedimentos gruesos. Adicionalmente, el aporte de materia orgánica puede aparecer diluido por la adición de partículas sedimentarias cársticas como en el caso del incremento del aporte sedimentario por erosión en la cuenca de drenaje, o incrementadas por la disolución de carbonatos en el caso de ambientes acidificados.

El sedimento está formado por partículas tanto de origen biológico como de origen inorgánico; por tanto, el estudio de sus características aporta información tanto de factores bióticos como abióticos de relevancia para la evaluación de cualquier sistema acuático. Los sedimentos pueden ser considerados como un banco de

información ambiental ya que tanto los procesos naturales como las actividades antropogénicas que se realizan en los alrededores de los cuerpos de agua y sus cuencas de drenaje dejan, directa o indirectamente, una huella en el registro sedimentario (Alcala-Herrera *et al.*, 1994). Los residuos se filtran en este laberinto de cuevas, y los contaminantes fluyen rápidamente a través de ellas hasta el mar. Estudios recientes han detectado la presencia de hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos (PAHs) en cuerpos de agua dulce en el estado (Gold-Bouchot, 2009). La explicación que se ofrece al respecto es la presencia de escurrimientos desde las carreteras cercanas (Metcalf et al, 2011).

Se seleccionaron 7 cenotes ubicados dentro de la zona hidrológica conocida como “anillo de cenotes” los cuales se resumen en la siguiente tabla y se observan en la Figura 14.

Tabla 6. Ubicación de cenotes.

Ubicación	Nombre	Coordenadas		Clave
Carr- kinchil- sinkeuel	Rancho Sta Julia	20° 48' 47.9"	90° 11' 46.8"	E6-CL
San Antonio Mullix	X- batún	21° 40' 26.059"	89° 46' 24.265"	E9-CL
Yaxcopoil	Yaxcopoil	20° 44' 11.3"	89° 43' 55.4"	E10-CL
Pixyah	Nah-yah	20° 38' 47.4"	89° 24' 16.6"	E13-CUZ
Homun	Yaxbacantun	20° 43' 37.2"	89° 16' 05.3"	E19-CUZ
Santo domingo- Buctzotz	Chen Vazquez	21°08'54.2"	88°39'28.2"	E22-BUX
Carretera el tajo	Rancho Xlabon Subim	21°21' 35.2"	88° 39' 33.4"	E25-DZ

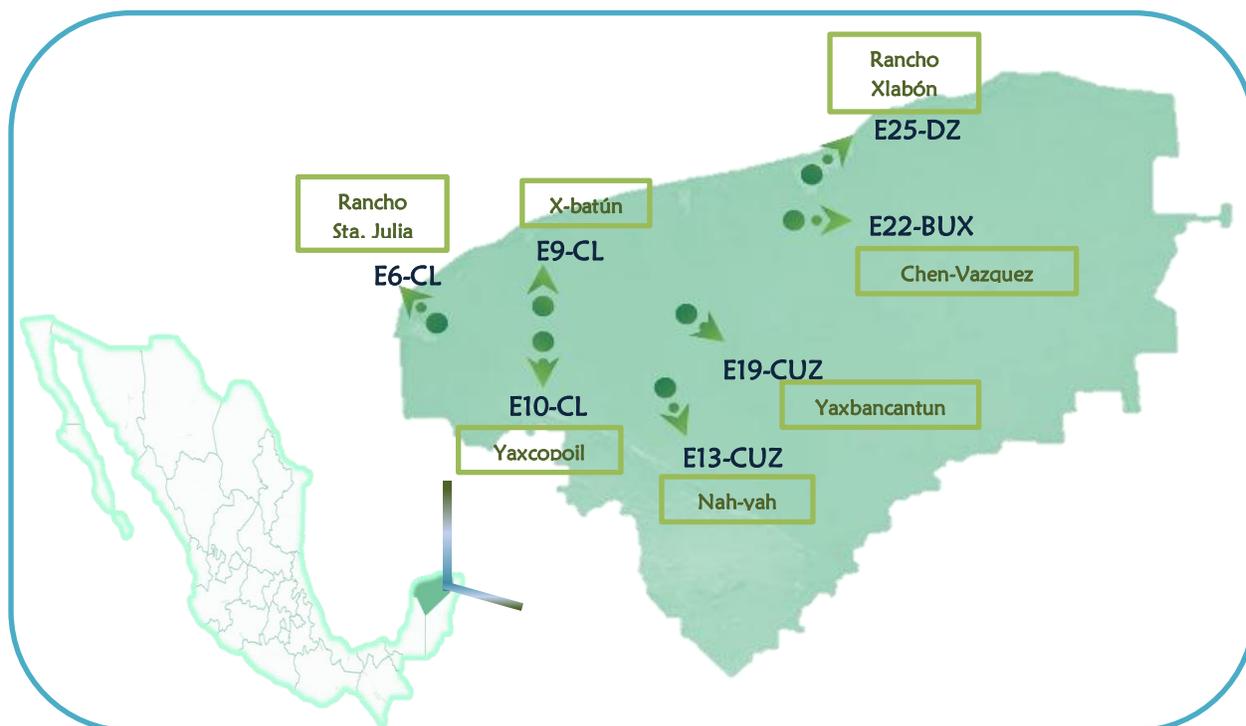


Figura 14. Mapa del estado de Yucatán, con su ubicación en la República Mexicana, en el que se señalan los cenotes muestreados.

III.I Cenotes muestreados

a. Cenote “Rancho Santa Julia” (E6)

Cenote ubicado al sureste de la Península de Yucatán, dentro del municipio de Kinchil, en el Rancho Santa Julia, clasificado como cenote abierto, presenta abundante vegetación circundante, agua turbia de color verde a café (Figura 15).



Figura 15. Fotografía de cenote E6. A: Temporada de secas, B: Temporada de lluvias.

b. Cenote “X- batún” (E9).

Cenote ubicado al sureste de la Península de Yucatán, dentro de la ex hacienda San Antonio Mulix en el municipio de Umán a 49 km de la ciudad de Mérida, clasificado como cenote abierto, cenote de gran importancia turística para la zona con agua transparente de color azul turquesa. (Figura 16).

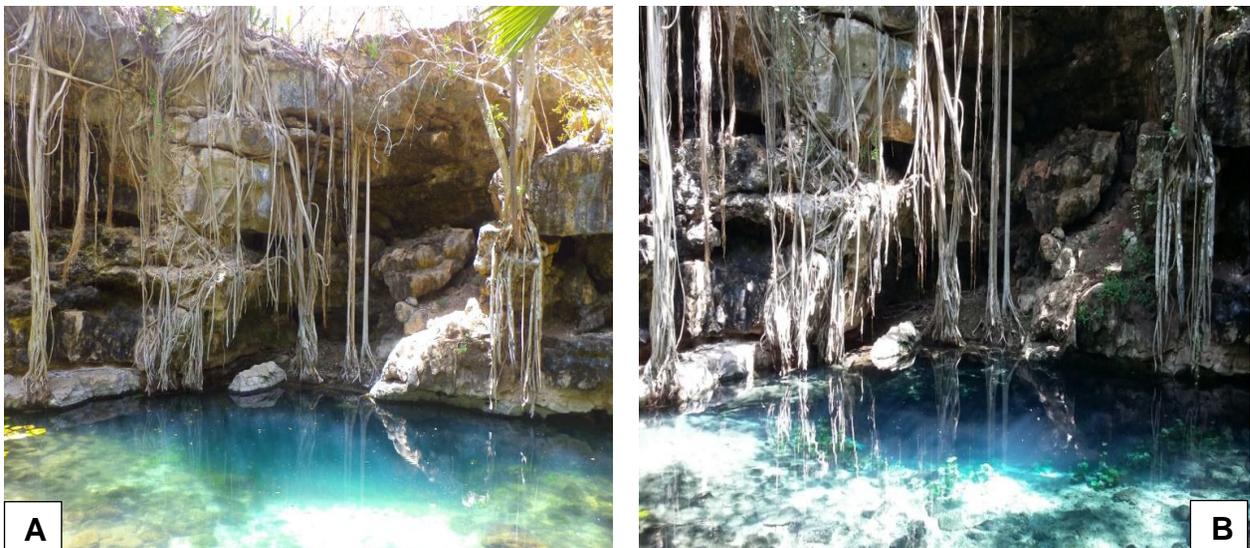


Figura 16. Fotografía de cenote E9. A: Temporada de secas, B: Temporada de lluvias.

c. Cenote “Yaxcopoil” (E10).

Cenote ubicado al sureste de la Península de Yucatán, lejos de la zona urbana, cerca de la ex hacienda Yaxcopoil dentro del municipio de Umán, clasificado como cenote cerrado, con abundante vegetación circundante, sin actividad aparente para



la zona, con agua transparente de color azul. Se encontró basura dentro del cenote
A ambas temporadas. (Figura 17). **B**

Figura 17. Fotografía de cenote E10. A: Temporada de secas, B: Temporada de lluvias.

d. Cenote “Nah-yah” (E13).

Cenote ubicado dentro de la zona central del anillo de cenotes muy alejado de la zona urbana, dentro del poblado de Pixyah dentro del municipio de Tecóh, clasificado como cenote cerrado, presenta muy poca entrada de luz, con abundante vegetación circundante y una profundidad aproximada de 16.8 m, cenote con actividad turística escasa para la zona, con agua transparente de color azul (Figura 18).

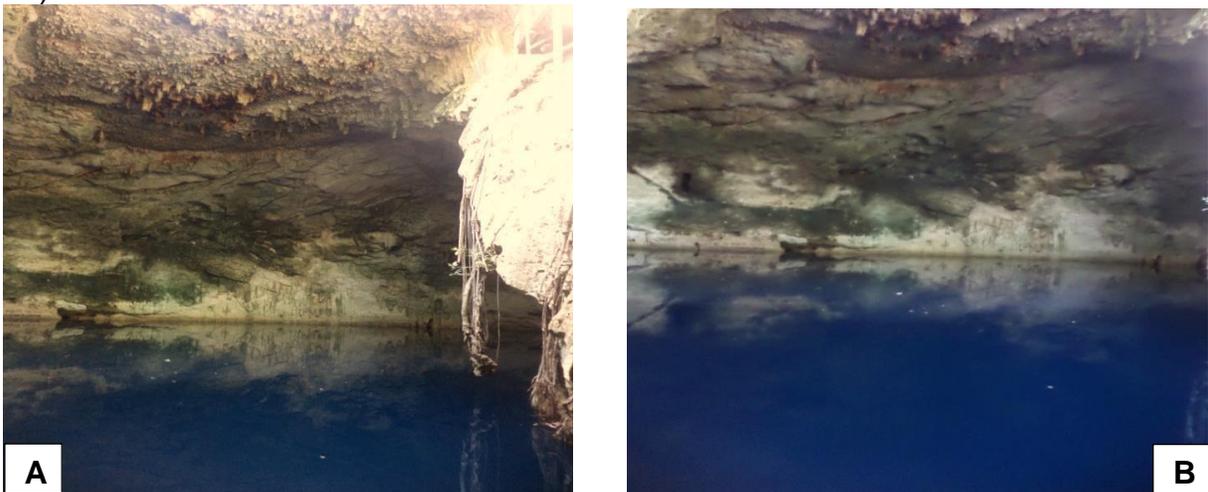


Figura 18. . Fotografía de cenote E13. A: Temporada de secas, B: Temporada de lluvias.

e. Cenote “Yaxbacantun” (E19).

Cenote ubicado dentro de la zona central del anillo de cenotes dentro del municipio de Homún, clasificado como cenote semi abierto, presenta gran actividad turística, con una profundidad aproximada de 8.3 m, con agua transparente de color azul (Figura19).

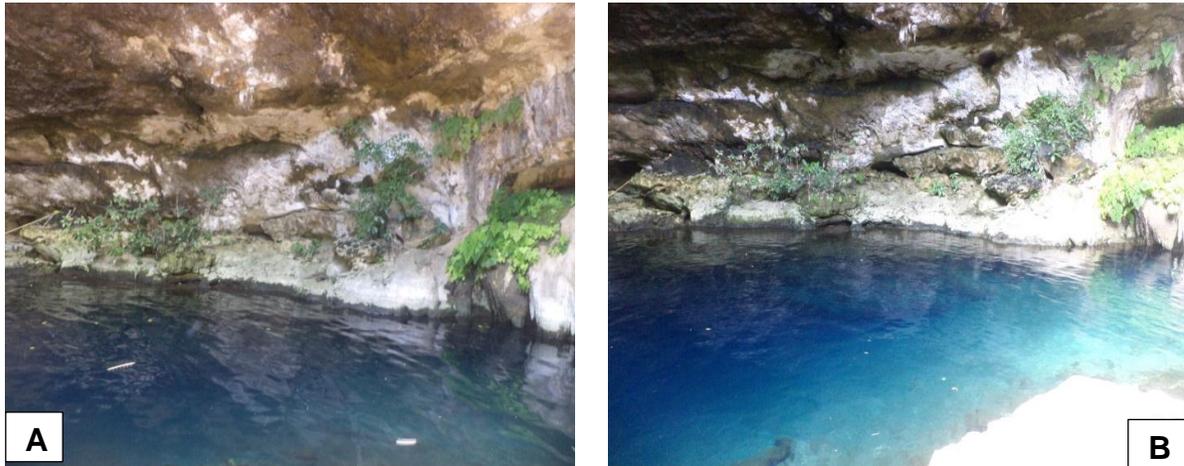


Figura 19. Fotografía de cenote E19. A: Temporada de secas, B: Temporada de lluvias

f. Cenote “Chen Vazquez” (E22).

Cenote ubicado dentro de la zona noroeste de la península de Yucatán, dentro del poblado de Santo Domingo en el municipio de Buctutz, cercano a diversas rancherías, con gran vegetación circundante, clasificado como cenote abierto, presenta actividad turística, con una profundidad aproximada de 44.8 m, con agua turbia color verdoso (Figura20).



Figura 20. Fotografía de cenote E19. A: Temporada de secas, B: Temporada de lluvias

g. Cenote “Xlabon” (E25).

Cenote ubicado dentro de la zona noroeste de la península de Yucatán, dentro del rancho Xlabon en el municipio de Dzilam, con gran vegetación circundante, clasificado como cenote abierto, con agua turbia color verdoso (Figura 21).



Figura 21. Fotografía de cenote E25. A: Temporada de secas, B: Temporada de lluvias

IV. ORGANISMO DE ESTUDIO

Los peces merecen especial atención como sistema de monitoreo en la vigilancia y la evaluación de la salud de los ecosistemas acuáticos, debido a que sus cambios bioquímicos y fisiológicos sirven como biomarcadores de contaminación, es por ello que se han convertido en los organismos prueba clásicos y son considerados organismos apropiados para monitorear ambientes acuáticos contaminados. El monitoreo de especies nativas constituye un enfoque realista del impacto adverso de los contaminantes sobre un ambiente en particular. Las respuestas de los biomarcadores evaluadas en especies silvestres representan una efectiva metodología para la realización de monitoreos de rutina de un conjunto de ecosistemas ya que proporciona una base cuantitativa del estado actual y de las tendencias a largo plazo de los niveles de exposición o de los efectos adversos producidos sobre especies críticas. En la Península de Yucatán existe un número considerable de especies dulceacuícolas en sitios potencialmente amenazados por la actividad antropogénica, como es el caso del pez mosquito (Figura 22).

(*Gambusia yucatana*)

Clasificación taxonómica:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Cyprinodontiformes

Familia: Poeciliidae

Género: *Gambusia*

Especie: *G. yucatana*

Regan,

1914



Figura 22. *Gambusia yucatana* “pez mosquito”

<http://www.fishbase.org/summary/Gambusia-yucatana.html>)

La *Gambusia yucatanana* pertenece a la familia Poeciliidae, también conocido como pez mosquito o guayacón yucateco como una de las especies nativas ampliamente distribuidas en los cenotes (Chumba y Barrientos, 1982); se encuentra distribuida desde el sureste de México de Veracruz hasta la zona del Petén en Guatemala y al norte de Belice, incluyendo la península de Yucatán (Figura 23). Son peces de talla pequeña, en adultos, la talla va de 3.5 a 4.5 cm en las hembras (a veces un poco más) y de 2.5 a 3.5 cm en los machos (figura 24); sus miembros muestran una marcada diferencia en los sexos, generalmente las hembras son más grandes y gordas que los machos y éstos presentan una marcada característica en la modificación de los radios tercero , cuarto y quinto de la aleta anal, en donde se encuentra el gonopodio, que actúa como canal para hacer llegar esperma al orificio genital del sexo opuesto; son vivíparos, tanto machos como hembras presentan una coloración verde olivacéa con la cabeza muy pigmentada con una lágrima negra en el ojo importante en la identificación de la especie (Figura 22).

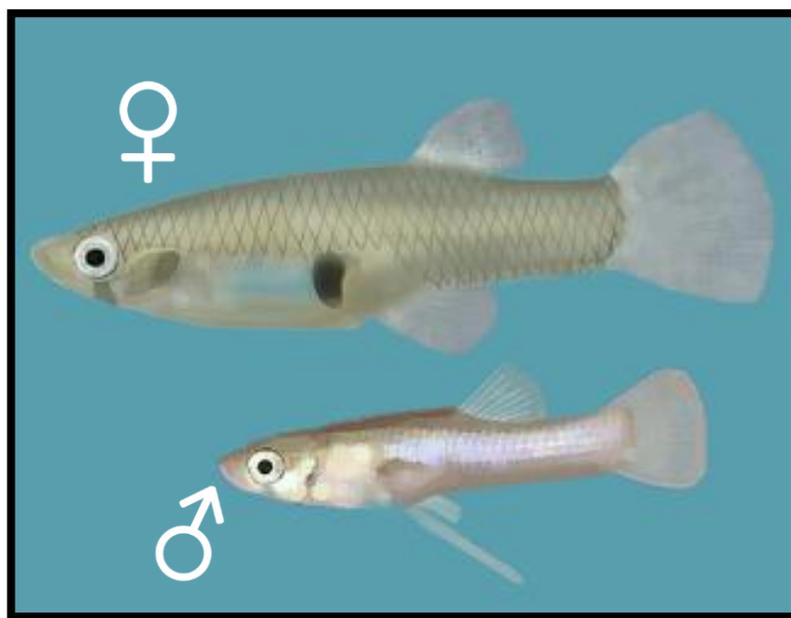


Figura 23. *Gambusia yucatanana*: Dimorfismo sexual.

Los *Gambusia* se mueven en cardúmenes, poseen un desplazamiento bento-pelagico con predominio en la superficie, debido a su preferencia por la alimentación flotante (Schmitter, 1996).

Es la especie más eurihalina del género; se adapta muy bien, coloniza todo tipo de encharcamientos, humedales y ríos, con buena tolerancia a las aguas salobres, soporta bien concentraciones bajas de oxígeno disuelto, su alimento principal está constituido por algas filamentosas, diatomeas, plantas vasculares, pequeños crustáceos (copépodos, gamaridos, ostrácodos) y de larvas de insectos y otros invertebrados. Las hembras dan crías varias veces durante el verano, son muy competitivas.

Por otro lado *G.yucatanana* carece de valor comercial, sin embargo, es importante mencionar su relevante papel ecológico, al servir de alimento a peces mayores y

regular poblaciones de otros organismos acuáticos, ya que son depredadores y la mayoría hace gran consumo de insectos, por lo que se les ha usado como controladores de larvas de mosquitos transmisores de la fiebre amarilla o paludismo (Pérez-León y Schmitter-Soto, 2007).

Gambusia yucatanana posee potencial para su uso como bioindicador de contaminación del medio ambiente regional (Von Osten, 2005). Se ha empleado como especie centinela (indicadores de la presencia o toxicidad de al menos un contaminante que puede utilizarse para evaluar efectos potenciales de los contaminantes para el humano y/o salud ambiental) para cenotes de la península de Yucatán (Rodríguez *et al*; 2016)



Figura 24. Distribución de *Gambusia yucatanana*
(http://www.aquamaps.org/AM_Americas/receive.php)

V. JUSTIFICACIÓN.

Los cambios o alteraciones en los sistemas acuáticos pueden ser estudiados mediante un monitoreo ambiental, que se refiere al estudio de las condiciones ambientales seleccionadas a escala espacial y temporal para conocer las realidades ecológicas del ecosistema, el efecto de diversos contaminantes es abordado en estudios ecotoxicológicos mediante la medición de parámetros fisiológicos y/o bioquímicos como es con el empleo de biomarcadores; con la información proveniente de estas pruebas se puede predecir la respuesta de los receptores ambientales a la exposición de contaminantes; así mismo, al integrar los aspectos químicos y fisiológicos se puede valorar la condición ambiental y algunos efectos en los organismos e interpretar el grado de estrés ambiental.

La península de Yucatán se caracteriza por la presencia de cuerpos de agua cársticos conocidos como cenotes, dichos cuerpos de agua dulce son empleados para el uso común y actividades agrícolas, alrededor de los últimos años se ha reportado la presencia de metales, nutrientes, plaguicidas, PAHs y otros contaminantes en estos cuerpos de agua. Es importante evaluar los hidrocarburos poliaromáticos como fuente de contaminación para el ambiente acuático debido a que son altamente persistentes, al ingresar a los cenotes se asocian con partículas y coloides en la columna de agua, flocculan y sedimentan hacia la interfase agua-sedimento, de esta forma, los sedimentos y las partículas asociadas quedan disponibles para la biota y pueden bioacumularse en el tejido lipídico de los organismos principalmente, representando un riesgo ambiental considerable debido a su potencial tóxico, carcinogénico y mutagénico a todo tipo de organismos desde el fitoplancton, pastos marinos, invertebrados, peces e inclusive para los mamíferos (Boffeta *et al*;1997).

La *Gambusia yucatanana* tiene un excelente potencial para ser utilizada como especie monitorea de contaminación en los cenotes de la península de Yucatán, debido a su tamaño, distribución y su significancia ecológica, ya que forman parte de las cadenas tróficas. La evaluación de ciertos biomarcadores en tejido muscular de esta especie como la expresión de CYP1A1, la actividad de glutatión s-transferasa, acetilcolinesterasa, glutatión total y lípidos peroxidados generará información que permita evaluar el efecto de estos contaminantes sobre estos peces, así mismo promover el uso de músculo para la evaluación de contaminantes; por lo tanto, los resultados del presente proyecto servirán como guía para determinar posibles riesgos ecológicos en los cuerpos de agua de la Península de Yucatán, así mismo se podrá generar la mejora en las metodologías existentes para la evaluación con biomarcadores, aprovechando al máximo los organismos de estudio, ya que muchas veces, el tamaño de los mismos puede resultar inadecuado para múltiples pruebas ecotoxicológicas.

VI. HIPÓTESIS

De acuerdo a las condiciones hidrológicas, las descargas residuales agrícolas y urbanas en los cenotes de la Península de Yucatán, se esperan encontrar diferencias cuantitativas en la concentración de PAHs en agua y sedimento entre los diferentes cenotes seleccionados así como una probable variación por época del año, de acuerdo a los aportes diferenciales de PAHs por temporada.

Los PAHs al encontrarse presentes en cuerpos de agua ejercen efectos adversos en la ictiofauna allí presente y pueden promover efectos en la expresión y actividad de enzimas involucradas en la biotransformación, estrés oxidante (CYP1A, glutatión, glutatión-s-transferasa, lípidos peroxidados) y neurotoxicidad (acetilcolinesterasa). Dado que se ha demostrado en diferentes especies acuáticas que la expresión de CYP1A es un biomarcador que refleja especificidad de la acción tóxica de PAHs e inducción en diversos tejidos extrahepáticos, se espera detectar un aumento en la expresión de CYP1A, así mismo una menor actividad de la enzima AChE, mayor actividad de GST, así como también concentraciones más altas de LPO y más bajas de glutatión total en músculo de *Gambusia yucatana* en aquellos cenotes con mayor concentración de PAHs. De este modo la *Gambusia yucatana* al ser una especie nativa, bento-pelagica y ampliamente distribuida en los cenotes, permitirá encontrar una correlación entre la concentración de PAHs con los efectos biológicos producidos.

VII. OBJETIVOS

VII.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la posible correlación entre diversos biomarcadores medidos en músculo de *Gambusia yucatanana* con la contaminación por PAHs en agua y sedimento de cenotes de la península de Yucatán, México.

VII.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Comparar a nivel espacial y temporal los cenotes a partir de las variables ambientales.
- Determinar el contenido de materia organica en sedimentos de cenotes de Yucatán, México.
- Evaluar la concentración de PAHs en muestras de agua y sedimento de 7 cenotes de Yucatán, México.
- Realizar la evaluación espacial y -temporal de la concentración de PAHs presentes en agua y sedimento de los cuerpos de agua de Yucatán, México.
- Determinar el posible origen de PAHs en los cenotes. Determinar la expresión de CYP1A, el contenido de glutatión total, de lípidos peroxidados y la actividad de la enzima glutatión-s-transferasa y acetilcolinesterasa en músculo de *Gambusia yucatanana*.
- Realizar la evaluación espacial y- temporal de la actividad enzimática de glutatión-s-transferasa, y acetilcolinesterasa, así como la expresión de CYP1A, el contenido de glutatión total y lípidos peroxidados en músculo de *Gambusia yucatanana*.
- Determinar la correlacion entre variables ambientales, concentración de PAHs y biomarcadores.
- Agrupar a los cenotes con base a la similitud en la relación entre variables ambientales, concentración de PAHs y biomarcadores.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de muestras.

Se recolectaron muestras puntuales (Invemar, 2003) de agua y sedimentos en cenotes de Yucatán así como organismos adultos de *Gambusia yucatanana*, 10 organismos por cenote. Se realizaron dos muestreos, uno en época de estiaje (Mayo-2015) y uno en época de lluvias (Octubre-2015). Los sitios fueron seleccionados con el objetivo de cubrir una amplia área de la Península, que el acceso fuera libre y seguro y que hubiera reportes de la existencia de los organismos de interés. El agua y los parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, ORP, conductividad, oxígeno disuelto) fueron obtenidos superficialmente (5-10 cm profundidad) en la zona central del cuerpo de agua usando un YSI-85-10FT. El sedimento fue colectado manualmente por buceo donde la profundidad así lo requirio. En casos donde el cenote presentó una profundidad mayor a 20m se colectó el sedimento en la zona de 20m.

El agua y los sedimentos fueron preservados en hieleras hasta su llegada a laboratorio donde fueron tratados y analizados con los métodos señalados a continuación. La determinación de PAHs en agua se hizo por medio de extracción por fase sólida, en sedimento se realizó por medio de extracción asistida por ultrasonido seguida de extracción en fase sólida, los extractos obtenidos fueron inyectados en un CG-EM, la descripción más detallada se muestra más adelante.

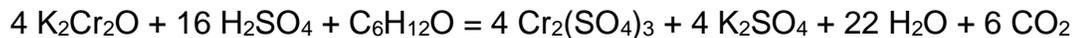
Para la determinación de biomarcadores se usaron 10 organismos colectados por cenote, los peces fueron sacrificados por choque hipotérmico y se registró la longitud total (LT), la longitud patrón (LP) y el ancho (A), se disectó un trozo de músculo conservado en RNA later ® el resto del músculo del pez fue colocado en criotubos de 2 mL y mantenidos en nitrógeno líquido hasta su arribo al laboratorio. Las muestras se conservaron a -70 °C hasta su procesamiento.

Los criterios de selección para los peces se basaron en capturar mayor cantidad de machos y talla similar, debido a que estos organismos serán utilizados para la evaluación de posible disrupción endocrina en otro proyecto. Los peces empleados como grupo control fueron capturados de los diferentes sitios de estudio, los cuales fueron aclimatados y depurados de acuerdo a los lineamientos del Comité sobre Métodos para ensayos de toxicidad con organismos acuáticos (1975), donde se menciona que los organismos deben estar en periodo de aclimatación por lo menos 15 días, manteniendo condiciones adecuadas para los peces en laboratorio. Los peces se mantuvieron en peceras de 40 L a 28°C (temperatura promedio registrada en los cenotes para ambas temporadas) y alimentación *ad libitum*; los residuos generados por los peces fueron eliminados mediante sifoneo diaramente, con recambios parciales de agua, así mismo los acuarios fueron limpiados 1 vez por semana, estas condiciones se mantuvieron por 1 mes para asegurar la depuración de los peces (Ramírez, 2008)

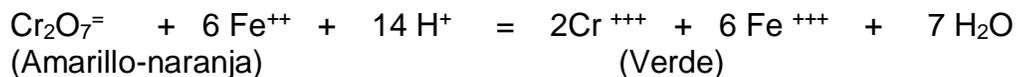
2. Determinación de Materia Orgánica.

El porcentaje de materia orgánica en sedimentos se obtuvo con el método de oxidación húmeda de Walkley-Black (ANEXO XI). La muestra seca y liofilizada se tamizó en una malla de 500 μm . Se pesó entre 0.05 y 0.8 g de sedimento seco y tamizado, anotando el peso exacto de sedimento usado en cada muestra.

Posteriormente, se determinó la cantidad de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 1N en exceso que no interviene en la reacción, mediante la técnica de valoración o titulación con solución de sulfato ferroso (FeSO_4) 1N y difenilamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NH}$) como sustancia indicadora del punto de equivalencia o punto final, de acuerdo a la siguiente reacción de oxido-reducción.



La determinación consiste en la oxidación del carbono orgánico presente en la muestra por una mezcla oxidante de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), acelerada por el calor de dilución del H_2SO_4 en agua. El carbono orgánico reduce los iones Cr^3 amarillo-naranja del dicromato inicial a iones Cr^3 de color verde.



3. Granulometría

a) Conservación de las muestras

El sedimento fue congelado en pequeños cubos y fue colocado en una liofilizadora Freezone 2.5, para eliminar toda la humedad presente.

b) Tamizado de muestras

Los sedimentos liofilizados de ambas temporadas fueron tamizados usando diferentes tipos de malla (Cole Parmer. USA standar) que van desde 63 μm hasta 500 μm .

El tamizado se realizó por agitación manual y constante durante 10min en cada muestra. Se pesó la cantidad de sedimento obtenido en cada número de malla en una balanza analítica (Adventurer Pro AV2102), para obtener el porcentaje de grano:

- Granos finos: limos, arcillas y arenas finas.
- Granos gruesos: arenas medias y arenas gruesas.

4. Determinación de la concentración de hidrocarburos en agua y sedimentos.

4.1 Extracción de Hidrocarburos en sedimento por medio de fase sólida/ultrasonido.

a) Tratamiento previo de las muestras

a.1) Extracción asistida por ultrasonido

Se tomaron 2 gramos de cada muestra previamente seca y tamizada (500 μm), y se colocaron en viales de 40 mL a los cuales se le adicionaron 40 μL de cada estándar surrogado (50 $\mu\text{g/mL}$): Alifático deuterado (Tetracosano d50), PAHs deuterados (Acenaftenod50, Fenantrenod10 y Crisenod12) y esteroides (colesterol-d6) y se mezclaron homogéneamente utilizando un vórtex Maxi Mix II Thermo Scientific.

La extracción se llevó a cabo en 3 etapas, en la primera con 12 mL de metanol, la segunda con 12 mL de metanol-diclorometano (1:1) y la tercera con 12 mL de diclorometano, con un procesador ultrasónico (Cole Parmer modelo CPX500) a 40% de amplitud con 4 minutos de trabajo (1 minuto de trabajo por 2 de descanso). Después de cada sonicación, el extracto se centrifugó 5000 rpm/5min para separar el sedimento de la solución y la solución obtenida en cada extracción se trasvasó a un matraz bola. A continuación la solución en el matraz bola fue evaporada a un volumen mínimo utilizando un rotavapor (Büchi Labortechnik AG CH-9230).

a.2). Separación en fracciones por cromatografía en columna

- Activación de sílice.

Se usó un equipo de filtración acoplado a vacío, donde a la sílice se le agregó hexano por las paredes hasta 1cm por arriba del contenido de la sílice, el cuál se filtrará, posteriormente se repite esta operación con con diclorometano (DCM) para finalmente hornear a 100°C por mínimo de 4 horas.

- Preparación de las columnas.

En una pipeta pasteur se acomodó 1cm de fibra de vidrio y se colocaron aproximadamente 5 cm de la sílice activada, se colocó en la superficie sulfato de sodio activado para cubrir. (Se agregó Cu activado en HCl 1-5% el momento de la elución para eliminar interferencias con compuestos azufrados).

- Eluciones en la columna.

El extracto orgánico se separó en 2 fracciones: compuestos alifáticos y compuestos aromáticos. Se añadió hexano (5 mL) para eluir la fracción que contiene los compuestos alifáticos y hexano-diclorometano (70:30, v / v) (5 mL o hasta que se desplazara el anillo de color amarillo característico de los compuestos aromáticos) para los compuestos aromáticos.

Cada fracción se colectó en un vial de 7mL que fue concentrado con una corriente suave de N₂.

b) Inyección en CG-EM

Se llevó a evaporar a sequedad con nitrógeno para luego reconstituir con 40 µL de Hexano: Acetona (9:1) en viales de 2 mL. Estos viales se llevaron al cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6850 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5975B VLMSD con inyector Agilent 7683B automático. La columna utilizada fue una HP-5MS (19099S-433E) Agilent J&W GC de 30 m largo, 0.250 mm diámetro interno, 0.25 µm de grosor de película.

c) Cuantificación de Hidrocarburos

Para la cuantificación de los compuestos se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de estándares como se presenta en la Tabla 7 (Anexo X).

Los análisis se realizaron en el modo Barrido Total del Espectro (SCAN) y en el modo de Monitoreo Selectivo de Iones (SIM, por sus siglas en inglés).

Tabla 7. Concentraciones de estándares dentro de la curva.

Punto Curva	C (ppm)	Masa (µg)
A	0.02	0.04
B	0.06	0.12
C	0.1	0.20
D	0.16	0.32
E	0.2	0.40
F	0.4	0.80
G	1.0	2.0
H	2.0	4.0

d) Condiciones cromatográficas.

Temperatura del inyector 300°C en modo splitless (1 min), empleando un volumen de inyección de 1 µL, gas acarreador Helio a 1 mL/min, con una rampa de temperatura de 90 a 300°C, la temperatura de la línea de transferencia fue de 280°C, la temperatura de la fuente de iones de 230 °C. Los PAHs analizados se describen en la Tabla 8; los Hidrocarburos Alifáticos analizados fueron del Nonano al Tretacotano (iones 57, 71, 85, 388).

COMPUEST	TIEMPO RET.	ION PRINCIPAL	ION(ES) CALIF	# ANILLOS
O				
Naftaleno	9.883	128	129, 127	2
Acenaftileno	15.715	152	153, 151	3
2-Bromonaftaleno	16.215	208	206, 207	2
Acenafteno	16.422	154	152, 153	3
Fluoreno	18.406	166	165, 167	3

Fenantreno	22.084	178	179, 176	3
Antraceno	22.278	178	176, 179	3
Fluoranteno	26.771	202	200, 201	4
Pireno	27.599	202	200, 201	4
Benzo(a)antraceno	32.397	228	226, 227	4
Criseno	32.555	228	226, 227	4
Benzo(b)fluoranteno	36.415	252	253, 251	5
Benzo(a)pireno	37.487	252	253, 251	5
Indeno(1,2,3-cd)pireno	41.529	276	275, 227	6
Dibenzo(a,h)antraceno	41.651	278	277, 279	5
Benzo(g,h,i)perileno	42.613	276	275, 277	6

4.2 Hidrocarburos en Agua (Sistema vacuun para extracción en fase sólida)

Se utilizó un litro de agua de cenote a temperatura ambiente, para la extracción de los compuestos se usó el sistema de vacío múltiple para extracción en fase sólida, este sistema ayuda a tener una filtración constante, consta de un equipo un recipiente de vidrio de paredes gruesas, equipado con un medidor de vacío y una válvula de regulación la cual permite reproducir la velocidad de flujo de la muestra, lavados y elución (Figura 25). Dentro del recipiente se colocan las gradillas resistentes al ataque químico, las cuales vienen para sostener tubos de ensayo de diferentes tamaños, viales o frascos volumétricos.



Figura 25. Sistema Vacuun para SPE

a) Acondicionamiento

Se utilizaron cartuchos Strata-x 33u polymeric reversed phase (500mg/6mL, S300-189 Phenomenex) previo al proceso de extracción se acondicionaron con diferentes solventes primero con 10mL de acetato de etilo, posteriormente con 10mL de metanol y finalmente con 10 mL de agua destilada, con flujo lento y continuo.

b) Carga de muestra

Se colocaron las muestras de agua a flujo lento y continuo, dejando pasar el litro de muestra por todo el cartucho y se lavó con 10mL de agua destilada. (Figura 26), se dejaron secar los cartuchos.

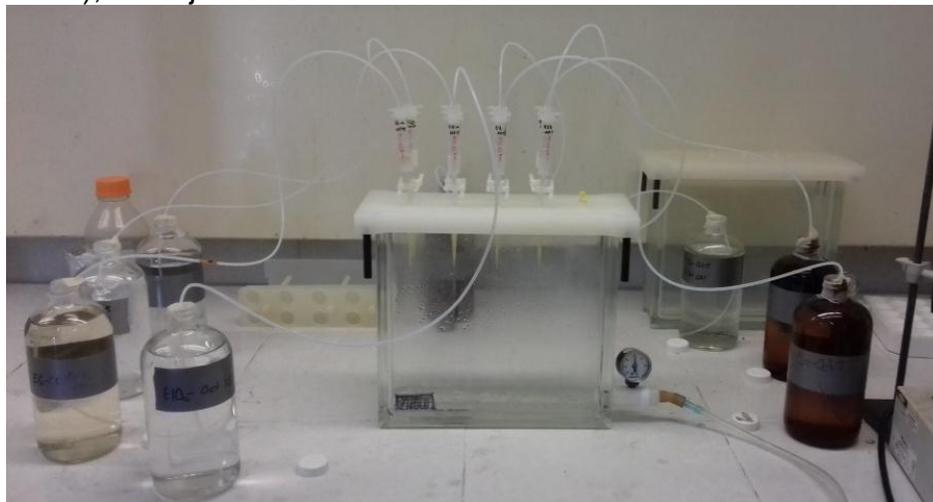


Figura 26. Carga de muestras de agua en el sistema de vacío.

c) Elución

En viales de 20mL se colocaron 2 g de sulfato de sodio anhidro, se hicieron pasar por el cartucho 15mL de acetato de etilo a flujo lento.

d) Inyección en CG-EM

El extracto obtenido a partir de la elución se evaporó a sequedad con nitrógeno para luego reconstituir con 40 μ L de acetato de etilo en viales de 2 mL, estos viales se llevaron al aparato de Gases-Masas Agilent Technologies 6850 para detectar los hidrocarburos aromáticos con el método SIM para PAHs, con las mismas condiciones cromatograficas descritas anteriormente.

Se realizó una curva de calibración con este mismo método la cual contenía las siguientes concentraciones conocidas.

Tabla 9. Concentraciones de estándares dentro de la curva.

CURVA	QTM PAHS (ng/L)	PAHS Deut (ng/L)
1	10	100
2	50	100
3	75	100
4	100	100

5	500	100
6	1000	100
7	2000	100
8	5000	100

5. Determinación de Biomarcadores.

Todas las determinaciones en las muestras se realizaron por triplicado. Para la determinación de los parámetros bioquímicos se prepararon homogeneizados de músculo de *Gambusias* (todo el pez). Estos homogeneizados se prepararon con buffer tris pH 7.4 (0.05 M). Los tejidos fueron homogeneizados en hielo con un homogenizador Potter-Elvehjem. El homogenizado se centrifugó a 10000 rpm x 10 minutos, el sobrenadante fue separado y congelado a -20° C hasta su uso (Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004).

5.1 Determinación de CYP1A

5.1.1 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de las muestras se utilizó el kit de GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep. Consiste en una lisis del tejido con mercaptoetanol, el homogeneizado se filtra. Se transfiere el filtrado a una columna donde se precipita el RNA con lavados de etanol. El RNA purificado es entonces eluido en 20 µL de agua en un tubo estéril y se guarda a -80°C. (GenElute™ User Guide, Sigma-Aldrich). El protocolo detallado viene en el Anexo II.

5.1.2 Geles de electroforesis.

Las muestras de RNA obtenidas se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, para comprobar la existencia de material de buena calidad para la amplificación. Para la carga de las muestras en el gel se tomaron 2µL del RNA obtenido y se mezcló con 1 µL de colorante (Invitrogen).

La corrida electroforética se realizó en gel de agarosa al 1% en TAE 1X, a 70±10V durante 1 hora. Deben observarse claramente las bandas correspondientes a rRNA (18-16S y 28-23S), con una mancha difusa entre ellas, que corresponde al mRNA. El gel es examinado en el fotodocumentador, para invertir colores y ajustar el contraste y brillo de la imagen.

5.1.3 Cuantificación de RNA

La cuantificación del RNA extraído se realizó por medio del uso de un espectrofotómetro NanoDrop 2000c. Se cuantificó el ARN de cada muestra y finalmente, se obtuvo un valor de concentración en ng/mL por muestra. (Protocolo detallado en Anexo III)

5.1.4 Retrotranscripción a cDNA

Para medir la expresión mediante PCR en tiempo real a partir de RNAm, es indispensable que este ácido nucleico sea copiado a cDNA por transcripción reversa (RT). La retrotranscripción o transcripción reversa consiste en la formación de DNA complementario (cDNA) (molécula que solo contiene los exones) a partir de ARNm, usando para ello la enzima transcriptasa reversa. La retrotranscripción del RNA a cADN se hizo usando el kit de cDNA síntesis iScript™ Kit de Biorad (número de catálogo 170-8890). El protocolo detallado se presenta en el Anexo IV.

5.1.5 Q-PCR (PCR tiempo real).

Los cebadores o primers empleados para este estudio contienen la siguiente secuencia:

Tabla 10. Cebadores empleados con sus características y secuencias.

Nombre	T° fusión	%GC	SECUENCIA
Gambu CYP A F	54	50	5' CCTCGCTGAAGATTTTGTCC
Gambu CYP A R	57	55	5' TCCGGTCCTCACAGTGATCT
Gambu B-Actin F	56	55	5' ACTGGGACGACATGGAGAAG
Gambu B-Actin R	56	55	5' CGTACATGGCAGGAGTGTTG

Se procedió a probar la eficiencia de estos cebadores con cDNA obtenido de músculo de *G.yucata*. Se realizó un qPCR para probar dicha eficiencia, el protocolo usado se describe más adelante

La eficiencia del método se verifica realizando una serie de diluciones de cDNA para cada par de primers, calculándose gracias a la tasa de amplificación en base a su regresión lineal, la cual varía generalmente entre 1.6 y por arriba de 2.

$$\text{Ecuación de la eficiencia: } E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

Se realizaron una serie de diluciones 1:5 usando cDNA anteriormente obtenido. Como se mencionó, debido a la falta de especificidad del fluoróforo SYBR®Green, es necesario confirmar la amplificación de un solo producto y de que no haya ocurrido interferencia por dímeros durante la reacción. Para ello se realiza también un análisis de disociación de DNA o “melting curve”.

Los análisis de qPCR se realizaron en un equipo BIO-RAD de 96 pozos en el laboratorio central de Bioquímica y Biología Molecular de la UAY sede en puerto Sisal de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Se usaron los reactivos provistos por el kit iQ™ SYBR®green Supermix, se utilizaron los siguientes volúmenes (Tabla 11).

Tabla 11. Reactivos y volúmenes empleados en qPCR.

Reactivo	Volumen en µL
iQ™ SYBR®green	7.5
Primer F	0.3
Primer R	
H ₂ O	5.2
Cadn	2
Volúmen final	15

Para reducir variaciones y evitar contaminaciones se realizó un “MasterMix” de los reactivos usados en todas las reacciones por cada uno de los primers, añadiendo solamente individualmente los cDNA en tubos ópticos (MicroAmp™ Optica 8-

tubstrip) o microplacas (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate) según lo requerido.

Se programó el equipo para 35 ciclos de la siguiente manera (Tabla 12):

Tabla 12. Programa empleado para qPCR.

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	10min
Desnaturalización	95°C	30seg
Alineación	60°C	1 min
Elongación		
Melting curve	95°C	1min
	50°C	30seg
	Δ+0.5°C hasta 95°C	20seg

La cuantificación de la expresión génica de CYP1A1 de *Gambusia yucatanna* se realiza usando el método ΔΔCt. El programa del equipo Bio-Rad iQ5 Optical System Software 1.0 muestra los valores de Ct medidos para cada muestra y sus repeticiones, los cálculos de ΔCt y ΔΔCt se realizan en el programa de cálculos Excel tomando como:

$$\Delta Ct = Ct \text{ CYP} - Ct \beta\text{-actina}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tratamiento} - \Delta Ct \text{ control}$$

Se reportan los resultados como expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de CYP1A por cada estación de muestreo.

5.2 Determinación de Acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad enzimática de AChE fue cuantificada por el método de Ellman acoplado a microplaca (Rodríguez Fuentes *et al*; 2008, Anexo V), el cual consiste en la cuantificación de la actividad enzimática mediante la hidrólisis del sustrato (ASChI) por parte de AChE, llevada a cabo en un medio que contiene 5´5 ditiobis(2-ácido nitrobenzoico; DTNB), mismo que reacciona con tiocolina uno de los productos de la catálisis enzimática de ASChI, produciendo una coloración amarilla que es sensible a una longitud de onda de 405 nm. La medición de la actividad enzimática se basa en la cinética enzimática de la AChE, donde se hace una lectura de la absorbancia en diferentes tiempos para obtener así el cambio de absorbancia por minuto (Figura 27). Los resultados obtenidos se normalizaron con el contenido de proteínas conseguido mediante el método de Bradford (Anexo VI) modificado a microplaca, el cual se basa en la tinción de la proteína por reacción intermolecular con azul de comassie, el cual originalmente es de color marrón pero cambia a azul con la interacción con el grupo aniónico y el grupo amino de los aminoácidos que componen a la proteína.

$$\text{Actividad en } \mathbf{nmol \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}} = \left(\frac{1}{10000} * \frac{\Delta Abs / \text{min}}{(Vh/Vt) * CP} \right) * 1000000$$

Figura 27. Ecuación para la determinación de la actividad enzimática de AChE.

Para cuantificar la proteína se realizó una curva de calibración utilizando proteína estándar de Sigma- Aldrich 2 mg/mL, en concentraciones conocidas desde 0 hasta 2000 µg/L. La absorbancia se determinó por medio de un lector de placas multimode Detector DTX 880 Beckman Coulter a una longitud de onda de 595 nm.

5.3 Determinación de Glutación -S- Transferasa (GST).

La determinación de la actividad de la GST está basada en el kit Sigma CS04 (Anexo VII) en el cuál se mide la aparición del complejo tioéter glutatión dinitrobencono (GS-DNB) a 340 nm, cuando se conjugan GSH y 1-cloro 2,4-dinitrobencono (CNDB) (Figura 25) (Habig y Jakoby, 1981). La tasa de aumento en la absorción es directamente proporcional a la actividad GST.

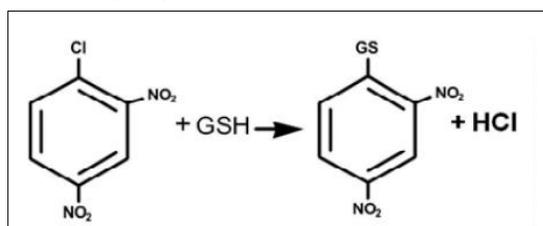


Figura 28. Reacción enzimática de la glutatión-s-transferasa

Se prepara una solución de trabajo la cual consiste en una mezcla de CNDB 100 mM con GSH 200 mM disueltos en buffer de fosfatos pH 7.4, en una microplaca de ensayo enzimático se agregaron 180 µL de esta solución más 20 µL de muestra y se leyó a 340 nm durante 6 minutos cada 30 segundo a 340nm en el lector de placas multimode. La actividad enzimática se expresó en unidades de GST por miligramo de proteína (Figura 29), la actividad específica de las muestras se normalizó respecto a la concentración de proteína obtenida por el método Bradford como se mencionó con anterioridad con la AChE.

$$\frac{(\Delta A_{340}) / \text{min} \times V(\text{ml}) \times \text{dil}}{\epsilon_{mM} \times V_{enz}(\text{ml})} = \mu\text{mol} / \text{ml} / \text{min}$$

Figura 29. Ecuación para la determinación de la actividad enzimática de GST. Donde dil= factor de dilución de la muestra y ϵ_{mM} es el coeficiente de extinción del CDNB 9.6.Mm

5.4 Determinación de Glutación total.

Los niveles totales de glutatión en las muestras fueron determinados utilizando el método de Griffith (1980) con el kit de Sigma CA020 (Anexo VIII).

El glutatión total es evaluado por el procedimiento de reciclaje enzimático en el cual, el GSH es oxidado por el ácido 5, 5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB, reactivo de Ellman) y reducido por el NADPH en presencia de glutatión reductasa, para la formación de ácido 2-nitro- 5-tiobenzoico (TNB) y GSSG (Figura 30). Donde el TNB es el colorante que se observa a 405nm de longitud de onda, mientras que el GSSG es nuevamente catalizado por la glutatión reductasa para resultar en más TNB y

GSH. La producción de TNB es directamente proporcional con la concentración de GSH presente en la muestra.

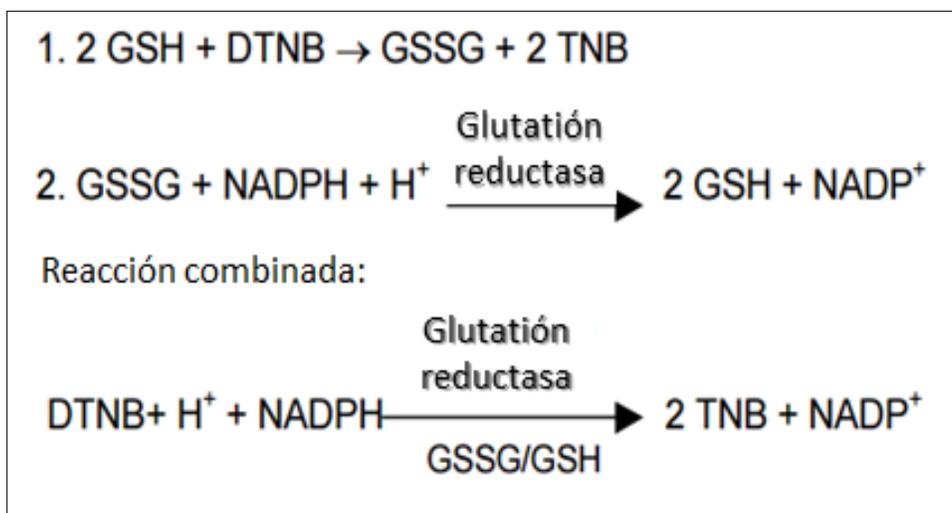


Figura 30. Reacción para la formación de TNB

La medición de GSH utilizó un ensayo de cinética de 2 minutos con intervalos de 17 segundos. El contenido total de glutatión de la muestra es determinado por comparación del valor observado con una curva estándar generada a partir de concentraciones conocidas de GSH (Figura 31) (Anexo VIII), los resultados obtenidos se normalizaron con el contenido en mg/mL de tejido presente en la muestra, la actividad enzimática finalmente se expresa en nmoles GSH/mg.

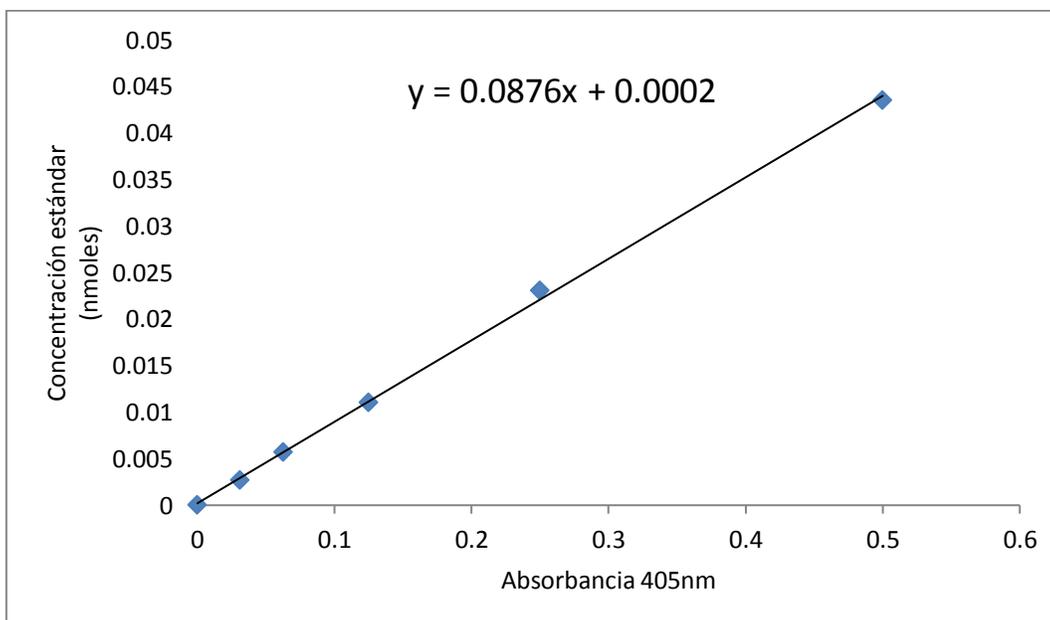


Figura 31. Curva de calibración para la cuantificación de Glutatión total a partir de concentraciones conocidas. Ecuación empleada para obtener las concentraciones para muestras con valor de correlación R^2 de 0.999.

5.5. Determinación de Lípidos Peroxidados (LPO).

La determinación del contenido de lípidos peroxidados se realizó mediante el método de FOX con el uso de kit peroxidetec de Sigma (Anexo IX), el cuál se basa en que los peróxidos oxidan iones ferrosos (Fe^{2+}) a iones férricos (Fe^{3+}) en pH ácido en presencia de colorante de naranja de xilenol (XO).

La cantidad de ion férrico Fe^{3+} generado se puede medir en función de la cantidad el complejo Fe-XO formado, la cual genera una coloración detectada a 560nm de longitud de onda que es medida con espectrofotómetro UV- visible *Lambda* 25.

El reactivo de FOX se preparó con 15 μM de naranja de xilenol, butirato de hidroxitolueno 480 μM , ácido sulfúrico 2.5M y sulfato amonio ferrico 25Mm. Para descartar la sospecha de Fe endógeno u otro metal de transición que pueda estar presente en la muestra que pueda causar un aumento en la señal, se realizó la preparación de un reactivo de trabajo en blanco con Trifenilfosfina 100mM, los resultados finales de contenido de lípidos peroxidados se obtuvieron de la resta del reactivo de trabajo con el reactivo blanco y por comparación del valor observado con una curva estándar generada con estándar de hidroperóxido de terc -butilo (TBOOH) 200 mM (Figura 32) (Anexo IX), los resultados obtenidos se normalizaron con el contenido en mg/mL de tejido presente en la muestra, la actividad enzimática finalmente se expresa en nmoles/mg.

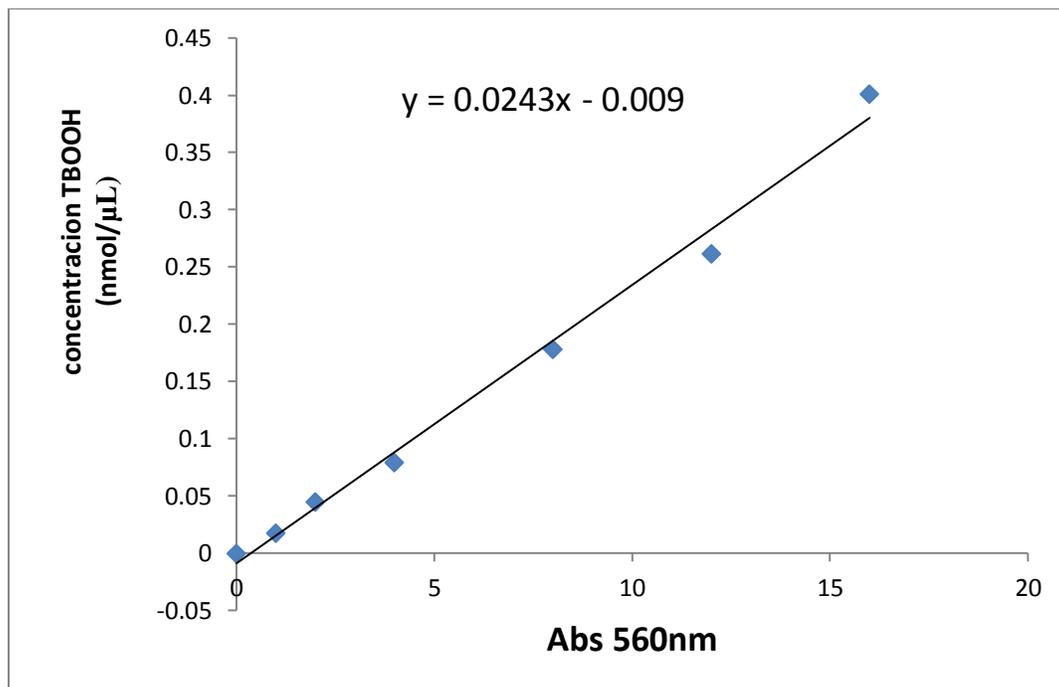


Figura 32. Curva de calibración de estándar TBOOH. Ecuación empleada para obtener los nmoles presentes en muestras con valor de correlación R^2 de 0.99

En la figura 33 se resume la metodología para determinación de Biomarcadores en *G.yucatana*.

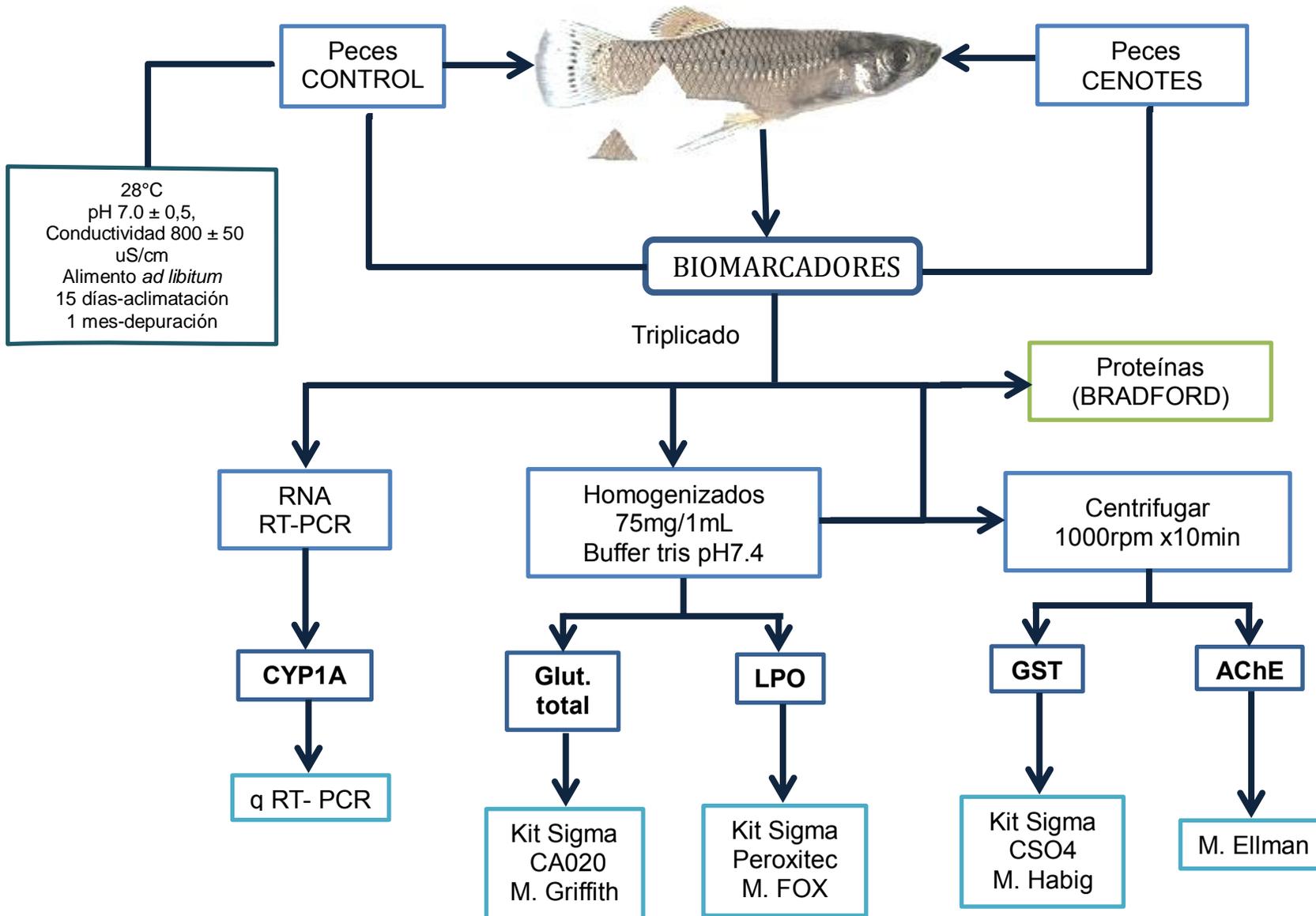


Figura 33. Diagrama de trabajo para Biomarcadores.

6. Análisis Estadístico.

En caso de las medidas biométricas los resultados se expresaron como la media \pm error estándar.

Para determinar las diferencias significativas de los resultados obtenidos por cada biomarcador se utilizó una prueba de varianza de una vía ANOVA no paramétrica de Kruskal Wallis y post hoc de Dunns ($p < 0.05$).

Con la finalidad de integrar los datos obtenidos de los distintos biomarcadores por estación, se realizó un IBR (Integrated Biomarker Response), cada uno de los valores obtenidos de los biomarcadores propuestos fueron normalizados y estandarizados mediante el método propuesto por Beliaeff y Burgeot (2002), que permite analizar de manera sencilla datos múltiples mediante el uso de gráficas de estrella. El método permite obtener una respuesta integrada de las variables estudiadas en un valor numérico sin establecer asociaciones entre éstas; además, identifican en tiempo y espacio, que variable contribuye más a la respuesta integrada. Los biomarcadores utilizados para el cálculo del IBR fueron CYP1A, GST, GSH, AChE y LPO. En primer lugar los datos fueron estandarizados para las comparaciones visuales directas de las respuestas de biomarcadores para cada sitio. Los datos estandarizados (Y) se calcularon de la siguiente manera:

$$Y = (X - m) / s$$

donde X = valor de la respuesta de cada parámetro biomarcador, m = media general de cada parámetro biomarcador, teniendo en cuenta los valores de X para cada sitio, s = desviación estándar de cada parámetro biomarcador.

Luego se obtuvo el valor mínimo (*min*) para cada biomarcador a partir de los datos estandarizados (Y). Por último, el *score* (S) se calculó como $S = Y + |min|$, donde $S \geq 0$ y $|min|$ es el valor absoluto. Para visualizar los resultados se utilizaron los gráficos de estrella (*star plots*), los cuales fueron realizados con el software EXCEL (Microsoft Office). Cada uno de los parámetros biomarcadores estandarizados fue representado gráficamente como un vector en el gráfico de estrella, cuando S_i y S_{i+1} representan los *scores* de los parámetros biomarcadores consecutivos el IBR es definido por el área encerrada en el polígono formado por la unión de todos los vectores. Al mismo tiempo, el valor del IBR se estimó mediante el procedimiento propuesto por Beliaeff y Burgeot (2002) de la siguiente manera:

$$IBR = [(S_i * S_{i+1})/2 + (S_{i+1} * S_{i+2})/2 + (S_{i+2} * S_{i+3})/2 + (S_{i+3} * S_i)/2]$$

En el caso de las concentraciones de hidrocarburos encontradas en sedimentos y agua se emplearon gráficos de estrella y barras. Se analizaron las relaciones entre las variables (biomarcadores, concentraciones de PAHS, parámetros ambientales, materia orgánica y porcentaje de grano fino), mediante un análisis de componentes principales, seguido de un análisis de redundancia (con programa primer 6 & permanova) y dendogramas de similitud por método de Ward con distancias calculadas de acuerdo a correlación de Person ($p < 0.05$).

Estas variables fueron transformadas logarítmicamente para la estandarización de datos ($1 + \log x$).

El RDA hace referencia a que una o más variables pueden estar superpuestas u orientadas en la misma dirección, en cuyo caso pueden ser eliminadas del análisis y por lo tanto del gráfico. El criterio para su eliminación/inclusión en el gráfico y el análisis es que cuanto más largos los vectores que representan las variables más correlacionadas están (más “peso” tienen). Ésto no implica dejar de lado dicha variable, sino que para el método gráfico y analítico la eliminación de las variables “redundantes” implica una mayor claridad así como un incremento de la varianza explicada. Luego, teniendo en cuenta tanto las variables de las gráficas, como las eliminadas (ya que están correlacionadas), este método permitió seleccionar qué variables son las que muestran una mayor influencia en la respuesta biológica de las *Gambusias*.

Los diferentes mapas fueron elaborados mediante programa Arcgis esri versión online.

IX. RESULTADOS

1. Variables Ambientales

Las variables ambientales registradas durante la captura de los organismos en los diferentes sitios se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Parámetros fisicoquímicos registrados para dos temporadas en un ciclo anual en 7 cenotes de la Península de Yucatán.

Sitios	Temperatura (°C)		Conductividad (µS/cm)		Ph		OD (mg O ₂ /L)		ORP (mV)		TDS (mg/L)	
	MAY	OCT	MAY	OCT	MAY	OCT	MAY	OCT	MAY	OCT	MAY	OCT
E6	28.7	27.1	2675.5	2862	7.85	7.4	4.2	1.35	29.7	35.1	1631	539.5
E9	28.5	27.7	2118	2180	7.1	6.94	4.3	1.38	27.8	40.7	1293	1306
E10	28.9	28.2	2124.5	2169	7.2	7.1	2.7	2.8	27.8	47.4	1222	1339
E13	27.2	27.1	1567	1506	7.05	7.19	2.6	2.5	29.7	44.2	962	ND
E19	27.4	27.1	1147	1154	7	6.94	3.3	2.6	33.2	42.3	715	721
E22	29.9	29.2	1536	1488	8.05	7.78	2.15	2.28	28.2	39.3	897	832
E25	30.2	30.1	2196	2093	8.14	8.28	6.2	2.02	26.4	31.1	1267	1202.4

ND: No determinado

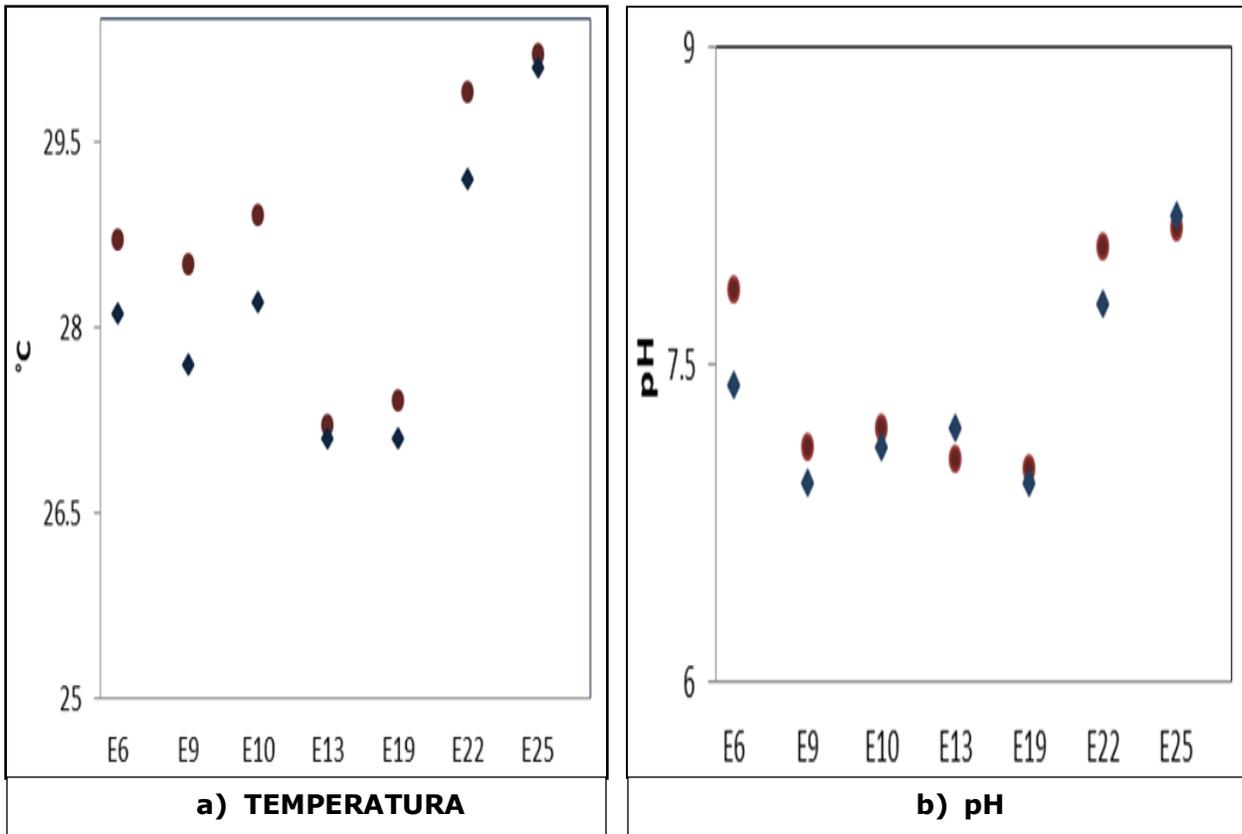
De manera general, la temperatura promedio registrada es de $28.5^{\circ}\text{C} \pm 1.03^{\circ}\text{C}$ con un mínimo de 27.1°C (cenote E13) y un máximo de 30.2°C (cenote E25), ambos registrados para la temporada de secas, se registró una diferencia temporal en los cenotes ubicados en el centro del anillo de cenotes ya que exhibieron los valores más bajos de temperatura (Figura 34a). El promedio de pH fue de 7.4 ± 0.42 con un mínimo de 6.9 (cenote E19) y un máximo de 8.2 (cenote E25) ambos registrados en temporada de lluvias.

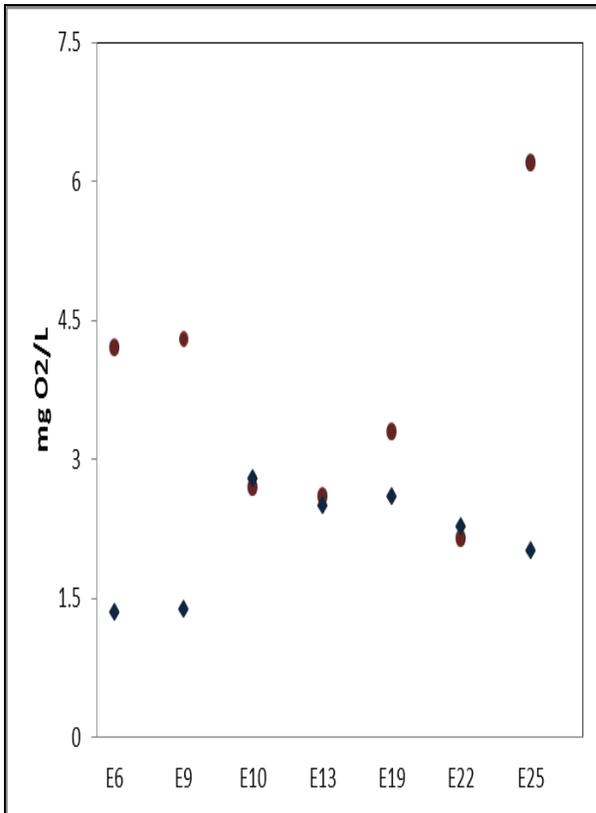
Para el anillo de cenotes los valores altos de pH van desde el centro hacia los extremos con el mayor aumento hacia el este de la Península, lo mismo sucede con la temperatura (Figura 34b) y conductividad (Figura 34e); los valores de conductividad aumentaron desde el centro hacia el exterior durante las dos temporadas muestreadas, como resultado de la incorporación de iones a partir de la interacción de agua-roca y la intrusión de agua de mar; sin embargo el aumento de la conductividad hacia el oeste (Cenote E6, $2862 \mu\text{S}/\text{cm}$) del anillo de cenotes fue más alto que hacia el este (Cenote E25, $2093 \mu\text{S}/\text{cm}$), ambos cenotes se encuentran cercanos a la costa (E6, 22km, E25, 11km). Para el 2015 se registró un promedio de conductividad de $1915.4 \pm 505 \mu\text{S}/\text{cm}$, con un mínimo de $1147 \mu\text{S}/\text{cm}$ (cenote E13) y un máximo de $2862 \mu\text{S}/\text{cm}$ (cenote E6) ambos registrados en temporada de lluvias.

Para los cenotes de este estudio se registró una media de sólidos disueltos totales (TDS) de $1157.7 \pm 290 \text{mg}/\text{L}$ en época de estiaje y 822.2 ± 242 en época de lluvias. Esta variable hace alusión a la materia suspendida o disuelta en un medio acuoso, en este estudio se pudo observar que para temporada de secas registró una mayor cantidad de TDS, siendo el cenote E6 quien presentó mayor cantidad (Figura 34f). El promedio de oxígeno disuelto en los cenotes muestreados de la península

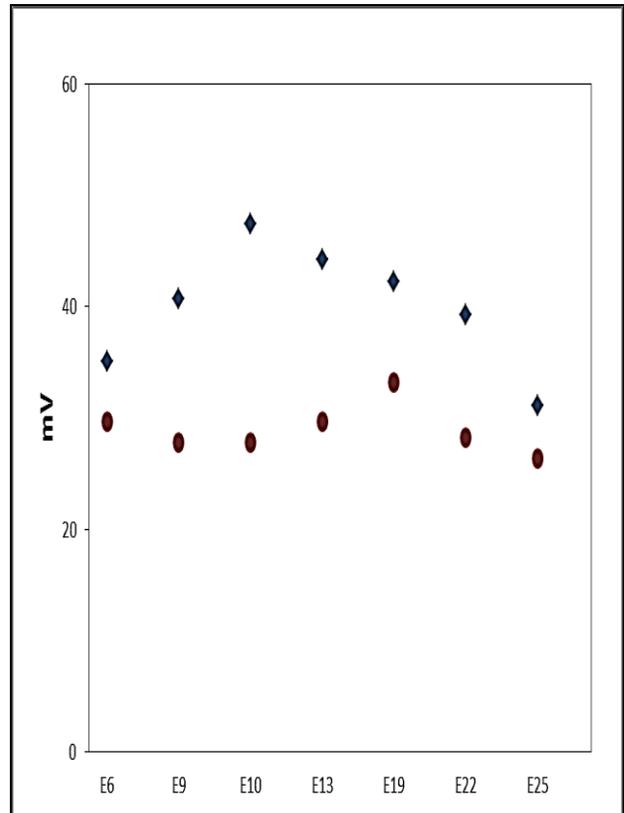
de Yucatán es de $4.46 \pm 0.3\text{mg/L}$, donde la temporada de secas presentó $3.6 \pm 1.29\text{mg/L}$ y en lluvias $2.1 \pm 0.54 \text{ mg/L}$.

En la Figura 34c no se observa una diferencia temporal en los sitios de la zona central del anillo de cenotes, mientras que para las estaciones E6, E9 y E25 si existen diferencias temporales ya que presentaron una menor concentración de oxígeno disuelto en temporada de lluvias. En cuanto al potencial oxidación – reducción (ORP), la Figura 34d nos muestra valores de ORP (de $29 \pm 2.03 \text{ mV}$ en temporada seca y $40 \pm 5.10 \text{ mV}$ en lluvias, indicando que ambas temporadas favorecen reacciones de oxidación.

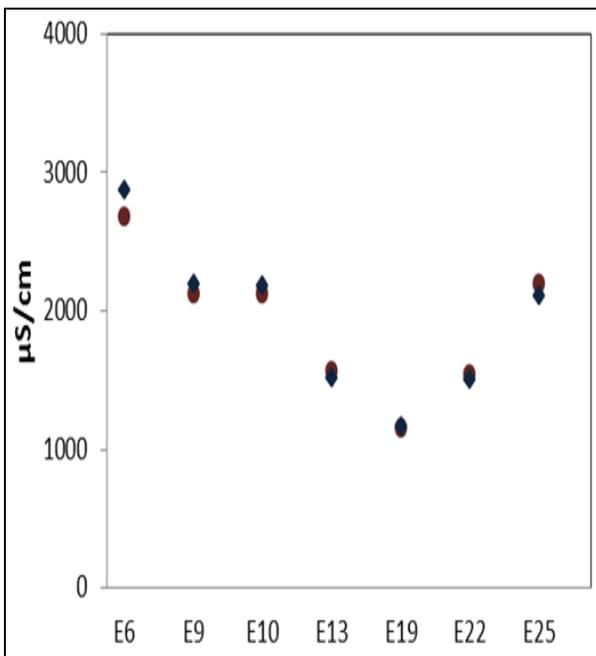




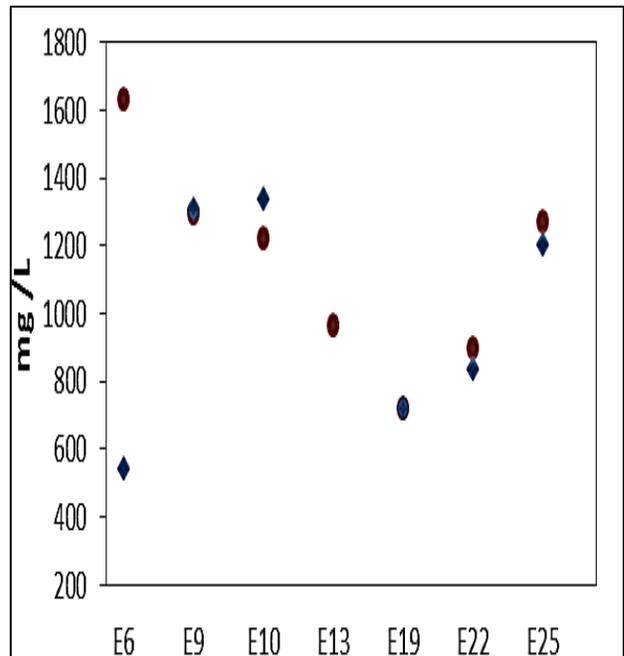
c) OXIGENO DISUELTO



d) POTENCIAL REDOX



e) CONDUCTIVIDAD



f) SOLIDOS DISUELTOS TOTALES

Figura 34. Variación espacio temporal de variables ambientales registradas en los sitios muestreados, a: Temperatura, b: pH, c: Oxígeno Disuelto, d: Potencial Oxido-reducción, e: Conductividad, f: Salinidad, g: Sólidos Disueltos Totales.

Rojo: mayo-2015 (secas), **Azul:** octubre-2015 (lluvias).

Con base en la similitud de las características de las variables ambientales anteriormente descritas se clasificó por método de Ward con distancias calculadas de acuerdo a correlación de Person, los sitios muestreados en dos grupos principales: el grupo A, aquellos cenotes que están en la parte central de la península, refiriéndose a los sitios con menor conductividad eléctrica, un mayor potencial oxido reducción, y una concentración de oxígeno disuelto constante (sin variación temporal); y el grupo B, aquellos cenotes que están cercanos a la costa, contiene los sitios con mayor conductividad, menor potencial oxido reducción y a los sitios con variación temporal en la concentración de oxígeno disuelto (Figura 35). Dicha clasificación presentó una ligera variación temporal que involucró al cenote E22, el cual se encontró en el grupo A en temporada de secas (Figura 35a) y en temporada de lluvias en el grupo B; esto puede explicarse con base en el diferente comportamiento de pH que presentó este sitio con respecto a el resto de cenotes centrales, presentando una variación temporal mayor que el resto del grupo A.

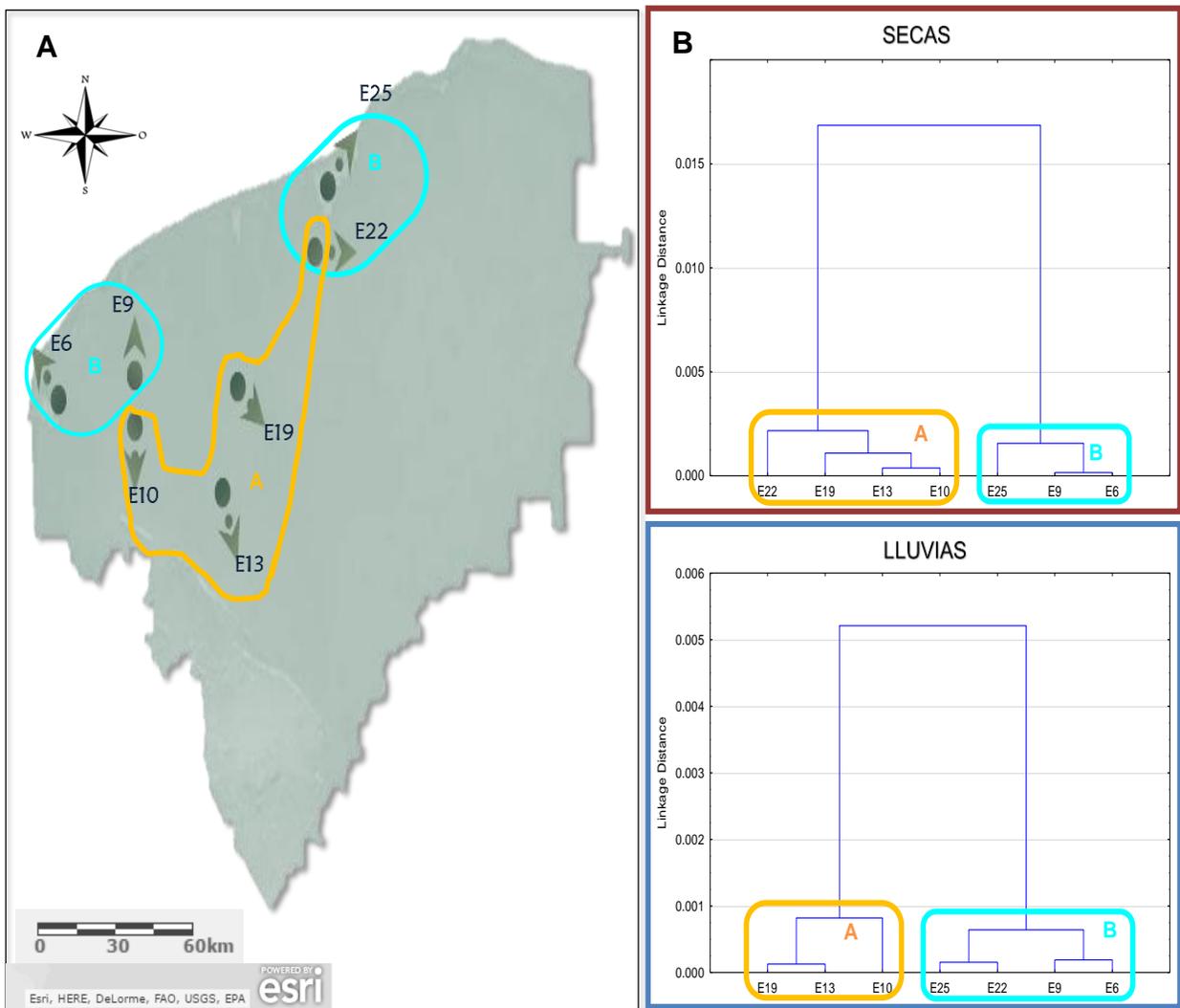


Figura 35. A. Mapa de Yucatán con cenotes de estudio. B. Dendrogramas de cenotes por sus características fisicoquímicas. Secas, Lluvias. Grupo A: zona central de anillo de cenotes, Grupo B: cenotes cercanos a la costa.

2. Materia Orgánica y Granulometría.

Para los cenotes muestreados se encontró un mayor porcentaje de granos finos (arenas finas, limos y arcillas) (Figura 36), con un promedio de 72.9 % \pm 17.7 de granos finos en temporada de secas con un máximo de 98.7% (cenote E10) y un mínimo de 47.78% (cenote E13); mientras en lluvias registró un promedio de 68.2 % \pm 20.8 de granos finos, con un máximo de 97% (cenote E19) y un mínimo de 44.49% (cenote E22); sin embargo, no se observó una variación temporal y los resultados obtenidos dependen de las características hidrogeológicas de cada sitio muestreado.

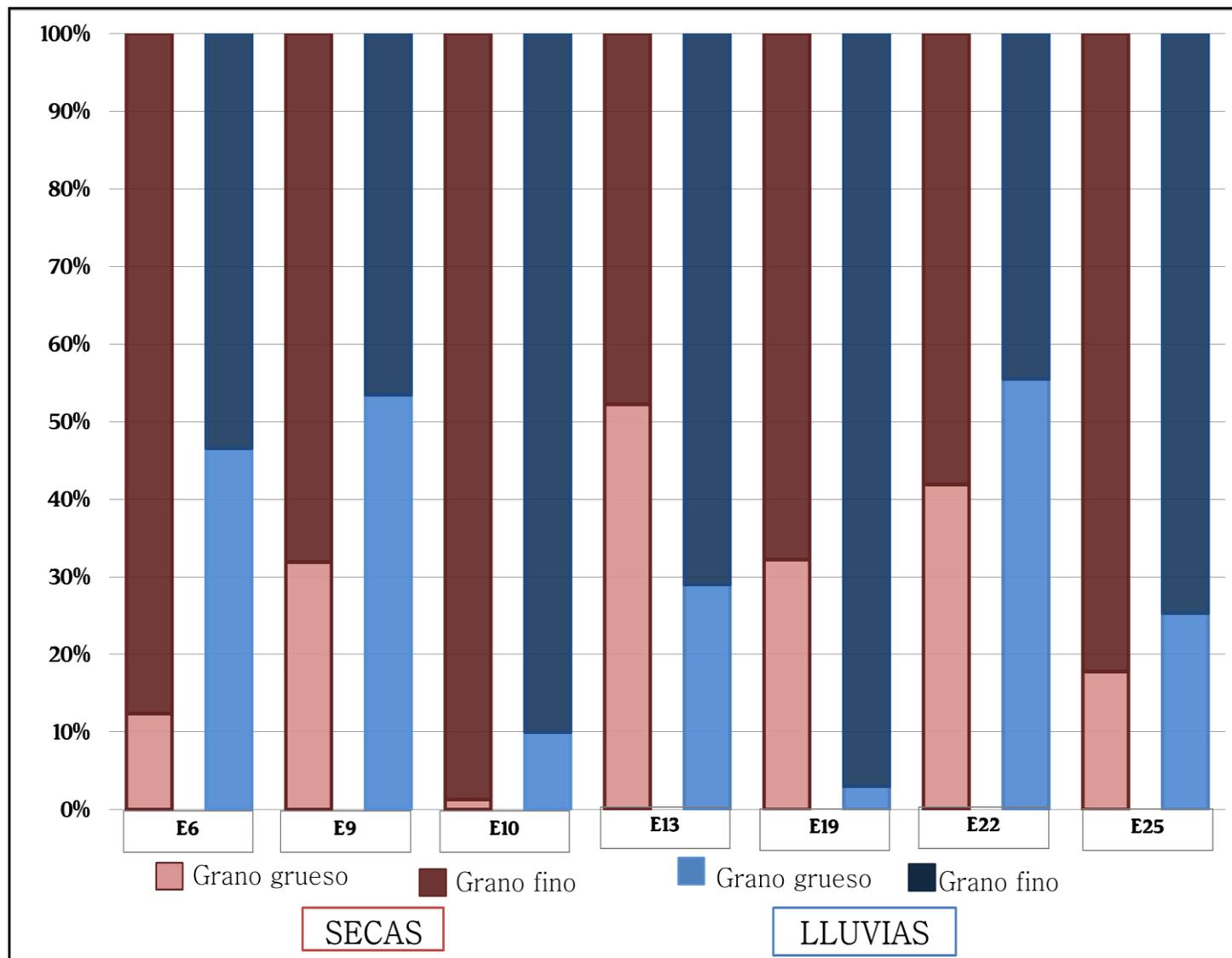


Figura 36. Porcentaje de grano para sedimentos de cenotes muestreados en la Península Yucatán en el año 2015.

La concentración de materia orgánica en los sitios de estudio fue similar para secas y lluvias (Figura 37). Se presentó un promedio de $9.94\% \pm 6.95$ en temporada de secas con un máximo de 19.64% (cenote E25) y un mínimo de 2.10% (cenote E10); un $9.36\% \pm 7.91$ en temporada de lluvias con un máximo de 22.52% (cenote E25) y un mínimo de 1.7% (cenote E19).

Se puede observar que para el anillo de cenotes los valores altos de materia orgánica van desde el centro hacia los extremos con el mayor aumento hacia el este de la Península, Los cenotes E6 Y E25 registraron valores de materia arriba del 15% para ambas temporadas cabe mencionar que ambos cenotes son de tipo abierto y están ubicados dentro de zona ganadera lo cual podría estar causando un mayor aporte de materia orgánica para estos sitios.

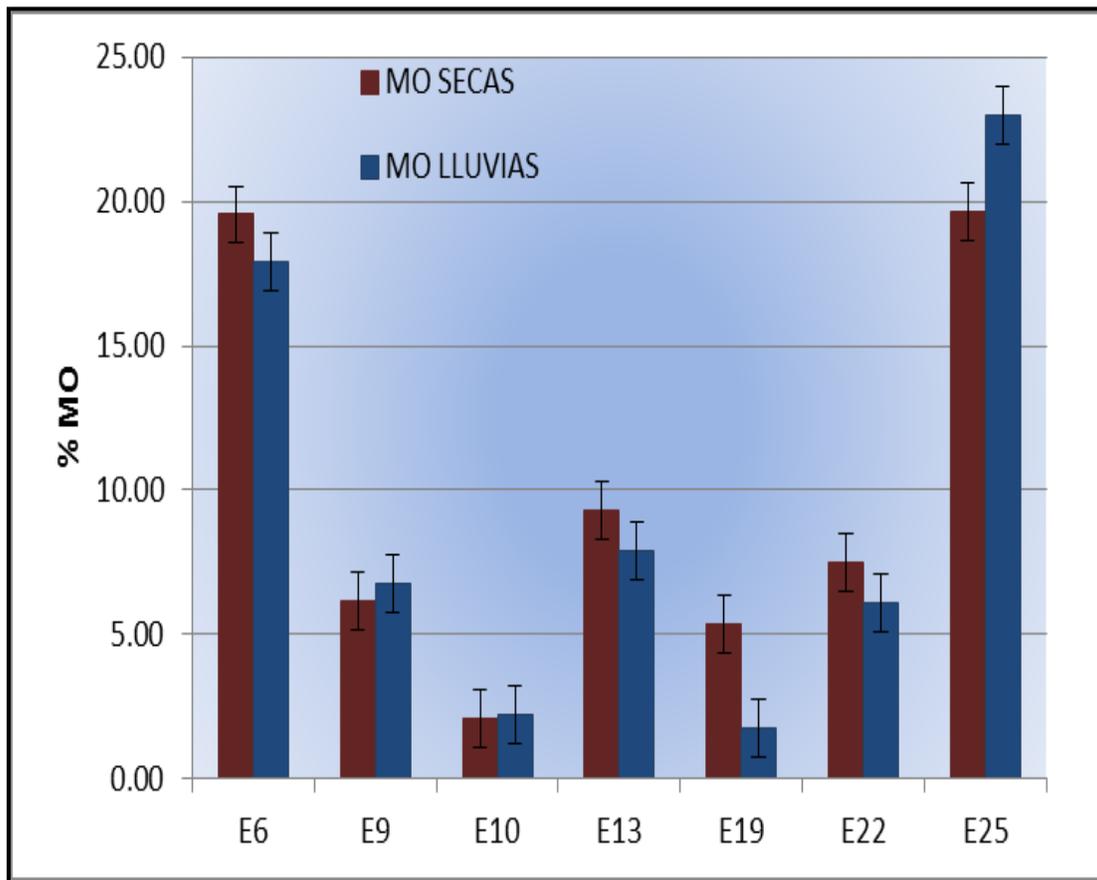


Figura 37. Variación temporal del porcentaje de materia orgánica total presente en cenotes de la Península de Yucatán en el año 2015

3. Concentración de Hidrocarburos en sedimento.

En los sedimentos de los sitios muestreados se midió la concentración de 16 hidrocarburos aromáticos (tabla 14), se registraron niveles de PAHs totales de 28.98 ng/g (cenote E10) a 94.75 ng/g (cenote E22) para la temporada de secas y concentraciones de 3.99 ng/g (cenote E13) a 23.64ng/g (cenote E25) en la temporada de lluvias.

Tabla 14. Hidrocarburos policíclicos aromáticos en sedimentos de cenotes de la Península de Yucatán en dos temporadas (seca y lluvia) durante el año 2015. (Concentraciones ng/g)

APM: alto peso molecular; BPM: bajo peso molecular.

Valores en negritas: muestran los valores más elevados

ND: Inferior al límite de detección del método (0.01 ng/g)

NA: No accesible

NGCS: niveles guía de calidad de sedimento sugeridos por Canadá (CCME, 1999-2002).

PEL.- Niveles probables de efectos; ERL.- Intervalo efecto bajo (NOAA, Buchman, 1999)

Anillos	NOMBRE	E6		E9		E10		E13		E19		E22		E25		NGCS	PEL	ERL
		may-15	oct-15	may-15	oct-15	may-15	oct-15	may-15	oct-15	may-15	oct-15	may-15	oct-15	may-15	oct-15			
2	Acenaftileno	2.57	2.86	3.15	ND	2.51	2.72	2.96	ND	2.32	4.12	2.44	2.43	2.72	2.48	5.78	128	16
2	Acenafteno	1.64	0.29	1.03	0.21	0.47	ND	0.90	0.18	0.32	0.29	0.31	0.15	0.76	1.78	6.71	88	44
3	Fenantreno	12.65	6.02	12.17	5.55	5.06	2.47	44.01	3.21	5.79	6.64	12.62	6.13	14.97	8.24	41.90	515	240
3	Antraceno	ND	ND	1.33	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.72	ND	4.85	0.22	2.91	46.90	245	85
Total BPM		16.86	9.16	17.67	5.76	8.03	5.20	47.88	3.39	8.44	14.76	15.36	13.55	19.34	15.42			
4	Fluoranteno	3.92	0.30	2.07	0.21	2.76	0.15	2.72	0.13	1.89	ND	5.09	ND	3.44	ND	111	1493	600
4	Pireno	4.68	0.67	2.61	0.57	3.51	0.54	4.19	0.46	2.91	0.42	4.75	0.36	3.59	0.31	53.00	875	2600
4	B(a)Ant	2.99	1.10	6.50	ND	5.65	ND	3.56	ND	4.48	ND	8.83	0.56	4.04	ND	37.70	385	261
4	Criseno	2.50	ND	3.36	ND	1.22	ND	1.86	ND	0.67	ND	7.29	ND	1.82	7.92	57.10	862	384
5	B(b)Fluorant	2.91	0.12	2.00	ND	2.90	ND	6.53	ND	ND	ND	16.44	0.06	3.45	ND	NA	NA	NA
5	B(a)Pireno	34.61	2.86	20.93	ND	4.91	ND	22.48	0.01	6.72	ND	35.64	ND	14.47	ND	31.90	782	430
Total APM		51.61	5.06	37.47	0.78	20.94	0.69	41.34	0.60	16.67	0.42	79.39	0.97	33.67	8.23			
PAH TOT		68.46	14.22	55.13	6.55	28.98	5.89	89.21	3.99	25.11	15.18	94.75	14.52	53.02	23.64	NA	NA	4000

Se presentó una diferencia temporal ($p < 0.05$) para la concentración total de PAHs (Figura 38) siendo la temporada de secas la que presentó concentraciones mucho mayores de PAHs totales, donde el cenote E22 tuvo los niveles más altos 94.75ng/g, seguida de E13 89.21ng/g, E6 con 68.46ng/g, sin embargo el panorama cambia en lluvias espacialmente no se ven diferencias significativas pero disminuyen en gran proporción en todos los sitios.

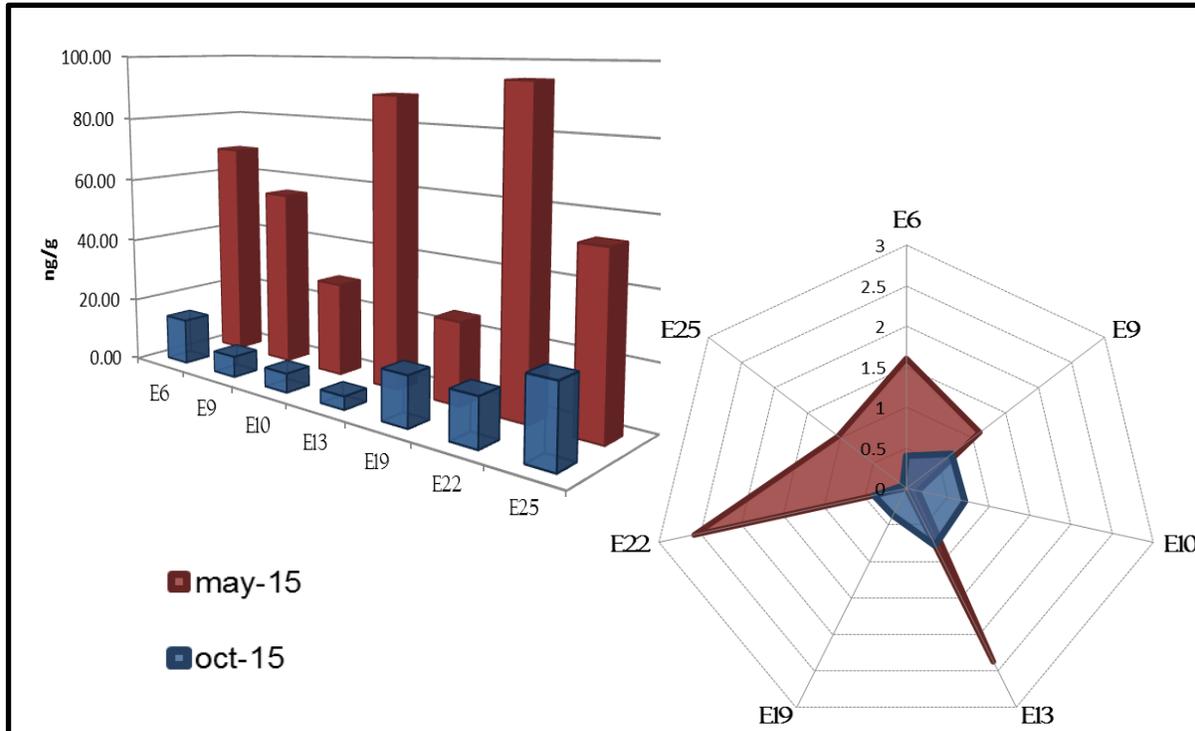


Figura 38. Variación espacio-temporal de concentración de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (ng/g) medidos en sedimentos de cenotes de la Península de Yucatán en 2015.

En los sedimentos de los cenotes muestreados solo se registraron 10 de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos evaluados; los cuales se agruparon por compuestos de bajo peso molecular (BPM:2-3 anillos) y alto peso molecular (APM:4-6 anillos). Como se observa en la figura 39, los compuestos de APM predominaron en los sedimentos para época de secas con las concentraciones mayores, siendo el cenote E22 el sitio con una mayor concentración de PAHs de APM con 79.39ng/g. Por otro lado para los PAHs de BPM, el cenote E13 presentó en mayor cantidad estos compuestos con 47.88 ng/g. En cambio para lluvias este comportamiento se encontró de forma contraria debido a que se encontró una mayor concentración de compuestos de BPM en todos los sitios muestreados, teniendo que el cenote E25 reportó las concentraciones mayores 15.42ng/g y 8.23ng/g para PHAs ligeros y pesados respectivamente.

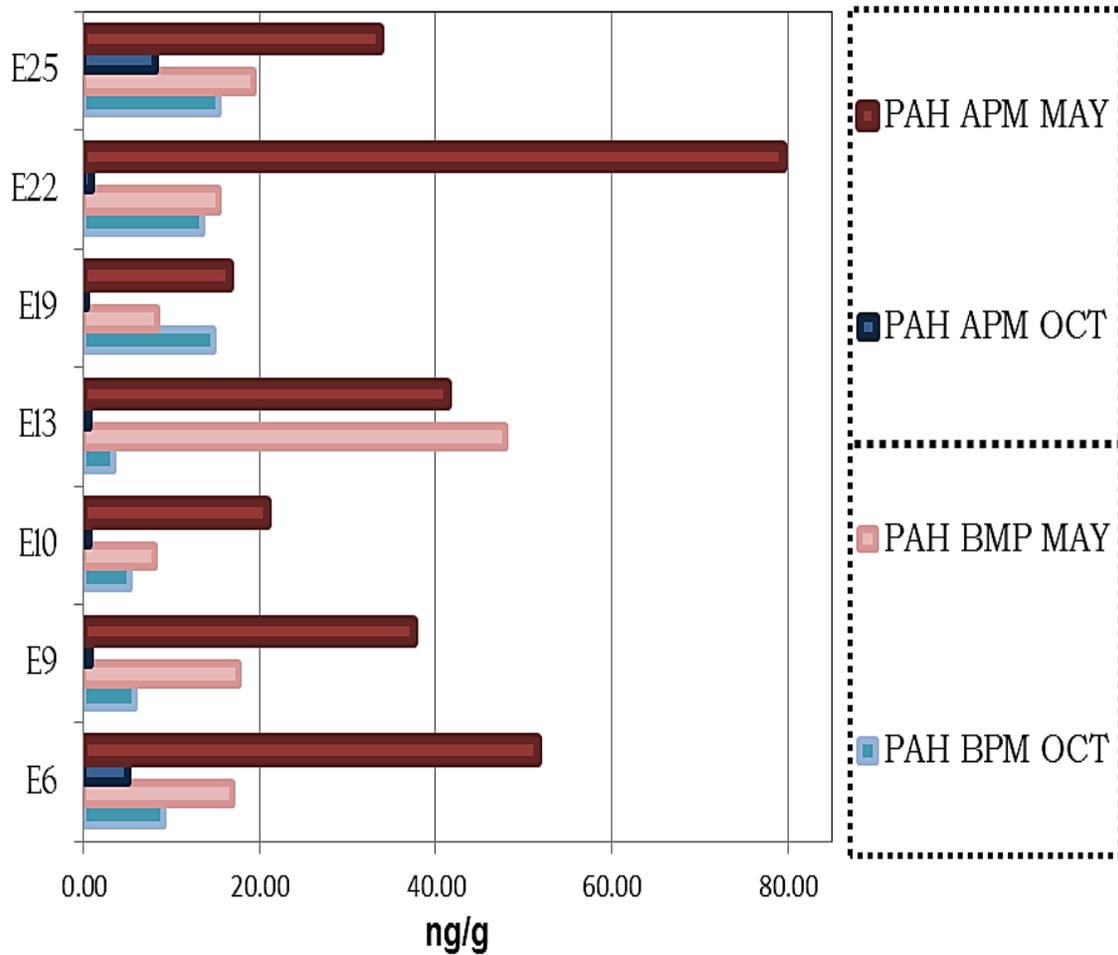


Figura 39. Variación espacio-temporal de concentración de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (ng/g). APM: alto peso molecular, BPM: bajo peso molecular, medidos en sedimentos de cenotes de la Península de Yucatán en 2015.

3.1 Posible origen de PAHs

El Acuífero de la Península de Yucatán, es considerado una unidad hidrológica y administrativa, la cual está conectada hidráulicamente; sin embargo, existen zonas que tienen distintos comportamientos debido a sus condiciones y características fisiográficas, geológicas, estructurales, hidrogeoquímicas y geohidrológicas. Una de estas zonas, es el anillo de cenotes, por lo que existen el área de recarga del acuífero que abastece a la zona metropolitana, su área de tránsito, así como los correspondientes a su área de descarga que pueden ser afectados o son más vulnerables a problemas con contaminantes (COTASMEY, 2012) (Figura 40). Dichas características podrían influir en el origen de los PAHs, por lo que la ubicación de los cenotes y su relación con su entorno resulta importante para determinar las posibles fuentes de estos hidrocarburos. Por ejemplo, los cenotes E6 y E9 (zona 4), E10 (zona 1) y E22 (zona 3) están ubicados en áreas de tránsito, lo que significa que en estas zonas hay mayor desarrollo urbano y actividades agrícolas; para el caso de los cenotes E13 Y E19 (zona 1), se encuentran ubicados en el área de recarga, lo que indica que en estos sitios existe una mayor infiltración en el suelo; finalmente, el cenote E25 (zona 3) está situado cerca del área de descarga, probablemente en estas zonas exista un mayor aporte por aguas residuales.(COTASMEY, 2012).

Tabla 15. Valores de índices moleculares discriminantes entre el origen pirolítico y petrogénico de los PAHs. **Negritas:** índices empleados en este proyecto.

Relaciones Isoméricas	Origen Petrogénico	Origen Pirogénico	Referencias
	Fen/ Ant	>15	
Ant/(Ant + Fen)	<0.10	>0.10	Yunker et al., 2002
Cris/BaA	>1	<1	Soclo et al., 2000
BaA/(BaA+Cris)	<0.20	>0.35	Yunker et al., 2002
Fluo/ Pyr	<1	>1	Baumard et al., 1998
Fla/(Fla + Pyr)	<0.4	>0.4	Yunker et al., 2002
BeP/BaP	>5	<2	Broyelle,1997
In123cdP/In123cdP +BghiP	0.20	>0.5(biomasa y carbón)	Yunker et al., 2002
LPAHs/HPAHs	Alto	Bajo	Soclo et al., 2000
	<1	>1	Yuan et al., 2002

Con el fin de inferir las posibles fuentes de origen de los PAHs encontrados en las muestras de sedimento (pirogénico o petrogénico), se usaron ciertas razones o cocientes de los analitos, por ejemplo, PAHs de APM (4-5 anillos) contra PAHs de BMP (2-3 anillos). Como se muestran en la Tabla 15, con estos lineamientos se logró determinar el posible origen de los hidrocarburos para los diferentes sitios (Tabla 16).

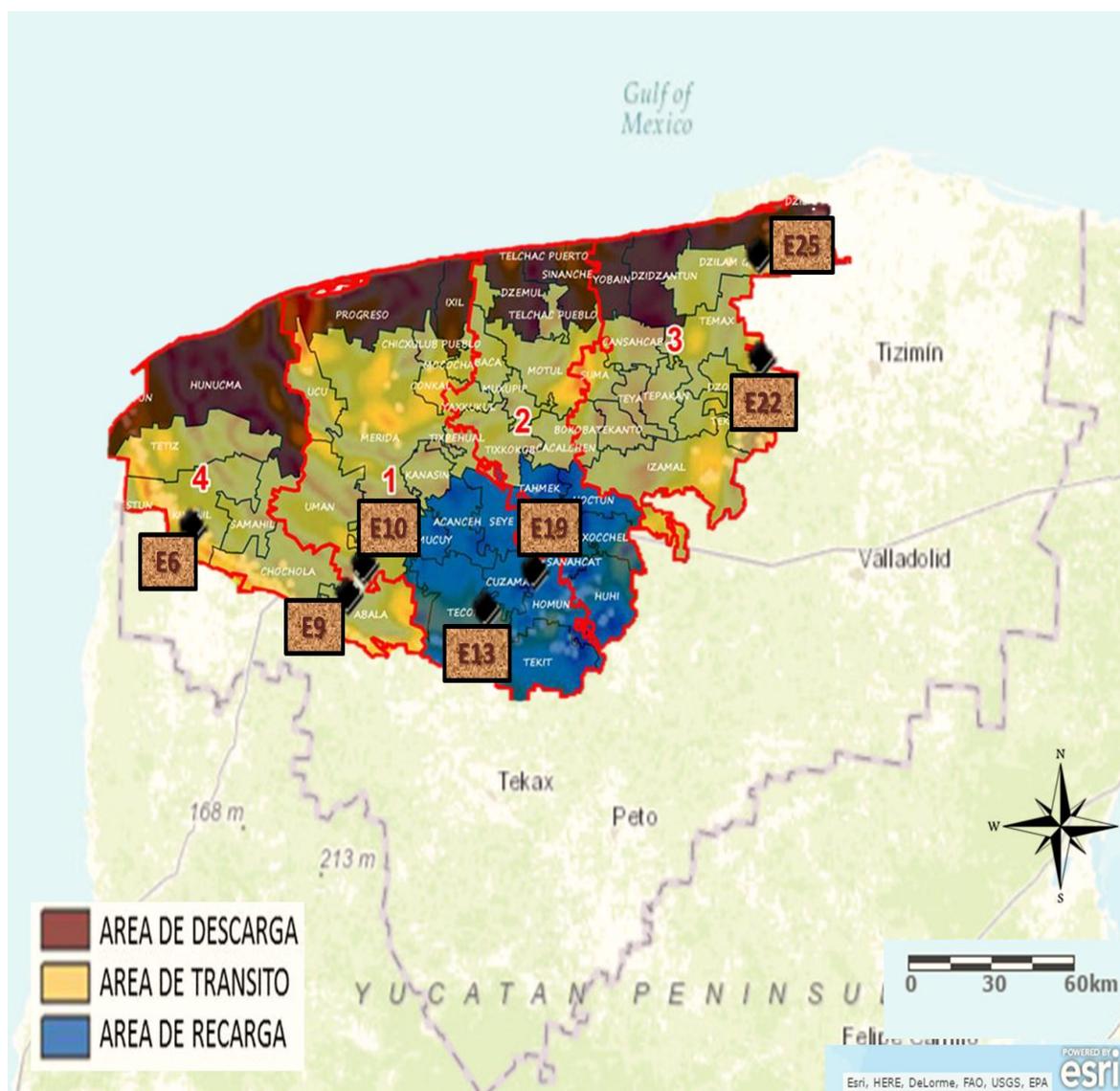
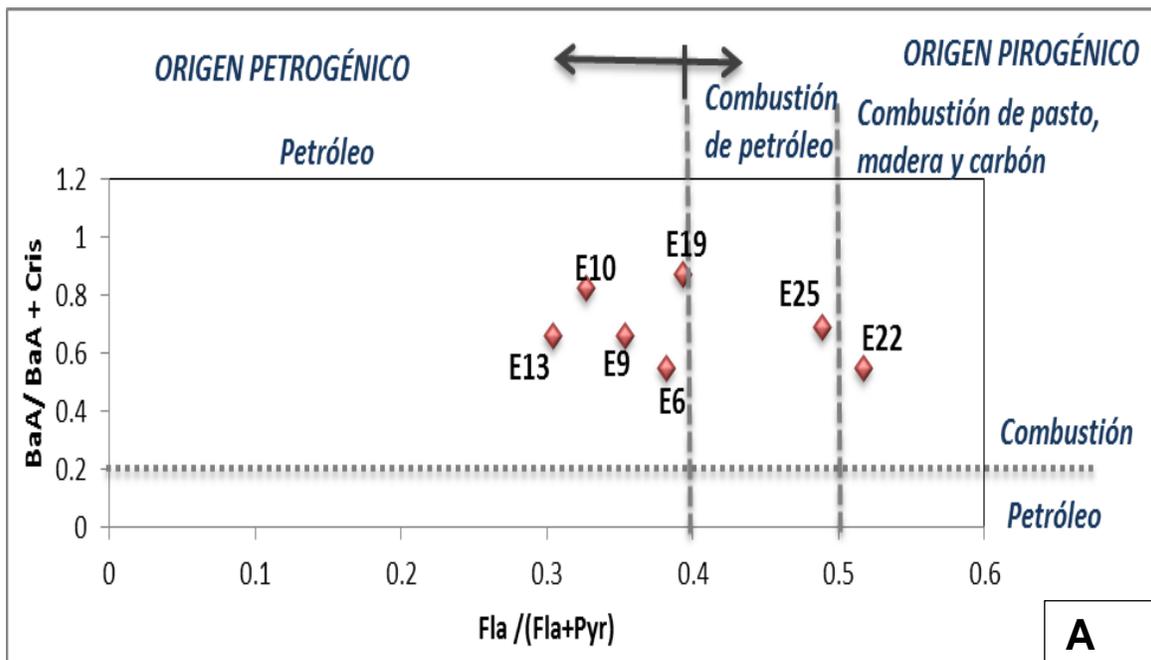


Figura 40. Anillo de cenotes de la Península de Yucatán, ubicación de cenotes muestreados en zonas en función del aprovechamiento del agua y generación de descargas al acuífero. Modificado de COTASMEY, 2012.

Tabla 16. Índices moleculares y origen de PAHs para los 7 sitios de cenotes estudiados de la península de Yucatán.

SITIO	Fla/(Fla+Pyr)	Ant/(Phe+Ant)	Cris/BaA	Fluor/Pyr	Origen
E6 May15	0.46	ND	0.84	0.84	pirogénico
E9 May15	0.44	1.44	0.52	0.79	pirogénico
E10 May15	0.44	ND	0.22	0.79	pirogénico
E13 May15	0.39	ND	0.52	0.65	pirogénico
E19 May15	0.39	ND	0.15	0.65	pirogénico
E22 May15	0.52	ND	0.83	1.07	pirogénico
E25 May15	0.49	0.23	0.45	0.96	pirogénico
E6 Oct15	0.31	ND	ND	0.45	pirogénico
E9 Oct15	0.26	ND	ND	0.36	pirogénico
E10 Oct15	0.21	ND	ND	0.27	pirogénico
E13 Oct15	0.22	ND	ND	0.27	pirogénico
E19 Oct15	0.00	4.28	ND	ND	petrogénico
E22 Oct15	0.00	5.64	ND	ND	pirogénico
E25 Oct15	0.00	3.27	ND	ND	petrogénico



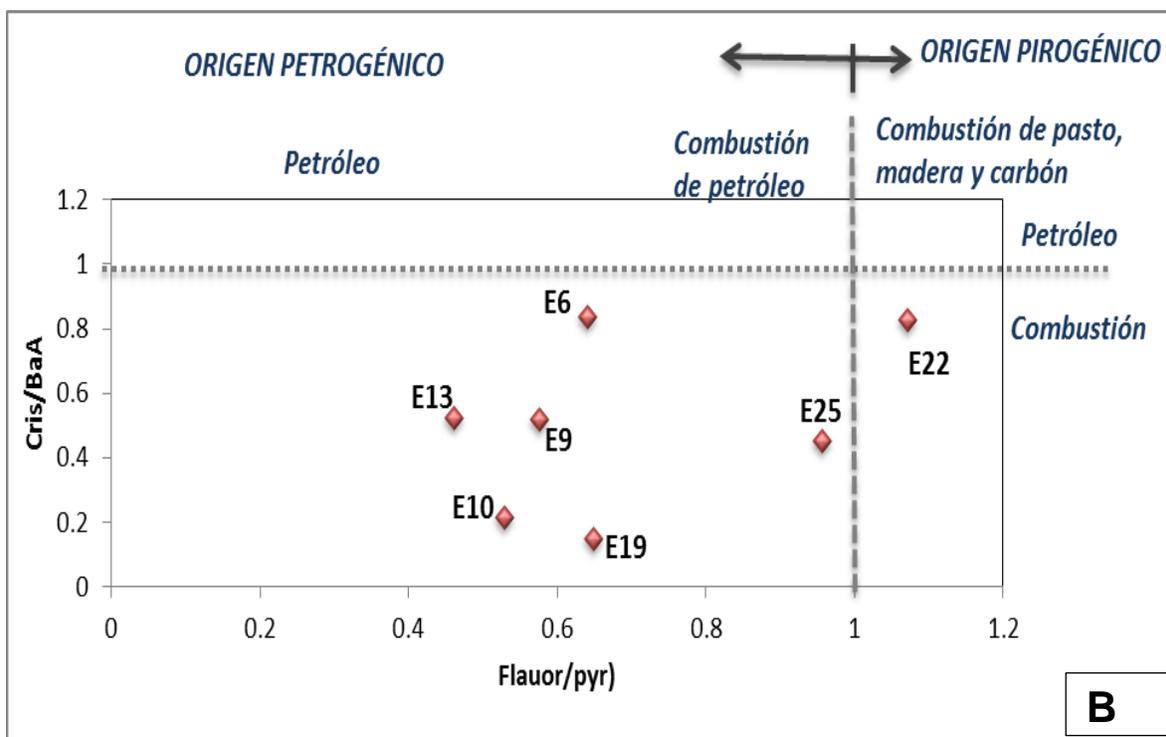


Figura 41. Representación esquemática de relaciones del índice molecular. **A:** Fla/Fla+Pyr con BaA/BaA+Cris. **B:** Fluor/Pyr con Cris/BaA; en sedimentos de cenotes de la PY, promedio de ambas temporadas, 2015.

Con el cálculo de diferentes índices (tabla 16) y con base en los datos de ubicación de los cenotes y su relación con su entorno, se determinó que la mayoría de los valores obtenidos refieren un posible origen de PAHs predominantemente pirogénico, en particular si se consideran los índices BaA/BaA+Cris y Cris/BaA, los valores resultantes se ubican en la zona de combustión. En el caso del índice Fla/Fla+Pyr, los datos sugieren combustión de pasto, madera o carbón para el sitio E22, el sitio E25 se clasifica como pirogénico encontrándose muy cercano a la transición por combustión de pasto, esta conducta es similar usando el índice Fluor/Pyr; sin embargo, también la representación esquemática de dos índices empleados puede no coincidir en la misma clasificación por lo tanto se deben calcular distintos índices con el fin de obtener la mayor información para su correcta clasificación (Tabla 16, Figura 41).

Al evaluar si existe un cambio en el origen de acuerdo a la temporalidad podemos observar que solo para las estaciones 19 y 25 en época de secas se observó un desplazamiento de los índices hacia puntuaciones pirolíticas, propias de la combustión de maderas, pasturas y/o carbón; la explicación sugerida es que estos PAHs podrían haber sido originados en procesos de quemados durante manejos agrícolas e incendios, ambos comunes en la región para esta temporada (Yunker *et al*; 2002).

3.2 Hidrocarburos alifáticos en sedimentos.

Como análisis adicional se determinó la concentración de hidrocarburos alifáticos en sedimentos, lo cuales generalmente están constituidos por mezclas complejas compuestas tanto por hidrocarburos autóctonos (derivados por causa biogénica) como alóctonos de naturaleza petrogénica, que en sedimentos pueden ser sintetizados por procesos bioquímicos bentónicos (Figura 42).

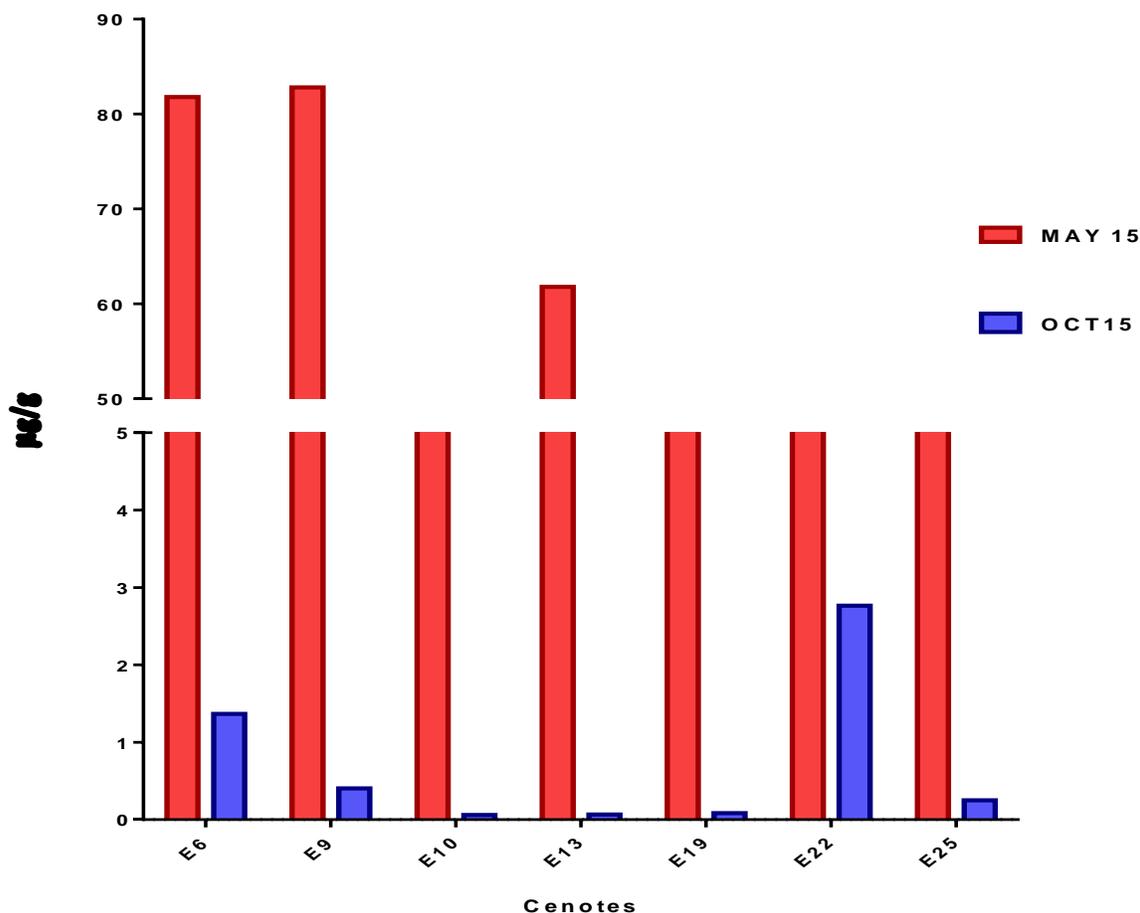


Figura 42. Variación espacio temporal de concentración de Hidrocarburos Alifáticos Totales medidos en sedimentos.

En la figura anterior se puede observar una variación temporal en la concentración de hidrocarburos alifáticos, siendo la temporada de secas (May-15) la temporada con concentraciones altas donde la E9, es la estación con mayor concentración de estos hidrocarburos $82.81\mu\text{g/g}$ seguido de E6 Y E22, en cambio para temporada de lluvias (Oct-15) se observa claramente una disminución en estas concentraciones. No obstante, se encuentra una diferencia significativa espacial para E22 y E6 con una concentración de 2.76 y $0.40\mu\text{g/g}$ respectivamente. El cambio en la concentración por la temporalidad podría explicarse debido a los fenómenos de

evaporación que ocurren durante esta época, provocando una mayor concentración de estos compuestos.

Una forma de determinar el origen de estos compuestos es con el índice de preferencia de carbono (IPC) definida como la relación entre la suma de los *n*-alcanos de número impar y los *n*-alcanos de número par, donde los valores mayores 1.0 se relaciona con los hidrocarburos de origen biogénico, mientras que los valores aproximadamente igual o menor a 1.0 indican hidrocarburos de origen petrogénico (Tabla 17) (Peters *et al*; 2005).

Tabla 17. Origen de Hidrocarburos Alifáticos en sedimentos de cenotes de la PY, 2015

CENOTE	MAYO 2015	OCTUBRE 2015	Origen
E6	8.22	2.11	biogénico
E9	4.33	1.12	biogénico
E10	1.61	0.84	petrogénico
E13	4.58	1.52	biogénico
E19	2.13	1.04	biogénico
E22	4.36	2.50	biogénico
E25	3.53	0.26	petrogénico

La importancia de evaluar el IPC en sedimentos recientes radica en conocer de manera indirecta y general, el tipo de aporte de hidrocarburos que se acumula en los sedimentos. De esta forma, se sugiere que el aporte de este tipo de compuestos se atribuyen a un aporte importante de materiales alóctonos (plantas vasculares y desechos de éstas; ceras cuticulares de plantas terrestres) (Bouloubassi *et al*; 2001).

4. Concentración de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en agua.

Las concentraciones que se determinaron para los 16 hidrocarburos aromáticos principales en muestras de agua para los distintos sitios se resumen en la tabla 18. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son fuertemente hidrófobos y difíciles de biodegradar, de ahí su comportamiento como contaminantes orgánicos persistentes, es por ello que la concentración de estos compuestos en agua es relativamente baja en comparación con la de sedimentos. Para este estudio se encontraron niveles de PAHs totales de 4.28 ng/L (cenote E10) a 7.64 ng/L (cenote E9) para la temporada de secas y concentraciones de 1.24 ng/L (cenote E22) a 12.07 ng/L (cenote E10) en la temporada de lluvias.

Tabla 18. Hidrocarburos policíclicos aromáticos en agua de cenotes de la Península de Yucatán en dos temporadas (seca y lluvia) durante el año 2015. (Concentraciones ng/L)

APM: alto peso molecular; BPM: bajo peso molecular.

Valores en negritas: muestran los valores más elevados

ND: Inferior al límite de detección del método (0.01 ng/g)

NOAA: Valores de referencia de la NOAA para PAHs en agua (NOAA, Buchman, 1999)

OMS: valores de referencia para PAHs en aguas subterráneas por la OMS, 2003

Anillos	NOMBRE	E6		E9		E10		E13		E19		E22		E25		NOAA
		may-15	oct-15	may-15	oct-15	may-15	oct-15	may-15	oct-15	may-15	oct-15	may-15	oct-15	may-15	oct-15	
2	Naftaleno	0.14	1.03	0.35	ND	0.19	ND	0.98	ND	0.63	5.61	0.15	0.13	0.66	0.22	2350.00
2	Acenaftileno	ND	0.67	0.20	0.03	ND	0.21	ND	ND	ND	0.17	ND	0.33	ND	2.30	
2	Acenafteno	0.38	0.93	1.18	0.36	1.05	0.26	0.82	0.40	1.48	0.46	0.65	0.12	1.31	0.69	970.00
3	Fluoreno	0.17	0.46	0.93	0.23	0.19	0.70	0.39	0.14	0.18	0.45	0.46	0.07	0.94	0.58	300.00
3	Fenantreno	1.33	1.87	2.62	1.34	2.07	2.06	1.55	1.46	1.34	1.48	4.31	0.44	2.84	1.45	
3	Antraceno	0.37	0.14	0.22	0.30	ND	0.77	0.23	ND	0.15	0.20	0.30	0.15	ND	0.22	
Total BPM		2.39	6.66	5.50	2.25	3.50	4.34	3.97	2.00	3.78	8.37	5.87	1.24	5.76	5.90	
4	Fluoranteno	0.29	0.28	0.38	0.22	0.16	1.78	0.06	0.07	0.08	0.32	0.18	ND	0.20	0.24	40
4	Pireno	0.36	0.51	0.66	0.30	0.16	1.88	0.11	0.06	0.15	0.29	0.26	ND	0.29	0.29	300.00
4	B(a)Ant	ND	0.89	0.10	ND	ND	1.81	0.09	ND	ND	0.16	0.10	ND	ND	0.27	300.00
4	Criseno	0.13	1.19	0.53	0.20	0.05	1.80	0.05	0.35	ND	0.13	0.13	ND	ND	0.44	
5	B(b)Fluorant	1.49	0.67	ND	0.06	ND	0.11	0.10	0.10	0.04	0.06	0.06	ND	0.12	0.11	
5	B(a)Pireno	0.11	0.46	0.47	0.30	0.40	0.35	0.38	0.25	0.28	0.44	0.48	ND	0.46	0.39	300.00
Total APM		2.37	4.01	2.14	1.07	0.78	7.73	0.80	1.02	0.57	1.41	1.21	0.00	1.07	1.74	
PAH TOT		4.76	10.67	7.64	3.32	4.28	12.07	4.76	3.02	4.35	9.78	7.08	1.24	6.83	7.64	300
																OMS
																0.1-0.5

Se puede observar que temporalmente se presentó una mayor concentración de PAHs en agua en lluvias (Figura 43), causado por el arrastre de estos compuestos durante esta temporada, por lo que los PAHs pueden quedar suspendidos en la superficie del agua al ser compuestos poco solubles.

El mayor aporte a la concentración de PAHs en agua fue por fenantreno n ambas temporadas.

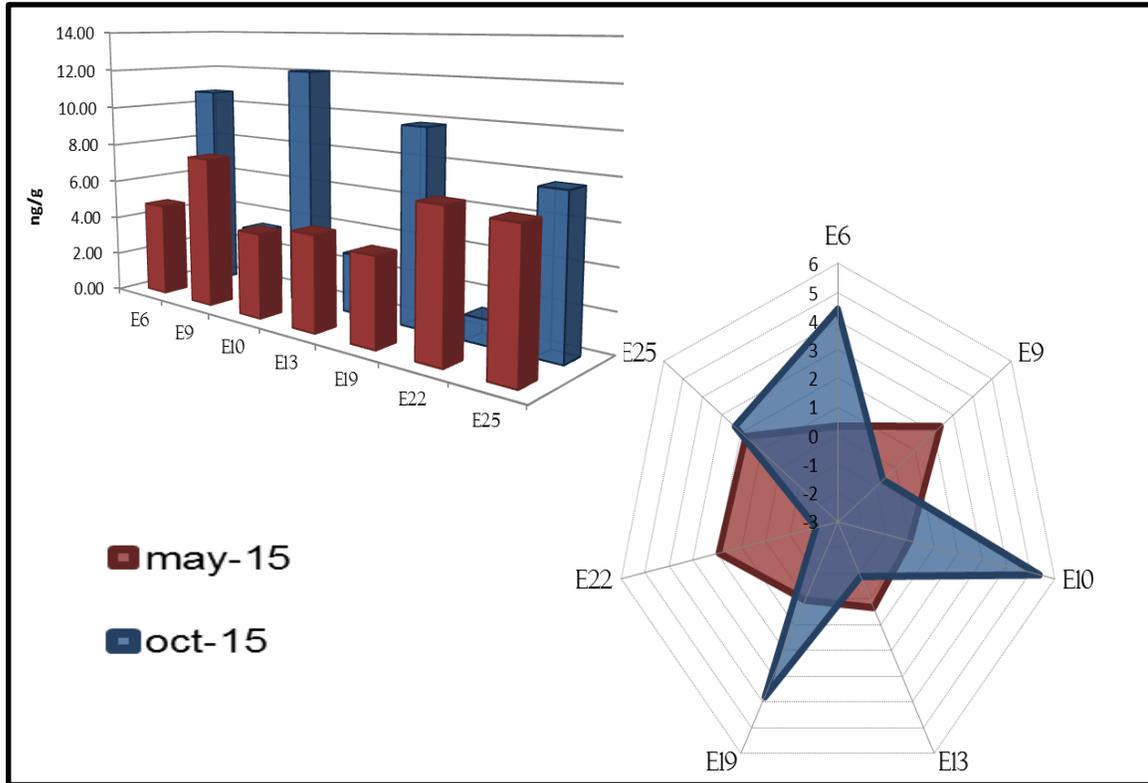


Figura 43. Variación espacio-temporal de concentración de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (ng/L) medidos en agua de cenotes de la Península de Yucatán en 2015.

Los cenotes E10, E6 y E19 en temporada de lluvias y los cenotes E9, E13 y E22 en temporada de secas contienen los valores más representativos de concentración de PAHs con las concentraciones más altas.

En las muestras de agua de cenotes muestreados solo se registraron 12 de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos evaluados; los cuales se agrupan por compuestos de BPM y APM (Tabla 18).

En general los compuestos APM predominaron en los sedimentos con mayor concentración en temporada de lluvias, provocando una diferencia temporal, asimismo la variación espacial muestra diferencias significativas donde el cenote E10 contiene la concentración más alta 12.07 ng/g de PAHs de este tipo, seguido del cenote E6 y E25 con una concentración de 10.67ng/g y 7.64ng/g respectivamente.

Para el caso del agua los compuestos de BPM son los que predominan, la variación temporal que se registró para estos PAHs no sugiere una diferencia temporal, sin embargo espacialmente se tuvo que para los cenotes E6 (6.6n g/g), E19 (8.37 ng/g) y E25 (5.9ng/g) contienen PAHs de BPM en mayor concentración en temporada de secas, mientras que E9 (5.5ng/g), E22 (5.87ng/g) y E25 (5.76 ng/g) en época de lluvias. Se sugiere que una baja concentración de PHAs de APM se debe a una baja solubilidad de estos compuestos en agua por lo que estos compuestos tienden a sedimentarse. Las concentraciones de PAHs en general temporalmente, muestran una tendencia a aumentar en temporada lluviosa causado por el arrastre y disolución que existe en esta temporada. (Figura 44).

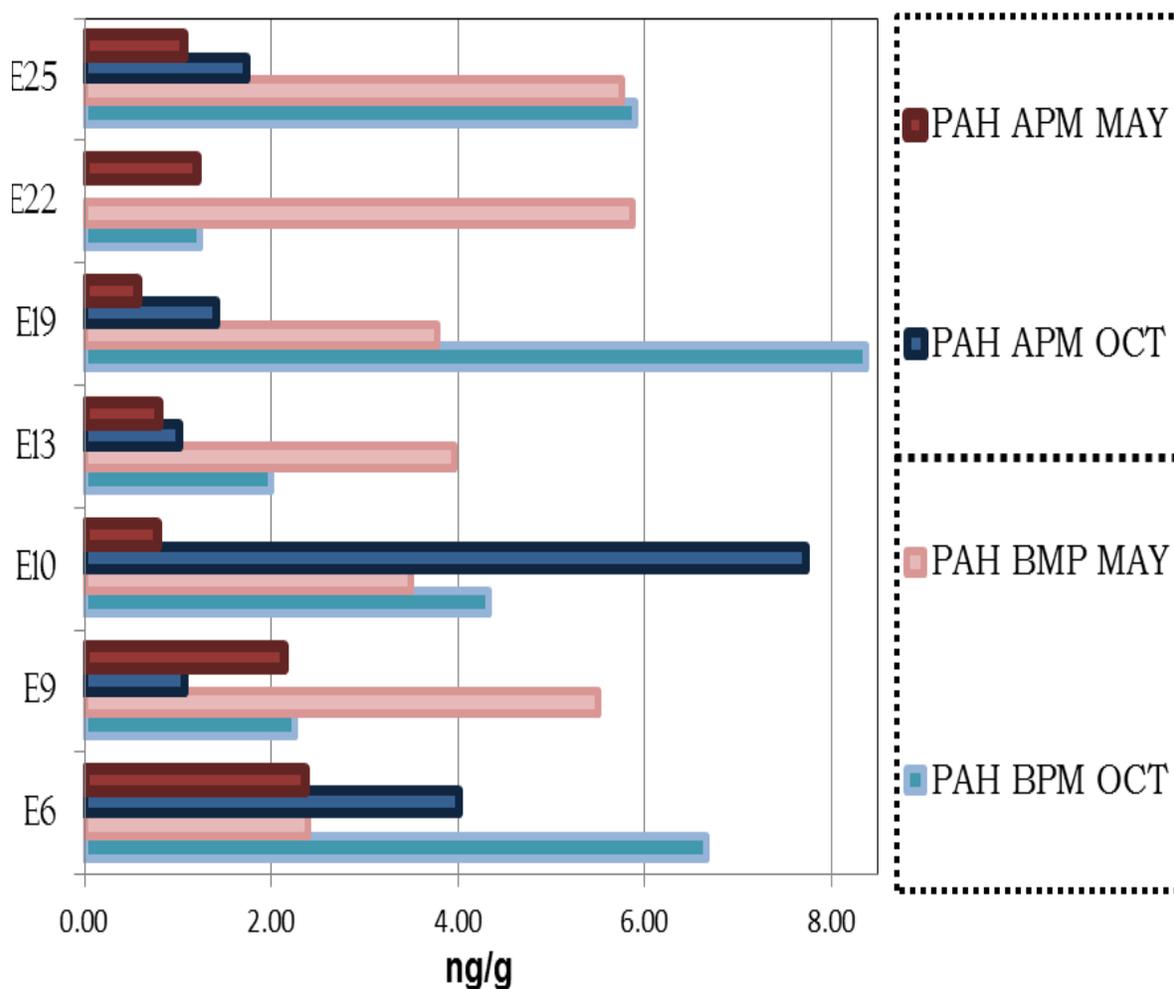


Figura 44. Variación espacio-temporal de concentración de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (ng/L). APM: alto peso molecular, BPM: bajo peso molecular, medidos en agua de cenotes de la Península de Yucatán en 2015

5. Correlaciones entre PAHs, materia orgánica y grano fino

Con base en los resultados anteriormente descritos, se puede decir que los sitios con mayores concentraciones de PAHs totales registradas para el año 2015 fueron E22 y E13 en temporada de secas y E10 y E25 en temporada lluviosa (Figura 45 A.B).

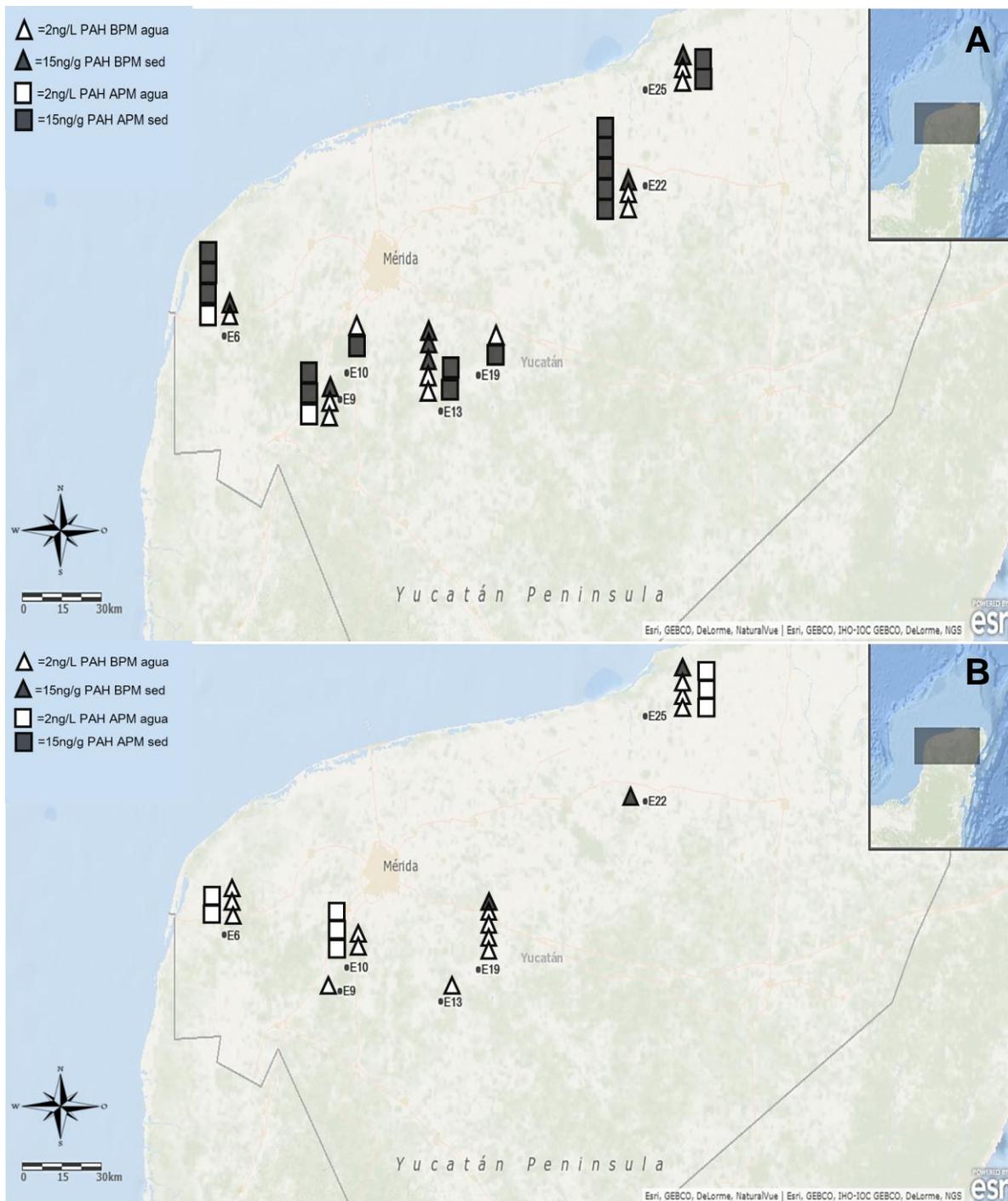


Figura 45. Mapa de cenotes muestreados donde se representan los sitios con mayor concentración de PAHs de APM, BPM y su variación temporal para 2015. A: secas, B: lluvias

Como una primera exploración se realizó un análisis estadístico no paramétrico (Prueba de Spearman) con el fin de determinar las correlaciones entre las concentraciones totales de PAHs en los sedimentos con los porcentajes de materia orgánica y grano fino de cada cenote. Fueron obtenidos valores de r de 0.57 en temporada seca y 0.33 en temporada lluviosa, no se presentaron correlaciones significativas ($p < 0.05$). Sin embargo, con fines únicamente descriptivos y de visualización se realizaron regresiones lineales entre las concentraciones de sedimento y los porcentajes de materia orgánica y grano fino. Los mayores coeficientes de regresión se presentaron para la relación entre PAHs totales con materia orgánica, principalmente en aquellos sitios con mayor contenido de materia orgánica y concentración de PAHs, (cenotes E6 y E25) los cuales se caracterizan por estar dentro de ranchos. Los PAHs no mostraron una tendencia definida de asociación con el porcentaje de granos finos (arenas finas, limo y arcilla). (ANEXO XII).

6. Biomarcadores (Respuestas Biológicas)

Los peces son organismos importantes para determinar contaminantes ambientales (Flammarion *et al*; 2002), al analizar las tallas de los peces capturados para la evaluación de biomarcadores (ANEXO I), no se encuentran diferencias significativas en los parámetros morfométricos y de proporción sexual temporalmente ni espacialmente.

Previo al análisis se verificó la integridad de ARN de tejido muscular de diferentes organismos obtenidos en ambas temporadas, mediante una electroforesis en gel de agarosa, en el cual se observó que para los diferentes organismos capturados procedentes de distintos cenotes el ARN se encontraba en perfectas condiciones para su uso (Figura 46).

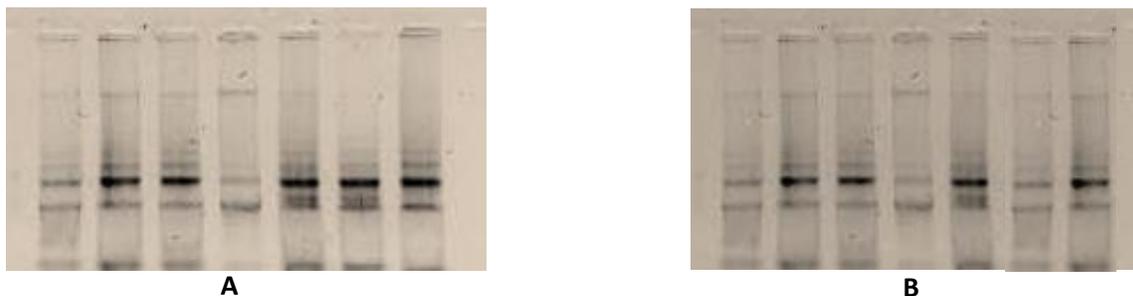


Figura 46. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se puede observar dos bandas definidas en músculo A: secas, B: lluvias. Muestras al azar.

Con dichas muestras se realizaron una serie de diluciones 1:5 y se usó 1 μ L de cDNA con el kit CDNA synthesis/thermo. Se realizó una PCR para medir las amplificaciones de CYP1A1 y β -actina (Figura 47), a partir de la pendiente de la regresión lineal obtenida con los Ct a las diferentes concentraciones de cDNA, se calculó la eficiencia: $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$.

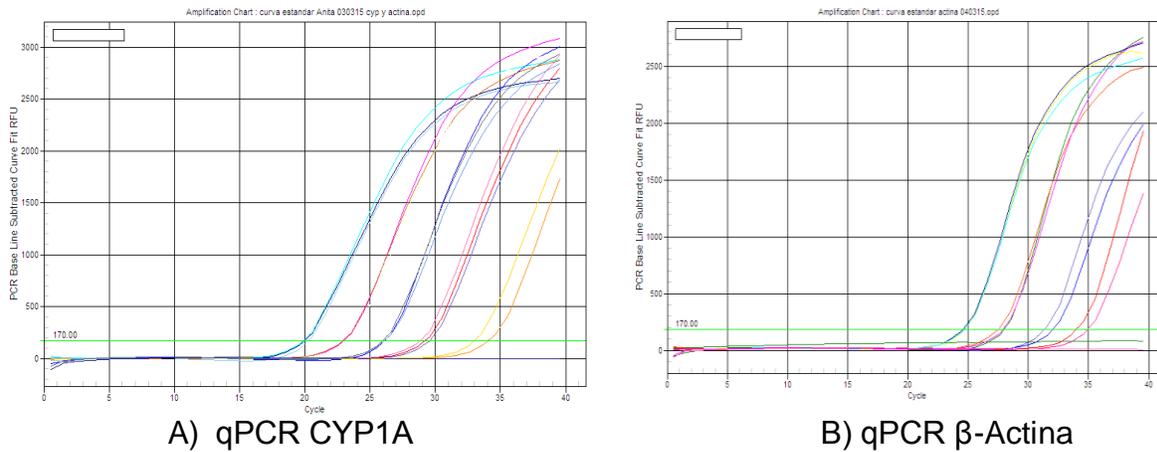


Figura 47. qPCR. Cálculo de la eficiencia en la fase exponencial.

Los valores de eficiencia usualmente varían en un rango de entre 1.6 hasta por arriba de 2 (Pffaf, 2006), este estudio cumple con este criterio reportando una eficiencia de 2.21 para β actina y 2.82 para CYP1A ($E=10(-1/\text{pendiente})$) (Figura 48). Así mismo se estudiaron las curvas de desnaturalización de ADN (melt curve) para verificar la existencia de un solo producto de amplificación.

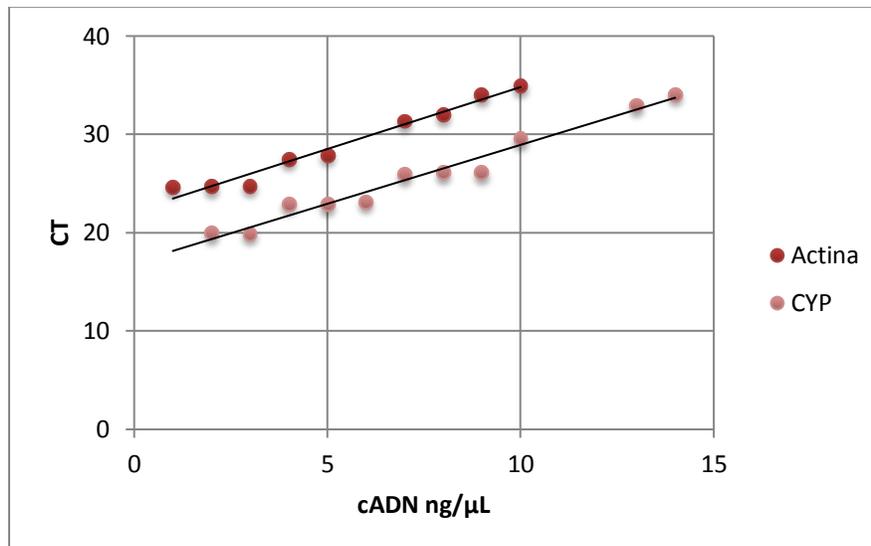


Figura 48 Curva de eficiencia: se calculó a partir de una serie de diluciones de cDNA de músculo. Relación lineal $R^2=0,978$ para CYP, y $R^2=0,971$ para β -actina

Las curvas de disociación de ADN obtenidas para los dos genes fueron satisfactorias puesto que en ambas presentan un solo pico, lo cual nos indica la formación de un solo producto que nos asegura que la fluorescencia medida por el aparato está relacionada a la formación del amplicón y no de dímeros o de algún otro producto no específico, en seguida se presentan las curvas de disociación de DNA conseguidas para los genes estudiados (Figura 49).

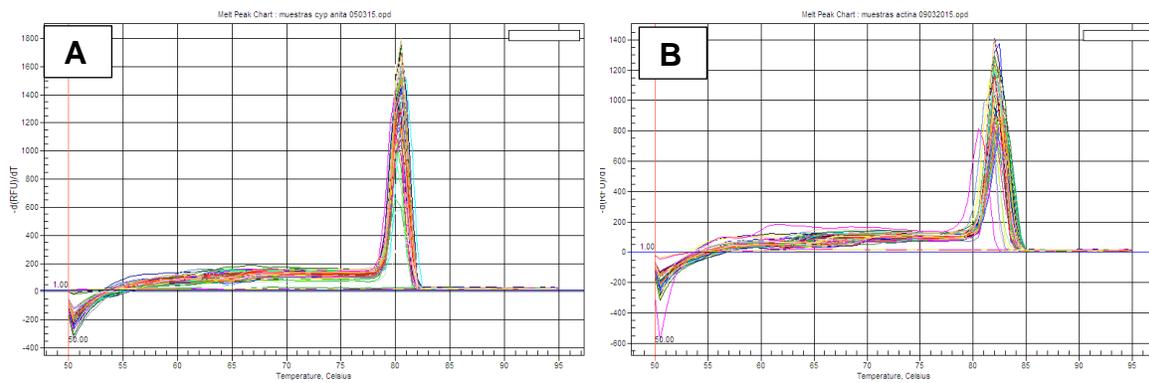
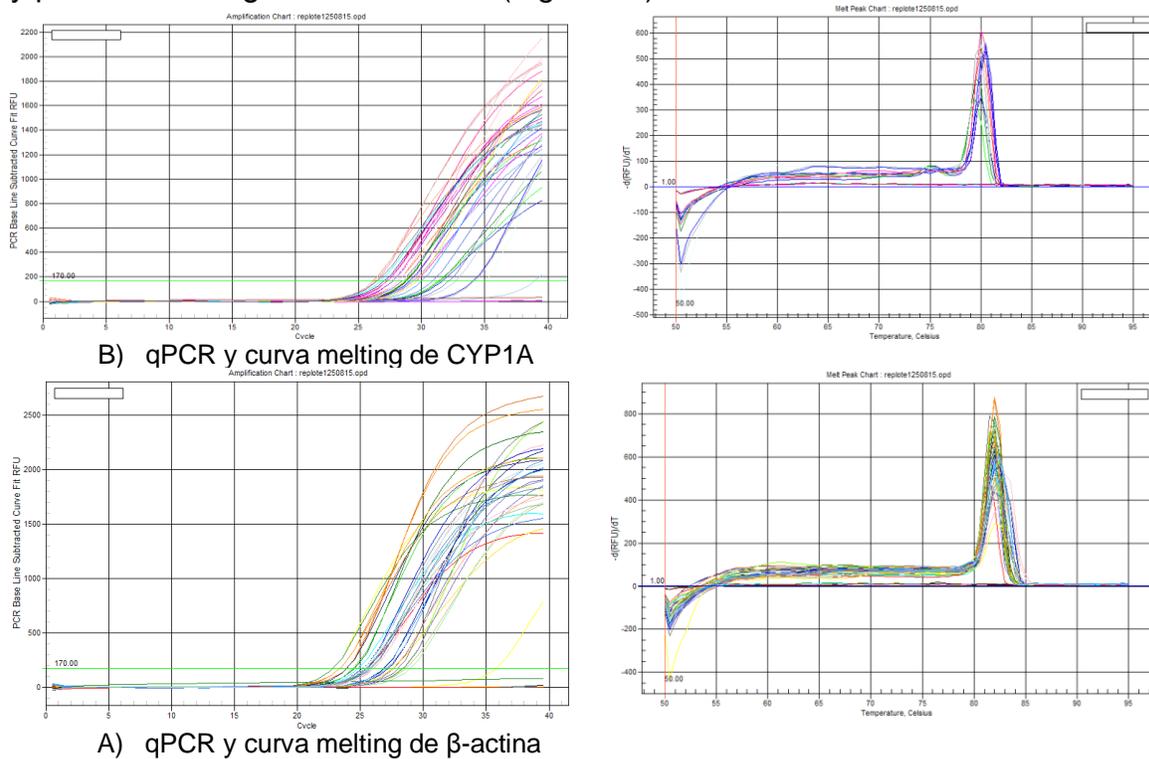


Figura 49. Curvas melting de A: CYP1A, y B: β -actina

Para la evaluación de cada biomarcador se comparó la respuesta frente a un grupo control propuesto, así mismo se contrastó entre cada sitio estudiado como por estación del año, cabe mencionar que la respuesta del grupo control mostró una distribución normal (ANEXO XIII), indicando que para este estudio el grupo control fue efectivo y podría ser utilizado como línea base para la especie *Gambusia yucatanana*; por otro lado, con el fin de descartar que el sexo y la talla de los peces capturados pudiera influir en la respuesta, se realizaron pruebas de Mann-Whitney-Wilcoxon (ANEXO XIV) donde se obtuvo que el sexo y la talla no influyen en la respuesta de los biomarcadores.

6.1 Expresión de CYP1A

Se realizaron PCR's en tiempo real de tejido muscular correspondiente a peces capturados en periodo de secas y lluvias 2015 para medir la expresión de CYP1A y β actina como gen de referencia (Figura 50).



B) qPCR y curva melting de CYP1A

A) qPCR y curva melting de β -actina

Figura 50. qPCR y curva melting de CYP1A y β -actina obtenidas para todas las estaciones. No se observa formación de dímeros en las curvas melting.

En análisis de los niveles de expresión de CYP1A se representa gráficamente en la figura 51, la expresión de CYP1A en pez mosquito (*G. yucatanana*) en los 7 sitios de la PY mostró una diferencia significativa en ambas temporadas estudiadas, siendo la época seca la que presenta mayores valores de expresión en todos los sitios en comparación con la temporada de lluvias, la E22 seguida de E10 y E19 presentan diferencias significativas con respecto al control $p < 0.05$, en ambas temporadas. A pesar de que las 3 estaciones antes mencionadas presentan diferencias significativas con respecto al control en ambas temporadas, podemos observar que los peces del cenote E10 presentaron una mayor expresión de CYP1A en lluvias, lo que podría estar relacionado con las altas concentraciones de PAHs de APM, en agua encontradas en mayor concentración para este sitio, tal expresión también se observó en los peces del cenote E22 en la temporada de secas el cual presentó altos valores de PAHs en temporada de secas. Sin embargo, existen otras estaciones con concentraciones más altas de PAHs, como es el caso del cenote E6.

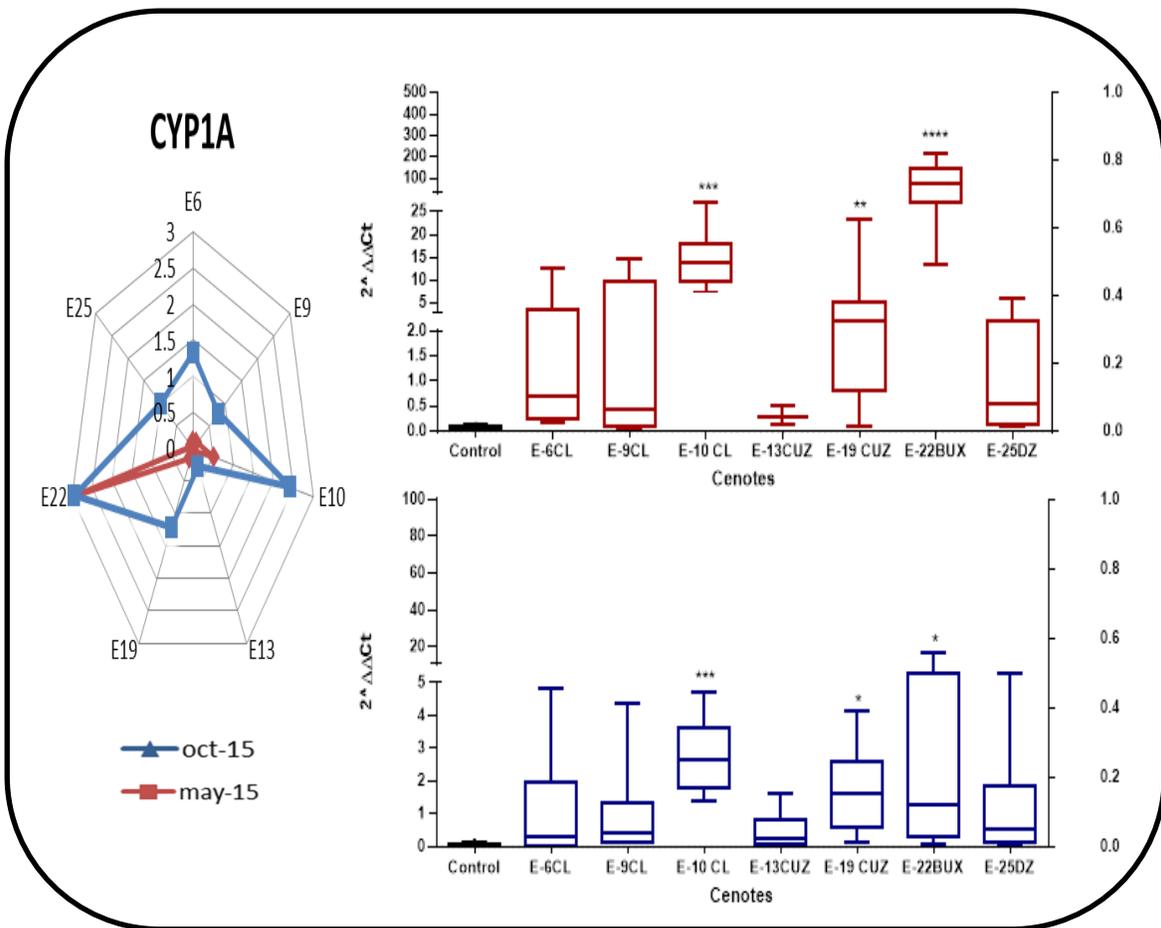


Figura 51. Variación espacio-temporal de expresión relativa de CYP1A, usando β -actina de gen de referencia obtenida para cenotes de la PY en 2015. Gráfico de estrella para CYP1A, por sitio y temporada (resultado de IBR). ANOVA presenta medianas y rangos intercuantiles,* Diferencia significativa

6.2 Actividad enzimática de GST

En el presente estudio la actividad de glutatión-s-transferasa del grupo control mostró una actividad de $0.024 \pm 0.004 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$, se puede ver una diferencia temporal en la actividad de GST donde destacó la temporada de secas con el aumento de la actividad de GST en los peces, sin embargo, espacialmente también se encontraron diferencias significativas y no con respecto al grupo control, en temporada de secas, los peces de los cenotes que registraron mayor actividad enzimática de GST fueron los del cenote E25 ($0.05 \pm 0.006 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$), el cenote E19 ($0.049 \pm 0.009 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$) y el cenote E22 ($0.045 \pm 0.011 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$), estos cuerpos de agua a excepción del cenote E25, también presentaron mayor actividad GST en la época de lluvias (Figura 52).

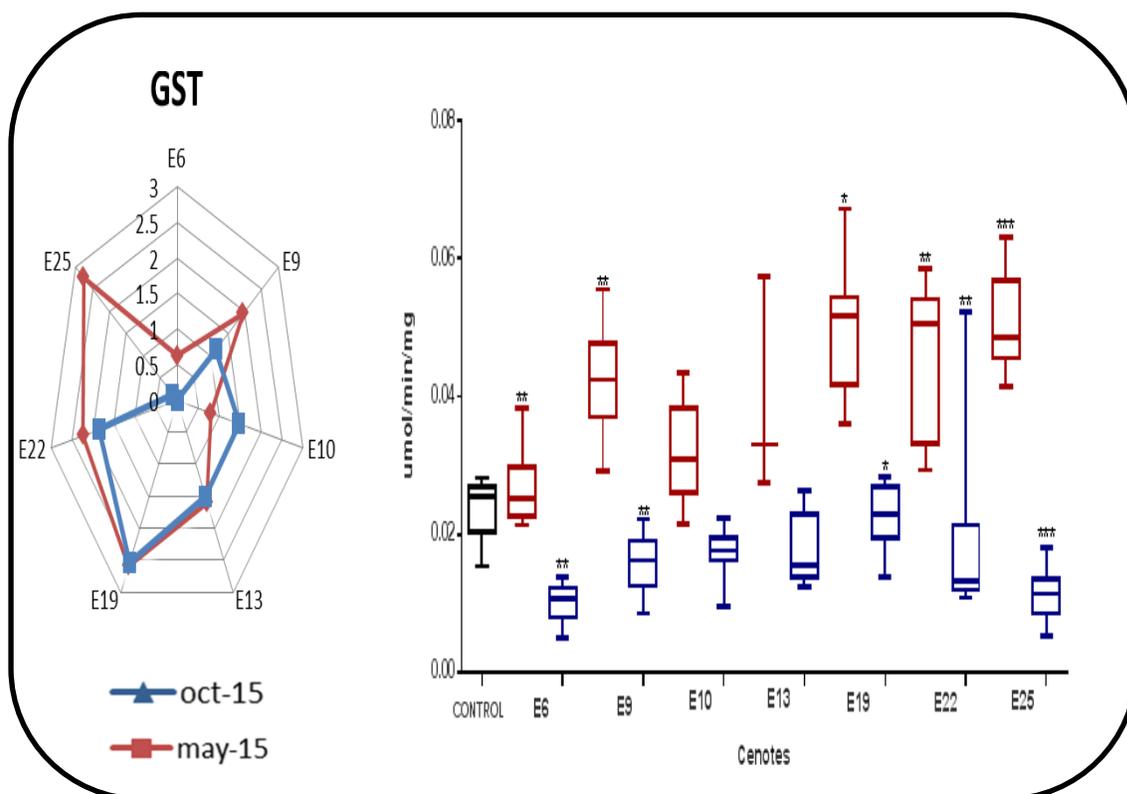


Figura 52. Variación espacio temporal de la actividad promedio de la enzima glutatión-s-transferasa ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) en *G. yucatanana*, en un ciclo anual (2015). Gráfico de estrella para GST, por sitio y temporada (resultado de IBR) Intervalos de confianza del 95%. Existe diferencia significativa entre cenotes ($P < 0.05$). * respecto a temporada.

6.3 Contenido de Glutación total.

La concentración total de glutación para el grupo control fue de 0.98 ± 0.46 nmol/mg, hay una diferencia espacial para la concentración de glutación donde los cenotes E9 y E13 presentaron un menor contenido de glutación con concentraciones de 0.936 ± 0.19 nmol/mg y 0.931 ± 0.18 nmol/mg respectivamente en temporada de secas, en el caso de la época de lluvias los cenotes que representaron un menor contenido de glutación fueron E25 (0.63 ± 0.13 nmol/mg) y E6 (0.73 ± 0.17 nmol/mg), el cenote E22 (1.35 ± 0.09 nmol/mg) indicó el mayor contenido de glutación total en temporada de secas, lo que podría ser indicativo de una mayor producción de Glutacion por parte de los peces de este cenote.

En general no existe una diferencia significativa respecto al control, sin embargo existe una diferencia significativa temporal y espacial para el contenido de glutación en estos peces, donde en época de lluvias se presentó un menor contenido de glutación en todos los cenotes principalmente para los peces del cenote E25 y E22, los cuales se ubican cerca de la costa y de ranchos, convirtiéndose en sitios vulnerables a la presencia de distintos contaminantes (Figura 53).

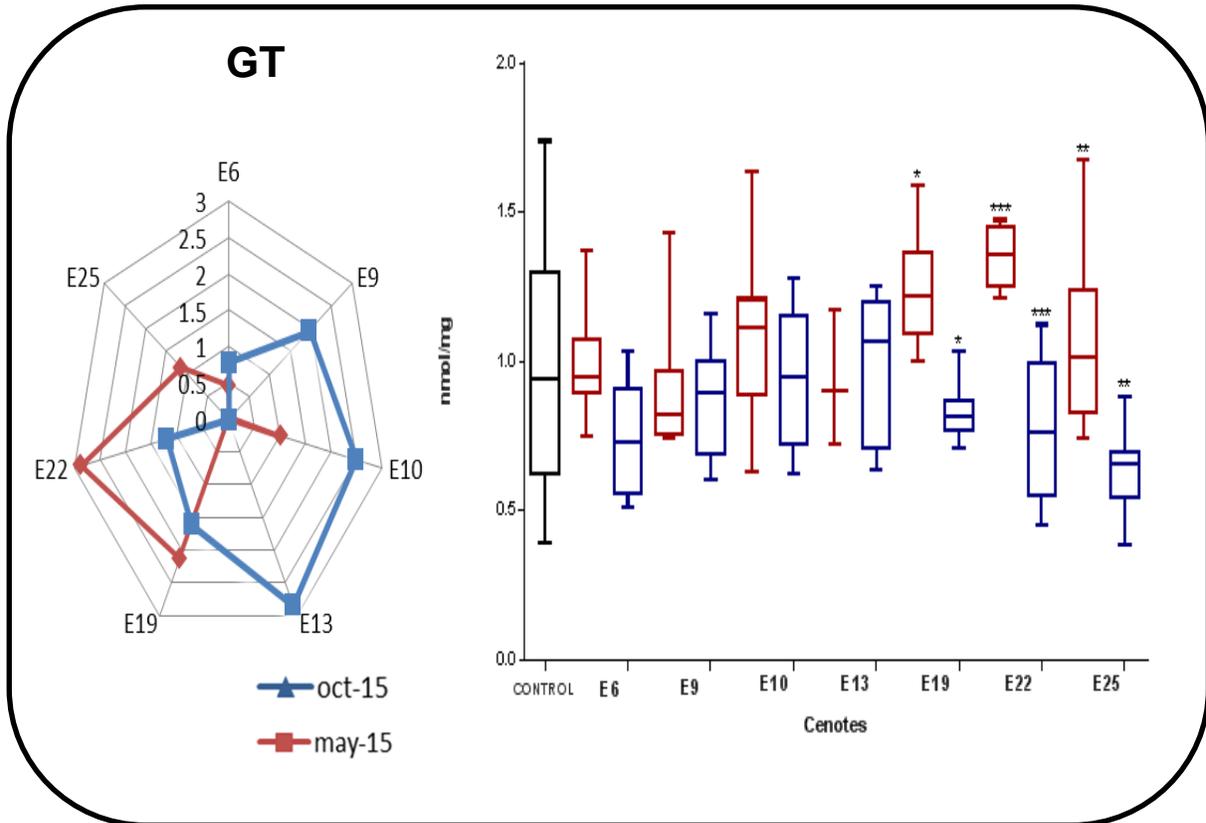


Figura 53. Variación espacio temporal de Glutacion total (nmol/mg) en *G. yucatanana*, en un ciclo anual (2015). Gráfico de estrella para GT, por sitio y temporada (resultado de IBR) Intervalos de confianza del 95%. Existe diferencia significativa entre cenotes ($P < 0.05$). * respecto a temporada.

6.4 Contenido de Lípidos peroxidados (LPO).

Para *G.yucatana* el contenido de lípidos peroxidados registrados en este estudio, el grupo control obtuvo un promedio de 0.265 ± 0.19 nmol/mg, no se observó una deferencia temporal significativa, sin embargo se pudo apreciar que para temporada de lluvias el contenido de lípidos peroxidados mostró una tendencia a aumentar, los peces con mayor contenido de LPO registrados en ambas temporadas fueron los pertenecientes a los cenotes E10 Y E22 con 0.60 ± 0.086 nmol/mg y 0.58 ± 0.25 nmol/mg respectivamente en periodo de secas y 1.065 ± 0.41 nmol/mg y 0.96 ± 0.45 nmol/mg respectivamente en periodo de lluvias, el cenote E10 en temporada de lluvias mostró diferencia significativa con el grupo control sin embargo el cenote E13 contiene los valores mínimos de lípidos peroxidados (Figura 54).

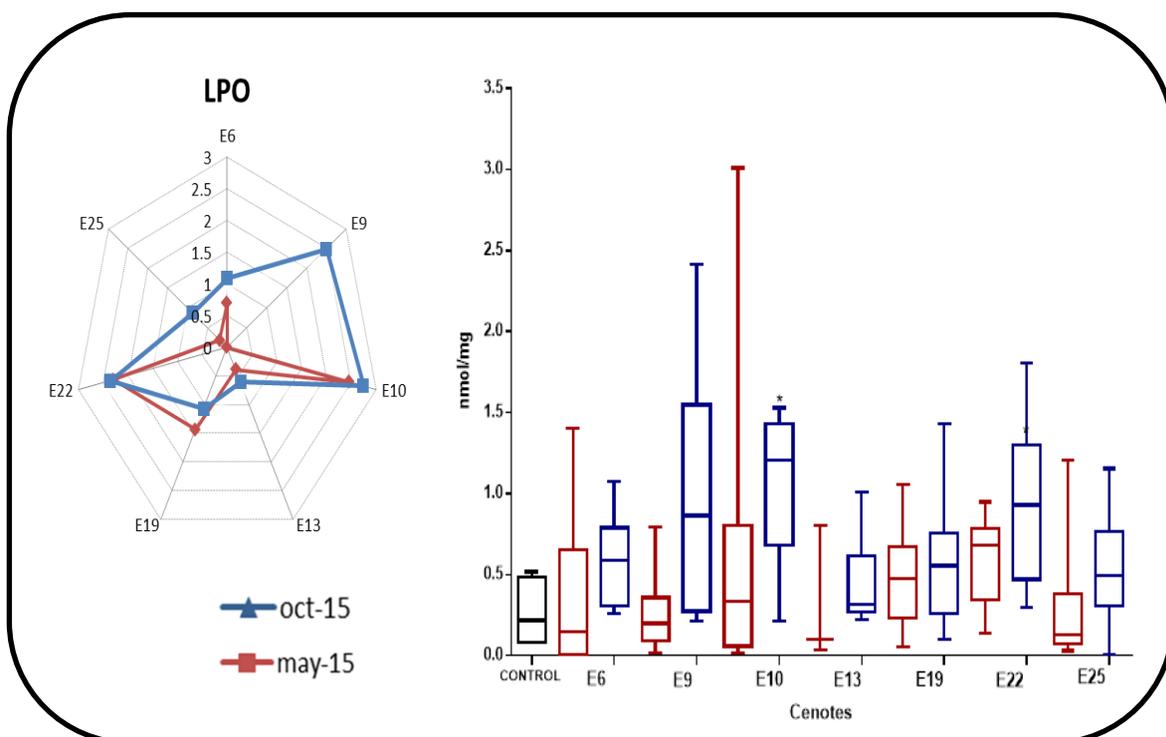


Figura 54. Variación espacio temporal de Lípidos Peroxidados (nmol/mg) en *G. yucatana*, en un ciclo anual (2015). Gráfico de estrella para GT, por sitio y temporada (resultado de IBR) Intervalos de confianza del 95%. Existe diferencia significativa entre cenotes ($P < 0.05$). * respecto al control.

6.5 Inhibición de AChE.

En este estudio la actividad enzimática de acetilcolinesterasa presentó una actividad promedio de $187.25 \pm 58.3 \text{ nmol/min.mg}$ para el grupo control, se puede observar en la Figura 55 que las gambusias del cenote E9 presentaron diferencia significativa temporal y respecto al grupo control siendo el sitio que tubo mayor actividad de AChE ($364.26 \pm 32.45 \text{ nmol/min.mg}$) en temporada de secas.

Aunque los demás sitios no presentaron una diferencia significativa temporal, se puede observar una tendencia en la temporada de lluvias los sitios tienden a presentar una mayor inhibición de AChE; los sitios con mayor inhibición enzimática de AChE en ambas temporadas fueron el cenote E6 ($102.71 \pm 72.47 \text{ nmol/min.mg}$), y el cenote E10 ($179.95 \pm 42.56 \text{ nmol/min.mg}$)

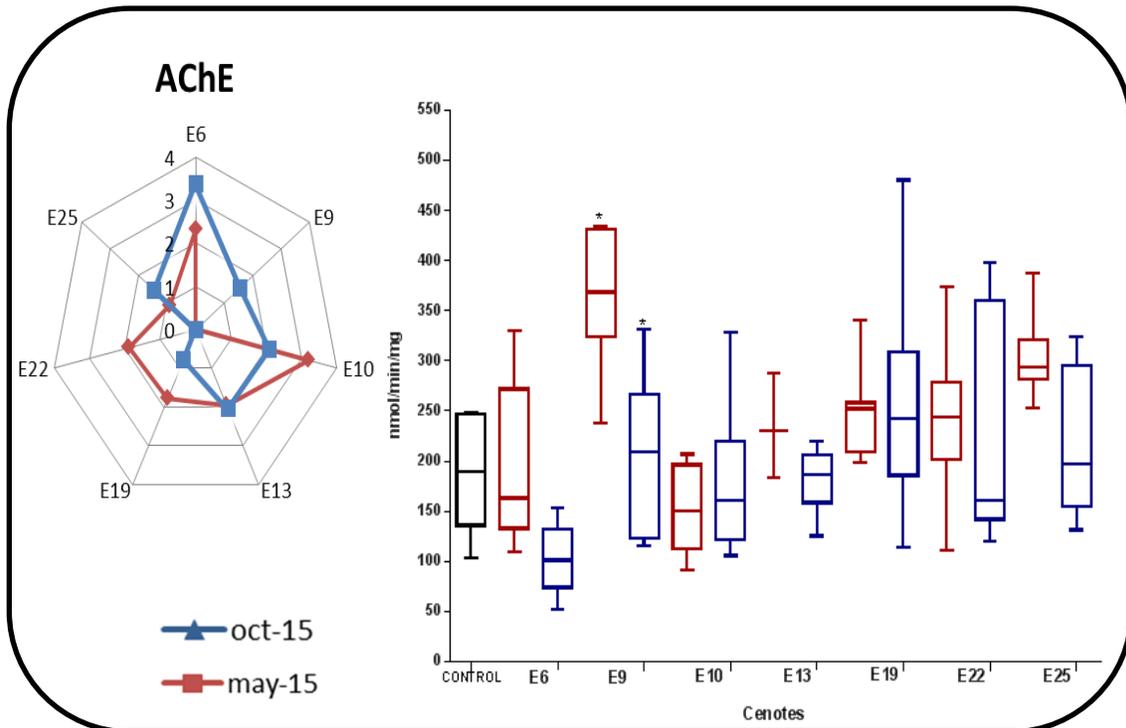


Figura 55. Variación espacio temporal de la actividad promedio de la enzima acetilcolinesterasa (nmol/min/mg) en *G. yucatan*, en un ciclo anual (2015). Gráfico de estrella para AChE, por sitio y temporada (AChE invertida para reflejar sitios con mayor inhibición resultado de IBR) Intervalos de confianza del 95%. Existe diferencia significativa entre cenotes ($P < 0.05$). * respecto al control

7. Análisis de Resultados .

7.1. IBR (Respuesta integrada de biomarcadores)

Con el objeto de sintetizar e integrar la información obtenida de las respuestas de los distintos biomarcadores utilizados, se aplicó un índice de respuesta integrada (IBR, de las siglas en inglés *Integrated Biomarker Response*), así mismo, se utilizaron gráficos de estrella como una herramienta que permite representar y visualizar las respuestas de los biomarcadores en cada cenote.

Según lo propuesto por Beliaeff y Burgeot (2002) la IBR puede estar asociada con un gráfico de estrella o de radar que muestra las respuestas específicas de biomarcadores en cada sitio analizado.

De manera general se puede decir que en temporada de secas en todos los sitios hay una inhibición de la AChE y un aumento en la actividad de GST. Solo para el caso de los cenotes E10 y E22 un aumento en la cantidad de lípidos peroxidados, en el cenote E13 una notoria disminución en el contenido de glutatión y una sobreexpresión de CYP1A en el cenote E22.

En cambio para temporada de lluvias se observa una mayor expresión de CYP1A en las *Gambusias* de los diferentes cenotes, así mismo la inhibición de la AChE y el aumento en la actividad de GST se mantuvo en esta temporada, lo que sugiere que probablemente en temporada de lluvias los procesos de biotransformación de fase I se estén activando por el transporte de otros contaminantes a los sistemas por las lluvias.

Según el índice de IBR se puede inferir que en el cenote E22 en temporada de secas y el cenote E10 en temporada de lluvias presentan las condiciones más desfavorables en comparación con los demás sitios de estudio ya que se promovió una mayor respuesta integrada de los biomarcadores en músculo de *G. yucatanensis* donde la expresión de CYP1A y la inhibición de AChE presentaron un aporte mayoritario a la respuesta integrada de biomarcadores (Figura 56, 57).

Sin embargo cabe resaltar que las diferentes respuestas en espacio y tiempo podrían estar siendo causadas por las características hidrogeológicas de cada cenote, factores ambientales y/o por la presencia de diversos contaminantes que pudieran encontrarse en estos sitios.

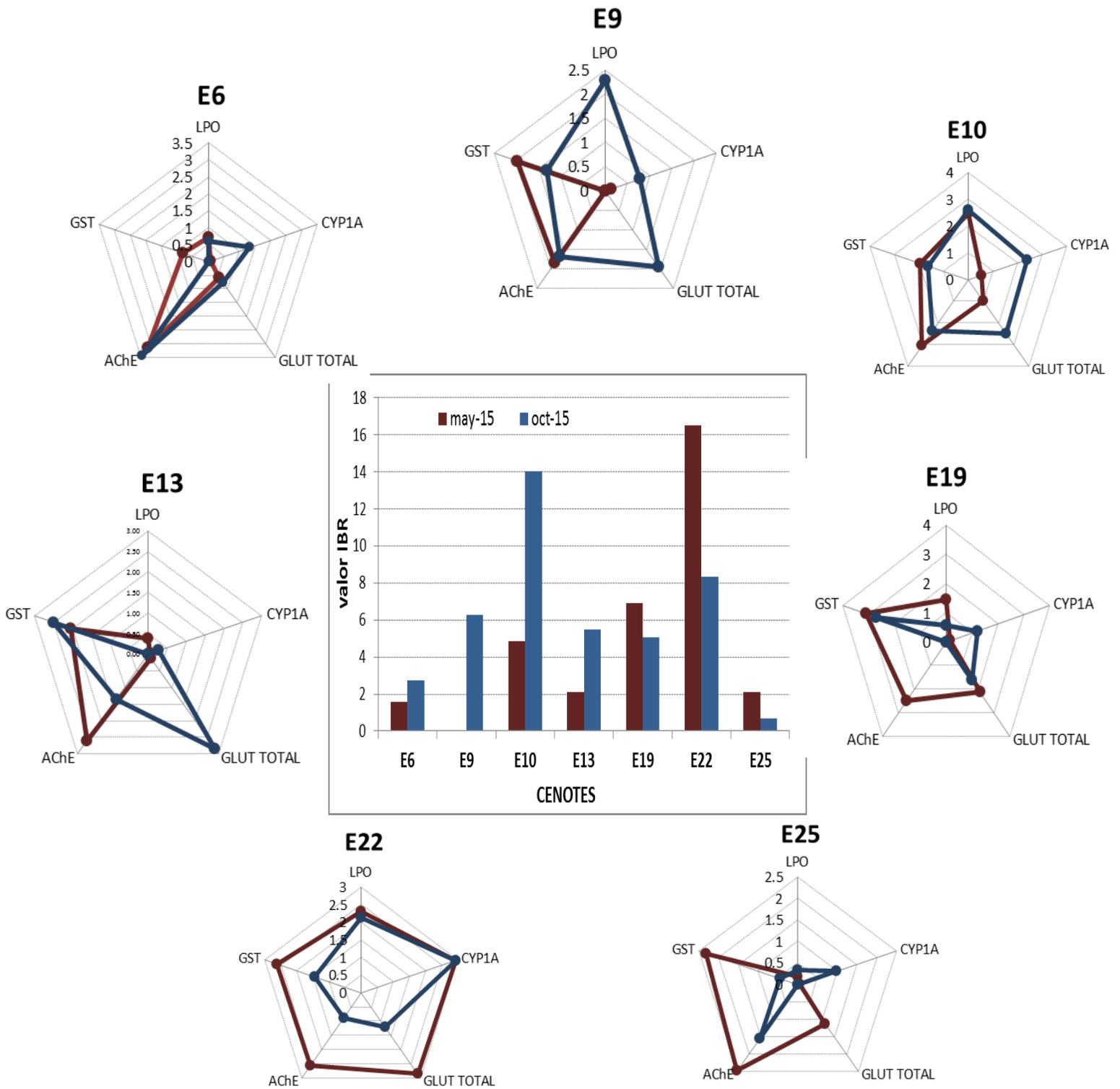


Figura 56. Respuesta Integrada de Biomarcadores (IBR) en un ciclo anual (2015), por sitios de estudio y temporada: secas (May-15) y lluvias (Oct-15). (AChE invertida para reflejar sitios con mayor inhibición)

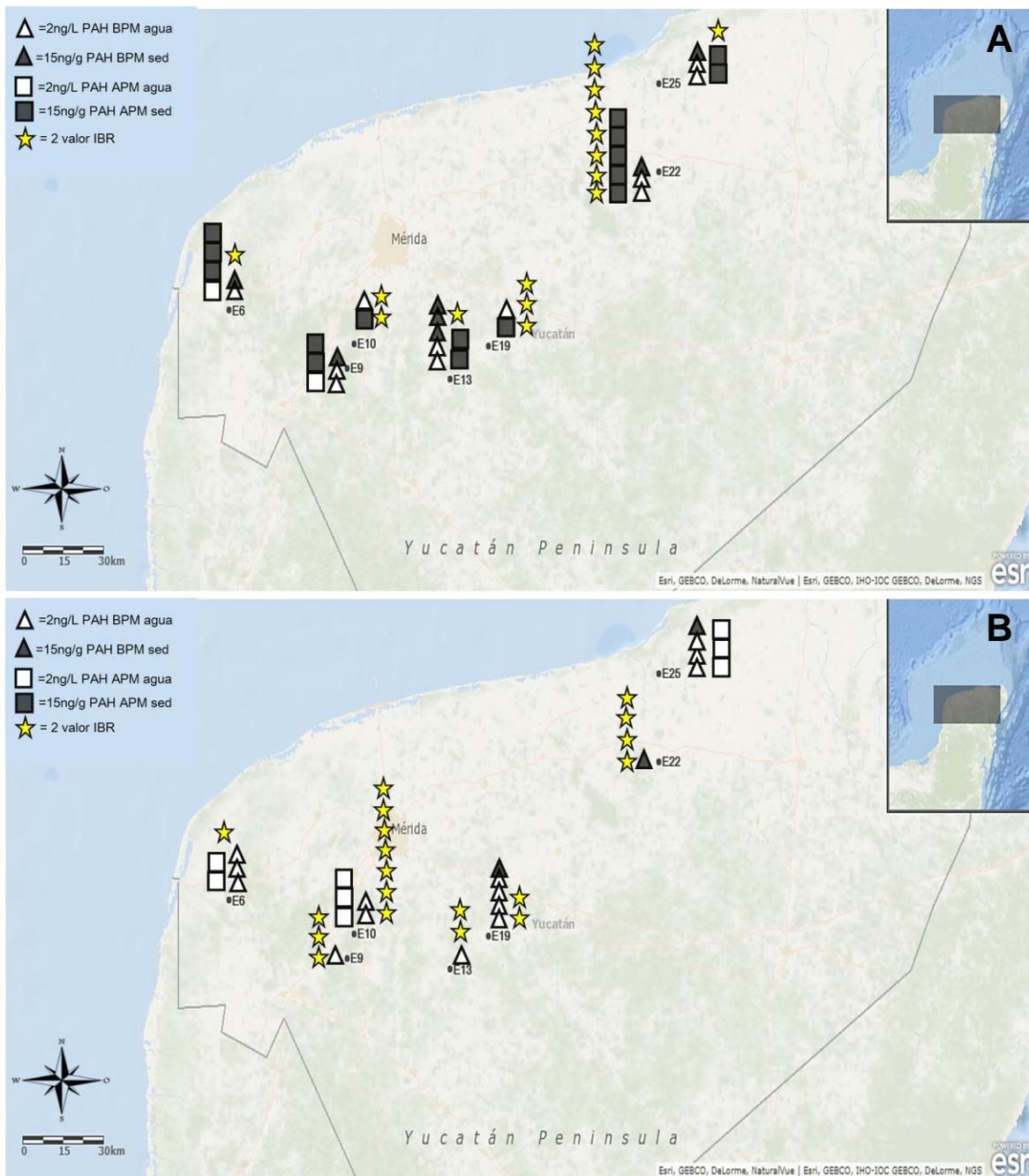


Figura 57. Cenotes con mayor Respuesta Integrada de Biomarcadores (IBR) en la PY (2015), por temporada. A: secas (May-15), B: lluvias (Oct-15).

Sumado a lo anterior se buscaron herramientas estadísticas que pudieran sustentar que el efecto observado en las diferentes respuestas de los biomarcadores esté siendo causado por contaminantes y no por factores ambientales, por lo que el IBR es una herramienta que presenta tendencias pero no es concluyente, así mismo no se puede atribuir de forma directa que estas respuestas estén siendo causadas por las concentraciones de PAHs encontradas.

Con la intención de evaluar cuáles de todos los indicadores analizados podría explicar mejor la situación ecotoxicológica de los cenotes de la PY, se llevó a cabo un análisis multivariado; en particular un Análisis de Componentes Principales (PCA), análisis de Factores, análisis de redundancia (RDA) y análisis de agrupamiento.

Diversos autores han aplicado la misma o similares técnicas estadísticas (Análisis Discriminante, Análisis de Clusters) para analizar la calidad de muestras de aguas superficiales (Por ejemplo: Kazi *et al*; 2009; Cazenave *et al*; 2009; Monferrán *et al*; 2011; entre otros). Se analizaron las respuestas de los biomarcadores, las concentraciones de hidrocarburos aromáticos, el contenido de materia orgánica, porcentajes de granos finos, y variables ambientales durante el año 2015 en cenotes de la PY. Así mismo se analizó la temporalidad. Posteriormente se realizó un análisis de redundancia (RDA), un método que permite estudiar la mayor correlación posible entre variables e interpretar cuales son las variables de mayor peso en la respuesta de los organismos.

Para estudiar la variación espacial y temporal se utilizó un análisis de escalonamiento multidimensional (nMDS por sus siglas en inglés) partiendo de las respuestas de biomarcadores medidos en músculo de *Gambusia yucatanana* (Figura 58). Se tuvo que existe una marcada diferencia temporal en la respuesta de biomarcadores, donde la temporada de secas tiene una mayor variación en cuanto a la respuesta espacial. La variación se explica por la respuesta encontrada en los biomarcadores CYP1A, LPO y AChE, principalmente dado por los cenotes E10 y E22. (Figura 58; Anexo XV).

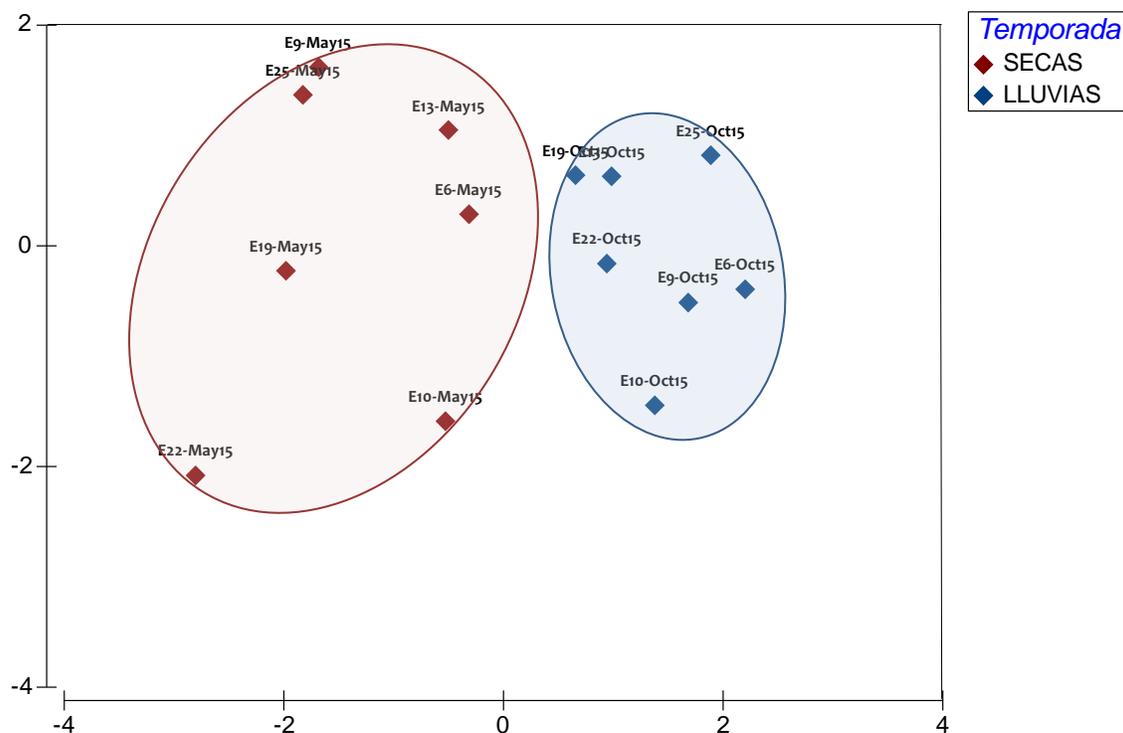


Figura 58. Diagrama de ordenación obtenido por el método nMDS (non metric Multi-dimensional Scaling) de los 7 cenotes muestreados en la PY en función de la respuesta de biomarcadores en músculo de *G. yucatanana*.

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA), por temporada y por sistema refiriéndose a agua y sedimento, con el fin de explorar las variables estudiadas y visualizar cuales aportan una mayor variación.

En la Figura 59 (A, B), se representó el análisis para sedimento, donde, en la temporada de secas (Figura 59A) el 66% de la variación se explica por la expresión de CYP1A, contenido de LPO y glutatión, principalmente por los cenotes E19 y E22; mientras en lluvias (Figura 59B) el 66.3% de la variación se explica por la actividad enzimática de GST y AChE en los cenotes E10 y E19.

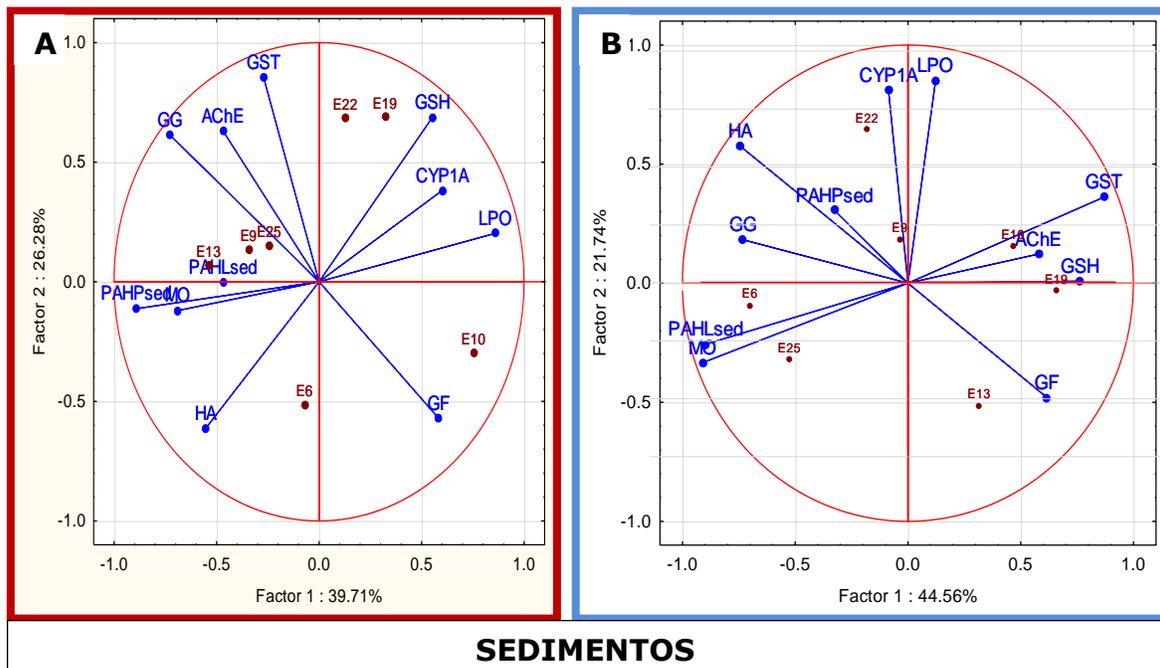
Así mismo se observó que en ambas temporadas existió una asociación entre materia orgánica (MO) con PAHs y por otro lado, una asociación entre los biomarcadores AChE, GST y Glutatión.

En la Figura 59 (C, D), se representó el análisis para agua, donde en la temporada de secas (Figura 59C) el 62.18% de la variación se explica por la concentración de PAHs de bajo peso molecular, los sólidos disueltos totales, el contenido de oxígeno disuelto (OD) medidas en la superficie de agua de los cenotes E6, E25 y por los PAHs de alto peso molecular y el contenido de glutatión en los cenotes E22 y E25.

Mientras en lluvias (Figura 59D) el 61% de la variación se explica por la actividad enzimática de GST, AChE, el contenido de oxígeno disuelto (OD) y el potencial redox (ORP) en los cenotes E10, E13 y E19.

Así mismo se observó que en ambas temporadas existió una asociación entre pH y temperatura (T) y que la mayor expresión de CYP1A esta en el cenote E22.

Por otro lado los biomarcadores AChE, GST, Glutatión y CYP1A muestran una asociación con PAHs y los biomarcadores AChE, GST, LPO con el contenido de OD y ORP.



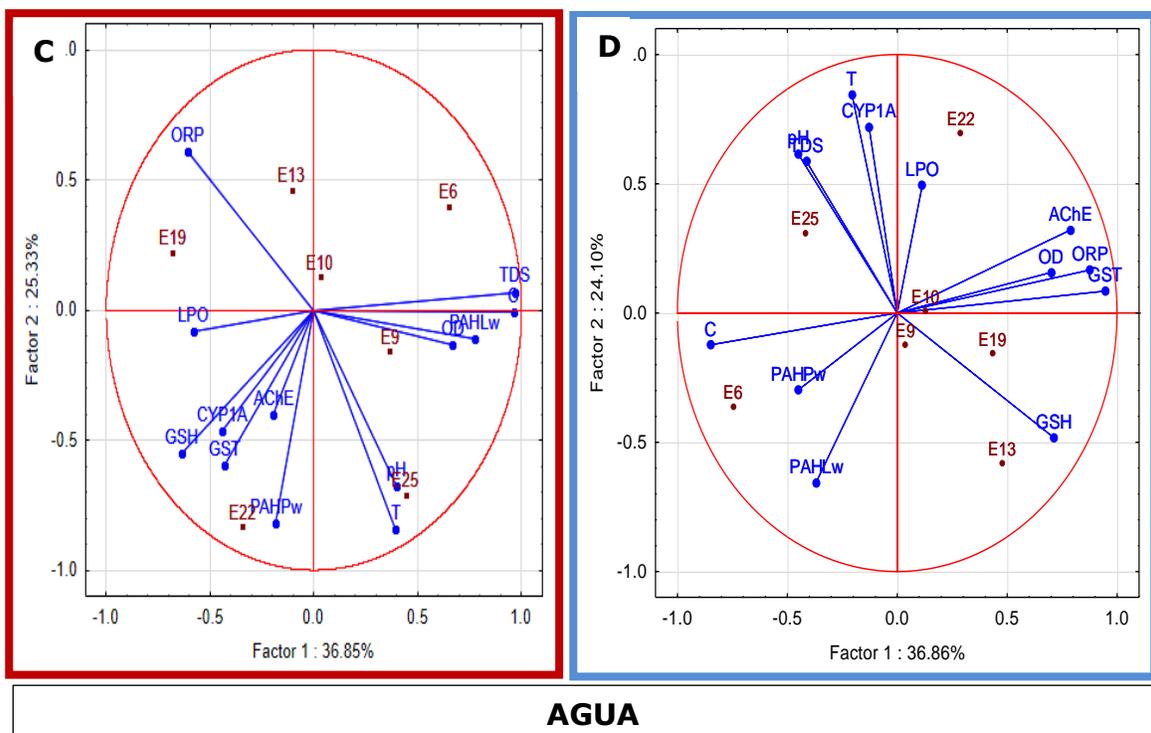


Figura 59. Análisis de componentes principales para ambas temporadas y por sistema: Sedimento A:secas , B: lluvias y Agua C: secas , D: lluvias. PAHLsed= Hidrocarburos Aromáticos Ligeros en sedimentos, PAHPsed= Hidrocarburos Aromáticos pesados en sedimentos, HA=Hidrocarburos Alifáticos totales, MO: Materia orgánica, GG: arenas gruesas, GF: arenas finas, AChE: acetilcolinesterasa, GST: glutatión-S-transferasa, GSH: glutatión total, CYP1A: citocromo p450 1A, LPO: lípidos peroxidados. PAHLw=Hidrocarburos Aromáticos ligeros en agua, PAHPw= Hidrocarburos Aromáticos pesados en agua, T: Temperatura, C: Conductividad, pH, TDS: sólidos disueltos totales, OD: oxígeno disuelto, ORP: potencial oxido-reducción.

Con el fin de conocer cuales variables ambientales o si los PAHs influyen más en la respuesta biológica observada en el músculo de las *Gambisuas*, de acuerdo a lo encontrado en la respuesta de biomarcadores utilizados en este estudio, se realizó un análisis de redundancia (RDA), el cual mostró una segregación de los sitios de estudio, las variables ambientales más representativas y las respuestas de los biomarcadores como se presenta a continuación:

7.2 Relación de variables ambientales, PAHs y respuestas bioquímicas en músculo de *Gambusia yucatanana*.

El Análisis de Redundancia (RDA) mostró una separación de los sitios de estudio por temporada del año, las variables ambientales más representativas y las respuestas de los biomarcadores, alcanzando un 73.85% de la varianza explicada. Los sitios de estudio se agruparon de acuerdo a sus características fisicoquímicas anteriormente descritas como grupo A (zona central del anillo de cenotes) y grupo B (cercanos a la costa) en ambas temporadas.

En el cuadrante del extremo derecho de la Figura 60 (ANEXO XVI), los cenotes E22, E13, E10 (grupo A) de la temporada de secas se relacionan con la mayor concentración de hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular en sedimento (HBMPs), los cuales se relacionan positivamente con la expresión de CYP1A. Los PAHs asociados a la materia orgánica en sedimentos no mostraron relación con la expresión de CYP1A.

Se mostró una relación entre PAHs con el contenido de glutatión y la actividad de GST en la cual, conforme aumentaron las concentraciones de PAHs disminuyó el contenido de glutatión total y aumentó la actividad de GST. Por otro lado en este mismo cuadrante se observó la asociación entre TDS (sólidos disueltos totales) con M.O. (materia orgánica), con HAPMa (Hidrocarburos aromáticos de alto peso molecular en agua), con la conductividad y el pH. Mientras tanto, el grupo A (E19, E13, E10) en la temporada de lluvias presentó una mayor relación con la concentración de hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular en agua (HBPMa) y el potencial oxido-reducción (ORP).

En el cuadrante superior izquierdo se encuentran los sitios que pertenecen al grupo B (E25, E22, E9, E6) de la temporada de lluvias donde se encontró una mayor relación con la cantidad de lípidos peroxidados (LPO) y el ORP.

En el cuadrante inferior derecho los sitios que pertenecen al grupo A (E22, E19, E10) en la temporada de secas están mayormente relacionados con el oxígeno disuelto (OD), el cual está positivamente relacionado con la actividad de la Acetilcolinesterasa (AChE) y con glutatión S transferasa (GST).

Con el análisis RDA se logró determinar que para este estudio, los hidrocarburos de bajo peso molecular encontrados en sedimento (HBMPs) y el oxígeno disuelto (OD) aportan casi el 50% de la variación encontrada en la respuesta de los biomarcadores medidos en músculo de *Gambusia yucatanana* (Anexo XVII); especialmente por que los hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular se ven correlacionados significativamente con CYP1A (0.69), GST (0.687) y GSH (0.67) indicando la eliminación de estos compuestos por los mecanismos de biotransformación de fase I; el OD por su parte presentó una correlación positiva con GST (0.687), AChE (0.56) y correlación inversa con LPO (0.6)

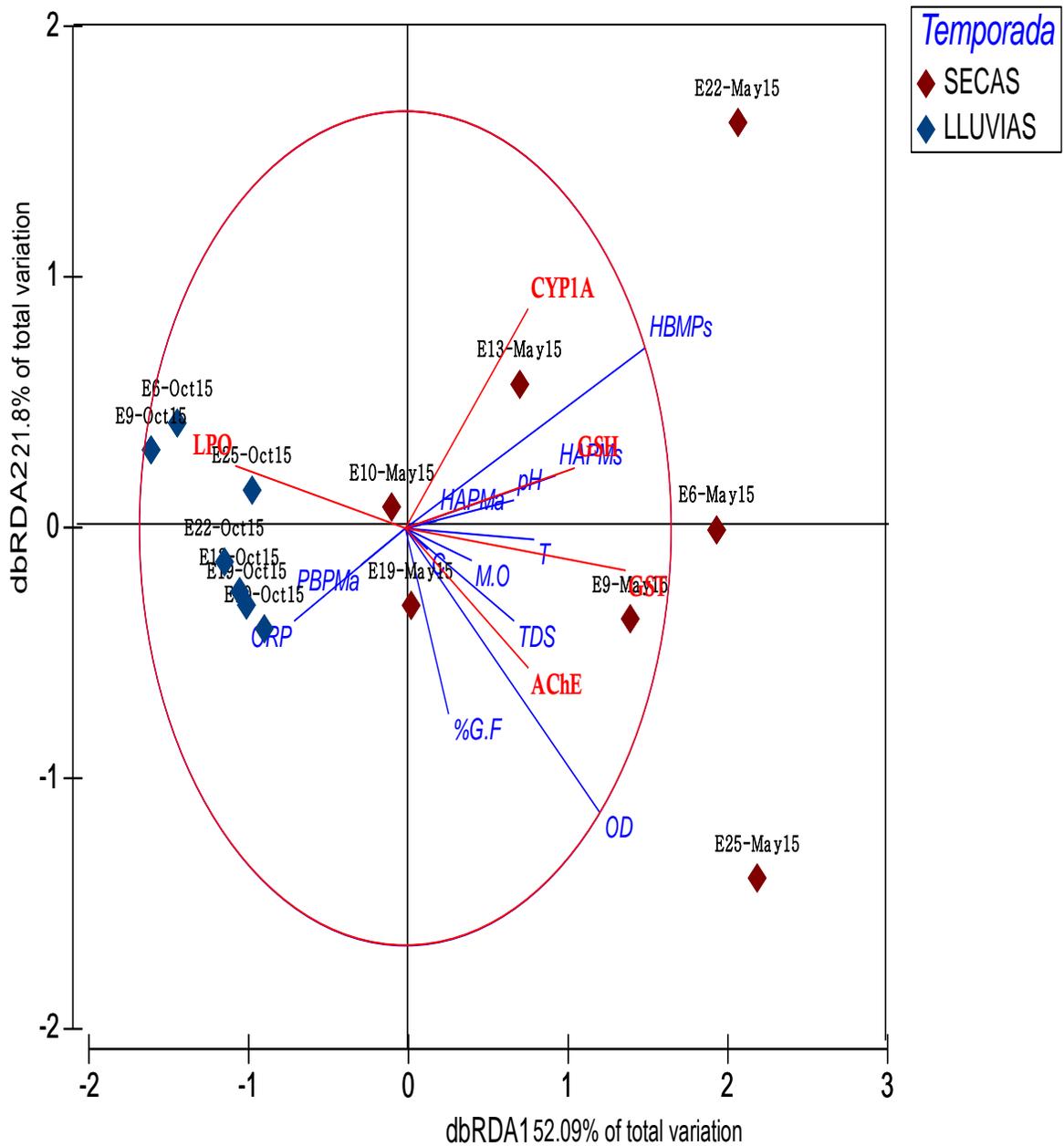


Figura 60. Análisis de redundancia 2 temporadas de un ciclo anual, sitios de estudio (2015). HBMPs= Hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular en sedimento, HAPMs= Hidrocarburos aromáticos de alto peso molecular en sedimento, HBPMa= Hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular en agua, HAPMa= Hidrocarburos aromáticos de alto peso molecular en agua, M.O= Materia orgánica, T= temperatura, C= conductividad, TDS= sólidos disueltos totales, OD=Oxígeno disuelto, ORP= potencial redox, %GF= porcentaje de granos finos. AChE: acetilcolinesterasa, GST: glutatión-S-trasnsferasa, GSH: glutatión total, CYP1A: citocromo p450 1A, LPO: lípidos peroxidados.

7.3 Dendrogramas de similitud

Se realizaron dendrogramas de similitud de los cenotes muestreados de acuerdo a la respuesta encontrada en los biomarcadores y su relación con la concentración de PAHs y variables ambientales, con la finalidad de visualizar aquellos sitios que son mayormente afectados. Las variables consideradas fueron seleccionadas con base a los análisis anteriormente descritos, es decir, se tomaron solo las variables que mayormente mostraron una influencia en la respuesta de biomarcadores en cada temporada.

Se logró agrupar a los cenotes de acuerdo a su similitud en la respuesta de biomarcadores (método Ward con correlaciones de Pearson). Existe una diferencia temporal en el agrupamiento de cenotes, se formaron 2 grupos principales de cenotes en cada temporada, como resultado del agrupamiento según la respuesta en conjunto de biomarcadores medidos en músculo de *G.yucatanana*, dichos grupos se conformaron por la mayor o menor respuesta en la integración de sus biomarcadores (Figura 61).

En el caso de la temporada de secas (Figura 61A) se tomaron en cuenta las variables ambientales (PHAs totales, materia orgánica, TDS, OD, C, T) y biomarcadores (CYP1A, GST, LPO, Glutathion y AChE), se evidencio la similitud de los cenotes E22, E19 y E10 debido a la existencia de la relación entre la respuesta de biomarcadores con concentración de PAHs, ya que el primer grupo (G1) representó a los cenotes que contienen una mayor respuesta en sus biomarcadores principalmente por mayor expresión de CYP1A, mayor contenido de glutatión total y mayor inhibición de AChE, coincidiendo con lo encontrado en el valor numérico de la IBR, el otro grupo (G2), se integró por dos subgrupos que presentaron una menor respuesta integrada en sus biomarcadores, donde, los cenotes E25 y E13 son similares por presentar altas concentraciones de hidrocarburos de BPM así como inhibición de AChE, menor contenido de glutatión total, y aumento en la actividad de GST; para los cenotes E9 y E6 donde se presenta la mayor inhibición de AChE, altas concentraciones de hidrocarburos de APM y TDS.

Los grupos de cenotes formados en lluvias difieren de los de secas, debido a las variables ambientales (OD, ORP, M.O y PAHs totales) y por la respuesta de biomarcadores (CYP1A, GST, LPO, Glutathion y AChE). La Figura 61B mostró la formación de grupos de cenotes similares en la respuesta de biomarcadores y concentración alta de PAHs; el cenote E22 es significativamente diferente del resto probablemente relacionado con que presenta una mayor integración en la respuesta de sus biomarcadores (>CYP1A, >LPO y <Glutathion total) con hidrocarburos de BPM. El grupo 1 formado por el cenote E19 y E10 presentan en forma general una mayor expresión de CYP1A y una mayor actividad de GST con concentraciones altas de PAHs, una menor inhibición de la AChE.

El grupo 2 donde se presenta una relación menor entre hidrocarburos y biomarcadores esta integrado por 2 subgrupos, en el A se presentan el cenote E13 y E9, con una baja concentración de PAHs totales y mayor contenido de glutatión total en esta temporada. El subgrupo B, lo conformaron los cenotes E25 Y E6 los

cuales registraron alta concentración de PAHs relacionados a la presencia de M.O y TDS. Ambos cenotes registraron una marcada inhibición de la AChE, así mismo los dos se ubican cerca de la zona de descarga de la PY lo que los hace más vulnerables a presentar diversidad de compuestos contaminantes.

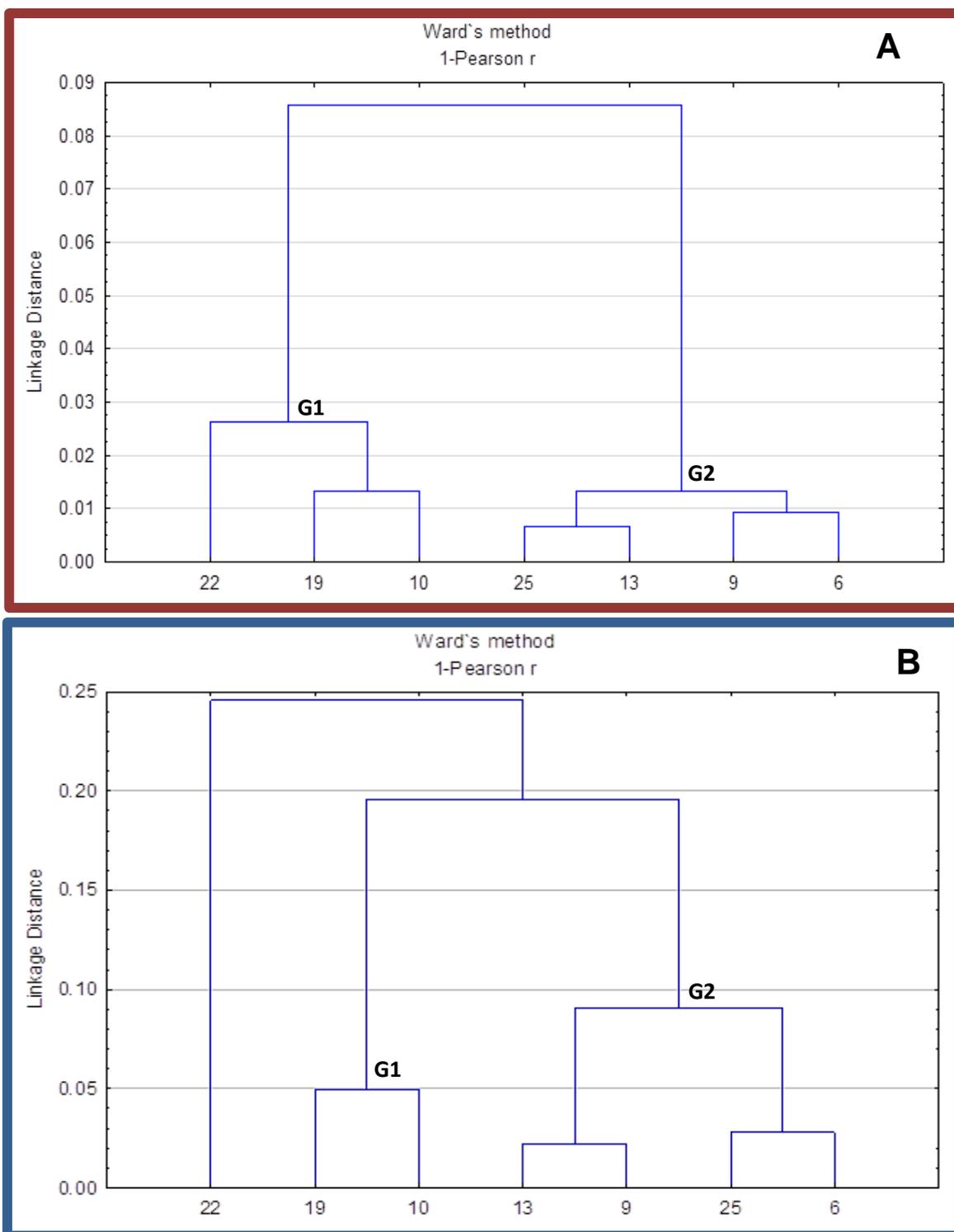


Figura 61. Dendrograma de similitud entre cenotes de la PY según la relación entre biomarcadores, hidrocarburos y variables ambientales. A: SECAS, B: LLUVIAS.

X. DISCUSIÓN

Para el muestreo correspondiente al periodo de secas (mayo 2015) la península de Yucatán presentó un promedio de 35.7 mm de precipitación; y para el periodo de lluvias (octubre 2015) 100.4 mm (CONAGUA, 2015), este cambio estacional, las características topográficas y la ubicación de los cenotes, hace que los cenotes estudiados presenten variaciones espaciales de múltiples variables ambientales, tales como salinidad, temperatura, porcentaje de oxígeno disuelto, pH, potencial oxido reducción, sólidos disueltos totales y materia orgánica. Estas características clasifican a los cenotes estudiados en dos grupos los primeros cercanos a la costa y los segundos aquellos que pertenecen a la parte central del conocido “anillo de cenotes”. Donde los primeros presentan valores altos de temperatura, conductividad, pH, menor potencial redox y una concentración de oxígeno disuelto constante (sin variación temporal), y los segundos contienen a los cenotes con menor conductividad, mayor potencial oxido reducción y a los sitios con variación temporal en la concentración de oxígeno disuelto.

De manera general los cenotes estudiados presentan un valor de temperatura de $28.5^{\circ}\text{C} \pm 1.03^{\circ}\text{C}$, pH de 7.4 ± 0.42 , valores que coinciden con lo reportado por Ceballos, 2012 que registró un promedio anual de pH para el anillo de cenotes de 7.15 ± 0.78 y una temperatura de 28°C del mismo modo se encuentra dentro del intervalo de pH 6.7 a 8 que reportó Schmitter y colaboradores; (2002). Los valores de pH pueden estar influenciados por diversos factores como la capacidad amortiguadora del sistema de alcalinidad carbonato-bicarbonato, la intensidad de procesos biológicos tales como la fotosíntesis, respiración y descomposición de materia orgánica, estos procesos traen consigo un aumento de pH, turbidez, concentración de oxígeno disuelto en la superficie y condiciones anóxicas y ácidas en el fondo (Schmitter *et al*; 2002).

Las aguas dulces pueden ser definidas como agua con menos de 500 ppm de sales disueltas, los cenotes son cuerpos de agua dulce, no obstante, es conveniente aclarar que hay una variación de un cuerpo de agua dulce a otro, como resultado de diferencias en condiciones de geografía, topografía, actividad biológica etc. El desgaste o mineralización de rocas son fuentes de iones para los cenotes y cuerpos de agua dulce en general; lo que influye en la capacidad de conducir electricidad, cuanto mayor sea la cantidad de iones disueltos mayor será la conductividad. El agua dulce suele tener entre 30 y 40 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (aunque en aguas muy calizas puede alcanzar entre 1000 y 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, en aguas subterráneas entre 30-1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (Appelo; 2005), para el caso de este estudio se encuentra un valor de conductividad de $1915.4 \pm 505\mu\text{S}/\text{cm}$ y de sales disueltas (TDS) de $1157.7 \pm 290\text{mg}/\text{L}$; Herrera y colaboradores (2000) reportan un valor promedio de conductividad para cenotes de $1645 \pm 150\mu\text{S}/\text{cm}$ y de TDS $<3000\text{mg}/\text{L}$, coincidiendo con lo reportado en este proyecto. Por otro lado se encuentra que en la época de lluvias se afecta este parámetro fisicoquímico, por lo que se puede inferir que existe un mayor aporte de iones por arrastre en lluvia, en el caso del cenote E6 presento mayor cantidad de TDS en secas atribuyendo este efecto a que en esta temporada está precipitándose

material transportado por lluvias anteriores o de forma aérea, en contraste en la temporada de lluvias existe un menor aporte de TDS debido a la entrada reciente de agua proveniente de lluvia o por escorrentías. Los sólidos disueltos del agua de los cenotes se concentran por evapotranspiración y, en forma conjunta con la disolución de sales presentes en el suelo incrementan el contenido de TDS, el incremento de éstos permite explicar al menos en parte la disminución de algunos parámetros relacionados, como el pH el cual disminuye.

Con respecto al oxígeno disuelto se tiene un promedio de $4.46 \pm 0.3\text{mg/L}$, el cual proviene del oxígeno en el aire que se ha disuelto en el agua, sin embargo también es resultado de la fotosíntesis de las plantas acuáticas, algunos factores pueden influir en su concentración, por ejemplo, las sales disueltas en agua reducen los espacios intermoleculares disponibles para la disolución del oxígeno provocando una disminución de oxígeno disuelto; del mismo modo, la concentración de oxígeno disminuye con la altitud, ya que la presión parcial de oxígeno es afectada por cambios en la presión atmosférica. Los cambios estacionales pueden generar alteraciones en la temperatura de los cuerpos de agua que a su vez tendrán un efecto sobre los niveles de oxígeno disuelto; un aumento en la temperatura del agua trae como consecuencia una disminución en los niveles de oxígeno disuelto. Es conveniente aclarar que dicha relación puede ser alterada por los procesos de fotosíntesis y respiración (Jimenez; 2001).

El agua de los cenotes suele estar subsaturada (<50% de oxígeno disuelto), es decir con un déficit de oxígeno; este hecho se asocia con los procesos de oxidación biológica y química, e incluso se han llegado a medir concentraciones hipóxicas (<1mg/L) en el agua subterránea que descarga hacia y en las lagunas costeras de Yucatán (Herrera, 2000). En los cenotes E6, E9 y E25 se presenta una menor concentración de oxígeno disuelto en temporada de lluvias. Esto puede explicarse con relación a la degradación aerobia de la materia orgánica, ya que el oxígeno es utilizado para este proceso disminuyendo así su concentración, aunque este proceso también va depender de las características topográficas de los cenotes, es decir algunos cenotes son abiertos por lo tanto en estos al estar expuestos a mayor cantidad de luz propician un aumento en fotosíntesis de las plantas acuáticas tal es el caso de E6, E22 Y E25, clasificados como cenotes abiertos. El caso contrario ocurre para aquellos cenotes cavernosos o cerrados como es en el caso de E13 y E19, en donde encontramos menores cantidades de oxígeno disuelto y poca variación en el mismo.

De esta manera el contenido de oxígeno disuelto presente en los cenotes puede influir en reacciones de oxidación y reducción, estas reacciones regulan el comportamiento de muchos compuestos químicos presentes en cuerpos de agua, así como, elementos esenciales para los sistemas biológicos pudiendo afectar la distribución y la actividad metabólica de los microorganismos. El ORP obtenido demuestra que en ambas temporadas se favorecen reacciones de oxidación, pero es en la temporada de lluvias donde se observa una tendencia a aumentar los

procesos de oxidación, en el caso particular de los cenotes E13 y E19 registraron mayor potencial redox y una menor cantidad de oxígeno disuelto a causa de su topografía, al ser cenotes cerrados, tienen una menor entrada de luz que provoca una disminución en la fotosíntesis de plantas acuáticas, sumado a esto, el aporte de materia orgánica por escorrentías provocan una disminución de OD por la degradación aerobia de ésta. En el proceso, el agua adquiere CO₂ del suelo y de la oxidación de la materia orgánica disuelta y particulada, así como de la oxidación química de algunos minerales. Todos estos procesos tienden a disminuir la concentración de oxígeno disuelto e incrementar la acidez, la cual es neutralizada por la disolución de la roca caliza.

Los sedimentos constituyen una parte fundamental para conocer el grado de contaminación en cuerpos de agua como los cenotes, algunos contaminantes como los PAHs poseen una alta afinidad a la materia particulada, debido a la naturaleza hidrofóbica de estos compuestos, de esta manera los sedimentos se comportan como aceptores finales de diversos contaminantes que pueden actuar como fuentes secundarias de contaminación (Burton, 2002)

Hay que considerar que de acuerdo a lo citado por Valette (1993), los sedimentos de grano fino ($\leq 100\mu\text{m}$) tienen una gran capacidad de adsorción para la materia orgánica como para los contaminantes, los sedimentos de los cenotes estudiados muestran mayor cantidad de grano fino y en cuanto a materia orgánica, el mayor porcentaje se encuentra en el sedimento de los cenotes ubicados en los extremos de la península (E6 y E25) con materia orgánica arriba del 15%, por lo cual se consideran sedimentos muy ricos en humus. Ambos cenotes se encuentran ubicados cerca de la costa lo que los hace más vulnerables a la descargas de aguas residuales, lo que podría ocasionar que se registren altos porcentajes de materia orgánica en estas zonas. Valores similares reporta Mendo Pascual (2014) en su estudio de "Alternativa de biorremediación con bacterias autóctonas de sedimento contaminado de la Laguna de Tamiahua, quien en el análisis de materia orgánica de las muestras, considera sedimentos ricos en humus a aquellos por arriba de 12% y a su vez, relaciona este valor con la presencia de contaminantes de petróleo.

La concentración de materia orgánica en sedimentos depende de diversas variables, entre ellas está el carácter léntico o lóxico del cenote, así como en el tamaño de la abertura del cenote, ya que mucha materia orgánica puede entrar en él por arrastre ocasionado en lluvias. Otra variable importante es la exposición a la luz, pues determina los procesos de fotosíntesis importantes en la formación de materia orgánica. Entre otros factores que intervienen en el contenido de materia orgánica están el tipo de vegetación circundante, la textura de los sedimentos, sedimentos arcillosos se caracterizan por una mayor retención de nutrientes que favorece el aumento de su contenido (Ceballos; 2011); se observa que para el caso del cenote E25 tiene gran aporte de materia orgánica por arrastre en la temporada de lluvias. Para el caso especial del cenote E13 la cantidad de materia orgánica encontrada podría estar relacionada con su ubicación dentro de una zona agrícola según la distribución agrícola del estado de Yucatán (Pacheco; 2004) y por ello,

contiene un mayor porcentaje de materia orgánica en comparación con los otros cenotes ubicados en el centro del anillo de cenotes (E9, E10, E19).

Los sedimentos de los cenotes registran concentraciones aproximadas a los 100ng/g de PAHs. (Cenote E22); estos valores se encuentran por debajo de los valores establecidos por la NOAA (4000ng/g) (Buchman, 1999) y por los niveles guía de Canadá (CCME, 2001), en los que describen los niveles de PAHs en los que problemamente un organismo puede presentar algún efecto (PEL). Sin embargo, los cenotes E6 y E25 en temporada de secas presentan concentraciones de B(a) Pireno (31.9ng/g) por arriba de PEL, dicho compuesto es considerado de riesgo ambiental (Botello *et al*; 1998).

Lo mismo ocurre en el sitio E13 que tiene niveles de fenantreno por arriba del nivel guía (41.9ng/g) también en temporada de secas Otros estudios realizados en la península de Yucatán (Progreso y Chelem) reportan concentraciones por arriba de 10 µg/g en sedimentos (Valenzuela, 2005), a diferencia de los cenotes, estos sitios son cuerpos de agua costeros, presentan asentamientos urbanos, actividad marítima, industrial, pesquera y turística, de tal manera que el aporte por PAHs en mayor medida es antropogénico.

Gauss y Hamdy (1991) apuntaron que la predominancia de compuestos de alto peso molecular es indicadora de productos relacionados con la combustión. El fluoranteno y pireno son característicos de muestras originadas por la combustión incompleta de hidrocarburos (Botello, 1996); y el benzo(a) pireno está relacionado con la quema de carbón y madera, y ha sido utilizado como marcador de descargas industriales en sedimentos (Mather y Aislabe, 1992); como se mencionó anteriormente, el benzo(a) pireno presentó concentraciones altas en los cenotes E22 Y E6 en temporada de secas. Además, la predominancia de PAHs de alto peso molecular en sedimentos, también puede deberse a su mayor persistencia (Witt, 1995), los de mayor número de anillos, pues estos compuestos persisten por más tiempo en el ambiente por su lenta degradación mientras que los de bajo peso molecular generalmente se asocian con entradas recientes de combustibles (Gerritse *et a*; 1995). Por lo que en el caso de los sitios muestreados el aumento en PAHs de BPM en lluvias se debe principalmente por entradas recientes de PAHs ocasionadas por el arrastre de estos compuestos durante esta época.

En estudios de hidrocarburos alifáticos en sedimento principalmente se utiliza para discernir entre un autóctono o alóctono, actualmente se conoce que las concentraciones de hidrocarburos biogénicos son más pequeñas con relación a concentraciones de muestras contaminadas y a modo de comparación, los niveles promedio de hidrocarburos biogénicos en sedimentos costeros tienen aproximadamente de 5 a 10 µg/g (UNEP, 1992; Volkman *et al*. 1992), en sitios de derrames de petróleo los niveles de hidrocarburos del petróleo exceden las

3000µg/g, y por último, en los sedimentos de puertos urbanos-industriales las concentraciones de hidrocarburos del petróleo fluctúan de 10 hasta 1000µg/g en peso seco (UNEP, 1992); sin embargo, Volkman et al. (1992) restringen a 500µg/g de hidrocarburos para establecer sedimentos con contaminación significativa, con base a lo anterior para los cenotes de la PY no se sugiere una contaminación significativa por este tipo de hidrocarburos puesto se registraron concentraciones por debajo de 100 µg/g.

Los PAHs debido a sus propiedades químicas son de naturaleza hidrófoba, por lo que se esperaban encontrar concentraciones menores de PAH en agua que en sedimento; para este estudio se encontraron niveles de PAHs totales en agua de 4.28ng/L (cenote E10) a 7.64ng/L (cenote E9) para la temporada de secas y concentraciones de 1.24ng/L (cenote E22) a 12.07ng/L (cenote E10) en la temporada de lluvias, los cuales se encuentran por debajo de los valores de referencia de la NOAA para PAHs en agua (NOAA, Buchman, 1999); sin embargo, se encontraron concentraciones por encima del valor reportado por la OMS (aguas subterráneas sin contaminar suelen oscilar entre 0.1 y 5ng/L) en los cenotes E9, E22 y E25 en secas y E6, E10, E19 y E25 en lluvias, considerándolas como aguas contaminadas.

El mayor aporte a la concentración de PAHs en agua fue por fenantreno en ambas temporadas, conducta similar observada en la concentración de PAHs medida en sedimentos, el fenantreno es uno de los PAHs más comunes en el ambiente (Shimada *et al*; 2004; Nizetto *et al*; 2008), clasificado por la US Environmental Protection Agency (EPA) como un contaminante prioritario que contribuye con más del 49 % del total de PAHs en el ambiente, y considerado junto con el fluoranteno y pireno, como los principales hidrocarburos contaminantes atmosféricos (Orliski, 2002; Shimada *et al*; 2004).

En el sedimento, la adsorción de PAHs probablemente está influenciada por el tamaño de las partículas y por el contenido de materia orgánica. Sin embargo, Olajire y Brack (2005) y Srogi (2007) afirman que la capacidad de retención de PAHs en el sedimento está más relacionada con la materia orgánica que con el tamaño de grano, resultados similares se encuentran en sedimentos superficiales de la Bahía de Cádiz España (Fuentes *et al*; 2012), donde las concentraciones de PAHs tampoco mostraron preferencia por una textura granulométrica particular, ni afinidad importante con la materia orgánica. En los cenotes estudiados en el presente trabajo tampoco se encuentra una relación de los PAHs con la textura granulométrica y solo en algunos casos correlaciona con el contenido de materia orgánica, como lo encontró Viguli *et al*. (2002) en la Bahía de Santander, España, donde la concentración de PAHs fue muy dependiente de la materia orgánica. Sin embargo, Matheus Medeiros y Caruso Bicego (2004) encontraron en la zona industrial de São Sebastian, Brasil, que las concentraciones

más bajas de PAHs, originados por combustibles fósiles (petrogénicos y pirogénicos) estuvieron relacionadas con arena, y las más altas con limo y arcilla.

Estos planteamientos sugieren que el carácter areno-limoso de los sedimentos no facilita una mayor adsorción de PAHs. Aunque el concepto de partición implica que la cohesión de moléculas orgánicas hidrofóbicas está determinada por el contenido de materia orgánica del sustrato (Means *et al*; 1980), en los cenotes no hubo un patrón de comportamiento definido por las correlaciones entre concentraciones totales de PAHs con el porcentaje de materia orgánica. Esto puede deberse a una mezcla de factores: las diferentes concentraciones de la materia orgánica acumulada, las distintas características de los sitios específicos de sedimentación en los cenotes, las maneras desiguales de cohesionar con la materia orgánica y el efecto de una dilución simple con los componentes inorgánicos del sedimento. Olajire y Brack (2005) atribuyen las escasas o medianas correlaciones PAHs y materia orgánica a las condiciones ambientales, las propiedades del sedimento o a la fácil degradación de los PAHs en el sedimento, encontraron que sedimentos por debajo de 2% de materia orgánica siempre presentaron concentraciones de PAHs < 10 ng/g; sin embargo, en zonas de mayor influencia antropogénica, principalmente procesos de combustión de tráfico y actividades industriales, las concentraciones alcanzaron aumentos importantes. Estos resultados permiten considerar que los cambios importantes en la acumulación de PAHs en sedimentos de los cenotes de la PY dependen de la cantidad de los aportes antropogénicos.

En general en temporada de secas se encontró la mayor concentración de PAHs de APM y BPM, con origen pirogénico lo que significa que el aporte de estos compuestos posiblemente se debe a procesos de combustión de madera, vegetación, etcétera, o por aportes antropogénicos, se observa que para los cenotes ubicados hacia las zonas noreste y noroeste hay una mayor concentración pudiendo deberse a que se ubican cerca de la zona de descarga, sumado al gran contenido de materia orgánica presente a causa del aporte por las actividades agrícolas llevadas a cabo en estos sitios, se sugiere que el aporte registrado de hidrocarburos aromáticos en lluvias se debe principalmente al transporte de estos compuestos.

La determinación de los niveles de CYP1A como respuesta de los organismos a la presencia de contaminantes en ambientes acuáticos ha sido reportada por muchos estudios en el mundo (Barber *et al*; 2007, Tong *et al*; 2004, Metcalfe *et al*, 2010) y es tomada como marco de referencia para monitorear de manera general la presencia de contaminantes que inducen la expresión de CYP1A en *Gambusia yucatanana*, donde se encuentra una mayor expresión de este biomarcador en secas, principalmente en los peces provenientes de los cenotes E22, E19 y E10, donde los dos primeros tienen actividad turística y se encuentran ubicados cerca de granjas ganaderas. Respuestas similares se reportan en peces expuestos con agua proveniente de cenotes de la PY, donde el 23% de los sitios estudiados sobre

expresan CYP1A con respecto a la referencia, los valores de expresión relativa más altos se encontraron en cuerpos de agua ubicados cerca de granjas ganaderas o en cenotes utilizados para actividades recreativas o situados cerca de aldeas (Rodríguez *et al*, 2012). Asimismo, los cenotes que presentan una mayor expresión de CYP1A, contienen una mayor concentración de PAHs, en la temporada de secas.

Existen evidencias que indican que los PAHs son capaces de incrementar la expresión de CYP1A en peces (Stegeman y Lech, 1991; Stegeman y Hahn, 1994). Evidentemente en mayo 2015 (secas) los peces de los cenotes E6, E19 y E22 incrementaron sus niveles de transcripción de CYP1A, lo que algunos autores relacionan con los mecanismos de respuesta celular para la excreción de contaminantes durante la fase I del metabolismo de citocromo (Barber *et al*; 2007) De esta manera, una fuerte inducción de CYP1A es aceptada como un biomarcador de exposición para detectar ambientes acuáticos contaminados con algunos hidrocarburos aromáticos (Fent, 2004; Sirok, 2004). La expresión de CYP1A luego de la inducción por PAHs se ha reportado por diversos autores en diferentes especies, por ejemplo: el bacalao (*Gadus morhua*) (Husy *et al*; 1994), la trucha arco iris (Aluru y Vijayan, 2004) y en el lenguado (*Scophthalmus maximus*) (Hartl *et al*; 2007), *Fundulus heteroclitus* (Patel, 2006), los cuales expresaron CYP1A al ser expuestos con PAHs con concentraciones por debajo de 1 µg/L. Dicho lo anterior y dado que se ha informado previamente de la presencia de contaminantes orgánicos en la Península (Graniel *et al*; 1999, Metcalfe *et al*; 2010), es probable que estos efectos estn siendo causados por PAHs, otros contaminantes y su mezcla.

Por otra parte, el contenido de glutatión total está asociado a una disminución en la concentración, en presencia de algunos xenobióticos debido a que el glutatión participa como conjugante en reacciones de biotransformación de fase II, es decir, donde el xenobiótico o un metabolito derivado de la fase I es covalentemente enlazado a una molécula endógena para ser eliminado. En este caso, se encuentra un menor contenido de glutatión en el músculo de *Gambusias* durante la temporada de lluvias principalmente para los peces del cenote E25 y E22, los cuales se ubican cerca de la costa y de ranchos, convirtiéndose en sitios vulnerables a la presencia de distintos contaminantes, cabe mencionar que durante el metabolismo de la fase II se incluye la conjugación de ciertos PAHs con intermediarios como el glutatión, a través de la actividad de la GST. El incremento de la actividad de GST ha sido reportada por diversos autores en ensayos de laboratorio como consecuencia de la exposición a diversos agentes inductores tales como PAHs (Van der Oost *et al*; 2003) como la β-naftoflavona (Ascar y de la Torre, 2005).

Los resultados encontrados para GST apoyan lo anterior, de manera general en la temporada de secas se encuentra una mayor actividad de la GST de forma significativa para los peces de los cenotes E25, E22 y E19, resalta que la actividad de GST en estos cenotes también se ve aumentada en lluvias con excepción del cenote E25. La GST se incrementa en presencia de contaminantes como los PAHs. Armknecht *et al*. (1998) reportaron una elevada actividad de GST ante la exposición a hidrocarburos aromáticos en el pez *Fundulus heteroclitus*; en este estudio se encontró un aumento en la actividad enzimática de GST en aquellos sitios que presentan altas concentraciones de PAHs; sin embargo, también se encuentra

umentada en sitios donde no hay un aumento en CYPA1. Por otro lado es probable que los sitios que registraron una menor actividad de GST en época de lluvias se relacione con la baja concentración de PAHs encontrada en esa temporada. Rios Sicaio (2008) no encontró cambios en la actividad GST en *Cyprinus carpio* al inyectarles Benzo-a-pireno 10 µg/L, resultados similares fueron reportados por Jifa y col. (2006) para *Lateolabrax japonicus*, para este caso se presentó una concentración hasta de 94.75ng/g en sedimentos.

No obstante la GST puede jugar un doble papel ya sea catalizando la conjugación de la fase II de los metabolitos reactivos de compuestos orgánicos o en la reducción de hidroperóxidos orgánicos por GSH y por lo tanto un incremento en su actividad pueda deberse a la formación de conjugados con otro tipo de contaminantes tales como metales (Ahner *et al*; 2002), PCBs (Kamohara *et al*; 1984) plaguicidas (Almli *et al*; 2002) o por una respuesta antioxidante, es importante mencionar que la inducción de GST se produce en varios tejidos en diferentes períodos de exposición a inductores, dependiendo del tipo de tejido y la naturaleza del inductor (Carvalho *et al*; 2012).

Considerando que el nivel de glutatión disminuye durante la generación de conjugados S–glutathion por las GST (Martínez *et al*; 2011), se esperaría que aquellos cenotes que obtuvieron un aumento en la actividad de GST tengan una disminución en el contenido de glutatión total, sin embargo puede no mostrarse esta relación, debido principalmente que GST puede estar involucrada en procesos de respuesta a estrés oxidante, durante la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante la interacción no enzimática con radicales como el anión superóxido, óxido nítrico y radical hidroxilo o proporcionando un electrón para la reducción de peróxidos (Martínez *et al*; 2011), y no solo a procesos de eliminación.

La GST es inducida por contaminantes orgánicos como parte de la Fase II en la vía de biotransformación, mientras que la inhibición de GST ha sido indicada como una respuesta más específica al desafío químico (Regoli *et al*; 2003). En este estudio, las respuestas de GST fueron inducidas en aquellos sitios con gran aporte de hidrocarburos aromáticos, sin embargo también se mostró inhibida, principalmente en época de lluvias donde los procesos de óxido reducción se vieron incrementados. Amado y col. (2006) en su estudio sobre biomarcadores en corvinas *Micropogonias Furnieri* (Sciaenidae) indicó una clara variación estacional en la actividad de GST (actividad enzimática fue más alta en la estación más caliente) apoyando a los resultados en este estudio.

Existen reportes que indican que contaminantes orgánicos pueden inhibir el contenido de glutatión, en *Cyprinus carpio* e *Ictalurus nebulosus* se encontró una inhibición de glutathion en ambas especies (Ozcan, *et al*; 2004); dichos resultados concuerdan con lo encontrado en este estudio donde se observa una inhibición mayor en aquellos sitios que contienen un incremento de concentración de PAHS como lo fueron los cenotes E6 y E25, con cambios en la temporalidad.

El metabolismo de los PAHs puede generar especies reactivas de oxígeno capaces de reaccionar con macromoléculas produciendo lesiones, por ejemplo a nivel de

lípidos (Monserrat *et al*; 2008). Se registra un mayor contenido de LPO (lípidos peroxidados) en las *Gambusias* en temporada de lluvias, pero para los casos de los cenotes E22 y E10 tienen un mayor contenido de LPO en ambas temporadas, esto puede estar relacionado con las concentraciones de PAHs en estos sitios. La peroxidación de lípidos está altamente relacionada con la formación de radicales reactivos e inestables a nivel de membrana celular, que tienen como consecuencia directa la oxidación o muerte celular (Klaassen y Watkins, 2001)

Scarcia (2013) reportó en *C. carpio* un incremento en los niveles TBARs, evidenciando el daño oxidativo en lípidos como consecuencia a exposición con Benzo (a) pireno (1µg/L) , sin embargo para los cenotes de la PY se registraron concentraciones por debajo 1µg/L. Cantú (2006), por su parte realiza un estudio en la almeja chocolata (*Megapitaria squalida*) relacionándola con almacenaje de hidrocarburos, determinando niveles de LPO (0.3nmol/mg) los cuales no representan efecto por contaminación antrópica, respuestas similares podrían estar ocurriendo en *Gambusia yucatanana* de la PY, debido a que no se evidencia un daño oxidativo a nivel de lípidos como consecuencia de la exposición de PAHs. Sin embargo, hay que considerar que se estas determinaciones se realizaron en músculo de *G.yucatanana*, el tejido podría determinar los niveles de LPO encontrados, existen reportes que indican diferencias en los niveles de peroxidación lipídica según el tejido analizado encontrando por ejemplo un mayor nivel de LPO en gonadas que en tejido digestivo (Montero, 2000). Las posibles causas de dichas diferencias podrían ser una variación en el contenido de los PUFA (Ac. Grasos poliinsaturados) en los lípidos de membrana y en las actividades de los enzimas antioxidantes en cada órgano.

Existe muy poca información disponible sobre la variación estacional de la peroxidación lipídica en organismos marinos, si exceptuamos un estudio en la glándula digestiva del mejillón *Mytilus* sp. realizado por Viarengo *et al.* (1991) y otro sobre la relación entre la peroxidación lipídica y el ciclo reproductivo en la llamada vieira japonesa *Mizuhopecten yessoensis* y en el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Lukyanova y Khotimchenko, 1995), se enunciaba que los principales factores que podían influir en la posible variabilidad estacional del proceso peroxidativo serían, en primer lugar, los de tipo ambiental, como el nivel de oxígeno disuelto y la temperatura; en segundo lugar, los que modifican el estado metabólico del animal, tales como el ciclo gonadal o la disponibilidad de alimento, en esta investigación aunque no se encontraron resultados significativos se pudo ver que el potencial redox y la temperatura se relaciona con los niveles de LPO.

La estacionalidad es un factor que se ha demostrado actúa sobre el nivel de las defensas antioxidantes y generación de ERO (Almeida *et al*; 2004). En bivalvos se reporta baja actividad de enzimas antioxidantes en invierno y paralelamente un incremento en la concentración de lípidos peroxidados (Wilhelm Filho *et al*; 2001, Niyogi *et al*; 2001.) Este estudio muestra una tendencia al aumento en LPO en lluvias, además se debe considerar que a bajas temperaturas, aumenta la cantidad de oxígeno disuelto en el agua, lo que puede conllevar una mayor producción de oxirradicales y, por tanto, un mayor daño oxidante (Viarengo *et al*; 1995).

Al hablar de la actividad enzimática de la AChE por lo general se asocia a tejido nervioso y a efectos causados por plaguicidas, pero en los últimos años se ha podido determinar en otro tipo de tejidos y relacionar con otro tipo de contaminantes como lo son los PAHs. Por ejemplo, Vioque (2008) determinó AChE en glándula digestiva y músculo de *P.clarkii* confirmó que las actividades AChE son muy elevadas en tejido nervioso, en tanto, en músculo encontró los niveles más bajos; Rodríguez y cols (2016) caracterizaron AChE para músculo y cabeza de *G. yucatanana* provenientes de cenotes de la PY con una actividad promedio de AChE (140.5 nmol/min/mg) en músculo coinciden con los niveles encontrados en este estudio.

La medida de la inhibición de la Acetilcolinesterasa es una aproximación bien establecida y validada para monitorizar ambientes probablemente contaminados por plaguicidas (Hyne, 2003). Aunque la AChE principalmente ha sido usada para evaluar la exposición a plaguicidas organofosforados (OFs) y carbámicos (CBs), existen pocos reportes que han determinado la inhibición de la AChE por otro tipo de contaminantes, como algunos metales pesados y productos derivados del petróleo en organismos marinos (Akcha *et al*; 2000; Moreira *et al*; 2004, 2005; Cunha *et al*; 2005), y en estudios "in vitro" (Jett *et al*; 1999).

Existen evidencias de que algunos PAHs pueden inhibir la AChE, y se ha atribuido que PAHs con más anillos aromáticos son inhibidores más potentes de la AChE (Kang y Fang ;1997), Rodríguez Fuentes y Gold Bouchot (2000) determinaron una alta correlación entre el contenido de PAHs en sedimentos y la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa en el cerebro de tilapias, lo cual coincide con este estudio donde se observa que la inhibición AChE puede ser detectada en músculo de *G.yucatanana*, esta inhibición existe a lo largo del ciclo anual siendo más representativa en temporada de lluvias en donde peces del cenote E6 tienen mayor inhibición para ambas temporadas, asimismo Pacheco y cols.(2014) reportaron una inhibición de AChE en *G.yucatanana* en cenotes de la PY en la cual podría existir una diferencia temporal.

Coincidiendo con los resultados mostrados en este proyecto, se han reportado que variaciones estacionales pueden influir sobre las respuestas de los biomarcadores. Sánchez y col. (2008) evidenciaron que la estacionalidad y algunos factores ambientales pueden influir en la variabilidad de las respuestas de ciertos biomarcadores como Vtg y EROD, otros autores reportan que ciertos parámetros asociados al estrés oxidativo (GST, GSH, LPO, etc.) no fueron afectados por la estacionalidad en la especie *Gasterosteus aculeatus* (Nahrgang *et al*; 2010), como lo que se encuentra en los biomarcadores medidos en este proyecto, los cuales exhibieron una respuesta que fue inducida o inhibida de acuerdo con el sitio, por tanto empleando el método de IBR se permite visualizar con mayor claridad la disposición espacial de estos biomarcadores y también la variabilidad espacio temporal de la exposición al estrés ambiental al que están sometidos los organismos estudiados. Según el índice de IBR se puede decir q los peces de los cenotes E22 Y E10 presentan las condiciones más desfavorables en comparación con los demás sitios por la mayor integración en la respuesta de sus biomarcadores.

Si bien la evaluación de biomarcadores es empleada como señales tempranas de efectos adversos, promovidos por compuestos de origen antrópico, es importante tener en cuenta que los biomarcadores son susceptibles a la variabilidad natural debido a factores abióticos (por ejemplo, temperatura, oxígeno disuelto) y factores bióticos (por ejemplo, género, edad, tamaño, etapa reproductiva) (Whyte *et al*; 2000; Van der Oost *et al*; 2003). Estos factores podrían enmascarar el efecto de las señales de estrés inducidas por contaminantes y dificultar la interpretación del resultado de las respuestas de los biomarcadores.

Por tal motivo se recurre al empleo de diversas herramientas estadísticas que sustentan el efecto biológico con contaminantes y/o variables ambientales. Con el análisis de nMDS y PCA se mostró una diferencia temporal en la respuesta de biomarcadores medidos en el músculo de la *G. yucatanana*. Se tuvo que la temporada de secas tiene una mayor representatividad de la variación encontrada. Existe una relación entre PAHs con el contenido de glutatión y la actividad de GST, donde conforme aumentan las concentraciones de PAHs disminuye el contenido de glutatión total y aumenta la actividad de GST, lo que indica que probablemente las Gambusias están eliminando estos compuestos a través de mecanismos de transformación de fase II. Por otro lado la asociación entre sólidos disueltos con materia orgánica, PAHs de APM con la conductividad y pH principalmente se encuentra en los cenotes cercanos a la costa, que como se ha descrito anteriormente son cenotes que por su ubicación son más vulnerables a presentar una mayor cantidad de contaminantes, material particulado, sumado a la actividad antrópica generada en la zona (rancherías).

Por otra parte, existen numerosos estudios sobre los factores que afectan la capacidad de los sedimentos para captar y concentrar algunos contaminantes, para metales las principales variables que determinan su concentración son el potencial redox, la granulometría (Ronco *et al.*, 2001), materia orgánica (Besser *et al.*, 2004). Sin embargo los PAHs no se ven afectados por estos parámetros ambientales, con excepción de la materia orgánica.

Con el RDA se determina que los peces que pertenecen al grupo de cenotes cercanos a la costa (grupo B) durante la temporada de lluvias tienen una relación con la cantidad de LPO con el potencial redox, probablemente debido que en esta temporada los procesos redox se ven mayormente favorecidos y si la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) es un proceso natural en el metabolismo de plantas y animales (Choo *et al*; 2004) en condiciones de oxidación como se encontró para lluvias, las *Gambusias* responden mediante un mecanismo de defensa que incluye una serie de enzimas antioxidantes como la GST (Choo *et al*; 2004), que en muchas ocasiones trabaja en conjunto con otras enzimas y grupos no enzimáticos para reducir y eliminar las especies reactivas de oxígeno, antes de que éstas puedan dañar a la célula. Por lo tanto, la resistencia de estos peces a la contaminación presente en dichos ambientes acuáticos se debe principalmente a la eficiente capacidad de respuesta antioxidante que impiden el daño oxidativo (Pinto *et al*; 2003; Li *et al*; 2006).

Generalmente, el potencial oxidación-reducción es afectado por la concentración de oxígeno disuelto, según baja este potencial en aguas y sedimentos, se observa una

disminución en la concentración de oxígeno disuelto, aunque, la actividad metabólica microbiana puede alterar este comportamiento como resultado de una respiración aeróbica intensa y de secreción de sustancias reductoras, la descarga de materia orgánica también tiene consecuencias, pues provoca un aumento en la actividad respiratoria y una disminución del oxígeno disuelto, según disminuye la concentración del oxígeno disuelto y ante la ausencia de un agente oxidante fuerte alternativo, se favorece la reducción de aceptadores de electrones alternos, con un potencial de reducción menor al de oxígeno, como ocurre en el caso de los cenotes estudiados principalmente en aquellos del grupo B donde se acentúa este proceso.

Los cenotes E22, E19 Y E10 en la temporada de secas tienen relación con el oxígeno disuelto (OD), el cual está positivamente relacionado con la actividad de la AChE y GST, cabe mencionar que para ambas temporadas los procesos de óxido-reducción se vieron favorecidos pero las defensas antioxidantes también pueden ser inducidas por el amoníaco y los nitritos (Nimptsch y Pflugmacher 2007) u otro tipo de contaminantes presentes en los cenotes, así mismo recordar el doble papel de la GST en su participación en eliminación de compuestos a través de fase II y ayudando a la eliminación de especies reactivas de oxígeno. Así mismo las gambusias de estos cenotes presentan mayor expresión de CYP1A, mayor contenido de glutatión total y mayor inhibición de AChE coincidiendo con lo encontrado en el valor numérico de la IBR, ya que estos cenotes representaron una mayor respuesta integrada de biomarcadores.

Con los dendogramas de similitud se agrupan los sitios de estudio de acuerdo a la similitud en la respuesta de sus biomarcadores, se evidenció la similitud de los cenotes E22, E19 y E10 por contener una mayor respuesta de sus biomarcadores, coincidiendo nuevamente con lo encontrado en los resultados de IBR.

El cenote E22 debido a que presenta una mayor integración en la respuesta de sus biomarcadores (>CYP1A, >LPO y <Glutathion total) con PAHs de BPM, y en especial en temporada de secas destaca por mayor contenido de PAHs con respecto a los otros cenotes, sumado a lo encontrado en el RDA indican que los PAHs de BPM influyen en la expresión del CYP1A para las *Gambusias* de este cenote.

Un segundo grupo formado por el cenote E19 y E10 similares por tener una mayor expresión de CYP1A y una mayor actividad de GST con concentraciones altas de PAHs, aunque no de forma muy clara puesto que para el cenote E19 presentó mayores concentraciones de PAHs de APM y el cenote E10 mayores concentraciones de PAHs de BPM en esta temporada de secas, sin embargo ambos cenotes presentan un contenido similar de OD (2.6mg/L) además tienen una menor inhibición de la AChE, reforzando así los resultados arrojados con el RDA en relación con la AChE y OD.

Por otro lado la actividad de la AChE es importante en muchos procesos fisiológicos su activación o inhibición puede influir en procesos colinérgicos de neurotransmisión y promover efectos no deseados, se encontró que aquellos cenotes que presentaron menor cantidad de oxígeno disuelto (grupo A, lluvias) tienen una mayor actividad en la AChE, Ossana (2011) encontró respuestas similares exponiendo larvas de

L.catesbeianus a muestras del río Luján, con aumentos significativos en la actividad de la AChE cerebral en los muestreos realizados en primavera y verano, en este caso también se encontraron bajos niveles de oxígeno. Kaizer (2009) mostró que la actividad de esta enzima en el cerebro de *Rhamdia quelen* incrementó un 39% cuando fue expuesta 24h a bajos niveles de oxígeno y altas concentraciones de amonio. Los peces de los cenotes E9 y E6 de acuerdo al dendograma de similitud son afines en temporada de secas por contener la mayor inhibición de AChE, alta concentración de PAHs de APM y TDS, lo que sugiere que aunque en estos cenotes existan hidrocarburos aromáticos, las respuestas de biomarcadores de los peces no están asociados a ellos, la inhibición de la AChE puede estar siendo modulada por la presencia de otros agentes externos o internos de cada cuerpo de agua como algunos plaguicidas que pudiera estar causando el efecto observado en AChE, lo mismo se obtuvo con IBR.

Nuestros resultados indicaron que dado que las características fisicoquímicas y biológicas de los ambientes acuáticos son diversas y variables, la respuesta individual de un solo biomarcador no se puede considerar suficiente para brindar un diagnóstico completo de los efectos de la contaminación presente en cada cenote. Sin embargo, el empleo en conjunto de biomarcadores con otras mediciones químicas y biológicas permitiría alcanzar dicho objetivo (Cajaraville *et al*; 2000). Cabe mencionar que la *G.yucatanana* es una especie que se adapta muy bien, con buena tolerancia a las aguas salobres e incluso a concentraciones bajas de oxígeno disuelto.

XI. CONCLUSIONES

Para los cenotes de la PY durante el año 2015 se registraron concentraciones de PAHs en sedimento por debajo de 100ng/g, hasta la fecha no existe una Norma Oficial Mexicana que establezca límites permisibles para estos compuestos sin embargo tomando en cuenta la normatividad establecida para suelos en México, Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (uso: agrícola, forestal, recreativo y de conservación-residencial y comercial acepta de 2 a 10mg/kg dependiendo del uso del suelo, con lo que los sedimentos de los cenotes no sobrepasan este nivel, sumado a esto estas concentraciones también se encuentran por debajo del nivel de efecto más probable sugerido por la NOAA (4000ng/g, Buchman, 1999), así mismo se encuentran por debajo de los niveles guía de Canadá (CCME, 2001), a excepción de los cenotes E6 y E25, los cuales están por arriba del nivel en la concentración de B(a) Pireno (31.9ng/g) ambos registrados en la temporada de secas, dicho compuesto es considerado de riesgo ambiental (Botello *et al*; 1998). Lo mismo ocurre en el cenote E13 que tiene niveles de fenantreno por arriba del nivel guía (41.9ng/g) también en secas.

Existe una mayor concentración de PAHs de APM en temporada de secas, atribuyéndolo a sus características hidrofóbicas estas moléculas se acumulan junto con el sedimento en esta temporada, sin embargo existió un transporte de hidrocarburos de BPM en temporada de lluvias los cuales se encontraron suspendidos en el agua superficial de estos cenotes.

En los cenotes estudiados no se encuentra una relación de los PAHs con la textura granulométrica, variables ambientales y en algunos casos existe una mayor afinidad con el contenido de materia orgánica.

El probable origen de los PAHs presentes en los cenotes estudiados es pirogénico dicho comportamiento puede deberse a usos y costumbres en Yucatán donde se quema cotidianamente la basura, maleza y donde el roza, tumba, quema sigue en uso constante.

Las diferentes características topográficas, geomorfológicas, hidrogeoquímicas, la ubicación y el clima de los cenotes estudiados provocan una diferencia espacial y/o temporal en los parámetros ambientales de tal manera que se agrupan como: cenotes que están en la parte central del conocido “anillo de cenotes” y cenotes cercanos a la costa, donde los primeros refieren a los sitios con menor conductividad, mayor potencial redox y concentración de oxígeno constante, mientras que los del grupo cercano a la costa, contienen a los sitios con mayor conductividad, menor potencial oxidación-reducción y a los sitios con variación temporal en la concentración de oxígeno disuelto..

Por otra lado, para la evaluación ecotoxicológica de los cenotes de la PY no basta con el análisis de factores físicos y químicos, sino que es necesario la aplicación de herramientas como los biomarcadores que permiten medir la respuesta de los organismos, si bien, frecuentemente se ha empleado hígado como órgano primordial en este tipo de evaluaciones, con estos resultados se apoya el uso de otros tejidos como “músculo” para evaluar la respuesta biológica de los organismos acuáticos frente a contaminantes ; como lo han realizado otras investigaciones en branquias, riñón, intestino, entre otros.

Existe una variación temporal en la respuesta de los biomarcadores, la temporada de secas presentó la mayor variación.

En los cenotes E22 y E10 los cuales son de tipo abierto, con abundante vegetación aledaña y situados cerca de ranchos presentan una relación directa entre la expresión de CYP1A1 y la concentración de PAHs en sedimento en temporada de secas, principalmente por PAHs de BPM.

El contenido de glutatión total presentó una relación inversa con la concentración PAHs en ambas temporadas, mayormente en secas.

La GST presentó una relación directa los PAHs y en algunos sitios una relación inversa con la expresión de CYP1A1 (E19 y E25) probablemente debido a su doble papel defensor en las células catalizando la conjugación de la fase II o la reducción de hidroperóxidos orgánicos, con mayor actividad en secas.

El daño oxidante se expresó por el incremento en los niveles de LPO y en mayor medida en la época de lluvias que podrían estar relacionadas con las condiciones oxidantes de esa época.

En temporada de secas existe una mayor inhibición de AChE en el músculo de *G.yucatanana*, los peces del cenote E6 tienen una mayor inhibición de este biomarcador, no se muestra una relación significativa con la concentración de PAHs, este efecto puede ser causado por otros contaminantes presentes en ese cenote como plaguicidas.

La actividad enzimática de la AChE aumentó en cenotes que tienen una menor concentración de oxígeno disuelto.

Con la IBR se permite visualizar la magnitud del cambio de las respuestas biológicas al estrés ambiental. Los sitios con los valores más altos de IBR son E22, E19 y E10 en secas y E10, E22, E9 en lluvias en los cuales existe una mayor relación entre los biomarcadores en respuesta a la exposición a contaminantes pudiendo ser por la inducción de PAHs, otro contaminante o mezcla de ellos.

El conjunto de biomarcadores respondió eficientemente a cambios ambientales específicamente en los niveles de contaminantes y ha permitido una evaluación ambiental entre sitios.

Las diferentes respuestas en el espacio y el tiempo son evidentes en los diferentes cenotes, lo que significa que la contaminación no es homogénea, reflejando no sólo diferentes orígenes, intensidades y posibles interacciones de los contaminantes.

El análisis de redundancia permitió identificar las variables que generan una mayor variación en la respuesta biológica de las gambusias, indica que los PAHs de BPM influyen en la expresión del CYP1A, GSH, y el OD en AChE y GST.

Los dendogramas permitieron agrupar a los cenotes de acuerdo a la similitud en la respuesta de los biomarcadores y la concentración de PAHs y/o variables ambientales, teniendo que en secas la respuesta de biomarcadores está más relacionada con PAHs de BPM, coincidiendo con lo encontrado con los IBR, la respuesta de biomarcadores en los cenotes E10 y E22 está influenciada por PAHs.

Las respuestas de los biomarcadores en temporada de lluvias se deben principalmente a las variables ambientales encontradas en los cenotes, donde sobresalen los procesos de óxido-reducción. La estación E22 conocida como cenote Chen-Vazquez presentó la mayor respuesta asociada a hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Se confirmó que *Gambusia yucatanana* es una especie adecuada para la evaluación de la toxicidad mediante el uso de biomarcadores de contaminación.

Los sitios que presentaron una mayor concentración de PAHs totales (agua y sedimento) presentaron una mayor expresión de CYP1A, actividad enzimática de GST e inhibición de AChE, aunque no de forma significativa una tendencia al aumento en LPO y disminución de Glutación total.

La temporalidad es un factor importante que incide en la respuesta de los organismos, así como la presencia de otros contaminantes y por las características fisicoquímicas de cenote.

Con estos resultados se confirma el uso del pez *G.yucatanana* como especie monitorea de contaminación, así mismo, el empleo de músculo para la determinación de cada biomarcador fue efectivo, lo que promueve el empleo de diversos tejidos para evaluación de contaminación, utilizar músculo de peces en este tipo de estudios ayudará a poder evaluar un mayor conjunto de biomarcadores o parámetros bioquímicos que aporten una información más completa de lo que sucede en los sitios de estudio.

XII. RECOMENDACIONES

Una vez discutidos los objetivos de este trabajo de investigación, se considera interesante reflexionar sobre otros aspectos relacionados con la evaluación de la contaminación por PAHs a través de biomarcadores y se propone:

- Extender los estudios expuestos en esta tesis para verificar si existe una tendencia en la temporalidad.
- Aunque en los efectos encontrados en los organismos estudiados en esta tesis no presentaron un efecto con respecto al sexo, se recomienda tomar en cuenta la relación del contaminante con las variables biológicas del pez, tales como, índices de condición ya que estos brindan información acerca de la salud global de los individuos dando conocimiento acerca de la estructura, composición y crecimiento del pez así como el daño causado por el contaminante.
- Comparar los resultados mostrados en esta tesis con los efectos obtenidos en otros tejidos de organismo de estudio.
- Se recomienda la cuantificación de PAHs en músculo de los individuos para la comparación con los resultados obtenidos y tener un panorama más amplio acerca de los posibles efectos que puede estar ocasionando este contaminante.
- Continuar con el monitoreo ambiental de estos cenotes.

XIII. REFERENCIAS

- Abele D, Puntarulo S, 2004, Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, v.138, p 405–415.
- Ahner B E, Wei L, Oleson J R, y Ogura N, 2002, Glutathione and other low molecular weight thiols in marine phytoplankton under metal stress. *Marine Ecology Progress Series*, v. 232, p 93-103.
- Almeida E A, Miyamoto S, Bainy A C D, Medeiros M H y Mascio P, 2004, Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation in mussels *Perna perna* exposed to different metals. *Marine Poll Bull.*, v 49, p 386– 392.
- Almli B, Egaas E, Christiansen A, Eklo OM, Lode O y Kaellqvist T, 2002, Effects of three fungicides alone and in combination on glutathione S-transferase activity (GST) and cytochrome P-450 (CYP 1A1) in the liver and gill of brown trout (*Salmo trutta*). *Marine Environmental Research*, v.54, p 237-240.
- Aluru N y Vijayan MM, 2004, Naphthoflavone disrupts cortisol production and liver glucocorticoid responsiveness in rainbow trout. *Aquat Toxicol.*, v.67, p 273–285.
- Alvarez Legorreta T y Sáenz Morales, 2005, Hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos de la bahía de Chetumal, p, 299-31. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autónoma De Campeche, Univ. NaL. Autónoma De México. Instituto Nacional de Ecología.
- Alves L M, Lemos M F L, Correi, J P S, Nuno A R, y Novais S C, 2015, The potential of cholinesterases as tools for biomonitoring studies with sharks : Biochemical characterization in brain and muscle tissues of *Prionace glauca*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.465, p 49–55.
- Amado L, Robaldo R, Geracitano L, Monserrat J, Bianchini A, 2006, Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Mar Pollut Bull.* v.52, p 207-213.
- An Ping L, W Yuk Shan y T Nora Fung Yee, 2003, Pyrene-induced changes of glutathione-S-transferase activities in different microalgal species. *Chemosphere*, v.50(3), p 293-301.
- Anderson M, Cacela D, Beltman D, Teh S, Okihiro M, Hinton D , 2003, Biochemical and toxicopathic biomarkers assessed in smallmouth bass recovered from a polychlorinated biphenylcontaminated river. *Biomarkers*, v. 8, p 371–393.
- Andrea L Vulcano D, Soraci A L, y Tapia M O, 2013 Homeostasis del glutati6n, *Acta Bioquím Clín Latinoam*, v. 47, p 529-39.
- An-Ping L, W Yuk-Shan, y T. Nora Fung-Yee, 2003, Pyrene-induced changes of glutathione-S-transferase activities in different microalgal species. *Chemosphere*, v. 50(3), p 293-301.
- Armknecht S L, Kaattari S L y Vanveld, P. A. 1998. An elevated glutathione S-transferase in creosote-resistant mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Aquatic Toxicology.*, v. 41, p 1-16.
- Apelo C y Postma D, 2005, *Geochemistry, groundwater and pollution*, Balkema, p 649
- Arukwe A, 2002, Complementary DNA cloning, sequence analysis and differential organ expression of

beta-naphthoflavone-inducible cytochrome P4501A in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v.133, p 613–624.

Barber D S, McNally A J, Garcia Reyero N, Denslow N D, 2007, Exposure to p,p'-DDE or dieldrin during the reproductive season alters hepatic CYP expression in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquat. Toxicol.* v. 81(1), p 27–35.

Barrientos C, 2009, Efecto del benzoato de emamectina sobre los niveles de expresión y actividad de proteínas de metabolización en cáligus (*Caligus rogercresseyi*) y su huésped trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis, Escuela de Ciencias. Facultad de Ciencias. Univ. Austral de Chile. Bartozs, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* 77, 1303-1315 (2009)

Baumann PC, Harshbarger J C, 1995, Decline in liver neoplasms in wild brown bullhead catfish after coking plant closes and environmental PAHs plummet. *Environ. Health Perspect*, v.103, p 168-170.

Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Sorbe J C y Bellocq J, 1998, Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin*, v.36(12), p 951–960.

Bayne B L, Widdows J y Thompson T J, 1976, Physiological integrations, p. 261-291. In: B. L

Bayne (Ed.) *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*. Cambridge University press, Cambridge.

Beddows P A, Smart P L, Whitaker, F F, Smith S L, 2007, Decoupled fresh-saline groundwater circulation of a coastal carbonate aquifer: spatial patterns of temperature and specific electrical conductivity. *J. Hydrol.* v.346, p 18-32.

Beliaeff B, y Burgeot T, 2002, Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.21, p 1316–1322.

Besser J M, Brumbaugh W G, Kemble NE, May T W & Ingersoll C G, 2004, Effects of sediments characteristics on the toxicity of chromium (III) and chromium (VI) to the amphipod, *Hyalella azteca*. *Environ. Sci. Technol.*, v:38, p 621-6216.

Boffetta P, Jourenkova N, y Gustavsson P, 1997. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes and Control*, v.8, p 444-472.

Botello A V y Calva L G B, 1998, Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Pueblo Viejo, Tamiahua and Tampamachoco lagoons in southern Gulf of Mexico. *Bull Environ. Contam. & Toxicol.*, V.60, p 96-103.

Botello A V, 1996, Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo, p. 203-210. In: A.V. Botello, J.L. Rojas-Galaviz, J.A. Benítez, y D. Zárate-Lomelí, Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche, México. 666 p.

Botello A V, Calva L G B y. Ponce Vélez G, 2001, Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from coastal lagoons of Veracruz state, Gulf of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 67, p 889-897.

Botello A V, Rendón Von Osten J, Gold-Bouchot G y Agraz H C, 2006, Golfo de México: Contaminación e Impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da edición, Universidad Autónoma de Campeche, México, p, 53-141.

Botello A V, Villanueva S , Díaz G, Marina, L. D. C, 1995, Contaminación por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en sedimentos y organismos del Puerto de Salina Cruz, Oaxaca, v. 11, p 21–30.

Bouloubassi I, Roussiez V, Lorre A, 2012, Sources, dispersal pathways and mass budget of sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the NW Mediterranean margin, Gulf of Lions. *Mar. Chem.* 142–144, 18–28.

Burton G A, 2002, Sediment quality criteria in use around the world. *Limnology*, p.65-75.

Brammell B F, McClain J S, Oris J T, Price D J, Birge W J, Elskus A A , 2010, CYP1A expression in caged rainbow trout discriminates among sites with various degrees of polychlorinated biphenyl contamination. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v. 58 (3), p 772–782.

Bretau S, Toutant JP y Saglio P, 2000, Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholines- terase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotox. and Environ. Safety.*, v47, p 117-124.

Bretau S, J P, Toutant y P Saglio, 2000, Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholines- terase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotox. and Environ. Safety*, v. 47, p117-124.

Broyelle I, 1997, Contribution á létude de ka maetiére organique en milieu estuarien: cas des deltas du Rhône et de la Léna. Thesis, Université de Paris, 526 p.

Bucheli T D y Fent K, 1995, Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in the aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci*, v. 25, p 201-268.

Buchman M F, 1999, NOAA Screening Quick Reference Tables, NOAA HAZMAT Report 99-1, Seattle WA, Coastal Protection and Restoration Division, National Oceanic and Atmospheric Administration. Disponible en: www.response.restauration.noaa.gov/cpr/sediment/squirt/squirt.html.

Bzduzek P A y Christensen E R, 2004, Source apportionment of sediment PAHs in Lake Calumet, Chicago: application of factor analysis with nonnegative constraints. *Environ. Sci. Technol.* v.,38, p 97-03.

Cajaraville M P, Bebianno M J, Cinta Porte J, Sarasquete C y Viarengo A, 2000, The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Tot. Environ.*, v.247, p 295- 311.

Calva L G B, Botello A V y Ponce Vélez G, 2005, Composición de hidrocarburos alifáticos en sedimentos de la laguna Sontecomapan, Ver., México. *Hidrobiológica* v.15 (1), p 97-108.

Calva B L G, Botello A V y Wong-Chang I, 2002, Sedimentary record of PAH in a tropical coastal lagoon from the Gulf of Mexico. *Hidrobiológica*, v.12, p 137-146.

Cantú Medellín N, 2006, Variación espacial de los indicadores del estrés oxidativo en tejidos de almeja chocolate (*Megapitaria squalida*)(Sowerby, 1835) (Bivalva:Veneridae) de Bahía de la Paz B C S, Mexico. Tesis Licenciatura UABCS, La Paz B C S, México.

Carcamo JG, Aguilar MN, Barrientos CA, Carreno CF, Quezada CA, Bustos C, Manriquez, RA, Avendano Herrera R, Yanez AJ, 2011, Effect of emamectin benzoate on transcriptional expression of cytochromes P450 and the multidrug transporters (Pgp and MRP1) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the sea lice *Caligus rogercresseyi*. *Aquaculture*, v.321, p 207–215.

Carr R L, Ho L L y Chambers JE, 1997, Selective toxicity of chlorpyrifos to several species of fish during an environmental exposure: biochemical mechanisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.16, p 2369–2374.

Carr RL, Ho LL, Chambers JE, 1997, Selective toxicity of chlorpyrifos to several species of fish during an environmental exposure: Biochemical mechanisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.16, p 2369–2374.

Carvalho S, Aline V, Sobreiro H, Araújo S De Luiz E, Espíndola G, y Narciso M, 2012, Chemosphere Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, v. 89(1), p 60–69.

Cazenave J, Bacchetta C, Parma MJ, Scarabotti PA, Wunderlin DA, 2009, Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environ Poll.* v.157, p 3025-3033.

CCME, 2001, Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life: Introduction. Updated. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.

CCPY, 2012, Comité Técnico de aguas Subterráneas para la zona metropolitana de Mérida. COTASMEY. Consejo de Cuenca Península de Yucatán, p 31.

CEQG. 2002. Summary of Existing Canadian Environmental Quality Guidelines. www.ccme.ca/assets/pdf/e1_06.pdf

Chahin A, Guiavarch Y P, Dziurla M A, Toussaint H, Feidt C, Rychen G, 2008, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56 (5), p 1780-1786.

Chambers J E, Boone J S, Carr R L, Chambers H W, y Strauss D L, 2002, Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. *Hum Ecol. Risk Assess*, v. 8, p 165-176.

Choo K S, Snoeijs P y Pedersén M, 2004, Oxidative stress tolerance in the Chumba L, Roberto S y Barrientos C., 1982, Peces dulceacuícolas, Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán, v.1, p 253-254.

Cikcikoglu N y Yildirim N, 2014, Use of acetylcholinesterase, glutathione S-transferase and cytochrome P450 1A1 in *Capoeta umbla* as biomarkers for monitoring of pollution in Uzuncayir Dam Lake (Tunceli, Turkey). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.37(3), p116

1176.

CNA, Comisión Nacional del Agua, 1998, Gerencia de Recaudación y Control. Ley Federal de Derechos en Materia de Agua. México, Febrero, 1998, p 26- 35.

CONAGUA, 2015, Servicio meteorológico nacional. <http://smn.cna.gob.mx>.

Corsi I, Mariottini M, Sensini C, Lancini L, y Focardi S, 2003, Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations. *Oceanologica Acta*, v. 26(1), p 129-138.

Curtis L R, Carpenter H M, Donohoe R M, Williams D E, Hedstrom O R, Deinzer M L, Beilstein M A, Foster E, y Gates R, 1993, Sensitivity of cytochrome P450-1A1 induction in fish as a biomarker for distribution of TCDD and TCDF in the Willamette River, Oregon. *Environmental Science & Technology*, v. 27(10), p 2149-2157.

Cutz Verdejo F, Nictelol Couoh D, Memije Canepa M, Vargas Canto MG, Rendón von Osten J, 2010, Uso de ostiones (*C. virginica*) como bioindicadores de contaminación por plaguicida organoclorados en la Laguna de Términos Campeche. *Jaina en línea*, v.21, p 55-63.

Delescluse C, Lemaire G, Rahmani R, 2000, Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? , Elsevier, *Toxicology*, v.153, p 73-82.

Delgado C, Pacheco J, Cabrera A, Batllori E, Orellana R, Bautista F, 2010, Quality of groundwater for irrigation in tropical karst environment: The case of Yucatán, Mexico. *Agricultural Water Management*, v.97, p 1423–1433.

Dhainaut A y Scaps P, 2001, Immune defenses and biological responses induced by toxicants in Annelida. *Can. J. Zool.* v. 79, p 233-253.

Doehring D.O, Butler J.H, 1974, Hydrogeologic constraints on Yucatán's development. *Science*, v.186 no.4164, p 591–595.

Dorval J, Hontela A, 2003, Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 192, p 191-200.

Dos Santos Carvalho, Aline Bernusso, Heloísa Sobreiro, Gaeta Espíndola, Narciso Fernandes, 2012, Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*, *Chemosphere.*, v.89, p 60–69.

EPA, 1981, Manual for analytical quality control for pesticides and related compounds in human and environmental samples. United States Environmental Protection Agency Second revision. EPA-600/2 81-059.

Escolero O, Marín L.E, Steinich B, Pacheco J, Cabrera A, Alcocer J, 2002, Development of a protection strategy of karst limestone aquifers: the Mérida Yucatan, Mexico case study. *Water Resour. Manage*, v. 16, p 351–367

Espinoza H M, Williams C R, Gallagher E P, 2012, Effect of cadmium on glutathione S-transferase and metallothionein gene expression in coho salmon liver, gill and olfactory tissues. *Aquat. Toxicol.* ,v.110, p 37–44,

Farrington J W, 1991, Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms, *Environ. Health Perspect.* v.90, p 75-84.

Fent K, 2004, Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology.*, v. 205, p 223-240.
filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlnneriana*. *J Exp. Mar. Biol. Ecol.* v.298, p111–123.

Flammarion P, Noury P, Garric J, 2002. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub *Leuciscus cephalus*: the fish length should not be ignored. *Environ. Pollut.* v. 120, p 325–330.

Fraga C G, Motchnik P A, Wyrobek A J, 1996, Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat. Res.* v.351, p 199–203.

Fu G H, Yang X L, Zhang H X, Yu W J, Hu K, 2011, Effects of cytochrome P450 1A substrate (difloxacin) on enzyme gene expression and pharmacokinetics in crucian carp (hybridized Prussian carp). *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 31, p 307–313.

Fu G H, Yang X Le, Zhang H, X, Yu W J, y Hu K, 2010, Effects of cytochrome P450 1A substrate (difloxacin) on enzyme gene expression and pharmacokinetics in crucian carp (hybridized Prussian carp). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 31, p 307–313

Fuentes H María Valentina, Dakdouk Surima, Rojas de Astudillo Luisa, Escalona Andrés A, Ramírez, Armando, 2012, Presencia y fuentes de hidrocarburos policíclicos aromáticos en los sedimentos superficiales del saco del Colfo de Cariaco, Venezuela *Interciencia, Asociación Interciencia Caracas, Venezuela*, v. 37(2), p 99-106.

George S G., 1994, Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish, p. 37-85. In: D.C, Malins and G.K. Ostrander (Eds.) *Aquatic Toxicology: Molecular; Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publisher, Boca Raton.

George SG, 1994, Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish, p. 37-85. In: D.C, Malins and G.K. Ostrander (Eds.) *Aquatic Toxicology: Molecular; Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publisher, Boca Raton. 520 p.

Gerritse R, Hernandez F, Murria A S, Wall- brink P J, y Brunskill G, 1995, Distributions, phosphorus and ¹³⁷Cs in sediment profiles from Ellen Brook in Western Australia. *Marine and Freshwater Research*, v.46, p 843-851.

Gluszczak L, dos Santos Miron D, Crestani M, Braga da Fonseca, M, de Araujo Pedron F, Frescura Duarte M, Pimentel Vieira V L, 2006, Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environ Safe.*, v.65, p 237-241.

Goksøyr A, Förlin L, 1992, The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, v.22, p 287- 312.

Goksøyr A, 1995, Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl*, v. 17, p 80-95.

Gold Bouchot G, Silva Herrera y Zapata Pérez O. 1995. Organochlorine pesticides residues concentration in biota and sediments from Rio Palizada, México. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.54, p 554-561.

Gold Bouchout G, Metcalfe D, Drouillard K, 2009, Contaminantes tradicionales y emergentes, un amenaza para el acuífero. En Libro de resúmenes del seminario: *Análisis de la vulnerabilidad y riesgo de la contaminación de las aguas subterráneas en la península de Yucatán* (F. Bautista *et al.*, eds), Pp 35. CIGA-UNAM, Merida, Yucatan.

Goldstone J V, Stegeman J J, 2008, Gene structure of the novel cytochrome P450D1 genes in stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and medaka (*Oryzias latipes*). *Mar. Environ. Res.*, v.66(1), p 19–20.

Graniel C E, Morris L B y Carrillo Rivera J J. 1999). Effects of urbanization on groundwater resources of Merida, Yucatan, Mexico. *Environmental Geology*, v.37(4), p 303-312.

Graniel C.E, Morris LB, & Carrillo-Rivera JJ, 1999, Effects of urbanization on groundwater resources of Merida, Yucatan, Mexico. *Environmental Geology*, v.37 no.4, p 303-312

Gravato C, Santos M A, 2002, Liver phase I and phase II enzymatic induction and genotoxic responses of beta-naphthoflavone water-exposed sea bass. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* v.52, p 62–68.

Guengerich F P, 1999. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v. 39, p 1–17.

Haasch M L, Quardokus E M, Sutherland L A, Goodrich M S, Lech J J, 1993, Hepatic Cyp1a1 induction in rainbow-trout by continuous flowthrough exposure to beta- naphthoflavone. *Fundam. Appl. Toxicol.* v.20, p 72–82.

Hahn Me, 2002, Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chemico- Biol. Interact.* v.141, p 131-160.

Haritash A K. y Kaushik, ,2009, Biodegradation Aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Journal of Hazardous Materials*, v.169, p 1-15.

Hartl M G J, Kilemade M, Sheehan D, Mothersill C, O'Halloran J, O'Brien NM, van Pelt FN, 2007, Hepatic biomarkers of sediment-associated pollution in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Mar Environ Res.*, v.64, p 191–208.

Hassanin A I H, Kaminishi Y, Mohamed M M, Zamzam H A, El Kady M A H, Itakura T, 2009, Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining expression of benzo- apyrene-Inducible cytochrome P450 1A in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Afr. J. Biotechnol.* v. 8, p 6588-6595.

Herrera Silveira, J A y Comín F A, 2000, An Introductory account of the types of aquatic ecosystems of Yucatan Peninsula (SE Mexico). Pp. 213-227, in M. Munawar, S.G. Lawrence, I.F. Munawar and D.F. Malley (eds.): *Ecovision World Monographs Series. Aquatic Ecosystems of Mexico: Status & Scope*. Backhuys Pub. Leiden, Netherlands.

Hodge S, Longley M, Booth L, Heppelthwaite V, y O'Halloran K, 2000, An evaluation of glutathione S- transferase activity in the tasmanianlacewing (*Micromus tasmaniae*) as a biomarker of organophosphate conta- mination. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.65(1), p 8-15.

Hodge S, Longley M, Booth L, Heppelthwaite V, y O'Halloran K, 2000, An evaluation of glutathione S- transferase activity in the tasmanianlacewing (*Micromus tasmaniae*) as a biomarker of organophosphate contamination. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 65(1), p 8-15.

Hoffman D J, Rattner B A, Burton G A, Cairns Jr, 2003, "Handbook of Ecotoxicology". Chelsea, Mich, USA: Lewis Publishers, p 755.

Husøy A, Myers M, Willis M, Collier T, Celander, M. y Goksøyr A, 1994, Immunohistochemical localization of CYP1A and CYP3A-like isozymes in hepatic and extrahepatic tissues of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), a marine fish. *Toxicol Appl Pharmacol.*, v.129(2), p 294-308.

INEGI, 2012, <http://www.inegi.org.mx/>

INVEMAR, 2013, <http://www.invemar.org.co/>

Jifa W, Zhiminga Y, Song X, Wang Y, 2006, Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicol Environ Saf.*, v. 65, p 230-236.

Jiménez C BE, 2001, La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. México, Limusa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México A.C, p 926

Jung J H, Kim M, Yim U H, Ha S Y, An J G, Won J H, Han G M, Kim N S, Addison, R F, Shim W J, 2011, Biomarker responses in pelagic and benthic fish over 1 year following the Hebei Spirit oil spill (Taean, Korea). *Mar. Pollut. Bull.* v. 62 (8), p 1859–1866.

Kalf FD, T. Crommentuijn y J E van de Plassche, 1997, Environmental quality objectives for 10 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 36, p 89-97.

Kamohara K, Yagi N y Itokawa Y, 1984, Mechanism of lipid peroxidation in polychlorinated biphenyl PCB and dichlorodiphenyltrichloroethane DDT-poisoned rats. *Environmental Research.*,v.324, p18-23.

Kazi TG, Arain MB, Jamali MK, Jalbani N, Afridi HI, Sarfraz RA, Baig JA, Shah AQ, 2009, Assessment of water quality of polluted lake using multivariate statistical techniques: A case study. *Ecotoxicol Environ Saf.*, v.72, p 301-309.

Kiel Martínez, 2012, Productos farmacéuticos y de cuidado personal en el acuífero y la costa de la PY. Tesis de Maestría. UNAM.

Kim J H, Hwang D S, Son K H, Raisuddin S, Ki J S, Lee J S, Han, K N, 2008, cDNA cloning and expression of a xenobiotic metabolizing cytochrome P4501A (CYP1A) from the yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* (Siluriformes). *Environ. Toxicol.*, v. 23, p 346–353.

Kim, I C, Kim Y J, Yoon Y D, Kawamura S, Lee Y S, Lee J S, 2004, Cloning of cytochrome P450 1A (CYP1A) genes from the hermaphrodite fish *Rivulus marmoratus* and the Japanese medaka *Oryzias latipes*. *Mar. Environ. Res.*, v. 58, p 25–129.

Klaasen C D y Watkins J B, 2001, Manual de Toxicología, McGraw-Hill Interamericana de Editores, S.A. de C.V.- 981 p

Koenig S y Solé M, 2012, Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. *Mar Environ Res.* V. 79, p 122-131.

Kubista M, Andrade J, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N, 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, v.27, p 95-125.

Lee y M, Williams T D, Jung S O, Lee J S, 2005, cDNA cloning and expression of a cytochrome P450 1A (CYP1A) gene from the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 51, p 769–775.

Legorreta A T y R. Sáenz Morales, 2005, Hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos de la bahía de Chetumal. In: A V Botello, JRendón-von Osten, G. Gold Bouchot y C Agraz Hernández (Eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología, p 299-310.

Li M, Ch Hu, Q Zhu, L Chen, Z Kong y Z. Liu, 2006, Copper and Zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* Livingstone D R, 1993, Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotech*, v. 57(3), p 195-211.

Lugo H J, Aceves Q JF, Espinosa P R, 1992, Rasgos geomorfológicos mayores de la Península de Yucatán, UNAM, Instituto de Geología, 10:2, p 143-150

Lukyanova O N y Khotimchenko Y S, 1995, Lipid peroxidation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis* and sea-urchin *Strongylocentrotus intermedius* during the reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.110B(2), p 371-377.

Martínez-Sámano J, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA, 2011, El glutatión y su asociación con algunas enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral, v.30(2), p 56-67, 2011.

Mather W A, y Aislabie J, 1992, Polycyclic aromatic hydrocarbons in nearshore marine sediments of Australia. *Science of the Total Environment*, v.112, p 143-164.

Matheus Medeiros P, Caruso Bicego M, 2004, Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediment using geochemical markers. II. São Sebastião, SP, Brazil. *Mar. Poll. Bull.* v.49, p 892-899.

Mayer B, John M, Heinzl B, Klatt P, Werner ER, Böhme E, 1992, Properties of Ca²⁺ regulated brain nitric oxide synthase. In: Moncada S, Marletta MA, Hibbs JB Jr, Higg EA (eds) *Biology of Nitric Oxide*, 2 Enzymology, Biochemistry and Immunology, Portland Press, London and Chapel Hill, p 4-6.

McIlwain C, Townsend D y Tew K, 2006, Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene.*, v.25, p 1639-48.

Meador J P, Stein J E, Reichert W L, Varanasi U, 1995, Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* v.143, p 79-165.

Means J, Hasset J, Wood S, Banwart W, Ali S, Khan A, 1980, Sorption properties of polynuclear aromatic hydrocarbons and sediments: heterocyclic and substituted compounds. En Bjorseth A, Dennis J (Eds.) Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Biological Effects. Batelle. Ohio, EEUU. p 395- 404.

Medina-Moreno S A, Jiménez González A, GutiérrezRojas M y Lizardi Jiménez M A, 2014, Hydrocarbon pollution in underwater sinkholes as a function of tourism development in the Mexican Caribbean. Rev. Mex. Ing. Quím. 13, p 509-516.

Mendo Pascual W L, 2014, Alternativa de biorremediación con bacterias autóctonas de sedimento contaminado de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México, Tesis, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana.

Metcalfe C D, Beddows P A, Gold Bouchot G, Metcalfe T L Li, H Van Lavieren H, 2010, Contaminants in the coastal karst aquifer system along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Mexico. Environmental Pollution, v.159, p 991-997.

Monferrán M V, Galanti LN, Bonansea RI, Amé MV, Wunderlin DA, 2011, Integrated survey of water pollution in the Suquia river basin (Córdoba, Argentina). J Environ Monit, v.13, p 398-409.

Monserat J M, Ventura Lima J, Ribas Ferreira J L, Acosta D, Longaray Garcia M, Baptista Ramos P, Barros Moraes T, dos Santos L C, Amado LL, 2008, Modulation of antioxidant and detoxification responses mediated by lipoic acid in the fish *Corydoras paleatus* (Callychthyidae). Comp Biochem Physiol. v.148, p 287-292.

MonteroTorreiro, 2000, Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*,.Tesis de Doctorado. Facultad: Farmacia, Santiago de Compostela.

Morrison H G, Weil E J, Karchner, S I, Sogin M L, Stegeman J J, 1998, Molecular cloning of CYP1A from the estuarine fish *Fundulus heteroclitus* and phylogenetic analysis of CYP1 genes: update with new sequences. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol., v.121, p 231–240.

Mortensen A S y Arukwe A, 2007, Modulation of xenobiotic biotransformation system and hormonal responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after exposure to tributyltin (TBT).

Mottier P, Parisod V y Turesky R, 2000, Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecued meat sausages by gas chromatography coupled to mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. v. 48, p 1160-1166.

Nebert D W, Gonzalez F J, 1987, P450 genes: structure, evolution and regulation, Annu Rev Biochem, v. 56, p 945-993.

Nelson D R, Koymans L, Kamataki T, Stegeman J.J, Feyereisen R, Waxman D J, Waterman M R, Gotoh O, Coon M J, Estabrook R W, Gunsalus I C, y Nebert D W, 1996, P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics, v.6, p 1–42.

Nelson D R. Koymans L, Kamataki T, 1996, P450 superfamily: update in new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics, v. 6, p 1-42.

- Newman M, 1998, Fundamentals of ecotoxicology, Sleeping Bear/Ann Harbor Press, Chelsea, MI USA, p 401
- Nilsen B M, Berg K, Goksoyr A, 1998, Induction of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish. A biomarker for environmental pollution. *Methods Mol. Biol.* v.107, p 423–438.
- Nimptsch J, Pflugmacher S, 2007, Ammonia triggers the promotion of oxidative stress in aquatic macrophyte *Myriophyllum mattogrossense*. *Chemosphere.*, v.66, p 708-714.
- Nizetto I, Lohmann R, Gioia R, Jahnke A, Temme C, Dachs J, Herckes P, 2008, PAHs in air and seawater along a north south Atlantic transect: trends, processes and possible sources. *Environ Sci Technol.* v. 42(5), p 1580-1585.
- Noreña Barroso E, Zapata Perez O, Ceja Moreno V, y Gold-Bouchot g, 1998. Hydrocarbons and organochlorine residue concentrations in sediments from bay of Chetumal, Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v 61(1), p 81-87.
- Oakes K D, Kraak G J V D, 2003, Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquatic Toxicol.* v. 63, p 447–463.
- Ochoa D M y González J F, 2008, Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Rev. Med. Vet. Zoot.* v. 55, p 115-126.
- Olajire A, Brack W, 2005, Polycyclic aromatic hydrocarbons in Niger Delta soil: contamination sources and profiles. *Int. J. Env. Sci. Technol.*, v.2, p 343-352.
- OMS, 2003: Polynuclear aromatic hydrocarbons in drinking-water. Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra (Suiza), Organización Mundial de la Salud (WHO/SDE/WSH/03.04/59).
- Orli Ski R, 2002, Multipoint moss passive samplers assessment of urban airborne polycyclic aromatic hydrocarbons: concentrations profile and distribution along Warsaw main streets. *Chemosphere.* v. 48(2), p 181-186.
- Ortiz M C, Sáenz J R y Zavala M A, 1997, Hidrocarburos aromáticos, p. 32-34. *In*: M. C. Ortiz. Estudio Emergente sobre la Mortandad de Bagres en la Bahía de Chetumal. Secretaría de Infraestructura, Medio Ambiente y Pesca, Gobierno del Estado de Quintana Roo, El Colegio de la Frontera Sur.
- Ossana N, 2011, Biomarcadores de contaminación acuática: estudios en los ríos Luján y Reconquista, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Ozcan Oruc E, Sevgiler Y, Uner N, 2004, Tissuespecific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 137, p 43-51.
- Ozcan Oruc E, Sevgiler Y, Uner N, 2004, Tissuespecific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 137, p 43-51.

Pacheco Avila J, Cabrera Sansores A, Pérez Cevallos R, 2004, Diagnóstico de la calidad del agua subterránea en los sistemas municipales de abastecimiento en el Estado de Yucatán, México. *Ingeniería*, v. 8-2, p 165-179.

Pacheco Avila J, A Cabrera Sansores, 1996, Efecto del uso de fertilizantes en la calidad del agua subterránea en el estado de Yucatán. *Ing. Hidrául. Méx.* v.11, p 53–60.

Pacheco Avila J, A Cabrera Sansores, R Pérez Cevallos, 2004, Diagnóstico de la calidad del agua subterránea en los sistemas municipales de abastecimiento en el Estado de Yucatán, México. *Ingeniería* v.8 ,no.2, p 165-179.

Pacheco Garrido G T, R. Barrientos Medina J, Navarro Alberto V, Cobos Gasca y Jaime Rendón von Osten, 2014, Evaluación temporal de la actividad enzimática de acetilcolinesterasa en el pez mosquito, *Gambusia yucatanana* (Regan 1914), provenientes de tres cenotes de Yucatán, México, p. 71-86. En: A.V. Botello, J. Rendón von Osten, J. A. Benítez y G. Gold-Bouchot (eds.). Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. UAC, UNAMICMYL, CINVESTAV-Unidad Mérida. 1176 p.

Papas A., 1999, Determinants of antioxidant status in humans. In: Papas A M, editor. Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 21–36.

Patel M R, Scheffler BE, Wang L, Willett KL, 2006, Effects of benzo(a)pyrene exposure on killifish (*Fundulus heteroclitus*) aromatase activities and mRNA. *Aquat Toxicol.*, v.77 (3), p 267-278.

Pérez Ceballos Rosela, Julia Pacheco A J, Euán A y Hernández H, 2012, Regionalization based on water chemistry and physicochemical traits in the ring of cenotes, Yucatan, Mexico, *Journal of Cave and Karst Studies*, v. 74, no. 1, p 90-102.

Pérez León S, Schmitter Soto J J, 2007, Distribución y taxonomía del género *Gambusia* (*Teleostei: Poeciliidae*) en el norte y oriente de la península de Yucatán, México, *Universidad y Ciencia*, v. 23(2), p.167-171.

Ponce Vélez G y Botello A. V, 2005, Niveles de hidrocarburos en el Golfo de México, p. 269-298. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.

Perry E, Velázquez Olimán G, Marín L, 2002. The hydrogeochemistry of the karst aquifer system of the northern Yucatan Peninsula. *México. Int. Geo.*, v. 44, p 121–221.

Peters K, Walters C, Moldowan M, 2005, *The Biomarker Guide*, Cambridge University Press: New York.

Pinto E, Sigaud K T C S, Leitao A S M, Okamoto O K, Morse D y Colepicolo P, 2003, Heavy metal-induced oxidative stress in algae, *J. Phycol.* V.39, p 1008-1018.

Puga A Ma C y Marlowe J, 2009, The aryl hydrocarbon receptor cross- talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol.*, v. 77(4), p 713-22.

Quinn P, 2012, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Illinois Department of Public Health, Retrieved from: <http://www.idph.state.il.us/envhealth/factsheets/polycyclicaromatichydrocarbons.htm>

Rabergh C M, Vrolijk N H, Lipsky, M.M., Chen, T.T, 2000, Differential expression of two CYP1A genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.165 (3), p 195–205.

Rees C B, Stephen D, McCormick J P, Vanden H y Weiming L, 2003, Quantitative PCR analysis of CYP1A induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, v.62, p 67-78.

Rees C B, Wu H y Li W, 2005, Cloning of CYP1A in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, v.246, p 11 – 23.

Regoli F y Giuliani M E, 2014, Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms, *Marine Environmental Research*, v. 93, p 106 -117.

Rendon von Osten J, Ortiz Arana A, Guilhermino L, Soares A M, 2005, In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquito fish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere*, v.58(5), p 627-636.

Ríos Sicairos J, 2004, Análisis comparativo de la condición biológica de la lisa blanca (*Mugil curema VALENCIENNES*, 1836) como indicador de estrés ambiental en dos sistemas lagunares estuarinos de la costa sureste del Golfo de California. Tesis licenciatura. Esc. Biól. Univ. Autón. Sin. 1-88

Rodríguez Fuentes G y Gold-Bouchot G, 2000, Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. *Marine Environmental Research*, v.50, p 357-360.

Rodríguez Fuentes G, Luna Ramirez K S, Soto M, Richardson K, 2012, Gene expression in caged fish as indicators of contaminants exposure in tropical karstic water bodies. *Marine Environmental Research*, v.75, p 62-66.

Rodríguez Kaizer R, Loro VL, Schetinger MRC, Morsch VM, Tabaldi LA, Rosa CS, Garcia LO, Becker AG, Baldisserotto B, 2009, NTPDase and acetylcholinesterase activities in silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Heptapteridae) exposed to interaction of oxygen and ammonia levels. *Neotrop Ichthyol.*, v.7, p 635-640.

Ronco A E, Camilion C & Manassero M, 2001, Geochemistry of heavy metals in bottom sediments from streams of the western coast of the Rio de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental Geochemistry and Health*, v: 23, p 89-103.

Sanchez W, Piccini B, Ditché JM, Porcher JM, 2008, Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environ Int.*, v.34, p 791-798.

Sanden M, Olsvik P A, 2009, Intestinal cellular localization of PCNA protein and CYP1A mRNA in Atlantic salmon *Salmo salar* L. exposed to a model toxicant. *BMC Physiol.* v. 9, p 3.

Sarasquete C y Segner H, 2000, Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Sci Total Environ.*, v. 247, p 313-32.

Scarcia P I, 2013, Biomarcadores de contaminación de teleósteos dulceacuícolas como herramienta de evaluación de ambientes acuáticos afectados por compuestos orgánicos persistentes, TESIS Doctorado, Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas.

Schlenk D, Sapozhnikova Y, Irwin M A, Xie L, Hwang W, Reddy S, Brownawell B J, Armstrong J, Montagne D, Kelly M, Kolodziej E P, Sedlak D, Snyder S, 2005, In vivo bioassay-guided fractionation of marine sediment extracts from the southern California bight, USA, for estrogenic activity. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.24, p 2820–2826.

Schlenk D, Celander M, Gallagher EP, Stephen G, James M, Kullman SW, van der Hurk P, Willett K, 2008, Biotransformation in fishes. In: Di Giulio RT y Hinton, DE (Eds). *The toxicology of fishes* Taylor & Francis Group. NY, Boca Raton, FL, p 153-234.

Schmitter Soto J J, Escobar Briones E, Alcocer J, Suárez Morales E, Elías Gutiérrez M, Marín L E, 2002, “Los cenotes de la península de Yucatán”, en G. de La Lanza y J.L. García Calderón (comps.), *Lagos y presas de México*, agt, México, p 31-35.

Schmitter Soto, J, Comín, F, Escobar-Briones, E, Herrera Silveira, J, Alcocer, J, Suárez Morales, E, Elías Gutiérrez, M, Díaz Arce, V. Marín, L, and Steinich, B, 2002, Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico): *Hydrobiologia*, v. 467, no. 1–3, p 215–228,

SECTUR,2012, Dirección General de Información y Análisis sector . gob . mx.

SEMARNAT, Marzo 2005; NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, NORMA OFICIAL MEXICANA que establece límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación.

Shimada H, Oginuma M, Hara A, Imamura Y, 2004, 9,10-Phenanthrenequinone, a component of diesel exhaust particles, inhibits the reduction of 4-benzoylpyridine and all-trans-retinal and mediates superoxide formation through its redox cycling in pig heart. *Chem Res Toxicol.*, v. 17(8), p 1145-1150.

Simoneit B.R.T, 1998, Biomarker PAHs in the environment. In Neilson, A.H. (ed.): *PAHs and related compounds*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 175-215.

Sipes IG, y Gandolfi AJ, 1991, Biotransformation of toxicants, p. 88-126. In: M.O. Amdur, J. Doull, C.D. Klaas- sen, Casarett and Doull's toxicology. Pergamon Press

Sipes, I G, y Gandolfi A J, 1991, Biotransformation of toxicants, p. 88-126. In: M.O. Amdur, J. Doull, C.D. Klaas- sen, Casarett and Doull's toxicology. Pergamon Press ,

Siroká Z y Drastichová J, 2004, Biochemical markers of aquatic environment contamination–Cytochrome P450 in fish. A review. *Act. Vet. BRNO.* v.73, p 123-132.

Soclo H, Garrigues P H, Ewald M, 2000, Origin of polycyclic aromatic hydro- carbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Mar. Pollut. Bull.* , v.40, p 387–396.

Soniassy R, Sandra P. y Schlett C, 1994, *Water Analysis: Organic Micropollutants*. En: Hewlett Packard Publication, v. 23 (5962), p 141.

Stegeman J J y Hahn M E, 1994, Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology, Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, p 87–206.

Stegeman J J y Lecht J J, 1991, Cytochrome P-450 Monooxygenase Systems in Aquatic Species: Carcinogen Metabolism and Biomarkers for Carcinogen and Pollutant Exposure. *Environmental Health Perspectives*, v.90, p 101-109.

Stien X, Amichot M, Berge J B, Lafaurie M, 1998, Molecular cloning of a CYP1A cDNA from the teleost fish *Dicentrarchus labrax*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, v.121, p 241–248.

Tevfik Dorak, 2006, *Real-Time PCR, Bios Advance Methods*, ed, Taylor&Francis, EUA, p 28-139.

Tong Y, Shan T, Poh Y K, Yan T, Wang H, Lam S H, Gong Z, 2004, Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17 beta-estradiol. *Gene*, v. 328, p 25-36.

Trute M, Gallis B, Doneanu C, Shaffer S, Goodlett D and Gallagher E, 2007, Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) *Aquatic Toxicology*, v.81, p 126–136.

Tuan T, Kaminishi Y, Funahashi A, Mohamed E A H, y Abeer A I, 2014, cDNA cloning , characterization and expression of cytochrome P450 family 1 (CYP1A) from Javanese medaka , *Oryzias javanicus* by environmental conditions, v. 13, p 1898–1909.

Valenzuela Sánchez I S, Gold-Bouchot G, y Ceja Moreno V, 2005, Hidrocarburos en agua y sedimentos de la laguna de Chelem. y puerto Progreso. Yucatán. México. p. 31 1 -328. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. De Campeche, Univ. NaL. Autón. De México. Instituto Nacional de Ecología.

Valette S N, 1993, The Use of Sediment Cores to Reconstruct Historical Trends in Contamination of Estuarine and Coastal Sediments. *Estuaries*, v.16, p 577-588.

Van der Oost R, Heida H, Opperhuizen A, Vermeulen N, 1991, Interrelationships between bioaccumulation of organic tracepollutants (PCBs, OCPs and PAHs), and MFO-induction in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* v. 100c, p 43-47.

Van der Oost, R, Beyer J, Vermeulen, 2003, Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 3(2), p 57-149.

Vermeulen N P, Donné Op den Kelder, Commandeur J N M, 1992, Formation of and protection against toxic reactive intermediates. In: Testa, B., Kyburz, E., Fuhrer, W., Giger, R. (Eds.), *Perspectives in Medicinal Chemistry*. Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel, p 573-593

Viguli J, Carrier G, Irabien A, 2002, Environmental assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of Santander Bay, Northern Spain. *Chemosphere*, v. 48, p 157-165.

Wedemeyer G A y McLeay D J, 1981, Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors, Pickering Ed. Stress and Fish. Academic press inc. London, p 247-275.

WHO, 1986. Organophosphorus insecticides: a general introduction. Environmental Health Criteria No. 63. IPCS/WHO. Geneva

Whyte J J, Jung R E, Schmitt C J, Tillitt D E.,2000, Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. Crit Rev Toxicol., v. 30(4), p 347-570.

Wilcke W, Krauss M, Safronov G, Fokin AD, Kaupenjohann M, 2005, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils of the Moscow Region - Concentrations, temporal trends and small scale distribution. Journal of Environmental Quality., v.34(5), p1581-1590.

Wild S R y Jones K C, 1995, Polynuclear aromatic hydrocarbons in the UK environment: a preliminary source inventory and budget. Environ. Pollut. v. 88, p 91-10.

Witt G, 1995, Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of the Baltic sea. Marine Pollution Bulletin, v. 1, p 237-248.

Wong M, Medrano J, 2005, Review: Real-Time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques*, v.39, p 1-11.

Wu H Gao, C Guo Y, Zhang Y, Zhang J, y Ma, E. , 2014, Acute toxicity and sublethal effects of fipronil on detoxification enzymes in juvenile zebrafish (*Danio rerio*), v.115, p 9–14.

Yunker M B, Macdonald R W, Vingarzan R, Mitchell RH, Goyette D, Sylvestre S, 2002, PAHs in the Fraser River basin: A critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. Organic Geochemistry, v.33, p 489-515.

Zapata Pérez O, Gold-Bouchot G, Ortega A, López T, y Albores A, 2002, Effect of pyrene on hepatic cytochrome P450 1A (CYP1A) Expresión in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Arch. Environ. Contam. Toxicol, v. 42, p 477-485.

Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J y Jiang G, 2008., Bio monitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. Analytica Chimica Acta, v.606, p 135-150.

XIV. ANEXOS

ANEXO I: Morfometría de peces colectados en los sitios de muestreo y grupo control.

E6-CL	L.T							
Temporada	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15
Gambusia	L.T		L.P		A		SEXO	
1	2.6	3.4	2.1	2.6	0.4	0.7	Macho	Hembra
2	2.9	2	1.9	1.6	0.3	0.4	Hembra	Hembra
3	2.3	2.4	2.1	1.9	0.4	0.4	Macho	Macho
4	2.3	2.5	1.7	2	0.4	0.6	Macho	Hembra
5	2.2	3.5	1.8	2.7	0.4	0.6	Macho	Hembra
6	2.3	1.6	1.8	1.3	0.4	0.6	Macho	J
7	3.2	2.1	2.1	1.6	0.6	0.3	Hembra	J
8	3	1.9	2.4	1.5	0.7	0.3	Hembra	J
9	2.6	1.9	2.1	1.5	0.5	0.3	Hembra	J
10	2.6	1.6	1.8	1.3	0.4	0.3	Hembra	J
Promedio	2.6	2.29	1.98	1.8	0.45	0.45	5:5	J
DS	0.32	0.64	0.20	0.48	0.11	0.15		
E9-CL	San Antonio Mullix							
Temporada	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15
Gambusia	L.T		L.P		A		SEXO	
1	4	2.7	3.7	2.2	1	0.6	Hembra	Macho
2	3.5	2.6	2.8	2.3	0.6	0.6	Macho	Macho
3	3	2.7	2.5	2.2	0.5	0.6	Macho	Hembra
4	3	3.4	2.4	2.8	0.5	0.6	Macho	Hembra
5	3.4	2.8	2.8	2.3	0.8	0.6	Hembra	Macho
6	3	2.8	2.4	2.1	0.9	0.5	Macho	Macho
7	2.5	2.2	2.0	1.8	0.5	0.5	Macho	Hembra
8	3	2.4	2.4	1.9	0.5	0.4	Macho	Macho
9	2.6	3.5	2.1	2.9	0.4	0.7	Macho	Macho
10	2.9	3.4	2.3	2.9	0.4	0.7	Macho	Macho
Promedio	3.09	2.85	2.54	2.34	0.61	0.58	9:1	7:3
DS	0.42	0.42	0.46	0.38	0.20	0.09		
10-CL	Yaxcopoil							
Temporada	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15
Gambusia	L.T		L.P		A		SEXO	
1	4.7	3.2	3.8	2.6	1.3	0.7	Hembra	Macho
2	2.3	3.4	1.9	2.5	0.5	0.7	Macho	Macho
3	4.2	3.5	3.7	2.6	0.8	0.6	Hembra	Macho
4	4	3.3	3.1	2.6	0.9	0.9	Hembra	Macho
5	4.8	2.8	3.9	2	1.2	0.4	Hembra	Macho
6	3.6	3.1	2.8	2.6	0.9	0.6	Hembra	Macho

7	3.7	3.1	2.9	2.5	0.8	0.6	Macho	Macho
8	2.9	2.9	2.3	2.4	0.5	0.6	Macho	Macho
9	2.7	5	2.2	4.1	0.7	1.1	Macho	Hembra
10	2.5	5	2	3.9	0.4	1.3	Hembra	Hembra
Promedio	3.54	3.53	2.86	2.78	0.8	0.75	4:6	8:2
DS	0.86	0.76	0.72	0.64	0.28	0.26		
13-CUZ	Nah-Yah							
Temporada	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15
Gambusia	L.T		L.P		A		SEXO	
1	6.6	3.5	5.5	2.9	1.6	0.5	Hembra	Macho
2	4.1	6.4	3.6	5.3	1	1.6	Macho	Hembra
3	3.6	5.1	2.9	4.2	0.7	1.2	Macho	Hembra
4		3.4		2.7		0.7		Macho
5		3.2		2.6		0.7		Hembra
6		6.6		5.4		1.9		Hembra
Promedio	4.76	4	3.85	1.1	1.1	0.45	2:1	2:4
DS	1.31	1.42	1.10	1.18	0.37	0.51		
E19-CUZ	Yaxbacantún							
Temporada	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15
Gambusia	L.T		L.P		A		SEXO	
1	3.9	3.2	3.4	2.7	0.9	0.6	Hembra	Macho
2	3.7	3.1	3.3	2.8	0.9	0.5	Hembra	Macho
3	3	3.9	2.4	3.2	0.4	0.8	Hembra	Macho
4	3.1	3.6	2.7	2.9	0.5	0.7	Macho	Macho
5	3.6	4.5	3.4	3.7	0.9	0.9	Hembra	Macho
6	2.8	4.3	2.3	3.6	0.5	1	Macho	Macho
7	2.7	3.7	2.2	3.4	0.4	0.7	Macho	Macho
8	3.5	3.6	2.8	3	0.7	0.7	Macho	Macho
9	3.1	3.2	2.6	2.7	0.6	0.6	Macho	Hembra
10	3	3.5	2.5	2.7	0.5	0.7	Hembra	hembra
Promedio	3.24	3.66	2.76	3.07	0.63	0.72	5:5	8:2
	0.39	0.44	0.43	0.36	0.20	0.14		
E22-BUX	Chen Vázquez							
Temporada	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15
Gambusia	L.T		L.P		A		SEXO	
1	3.3	3.1	2.7	2.7	0.6	0.5	Hembra	Macho
2	2.8	3.2	2.3	2.7	0.5	0.7	Hembra	Macho
3	3.5	2.8	2.9	2.6	0.7	0.4	Macho	Macho
4	3.5	2.7	3	2.5	0.7	0.6	Hembra	Macho
5	3	2.8	2.6	2.5	0.5	0.5	Macho	Macho
6	2.9	3.1	2.4	2.6	0.4	0.6	Macho	Hembra
7	2.6	3.2	2.2	2.7	0.4	0.8	Macho	Hembra

8	2.8	2.6	2.5	2.4	0.4	0.6	Macho	Hembra
9	3.1	2.6	2.6	2.2	0.6	0.5	Macho	Macho
10	3	2.9	2.5	2.4	0.6	0.5	Macho	Macho
Promedio	3.05	2.9	2.57	2.53	0.54	0.57	7:3	7:3
DS	0.29	0.22	0.24	0.16	0.11	0.11		
E25-DZ	Rancho Xlabón							
Temporada	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15	May15	Oct15
Gambusia	L.T		L.P		A		SEXO	
1	3	2.7	2.3	2.1	0.6	0.4	Macho	Macho
2	2.5	2.6	2.2	2.1	0.5	0.5	Macho	Macho
3	2.6	2.3	2.1	1.8	0.5	0.3	Macho	Macho
4	2.8	2.6	2.4	2.2	0.5	0.4	Macho	Macho
5	3.3	3.4	2.7	2.7	0.6	0.8	Macho ¿?	Macho
6	2.4	2.5	1.8	2.1	0.4	0.4	Macho	Macho
7	3	2.4	2.5	2	0.6	0.4	Macho	Hembra
8	3.6	2.4	2.9	1.9	0.8	0.4	Macho ¿?	Hembra
9	2.7	2.3	2.2	1.9	0.4	0.4	Macho	Hembra
10	3	2	2.6	1.8	0.6	0.3	Hembra	Macho
11		3.2		2.8		1.7		Macho
Promedio	2.89	2.58	2.37	2.13	0.55	0.55	9:1	8:3
DS	0.35	0.39	0.30	0.32	0.11	0.39		

CONTROL				
Gambusia	LT	LP	A	SEXO
1	3	2.5	0.8	4:2
2	3.6	2.8	0.9	
3	2.8	2.4	0.7	
4	5	4.2	1.2	
5	4.5	3.8	1.2	
6	2.5	2	0.4	
Promedio	3.57	2.95	0.87	
DS	0.91	0.79	0.28	

ANEXO II. Protocolo de Extracción de RNA con GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit #030M6040.

Protocolo para tejido estabilizado con RNA later

Se usó músculo de *Gambusia yucatanana*.

1. Agregar al tubo correspondiente 500 µl de solución de lisis previamente preparada con 2-mercaptoetanol y mezclar hasta que no queden pedazos visibles de tejido (agregar 10µl de 2-mercaptoetanol por cada 1ml de solución de lisis)
2. Transferir el homogeneizado a un tubo Gen Elute Filtration (tubo azul)
3. Centrifugar a 11000 rpm por 2 minutos o hasta que pase todo el líquido. Tirar la columna de filtración, quedarse con el tubo que contiene el líquido.
4. Agregar 500µl de etanol (grado biología molecular) al 70% al filtrado y agitar con vortex fuertemente.
5. Transferir 700µl de la solución (homogeneizado con reactivos) a una columna Gen Elute Binding Column (transparente con un O-ring rojo).
6. Centrifugar a 11000 rpm por 15 segundos. Tirar el sobrenadante del tubo colector y colocar nuevamente la columna
7. Si falta más volumen por transferir, repetir el paso 6 y 7
8. Agregar 500µl de Wash Solution I previamente preparado con etanol. Centrifugar a velocidad máxima por 15 segundos. Tirar el líquido del tubo colector y colocar de nuevo la columna.
9. Agregar 500µl de Wash Solution II y centrifugar a máxima velocidad por 30 segundos. Desechar el líquido del tubo colector y colocar de nuevo la columna en el tubo colector. Repetir este paso centrifugando por 2 min.
10. Transferir la columna a un nuevo tubo nuevo de 1.5ml y colocarlo en el concentrador durante 4 min a 30°C o dejarla a temperatura ambiente por 10min, para evaporar los residuos de etanol.
11. Agregar 50µl de solución para eluir (Elute solution), centrifugar a 11000 rpm por 2 minuto
12. El RNA ya está listo en el sobrenadante. Es muy importante ponerlo en hielo mientras se usa o guardarlo a -80 °C para su posterior cuantificación y uso.

ANEXO III. Protocolo para la Cuantificación de RNA mediante espectrofotómetro Nanodrop 2000c

1. Para comenzar, limpiar las superficies ópticas superiores e inferiores del sistema de espectrofotómetro con agua desionizada.
2. Cerrar el brazo de palanca, asegurando que el pedestal superior entra en contacto con el agua destilada. Levante el brazo de palanca y limpie tanto las superficies ópticas con un paño limpio, seco y sin pelusa, un paño de laboratorio.
3. Abrir el software NanoDrop y seleccione la aplicación de ácidos nucleicos. Utilice un pequeño volumen, pipeta calibrada para realizar una medición en blanco mediante la supresión de un l de tampón sobre la superficie óptica inferior. Bajar el brazo de palanca y seleccione "En blanco" en la aplicación de ácido nucleico.
4. Una vez que la medición en blanco es completo, limpiar las superficies ópticas con un paño limpio, seco y sin pelusa, un paño de laboratorio.
5. Elegir la constante apropiada para la muestra que se va a medir, en este caso ARN-40.
6. El software calcula automáticamente la concentración y pureza
7. Se colocó 1µl de muestra para cada medición y se obtuvo la concentración en ng/µL.

ANEXO IV: Protocolo de retrotranscripción con cDNA síntesis iScript™ Kit de 170-8890.

El uso de este kit es sumamente ventajoso pues cuenta con todos los reactivos necesarios para realizar la retrotranscripción, además de que se realiza en un solo paso. Los reactivos ya vienen listos, no se necesita prepararlos ni adicionar nada extra. Se deben mantener en congelación, a -20°C Se preparan de acuerdo a lo siguiente:

Componente	Volumen por reacción
5x iScript reaction mix	4µL
Agua libre de nucleasas	xµL
RNA	xµL
Volumen final	20µL

xµL = se calcula de acuerdo a la concentración de RNA cuantificado y de acuerdo a la concentración a la cual se quiera retrotranscribir en ng.

Protocolo de reacción:

5 minutos a 25°C

30 minutos a 42°C

5 minutos a 85°C

Guardar a -20°C hasta su uso posterior.

ANEXO V. Protocolo para determinar actividad AChE por método de Ellman.

Preparación de reactivos:

- Buffer tris pH 7 0.05M: Pesar 0.774g de reactivo Tris 7.0 en 100mL de agua destilada.
- DTNB/Buffer Tris pH 7.4 0.05M: Pesar 0.758g de reactivo disuelto en 10mL de agua destilada. Pesar 0.0099g de reactivo DTNB y disolver en 100mL de buffer Tris pH 7.4 previamente preparado.
- Ioduro de Acetilcolina (ASChI): Pesar 0.0578g de reactivo ASChI y disolver en 10mL de agua destilada.

Procedimiento:

1. Cada muestra de tejido muscular se pesó en una balanza analítica para ser homogenizado con buffer tris pH 7.0 (0.05 M) (1mL de buffer por cada 75mg de muestra). Los tejidos fueron homogenizados en hielo con un homogenizador Potter-Elvehjem. El homogenizado se centrifugó a 10000 rpm x 10 minutos, el sobrenadante fue separado y recolectado en un tubo limpio.

2. Colocar 20 μ L de muestra en un pozo de microplaca, adicionar 170 μ L de DNTB/Tris Buffer pH 7.4.
3. Antes de la lectura, se adicionan 10 μ L del sustrato de acetilcolina lo más rápido posible.
4. Leer en el lector de placas multimode a una absorbancia de 405nm, con cinética de 20 ciclos cada 17segundos.
5. Obtención de proteína por el método Bradford

$$\text{Calculo de actividad enzimática : } \frac{1}{10000} * \frac{\frac{\Delta\text{Abs}}{\text{min}}}{(\text{Vh}/\text{Vt}) * \text{CP}}$$

Donde $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ = pendiente de la cinética obtenida directamente de la absorbancia.

Vh/Vt = volumen de la muestra entre el volumen total de la reacción en μL .

CP = Valor de proteína en mg/mL .

ANEXO VI. Protocolo contenido de proteínas por Bradford.

1. Se calcula el contenido proteico a partir de una curva de calibración, basada en diferentes concentraciones de proteína estándar (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
2. A partir de la muestra ya homogenizada, se toman 10 μ L.
3. Se carga la microplaca con 10 μ L para los valores de la curva, y los 10 μ L de muestra a calcular (por triplicado).
4. Se adicionan 175 μ L del reactivo de Bradford® a temperatura ambiente.
5. Mediante agitación leve se dejan incubar por 10 minutos.
6. Leer a una absorbancia de 595nm en el lector de multiplacas.
7. De los valores promedio de los estándares se realiza una curva de calibración, estos valores en el eje X y se obtiene línea de tendencia con ecuación y R^2 .
8. Sustitución de los valores x de la ecuación de la curva para la obtención de concentraciones en $\mu\text{g}/\text{mL}$.

ANEXO VII. Protocolo para actividad enzimática de GST (kit Sigma CS04)

Preparación de reactivos:

- Glutati3n reducido 200mM: pesar 246mg de L-glutati3n y disolver a un volumen final de 4mL. Mantener soluci3n en hielo, esta es estable muchos meses si se conserva en al3cuotas a -20°C.
- Buffer de fosfatos salino pH 7.4: Disolver el contenido de un sobre de buffer de fosfatos en un litro de agua destilada.
- CDNB 100mM: pesar 0.2025g de CDNB y disolver en 10mL de etanol. Dividir en al3cuotas y mantener a -20°C.

Procedimiento:

1. Buffer de fosfatos y el CDNB deben estar a temperatura ambiente.
2. Se prepara una soluci3n master de trabajo, debe ocuparse en el transcurso de 1 hora m3ximo despu3s de su preparaci3n:

Reactivo	Cantidad
Buffer de fosfatos	19.6mL
Glutati3n reducido 200mM	200μL
CDNB 100mM	200μL

3. Se colocan 20μL de muestra previamente homogenizada con buffer tris pH7 y centr3fugada.
4. Agregar 180μL de la soluci3n de trabajo para completar un volumen de 200μL.
5. Leer en el lector de placas multimode a una absorbancia de 340nm, con cin3tica de 6minutos cada 30segundos.
6. Calcular el cambio de absorbancia por minuto en el intervalo lineal de la gr3fica, para la muestra y para el blanco.
7. Restar la pendiente del blanco de las muestras.
8. Obtenci3n de prote3na por el m3todo Bradford.
9. Calcular la actividad espec3fica de GST con la siguiente formula:

$$\frac{(\Delta A_{340}) / \text{min} \times V(\text{ml}) \times \text{dil}}{\epsilon_{mM} \times V_{enz}(\text{ml})} = \mu\text{mol} / \text{ml} / \text{min} \times \text{CP}$$

D3nde:

dil= factor de diluci3n de la muestra original.

ϵ_{mM} = es el coeficiente de extinci3n del CDNB a 340nm para una placa de 96 pozoa es 9.6.Mm

V=volumen de reacci3n

Venz= volumen de la muestra utilizado

CP= concentraci3n de prote3na en mg/mL.

ANEXO VIII. Protocolo para determinar Glutación Total (kit Sigma CA0260).

Preparación de reactivos:

- Solución DTNB (1.5mg/mL): A 8mg de DTNB agregar 5.33mL de DMSO. Esta solución puede guardarse en alícuotas a -20°C por lo menos 3 meses.
- Solución de NADPH (40mg/mL): Disolver el contenido de un vial de NADPH (25mg) en 0.625mL de agua destilada. La solución puede guardarse en alícuotas a -20°C por lo menos 6 meses.
- Solución de ácido sulfosalicílico 5% (SSA): Disolver 2.5g de SSA en 50mL de agua destilada. Mantener a 2-8°C
- Glutación (GSH) solución estándar 10mM: Disolver 3mg del estándar en 1mL de agua. La solución puede ser almacenada a -20°C por lo menos 3 meses.
- Buffer de ensayo 5x: 500mM de buffer de fosfato de potasio pH 7 contenido en 5mM de EDTA.

Preparación de soluciones de trabajo:

Los volúmenes presentados son suficientes para 48 reacciones de 200µL en placa de 96 pozos.

- Buffer de ensayo 1x (12mL), 100mM buffer de fosfato de potasio pH 7 con EDTA 1mM: Diluir 2.4 de buffer de fosfatos 5x agregando 9.6mL de agua.
- Solución de enzima: diluir 8 µL de enzima en 500µL de buffer de ensayo 1x previamente preparado.
- Solución de NADPH (0.16mg/mL): Agregar 10 µL de la NADPH (40mg/mL) a 2.5mL de buffer de ensayo 1x.
- Solución de trabajo (8mL): a 8mL de buffer de ensayo 1x agregar 228µL de la solución diluida de enzima y 228µL de la solución de DTNB (1.5mg/mL), mezclar con vortex. Esta solución se mantiene viable 3 horas a temperatura ambiente.
- Soluciones estándar de glutación : Diluir la solución de GSH (10mM) 200 veces a 50µM con SSA 5%, para la preparación de la curva :

- 1: 5 µL GSH + 995µL de SSA 5%,
- 2: 300µL de 1 + 300µL de SSA 5%,
- 3: 300µL de 2 + 300µL de SSA 5%,
- 4: 300µL de 3 + 300µL de SSA 5%
- 5: 300µL de 4 + 300µL de SSA 5%

Procedimiento:

1. Se colocan 10µL de muestra previamente homogenizada con buffer tris pH7 sin centrifugar, 10µL para los estándares y 10µL blanco (SSA 5%) en la microplaca.
2. Agregar 150µL de la solución de trabajo para completar un volumen de 160µL.
3. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación.

4. Poner el lector de placas multimode en una absorbancia de 405nm, con cinética de 2 minutos con intervalos de 17 segundos.
5. Antes de realizar las lecturas colocar 50µL de NADPH(0.16mg/mL), para completar un volumen final de 200µL.
6. Calcular el cambio de absorbancia por minuto en el intervalo lineal de la gráfica, para la muestra y para el blanco.
7. Usar los valores de glutatión estándar para realizar una curva de calibración y determinar el equivalente a 1nmol de glutatión reducido.
8. Calcular los nmoles de GSH en las muestras con al siguiente formula:

$$GLUTATION = \frac{\Delta Abs_{405}/min \times dil}{\Delta Abs_{405}/min(1nmol) \times vol \times CT}$$

Dónde:

dil= factor de dilución de la muestra original.

$\Delta Abs_{405}/min$ = el cambio de absorbancia por minuto en el intervalo lineal

$\Delta Abs_{405}/min$ 1nmol= el cambio de absorbancia por minuto en el intervalo lineal para 1nmol de GSH

V=volumen de reacción

CT= concentración de tejido en mg/mL.

ANEXO IX. Protocolo para determinar Lípidos Peroxidados por método FOX (kit peroxidetect Sigma).

Preparación de reactivos:

- Reactivo de color: 480 μ moles de hidroxitolueno butilado (0.1058g), 15 μ moles de naranja de xilenol (0.0100g), agregar 120mL de metanol al 90% (108mL de metanol con 12mL de agua destilada).
- Reactivo de Sulfato de Amonio Férrico (SAF): SAF 25mM en ácido sulfúrico 2.5M: 0.049g de SAF en una mezcla de 6mL de ácido sulfúrico más 6mL de agua destilada.
- Trifenilfosfina 100Mm (TPP): pesar 0.03934g de TPP y disolver en 3mL de metanol.
- Ter-butil hidroperóxido (TBOOH) 200 μ M: Diluir la solución al 70% con metanol 7 veces para preparar una solución 1M. Diluir esa solución 3 veces en metanol para preparar una solución 1mM, de esa diluirla 5 veces para llegar a la concentración 200 μ M.

Procedimiento:

1. Preparar reactivo formador de color: mezclar 100 volúmenes de reactivo de color con 1 volumen de reactivo de SAF.

2. Preparar curva de calibración:

μ L de solución 200 μ M TBOOH	μ L de metanol	nmol por volumen
0	100	0
5	95	1
10	90	2
20	80	4
40	60	8
60	40	12
80	20	16

3. En tubos ependdorf colocar hasta 100 μ L de muestra. Llevar el volumen a 100 μ L con metanol. Hacer lecturas por duplicado agregando a la muestra 10 μ L de solución de TPP. Hacer un blanco de TPP el cual tendrá el reactivo de color de trabajo para corregir la absorbancia.

Muestra μL	Metanol μL	TPP μL
80	20	0
80	0	20
BLANCO TPP	80	20

4. Agregar 1 mL de reactivo de color de trabajo a cada tubo y mezclar incubar a temperatura ambiente 1 hora hasta que la formación de color sea completa.
5. Leer cada estándar y cada muestra a 560nm en un espectofotometro uv-visible utilizando metanol al 90 o 100% como referencia. Si la señal es muy alta se puede leer la absorbancia de la solución a 590nm.
6. Hacer una curva de nmol de TBOOH contra Abs 560nm y calcular los nmoles de peróxido en la muestra

$$\frac{\text{Abs}_{560}(\text{muestra}) - \text{Abs}_{560}(\text{blanco}) * \text{dil}}{\text{Abs}_{560}(1\text{nmol peróxido}) * \text{vol}}$$

ANEXO X. Curva de calibración de Sedimentos.

Curva de calibración siguiendo el procedimiento analítico para cuantificar.

Se preparan estándares para hidrocarburos alifáticos deuterado (Tetracosano d50), PAHs deuterados (Acenaftenod50, Fenantrenod10 y Crisenod12) y esteroides (colesterol-d6)

Se quieren evaluar las siguientes concentraciones dentro de la curva de calibración:

Punto Curva	C (ppm)	Masa (μg)
A	0.1	0.2
B	0.3	0.6
C	0.5	1
D	0.8	1.6
E	1	2
F	2	4
G	5	10
H	10	20

Considerando que en la técnica se analizan 2 g de sedimento y teniendo en cuenta que $1 \text{ ppm} = 1 \mu\text{g/g}$, entonces, una concentración de 1 ppm equivaldría a agregar una masa de $2 \mu\text{g}$, es decir $1 \mu\text{g}$ por cada gramo analizado.

Los diferentes puntos de la curva de calibración, se van a preparar a partir de soluciones de trabajo que contienen los analitos que se quieren cuantificar, dichas soluciones se prepararán a partir de soluciones madre con las que se cuenta: una de alifáticos de $1000 \mu\text{g/mL}$, una de PAHs de $500 \mu\text{g/mL}$. Para los esteroides, se empleará la solución de trabajo MixA, cuya preparación se detalló anteriormente.

Las soluciones de trabajo de hidrocarburos alifáticos y aromáticos se prepararán de acuerdo a los siguientes cálculos:

	C1 ($\mu\text{g/mL}$)	C2 ($\mu\text{g/mL}$)	V1 (mL)	V2 (mL)
PAH's	2000	50	0.125	5
Alifáticos	1000	50	0.25	5

Una vez preparadas las soluciones de trabajo de $50 \mu\text{g/mL}$ de cada grupo de compuestos, se agregará el volumen requerido a cada muestra para alcanzar la masa deseada de acuerdo a la siguiente tabla (tomando en cuenta que por cada μL agregado de la solución de $50 \mu\text{g/mL}$, se agregan $0.05 \mu\text{g}$ de masa):

Punto Curva	C (ppm)	Masa (μg)*	Vol. Std Alif (μL)	Vol. Std PAHs (μL)	Vol. MixA Esteroles (μL)
A	0.1	0.2	4	4	4
B	0.3	0.6	12	12	12
C	0.5	1	20	20	20
D	0.8	1.6	32	32	32
E	1	2	40	40	40
F	2	4	80	80	80
G	5	10	200	200	200
H	10	20	400	400	400

NOTA: En el caso del B-Sitosterol las concentraciones de cada punto de la curva serán las siguientes:

Punto Curva	C (ppm)	Masa (μg)*
A	0.02	0.04
B	0.06	0.12
C	0.1	0.20
D	0.16	0.32
E	0.2	0.40
F	0.4	0.80
G	1.0	2.0
H	2.0	4.0

Estándares surrogados

Los estándares empleados como surrogados (Alifático deuterado, PAHs deuterados y colesterol-d6) se agregarán a todos los puntos de la curva en una concentración fija de 1 ppm.

El estándar de colesterol-d6 se encuentra a la concentración deseada de 50 ppm, los estándares de PAHs deuterados y alifático deuterado se preparan a partir de una solución de 500 µg/mL y de 1000 µg/mL respectivamente.

Las soluciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos se prepararán de acuerdo a los siguientes cálculos:

	C1 (ug/mL)	C2 (ug/mL)	V1 (mL)	V2 (mL)
PAH's	500	50	0.5	5
Alifaticos	1000	50	0.25	5

Una vez preparadas las soluciones de trabajo de 50 µg/mL de cada uno de los estándares surrogados, se agregará el volumen requerido a cada muestra para alcanzar la concentración previamente establecida de 1 ppm.

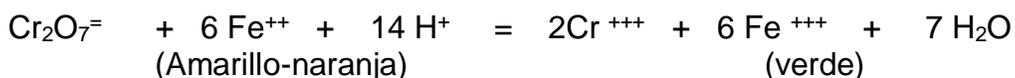
Punto Curva	C (ppm)	Masa (µg)*	Vol. Std Alif (µL)	Vol. Std PAHs (µL)	Vol. MixA Esteroles (µL)
A	1	2	40	40	40
B	1	2	40	40	40
C	1	2	40	40	40
D	1	2	40	40	40
E	1	2	40	40	40
F	1	2	40	40	40
G	1	2	40	40	40
H	1	2	40	40	40

ANEXO XI. Determinación de Materia orgánica por método Walkley-Black

El método de oxidación húmeda de Walkley-Black se fundamenta en la siguiente ecuación de óxido-reducción:



La determinación consiste en la oxidación del carbono orgánico presente en la muestra por una mezcla oxidante de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), acelerada por el calor de dilución del H_2SO_4 en agua. El carbono orgánico reduce los iones Cr^{6+} amarillo - naranja del dicromato inicial a iones Cr^{3+} de color verde.



Reactivos

Solución de dicromato de potasio 1 N: Disolver 12.35 g de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en agua y aforar a 250 mL.

Ácido sulfúrico concentrado. Agregar 1.25 g de sulfato de plata por cada 100 mL de ácido sulfúrico para evitar interferencias debidas a la presencia de cloruros

Ácido fosfórico concentrado.

Indicador de difenilamina. Disolver alrededor de 0.5 g de difenilamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{NH}$) grado reactivo en 20 mL de agua destilada y 100 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Solución de sulfato ferroso 1 N: Disolver 278 g de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en agua; agregar 15 mL de ácido sulfúrico concentrado y diluir a un litro. Esta solución de sulfato ferroso debe valorarse para obtener el factor F para la realización de los cálculos.

. Procedimiento

A) Tamizado de los sedimentos y determinación de la cantidad de muestra necesaria.

- a. Secar la muestra de sedimento y tamizarla a través de una malla de 0.5 mm.
- b. Pesar entre 0.2 y 1.0 g de sedimento seco y tamizado. La cantidad adecuada de sedimento solamente puede ser estimada a partir del conocimiento que se tenga sobre el área bentónica estudiada. En la práctica, una alícuota de aproximadamente 1 g es conveniente; sin embargo, si el contenido de materia orgánica es muy alto, se reducirá todo el dicromato sin quedar un exceso para titular. Esta situación será evidente ya que al agregar el indicador la solución vira al color terminal (verde). Para este caso, así como si no se gasta más de 1 mL de la solución de sulfato ferroso durante la titulación, deberá reducirse a la mitad la cantidad de sedimento usada. Si por el contrario, se usan más de 9 mL de sulfato ferroso en la titulación, deberá duplicarse la cantidad de sedimento usada.
- c. Colocar el sedimento pesado en una matraz Erlenmeyer de 500 mL, anotando en la libreta de laboratorio el peso exacto de sedimento usado en cada muestra. Cada muestra se analizará por DUPLICADO.

B) Determinación del contenido de materia orgánica total de las muestras:

- a. Agregar 10 mL de la solución de dicromato de potasio.
- b. Agregar 20 mL de ácido sulfúrico concentrado con sulfato de plata. El ácido se debe agregar cuidadosamente ya que la reacción es exotérmica, evitando aspirar los vapores que se desprenden. De preferencia este paso debe realizarse en una campana de extracción.
- c. Agitar cuidadosamente en forma circular la mezcla durante un minuto, evitando que el sedimento se adhiera a las paredes del matraz.
- d. Dejar reposar durante 30 minutos, agitando de vez en cuando.
- e. Agregar 200 mL de agua destilada y mezclar.
- f. Agregar 10 mL de ácido fosfórico y mezclar.
- g. Agregar 1 mL del indicador de difenilamina y mezclar.
- h. Titular con sulfato ferroso 1 N empleando una bureta. La solución adquiere un color oscuro (generalmente azul marino oscuro) inicialmente: el punto final se da cuando la solución vira a color verde.

C) Procesamiento del blanco para calcular el factor F (Valoración del sulfato ferroso):

Estandarizar siguiendo exactamente el mismo procedimiento antes descrito, pero sin agregar sedimento (blanco). A partir de volumen de sulfato ferroso utilizado en la titulación del blanco, se calcula en factor F que se empleará para conocer el contenido de carbono orgánico de las muestras.

D) Cálculos.

Los cálculos se realizarán considerando que 1 mL de dicromato es equivalente a 3 mg de carbono:

$$\text{Carbono orgánico (\%)} = \frac{[10 - (V_2 * F)] \times 0.3}{\text{gramos de sedimento}}$$

donde V_2 = Volumen de sulfato ferroso usado en la titulación y F = Factor.

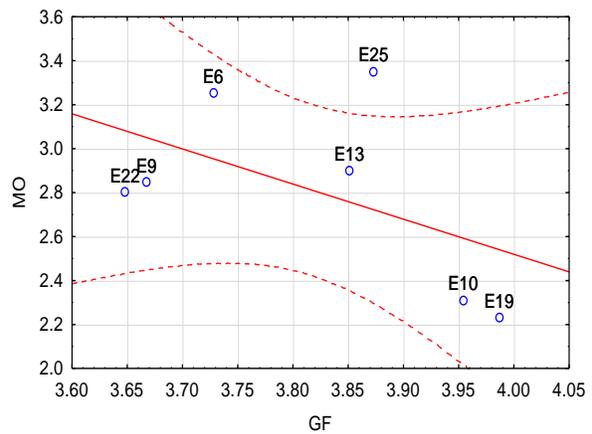
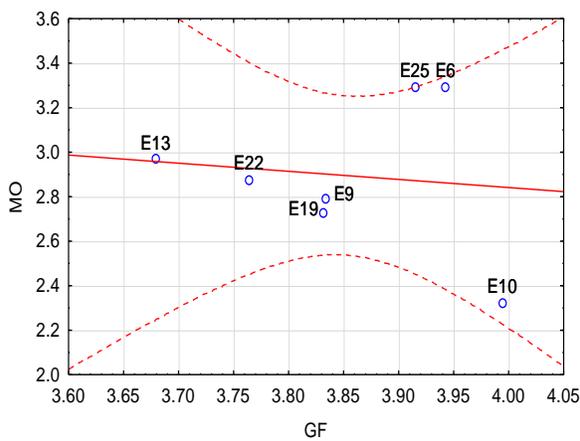
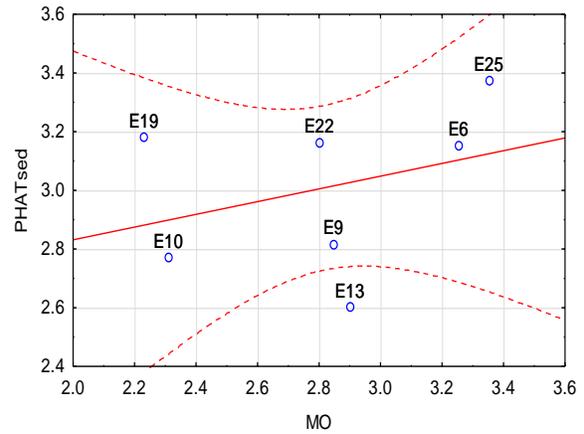
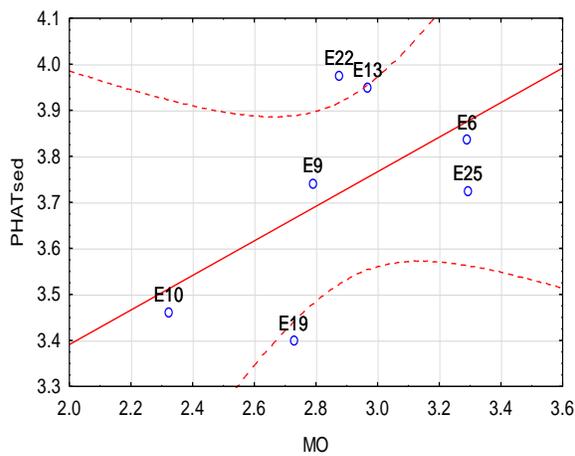
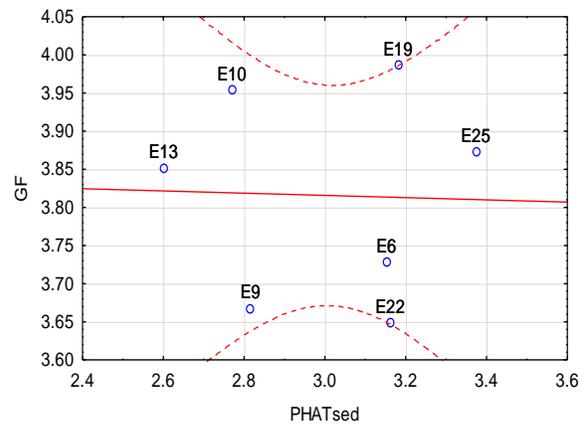
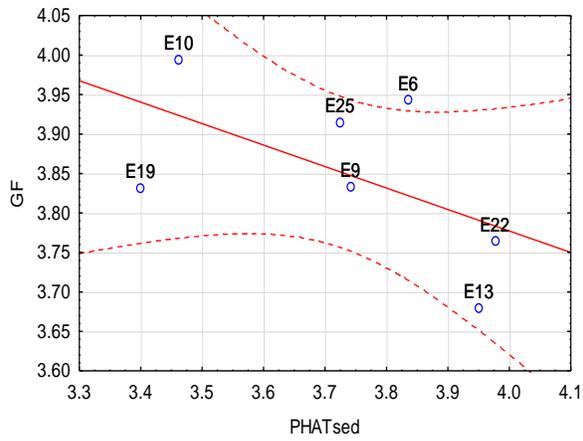
El factor se calcula de acuerdo a la cantidad de sulfato ferroso usada en la titulación de un blanco, mediante la fórmula:

$$\text{Factor} = \frac{10.0}{\text{mL de sulfato ferroso}}$$

ANEXO XII. Scatter Plots Correlacion de PAHs, MO y Granos finos

SECAS: MAYO 2015

LLUVIAS: OCTUBRE 2015



Correlations (basededatosseca2015.sta)
Marked correlations are significant at $p < .0500$
N=7 (Casewise deletion of missing data)

Variable	PHATsed	GF	MO
PHATsed	1.00	-0.56	0.57
GF	-0.56	1.00	-0.12
MO	0.57	-0.12	1.00

Correlations (basededatoslluvias2015.sta)
Marked correlations are significant at $p < .05000$
N=7 (Casewise deletion of missing data)

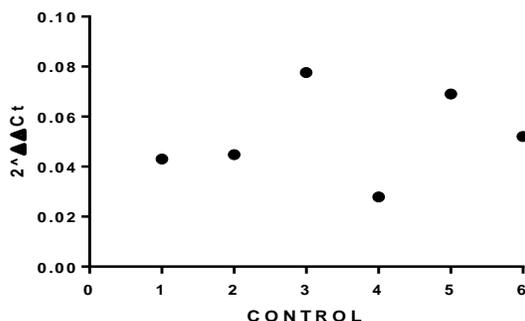
Variable	PHATsed	GF	MO
PHATsed	1.00	-0.03	0.33
GF	-0.03	1.00	-0.51
MO	0.33	-0.51	1.00

ANEXO XIII. Análisis de Grupo Control

Se realizó prueba de Kolmogorov-smirnov para comprobar si las respuestas de cada biomarcador en el grupo control siguen una distribución normal.

CYP1A.

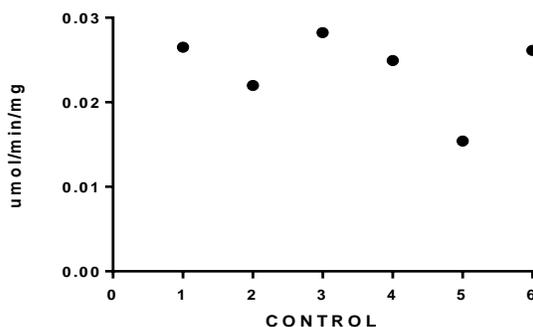
No hay diferencia estadísticamente significativa entre la distribución de la muestra y la distribución normal ($p < 0.05$), $p = 0.2$



Mean	0.04520
Std. Deviation	0.02531
Std. Error of Mean	0.01033

GST

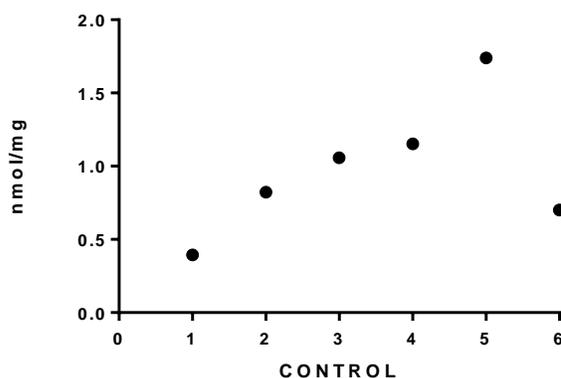
No hay diferencia estadísticamente significativa entre la distribución de la muestra y la distribución normal ($p < 0.05$), $p = 0.212$



Mean	0.02387
Std. Deviation	0.004635
Std. Error of Mean	0.001892

GLUTATION TOTAL

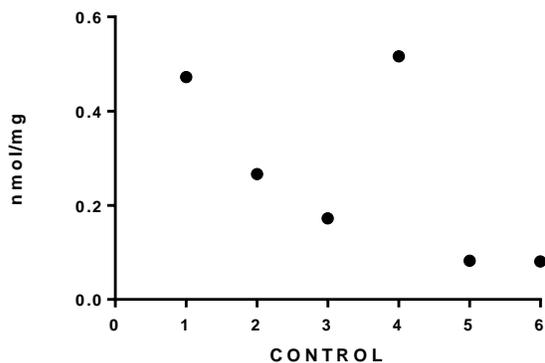
No hay diferencia estadísticamente significativa entre la distribución de la muestra y la distribución normal ($p < 0.05$), $p = 0.2$



Mean	0.9775
Std. Deviation	0.4603
Std. Error of Mean	0.1879

LPO

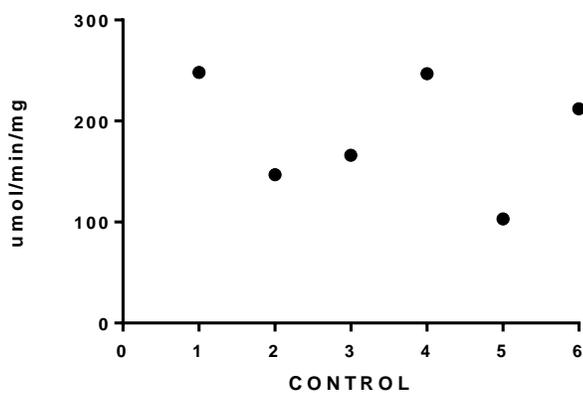
No hay diferencia estadísticamente significativa entre la distribución de la muestra y la distribución normal ($p < 0.05$), $p = 0.2$



Mean	0.2650
Std. Deviation	0.1909
Std. Error of Mean	0.07792

AChE

No hay diferencia estadísticamente significativa entre la distribución de la muestra y la distribución normal ($p < 0.05$), $p = 0.1422$



Mean	187.2
Std. Deviation	58.33
Std. Error of Mean	23.81

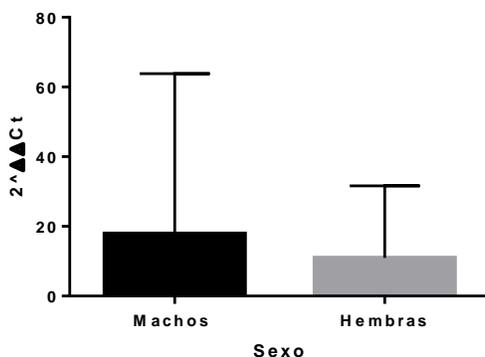
ANEXO XIV. Análisis de Biomarcadores entre Sexo y Longitud.

Con el fin de descartar la posibilidad de un posible efecto del sexo en la respuesta de los biomarcadores se realizó una prueba Mann-Whitney-Wilcoxon, adicionalmente se analizó la correlación con la talla de los organismos con correlación de Spearman.

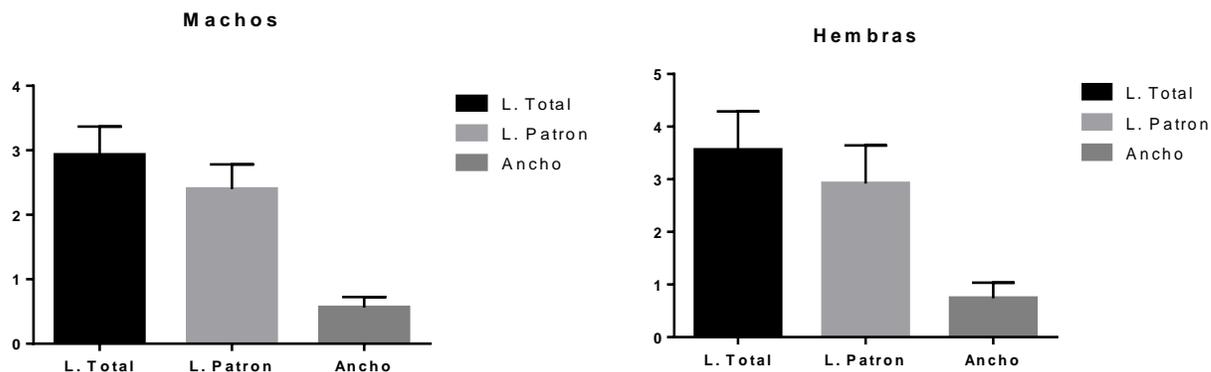
Temporada de secas

CYP1A

No hay diferencia significativa ($p > 0.05$), $p = 0.298$

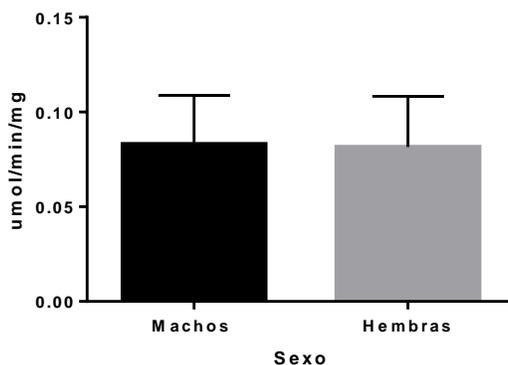


No hay diferencia significativa ($p > 0.05$)

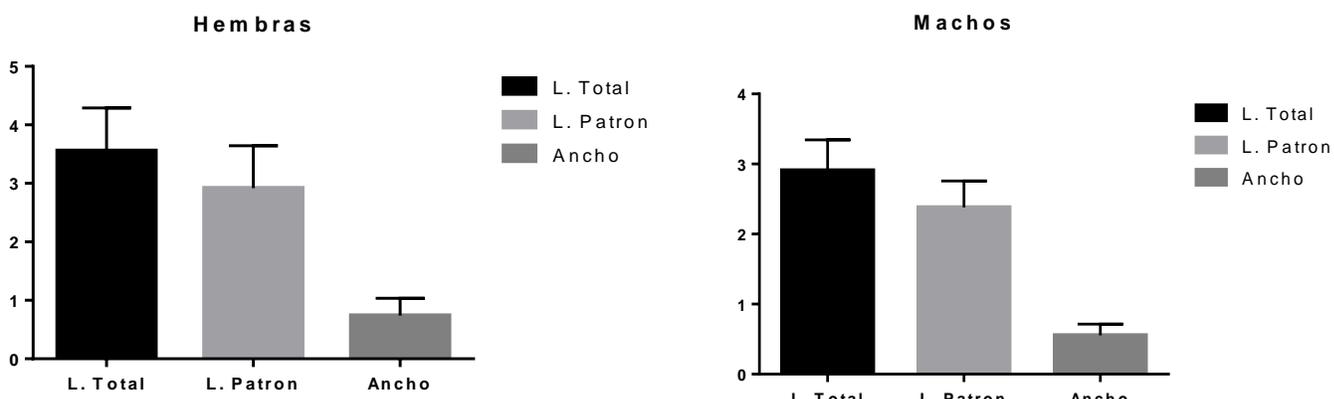


Glutation-S-transferasa (GST)

No hay diferencia significativa ($p > 0.05$), $p = 0.762$

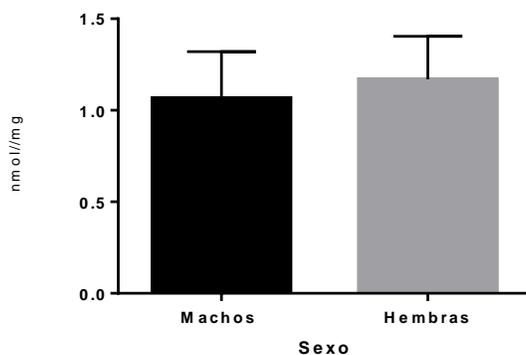


No hay diferencia significativa ($p > 0.05$)

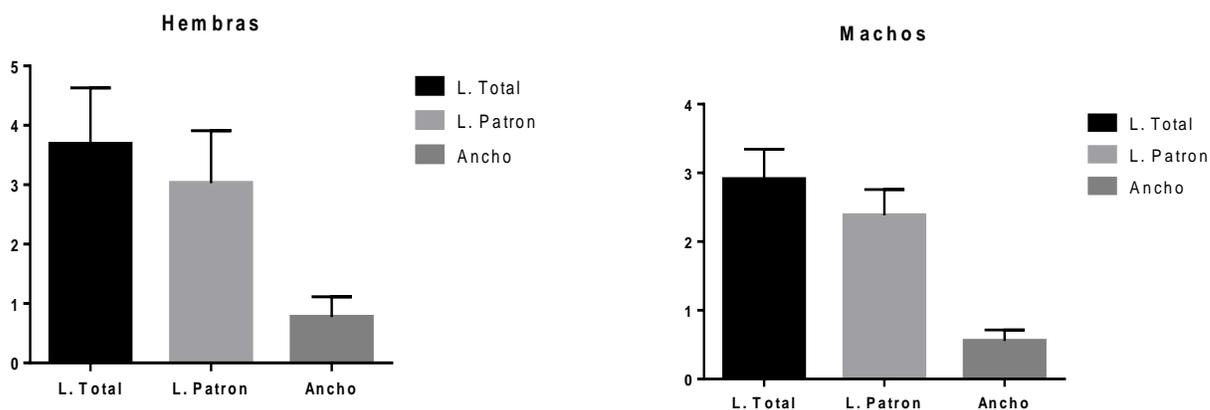


GLUTATION TOTAL (GSH)

No hay diferencia significativa ($p > 0.05$), $p = 0.088$

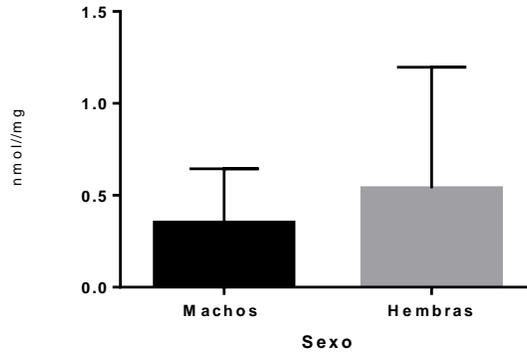


No hay diferencia significativa ($p > 0.05$)

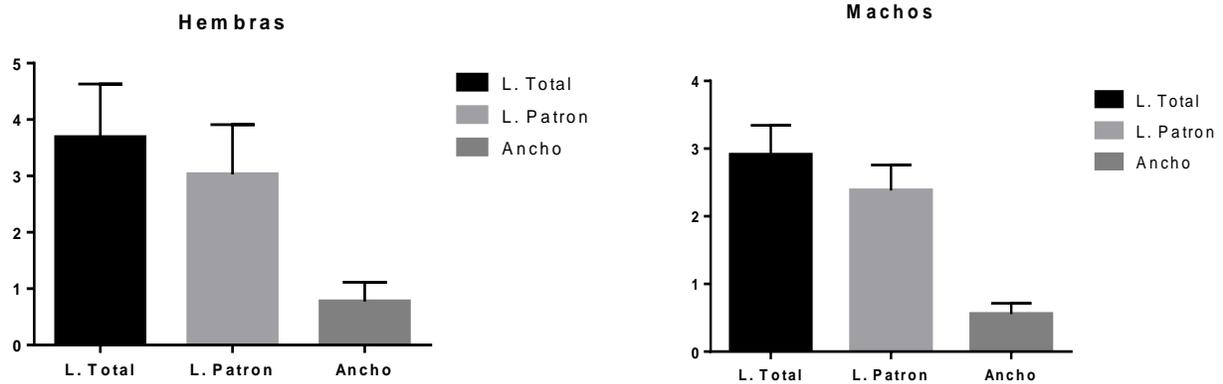


LIPIDOS PEROXIDADOS (LPO)

No hay diferencia significativa ($p < 0.05$), $p = 0.66$

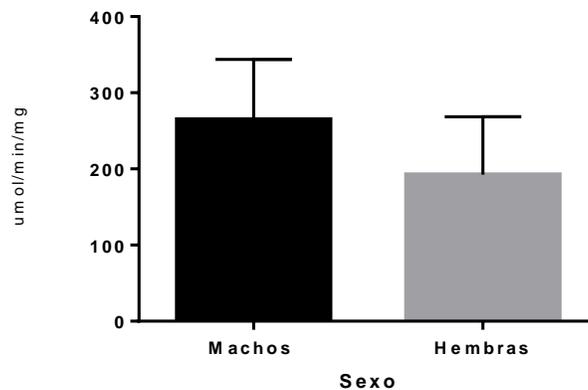


No hay diferencia significativa ($p > 0.05$)

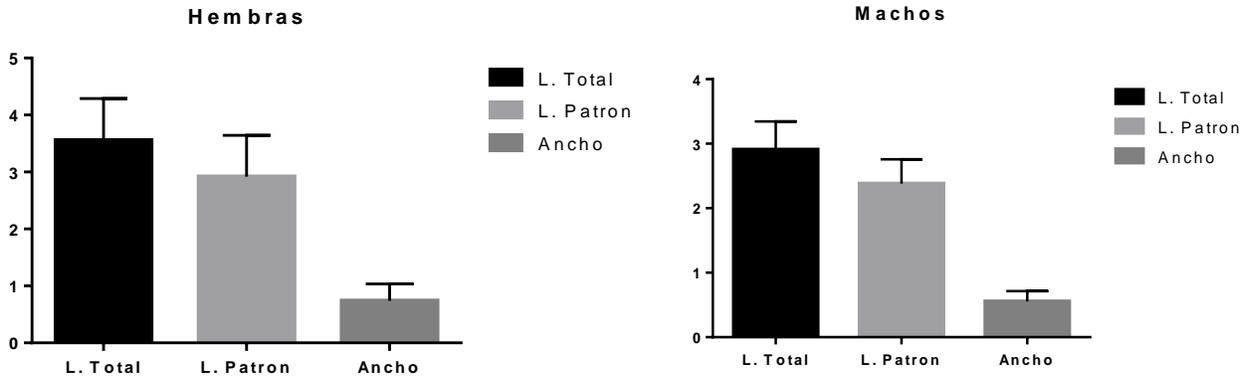


Acetilcolinesterasa (AChE)

No hay diferencia significativa ($p < 0.05$), $p = 0.445$



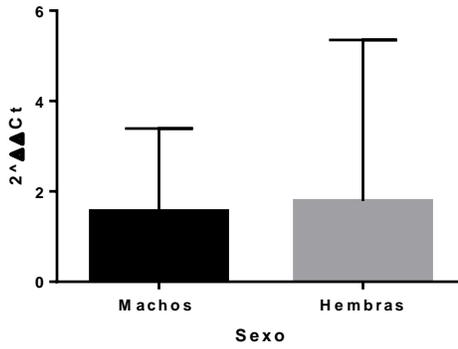
No hay diferencia significativa ($p > 0.05$)



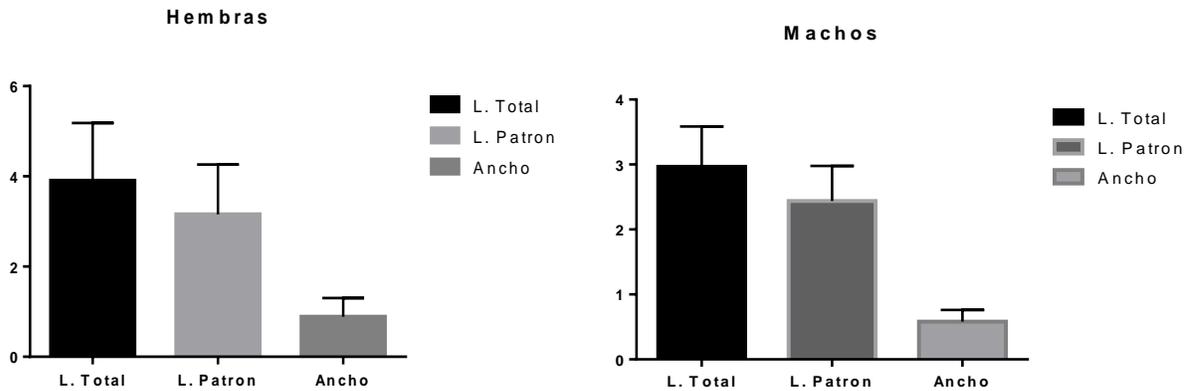
Temporada de lluvias

CYP1A

No hay diferencia significativa ($p > 0.05$), $p = 0.248$

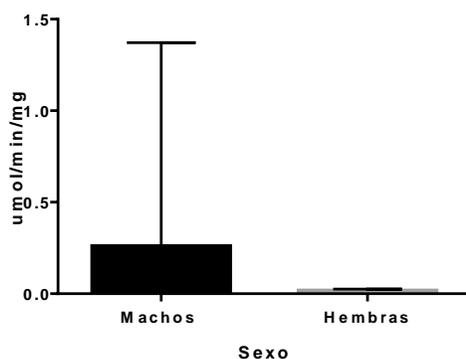


No hay diferencia significativa ($p > 0.05$)

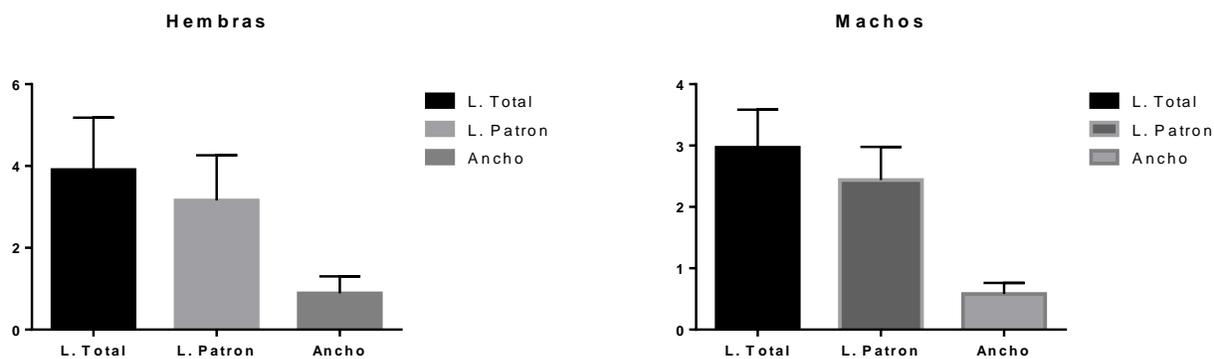


Glutation-S-transferasa (GST)

No hay diferencia significativa ($p > 0.05$), $p = 0.145$

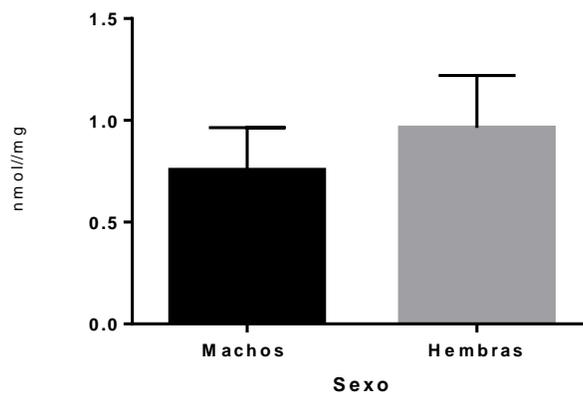


No hay diferencia significativa ($p > 0.05$) en hembras pero en machos presento correlación en talla $r = 0.8$

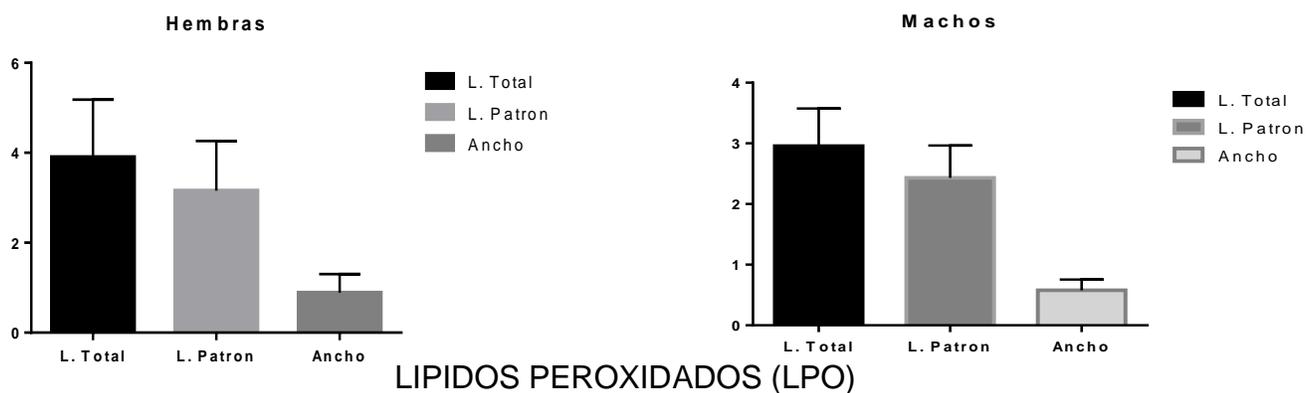


GLUTATION TOTAL (GSH)

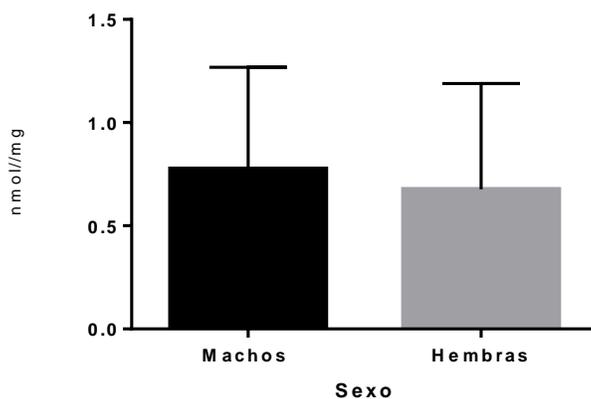
Diferencia significativa ($p < 0.05$), $p = 0.006$



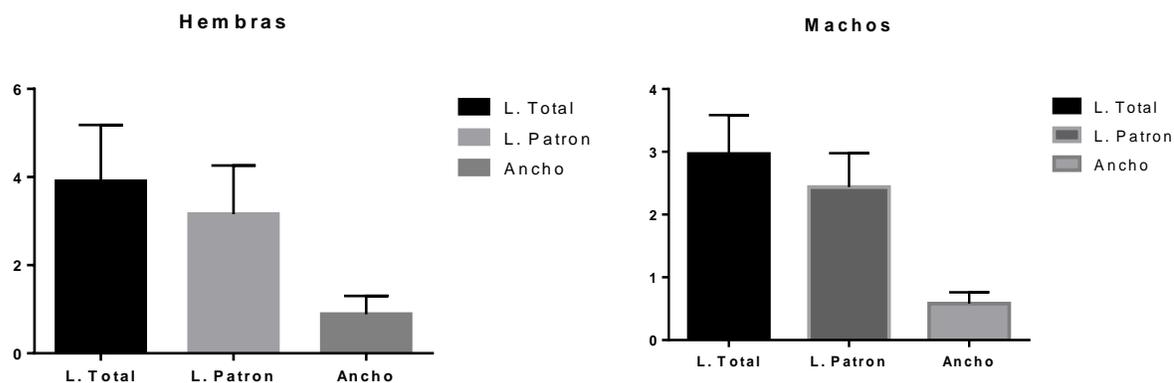
No hay diferencia significativa ($p > 0.05$) para hembras, sin embargo en machos existe correlación entre la talla y el contenido de glutatión $r = 0.96$



No hay diferencia significativa ($p < 0.05$), $p = 0.286$

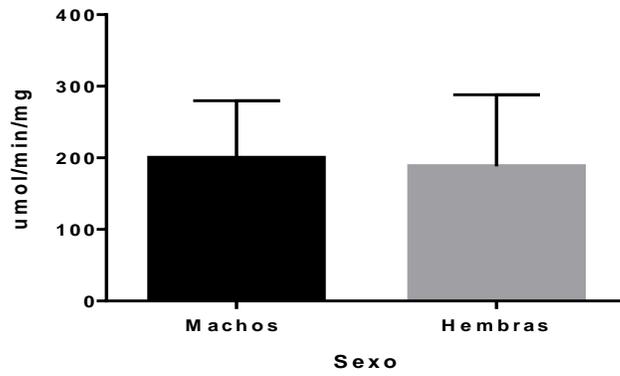


No hay diferencia significativa ($p > 0.05$)

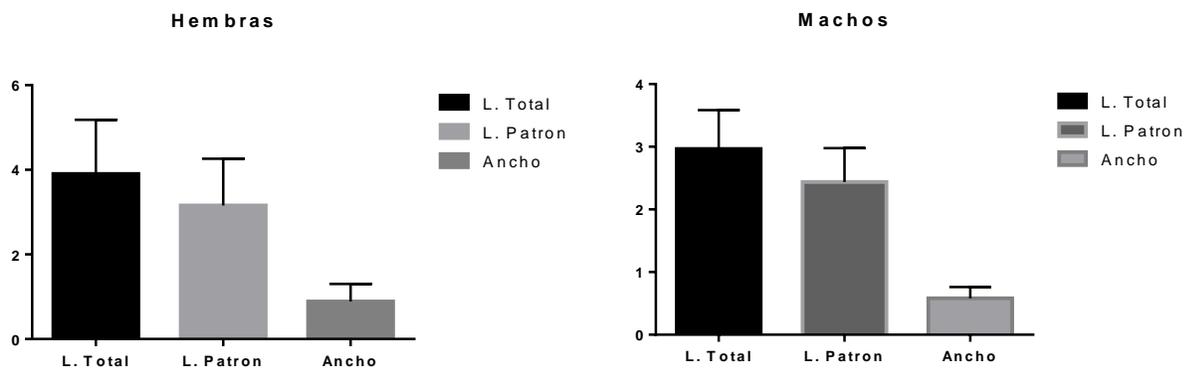


Acetilcolinesterasa (AChE)

No hay diferencia significativa ($p < 0.05$), $p = 0.2363$



No hay diferencia significativa ($p > 0.05$)



ANEXO XV. Análisis De Componentes Principales. (Biomarcadores)

Variable	Contribución de variables, basada en correlaciones.					
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6
CYP1As	0.20148	0.00033	0.00294	0.04002	0.33677	0.28993
GSTs	0.00066	0.36920	0.00002	0.00854	0.08385	0.00040
AChEs	0.04376	0.22502	0.00118	0.18441	0.22888	0.06536
GSHs	0.14574	0.05325	0.05559	0.10922	0.05230	0.04370
LPOs	0.18763	0.03313	0.00001	0.08180	0.00445	0.00031
CYPA1II	0.15734	0.01193	0.13874	0.01525	0.02015	0.10424
GSTII	0.08575	0.02676	0.28687	0.02002	0.02487	0.26665
AChEII	0.07088	0.22781	0.02827	0.00059	0.13277	0.19594
GSHII	0.00587	0.04141	0.48631	0.00758	0.00168	0.00593
LPOII	0.10084	0.01112	0.00002	0.53252	0.11424	0.02748

Case	Contribución de casos, basado en correlaciones.					
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6
6	8.9736	29.9969	21.6542	0.4697	19.7081	4.9115
9	4.7119	3.9950	5.8143	66.2802	0.2385	4.6742
10	16.1854	32.4291	1.6847	0.5906	34.7257	0.0986
13	15.3725	0.3585	36.2227	11.0055	2.1347	20.6202
19	3.6682	10.8121	3.7624	19.8881	0.0010	47.5822
22	40.6661	5.7973	3.0187	0.4746	19.1448	16.6125
25	10.4219	16.6109	27.8428	1.2910	24.0469	5.5005

Group SECAS

Average squared distance = 3.63

Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
LPO	-0.616	0.304	0.58	8.38	8.38
GST	0.867	0.315	0.57	8.68	17.06
GSH	0.684	0.655	0.54	18.07	35.13
AChE	0.324	1.04	0.51	28.66	63.80
CYP1A	0.504	1.31	0.50	36.20	100.00

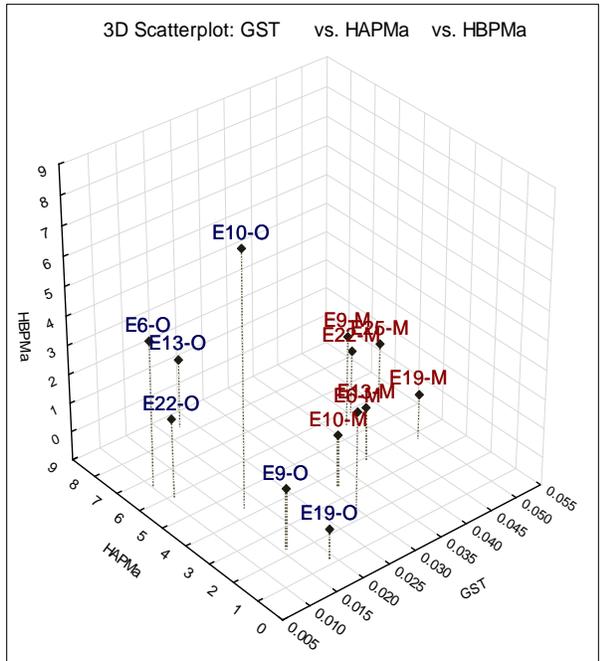
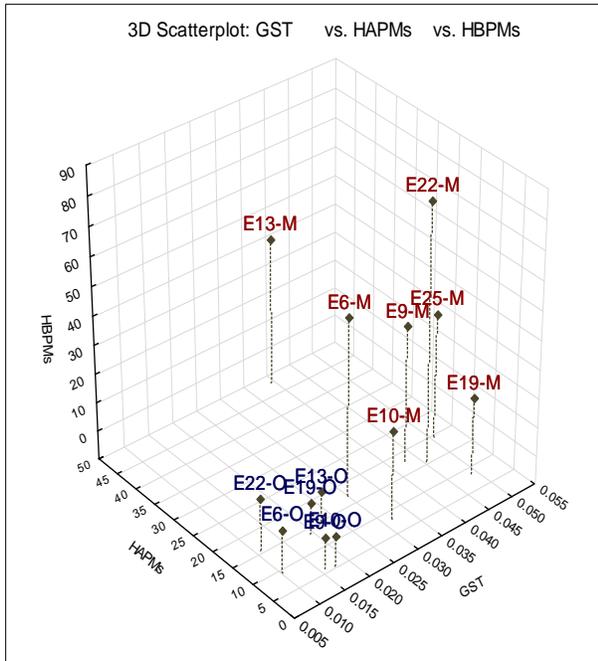
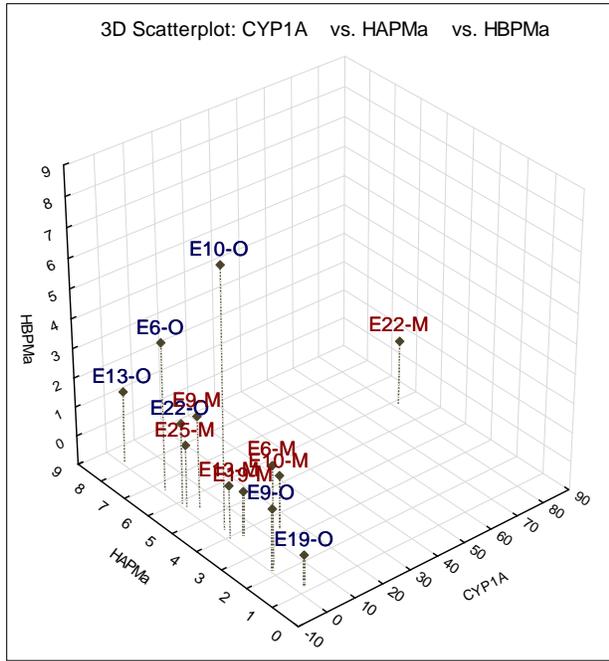
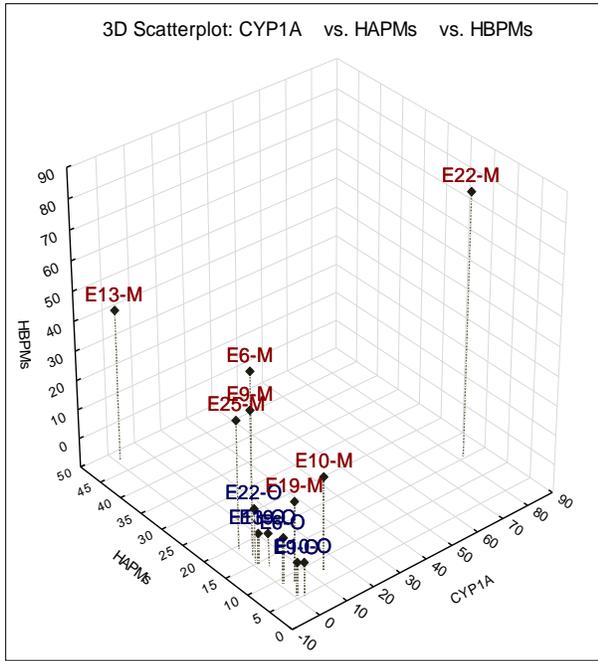
Group LLUVIAS

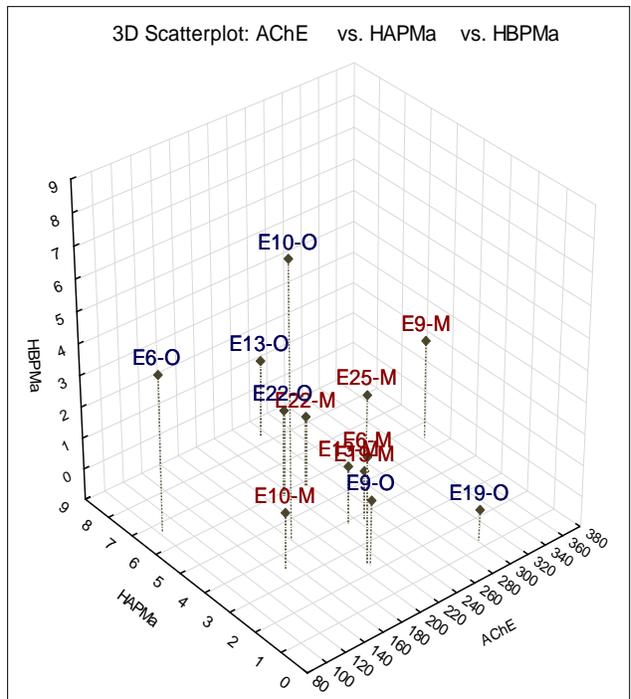
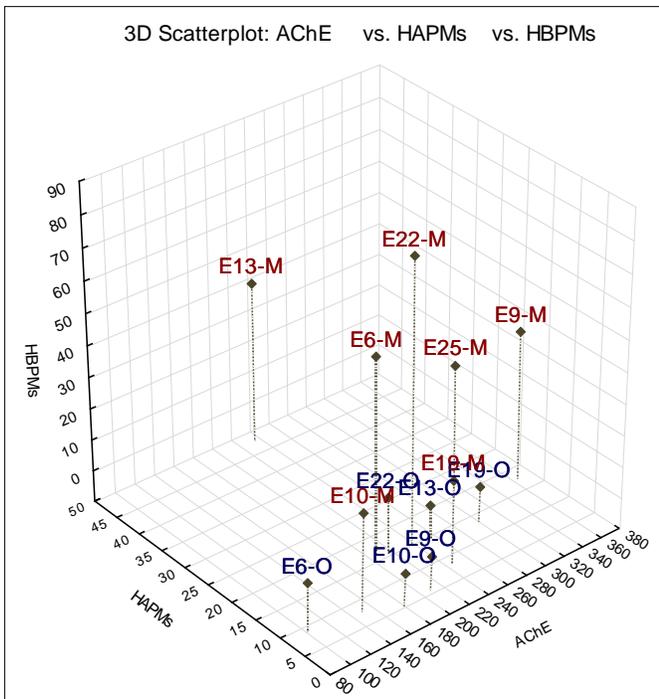
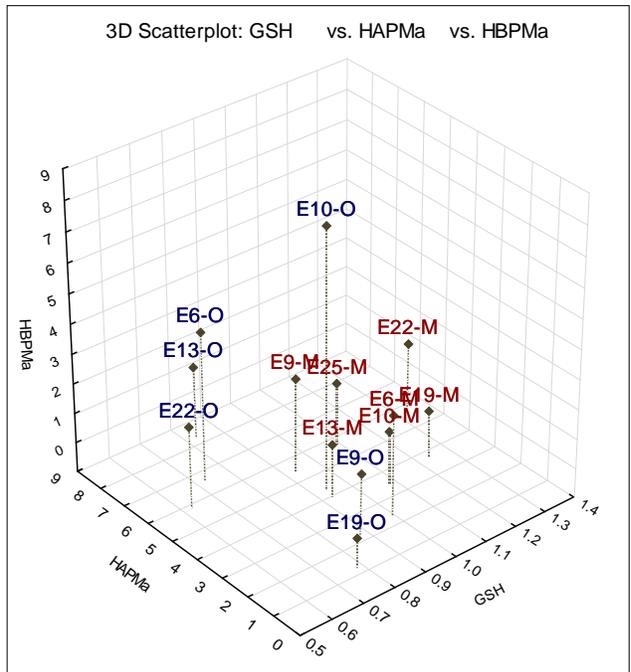
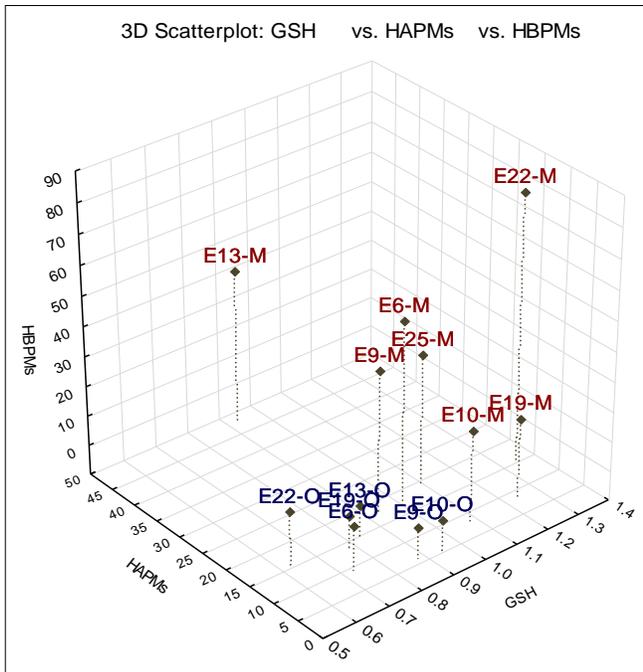
Average squared distance = 2.64

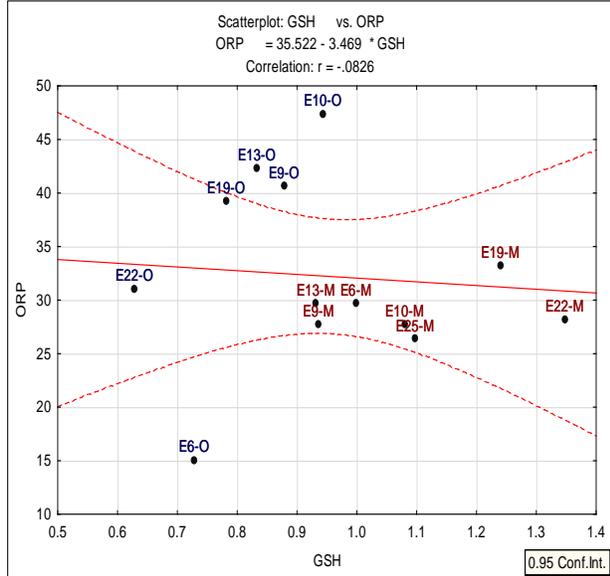
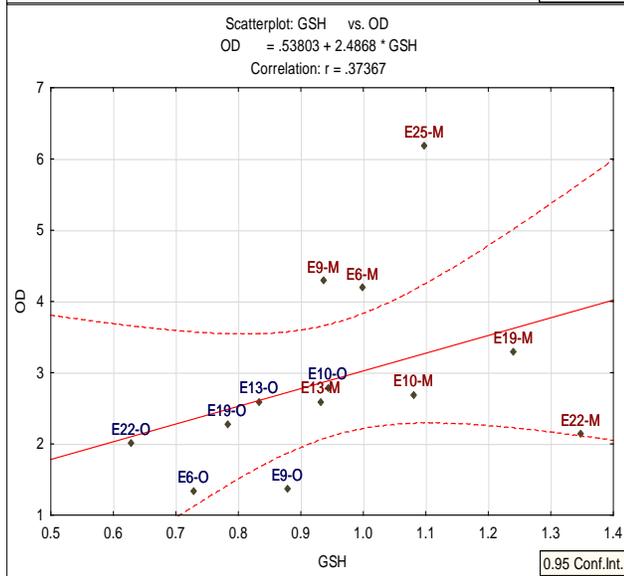
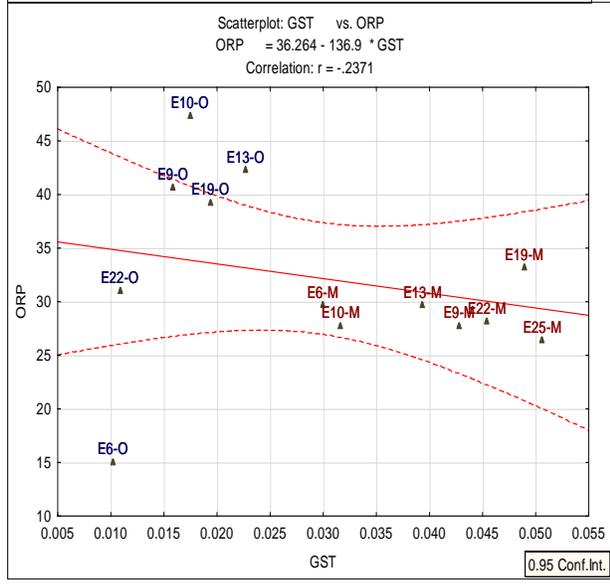
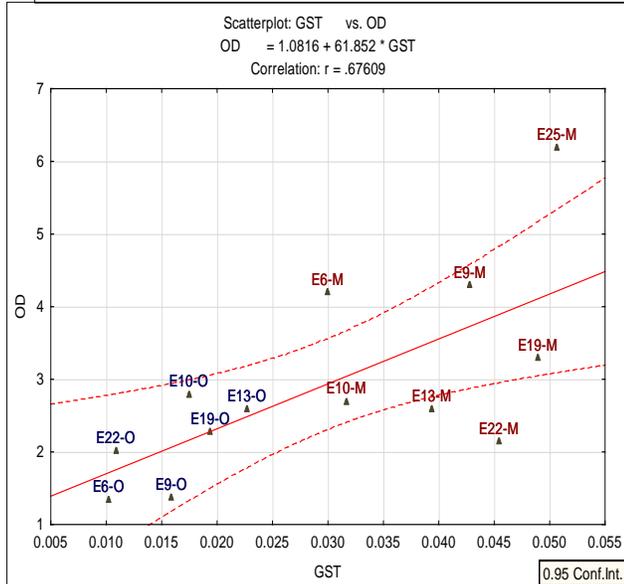
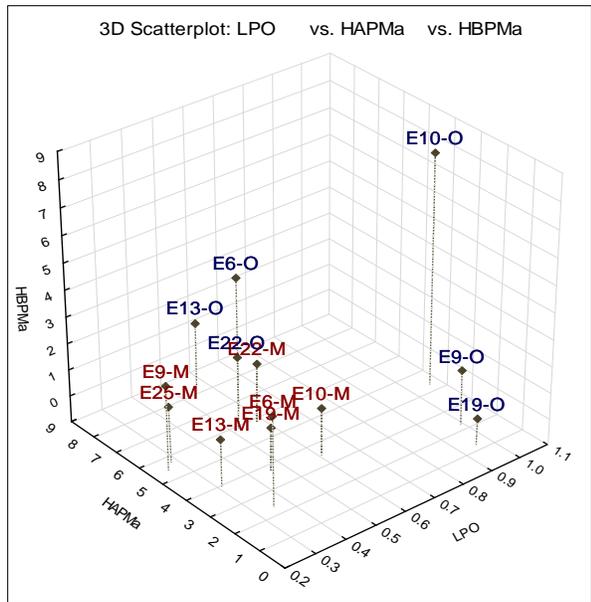
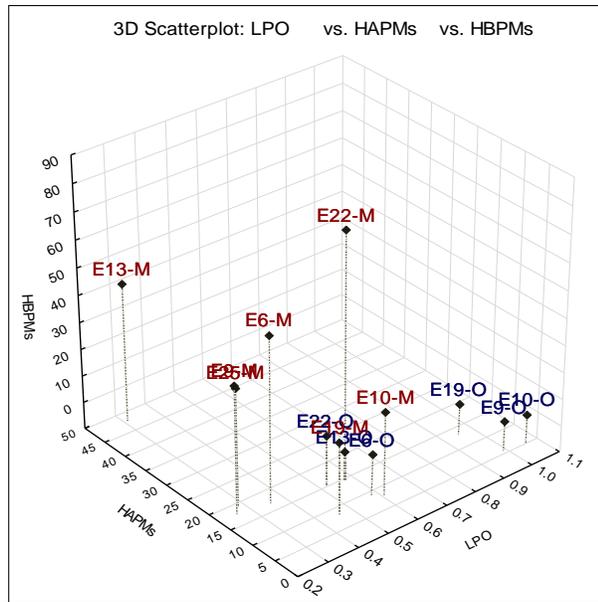
Species	Av.Value	Av.Sq.Dist	Sq.Dist/SD	Contrib%	Cum.%
GST	-0.867	9.71E-2	0.55	3.68	3.68
CYP1A	-0.504	0.262	0.52	9.92	13.60
GSH	-0.684	0.42	0.54	15.92	29.52
AChE	-0.324	0.883	0.51	33.46	62.99
LPO	0.616	0.977	0.61	37.01	100.00

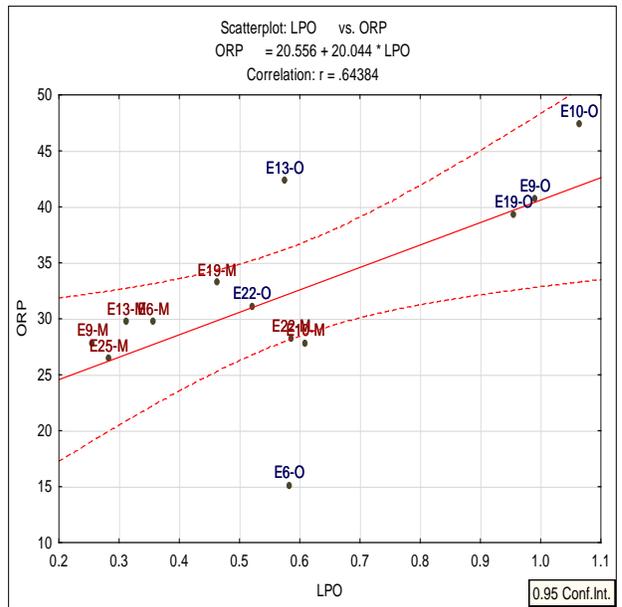
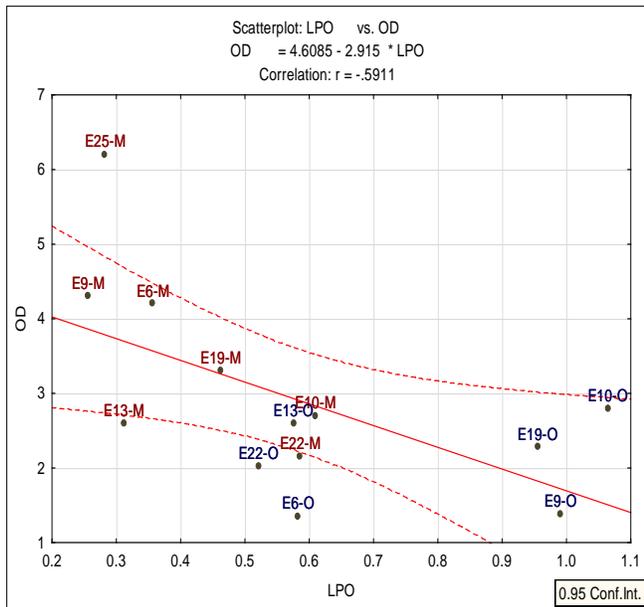
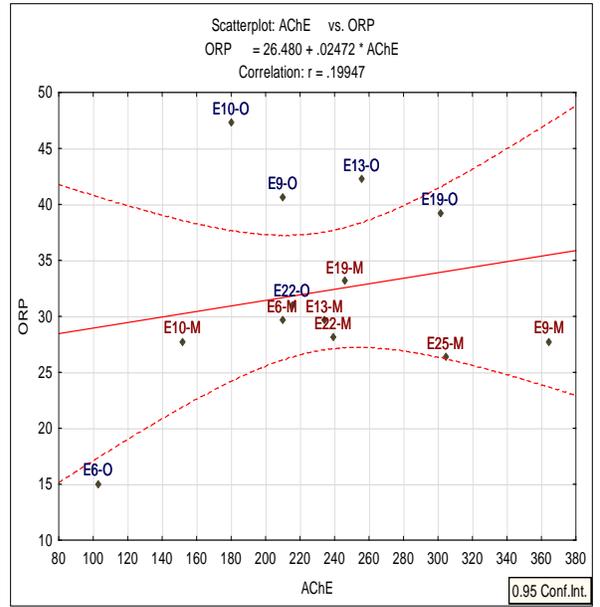
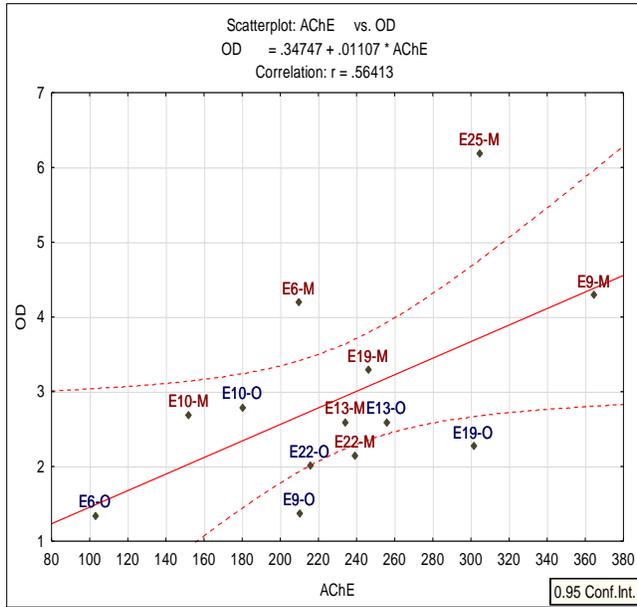
ANEXO XVI. Análisis de variables ambientales, PAHs y respuestas bioquímicas en *G. yucatanana*.

Correlación Biomarcadores, variables ambientales y PAHs																					
Marked correlations are significant at $p < .05000$																					
N=13																					
Variable	Means	Std.Dev.	T	C	S	pH	OD	ORP	TDS	CYP1A	GST	AChE	GSH	LPO	HAPMs	HBPMs	HAPMa	HBPMa	GF	GG	MO
T	28	1.1	1.000	0.127	0.088	0.858	0.366	-0.121	0.416	0.390	0.196	0.302	0.173	-0.096	-0.077	0.378	-0.069	-0.173	0.14	-0.14	0.396
C	1947	532.9	0.127	1.000	0.993	0.237	0.079	-0.459	0.472	-0.230	-0.362	-0.443	-0.307	-0.037	-0.208	-0.001	-0.075	0.467	0.09	-0.09	0.572
S	1	0.2	0.088	0.993	1.000	0.202	0.077	-0.412	0.492	-0.282	-0.394	-0.451	-0.334	-0.025	-0.235	-0.039	-0.101	0.497	0.14	-0.14	0.549
pH	7	0.5	0.858	0.237	0.202	1.000	0.245	-0.332	0.193	0.329	0.037	0.110	-0.003	-0.202	0.046	0.379	0.042	-0.148	-0.01	0.01	0.719
OD	3	1.3	0.366	0.079	0.077	0.245	1.000	-0.133	0.445	-0.168	0.676	0.564	0.374	-0.591	0.194	0.356	0.049	-0.074	0.42	-0.42	0.231
ORP	32	8.4	-0.121	-0.459	-0.412	-0.332	-0.133	1.000	0.195	-0.163	-0.237	0.199	-0.083	0.644	-0.220	-0.425	-0.253	0.191	0.17	-0.17	-0.568
TDS	1071	316.2	0.416	0.472	0.492	0.193	0.445	0.195	1.000	-0.147	0.056	0.136	0.053	-0.050	-0.026	0.226	-0.382	0.203	0.37	-0.37	0.204
CYP1A	9	22.1	0.390	-0.230	-0.282	0.329	-0.168	-0.163	-0.147	1.000	0.351	-0.007	0.636	0.008	-0.039	0.692	0.154	-0.132	-0.12	0.12	-0.159
GST	0	0.0	0.196	-0.362	-0.394	0.037	0.676	-0.237	0.056	0.351	1.000	0.536	0.820	-0.626	0.357	0.687	0.031	-0.393	0.07	-0.07	-0.118
AChE	232	68.0	0.302	-0.443	-0.451	0.110	0.564	0.199	0.136	-0.007	0.536	1.000	0.156	-0.324	0.283	0.235	-0.017	-0.409	-0.11	0.11	-0.112
GSH	1	0.2	0.173	-0.307	-0.334	-0.003	0.374	-0.083	0.053	0.636	0.820	0.156	1.000	-0.231	-0.017	0.669	-0.081	-0.188	0.13	-0.13	-0.298
LPO	1	0.3	-0.096	-0.037	-0.025	-0.202	-0.591	0.644	-0.050	0.008	-0.626	-0.324	-0.231	1.000	-0.565	-0.571	-0.361	0.347	-0.16	0.16	-0.430
HAPMs	15	10.9	-0.077	-0.208	-0.235	0.046	0.194	-0.220	-0.026	-0.039	0.357	0.283	-0.017	-0.565	1.000	0.430	0.049	-0.308	-0.27	0.27	0.188
HBPMs	23	24.5	0.378	-0.001	-0.039	0.379	0.356	-0.425	0.226	0.692	0.687	0.235	0.669	-0.571	0.430	1.000	0.035	-0.227	-0.05	0.05	0.181
HAPMa	5	2.0	-0.069	-0.075	-0.101	0.042	0.049	-0.253	-0.382	0.154	0.031	-0.017	-0.081	-0.361	0.049	0.035	1.000	0.196	0.33	-0.33	0.108
HBPMa	2	2.0	-0.173	0.467	0.497	-0.148	-0.074	0.191	0.203	-0.132	-0.393	-0.409	-0.188	0.347	-0.308	-0.227	0.196	1.000	0.29	-0.29	-0.027
GF	70	19.5	0.143	0.085	0.136	-0.007	0.425	0.173	0.370	-0.122	0.069	-0.114	0.133	-0.158	-0.272	-0.045	0.326	0.290	1.00	-1.00	-0.097
GG	30	19.5	-0.143	-0.085	-0.136	0.007	-0.425	-0.173	-0.370	0.122	-0.069	0.114	-0.133	0.158	0.272	0.045	-0.326	-0.290	-1.00	1.00	0.097
MO	10	7.4	0.396	0.572	0.549	0.719	0.231	-0.568	0.204	-0.159	-0.118	-0.112	-0.298	-0.430	0.188	0.181	0.108	-0.027	-0.10	0.10	1.000









ANEXO XVII. Análisis de Redundancia (relaciones entre variables)

VARIABLES

1	Temperatura (°C)	Trial
2	Conductividad	Trial
3	pH	Trial
4	OD	Trial
5	ORP	Trial
6	TDS	Trial
7	%G.F	Trial
8	M.O	Trial
9	HBPMs	Trial
10	HBMPs	Trial
11	HAPMa	Trial
12	HBPMa	Trial

Total SS(trace): 65

BEST SOLUTIONS

BEST RESULT FOR EACH NUMBER OF VARIABLES

AICc	R ²	RSS	No.Vars	Selections
20,968	0,3305	43,518	1	10
20,879	0,47479	34,139	2	4;10
21,344	0,59329	26,436	3	4;8;10
23,408	0,67154	21,35	4	1;4;8;10
26,354	0,74518	16,563	5	1;4;8-10
32,029	0,7942	13,377	6	2-4;8-10
39,997	0,84716	9,9345	7	2-5;8-10
53,927	0,88734	7,3229	8	2-5;7-10
82,641	0,89964	6,5231	9	1-5;7-10
140,66	0,91696	5,3978	10	1-8;10;11
319,51	0,93368	4,3107	11	1-11
∞	0,94317	3,6942	12	All

OVERALL BEST SOLUTIONS

AICc	R ²	RSS	No.Vars	Selections
20,879	0,47479	34,139	2	4;10
20,968	0,3305	43,518	1	10
21,344	0,59329	26,436	3	4;8;10
21,759	0,44073	36,352	2	8;10
21,821	0,43824	36,514	2	9;10
22,127	0,56988	27,958	3	2;4;10
22,254	0,56599	28,211	3	4;9;10
22,46	0,41201	38,22	2	2;10
22,595	0,24801	48,879	1	4
23,13	0,38316	40,094	2	5;10

Percentage of variation explained by individual axes

Axis	% explained variation out of fitted model		% explained variation out of total variation	
	Individual	Cumulative	Individual	Cumulative
1	81,32	81,32	38,61	38,61
2	18,68	100	8,87	47,48

