



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E INVESTIGACIÓN
CAMPUS SISAL

Caracterización bioquímica de Colinesterasas en
Gambusia yucatanana y su uso como biomarcador de
neurotoxicidad

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN MANEJO SUSTENTABLE DE ZONAS COSTERAS

P R E S E N T A

VALERIA MARÍN LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ FUENTES



Sisal. Yucatán. México 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos

1. Datos del alumno

Valeria Marín López

Tel. +52 55 53171411

Universidad Nacional Autónoma de México

Faculta de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación.

Campus Sisal

Manejo Sustentable de Zonas Costeras

310288079

2. Datos del jurado

| | |
|--|---|
| Directora de Tesis Secretaria | Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes Facultad de Química, Unidad de Química en Sisal, UNAM |
| Presidente | Dra. Cristina Pascual Jiménez Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Campus Sisal, UNAM |
| Vocal | Dra. Elsa Noreña Barroso Facultad de Química, Unidad de Química en Sisal, UNAM |
| Suplente | Dra. Flor Elisa del Rosario Arcega Cabrera Facultad de Química, Unidad de Química en Sisal, UNAM |
| Suplente | Dra. Reyna Cristina Colli Dulá CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida |

3. Datos del trabajo

Caracterización bioquímica de Colinesterasas en *Gambusia yucatanana* y su uso como biomarcador de neurotoxicidad

50 p

2018

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de esta gran institución. Siempre orgullosa de mi formación académica.

A la DGAPA por el financiamiento de los proyectos UNAM-PAPIIT-DGAPA IA200214 y IA202416.

A mi directora de tesis la Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes por todo su apoyo, comprensión y conocimientos brindados durante toda mi formación académica.

A los miembros del jurado a la Dra. Elsa Noreña, Dra. Flor Arcega, Dra. Cristina Pascual y a la Dra. Reyna Colli por su tiempo, apoyo y comentarios enriquecedores en este trabajo.

A mis padres por su amor y apoyo constante e incondicional, por respetar mis decisiones y darme las bases para ser lo que soy. Gracias, porque por ustedes soy.

A todos mis compañeros de generación, por los momentos compartidos, porque con ellos crecí y de ellos aprendí. Pero en especial a Javier, Diego, Daniel y Rodrigo porque se convirtieron en algo más que compañeros. Con cada uno tengo historias y momentos únicos que atesoro en mi memoria y corazón.

A Sisal y a su gente, porque es un lugar lleno de magia al cual le debo mucho aprendizaje a nivel personal. Por ser el lugar que me permitió coincidir con personas extraordinarias: Adán, Arantxa, Liz, Pedro, Rubén, Pastrana, Chuy y Patoni las cuales hicieron de mi estancia en este hermoso pueblo una experiencia maravillosa.

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen | 7 |
| I. Introducción | 8 |
| II. Antecedentes..... | 9 |
| Ecotoxicología | 9 |
| Biomarcadores | 9 |
| Colinesterasas | 10 |
| Uso de colinesterasas como biomarcador en sistemas acuáticos..... | 12 |
| Caracterización bioquímica de colinesterasas en organismos acuáticos..... | 13 |
| Plaguicidas organofosforados y carbamatos: efecto inhibitorio de ChE | 16 |
| <i>Gambusia yucatanana</i> : organismo modelo para el monitoreo de contaminantes en cuerpos de agua de la península de Yucatán..... | 17 |
| III. Justificación | 19 |
| IV. Hipótesis | 19 |
| V. Objetivos | 20 |
| Objetivo General | 20 |
| Objetivos Particulares..... | 20 |
| VI. Material y Métodos..... | 21 |
| Zona de estudio..... | 21 |
| Preparación de tejido de peces <i>Gambusia yucatanana</i> | 22 |
| Caracterización bioquímica de colinesterasas..... | 22 |
| Determinación de la actividad de colinesterasas en organismos de diferentes cuerpos de agua | 23 |
| Análisis estadístico | 24 |
| VII. Resultados | 25 |

| | |
|--|----|
| Caracterización bioquímica de colinesterasas en <i>Gambusia yucatanana</i> | 25 |
| Preferencia de sustrato | 25 |
| Inhibidores específicos..... | 28 |
| Actividad de AChE en <i>Gambusia yucatanana</i> de cuerpos de agua | 29 |
| VIII. Discusión | 32 |
| IX. Conclusión | 40 |
| X. Referencias | 42 |
| ANEXOS..... | 47 |
| 1. Método de Ellman, 1961 adaptado a microplaca (Rodríguez-Fuentes, 2005) | 47 |
| 2. Método Bradford, 1976 | 49 |
| 3. Sitios de muestreo | 49 |
| 4. Datos de peces muestreados | 50 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación esquemática de la función de la AChE en terminaciones nerviosas. Tomado de Rodríguez, 2005 | 11 |
| Figura 2. Representación gráfica: cinética enzimática de K_m y V_{max} (Michaelis-Menten) y de concentración inhibitoria media (IC_{50}) | 14 |
| Figura 3. Sitios de muestreo durante la campaña Mayo 2014 y la actividad agrícola del estado de Yucatán por municipio según el Sistema de Consulta de Información Geoestadística Agropecuaria (SCIGA) | 25 |
| Figura 4. Preferencia de ChE por sustrato ASChI y BSChI en cabeza y músculo de <i>Gambusia yucatanana</i> | 27 |
| Figura 5. Gráfico de dispersión de la actividad de AChE en cabeza de <i>Gambusia yucatanana</i> de los cinco diferentes sitios de muestreo. Datos agrupados por sexo | 29 |
| Figura 6. Actividad de AChE en cabeza y músculo de <i>Gambusia yucatanana</i> en los cinco sitios de muestreo y el grupo control. Las barras indican media \pm SD, * indica diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control | 31 |
| Figura 7. Relación de la actividad agrícola y estudios de contaminación realizados en el estado de Yucatán | 36 |

Lista de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Criterios para caracterización de ChE | 15 |
| Tabla 2. Resumen de organismos analizados por sitio de muestreo | 24 |
| Tabla 3. Parámetros cinéticos Michaelis-Menten de ChE en cabeza y músculo de <i>Gambusia yucatanana</i> | 26 |
| Tabla 4. Valores de IC_{50} para la actividad de ChE con inhibidores específicos en tejidos de <i>Gambusia yucatanana</i> | 28 |
| Tabla 5. Análisis de varianza de AChE en cabeza y músculo de <i>Gambusia yucatanana</i> | 30 |
| Tabla 6. Comparación de valores de K_m , V_{max} e IC_{50} para ChE en Cerebro de diferentes especies utilizando ASChI como sustrato y Eserina como inhibidores específicos | 33 |

Resumen

El uso de biomarcadores proporciona información cuantitativa y específica de la exposición y efecto de uno o varios contaminantes en un organismo. Además de que algunos biomarcadores son de fácil medición y análisis, proporcionan información sobre los cambios en respuestas biológicas, medidas a diferentes niveles y se pueden relacionar con la exposición o el efecto del contaminante y/o con el estado de salud del ecosistema. Uno de los biomarcadores de exposición más utilizado para ver el efecto de plaguicidas organofosforados y carbamatos, es la actividad de las colinesterasas (ChE). Varios reportes indican que en vertebrados se presentan dos tipos de ChE cuya distribución y comportamiento es específica para cada especie.

El objetivo del estudio fue caracterizar la ChE presente en cabeza y músculo del pez guayacón yucateco *Gambusia yucatanana* proveniente de cinco diferentes cuerpos de agua ubicados en los municipios de Buctzotz, Celestún, Homún, Tecoh y Umán del estado de Yucatán, considerando su preferencia a sustratos e inhibidores específicos y la relación de la actividad enzimática con la morfometría y sexo del pez. Los organismos fueron colectados en un solo muestreo durante el mes de mayo que corresponde a la época de estiaje.

Los resultados indican que la ChE presente en *Gambusia yucatanana* es una AChE atípica que presenta un valor menor de la constante de Km con el sustrato butirilticolina indicando mayor afinidad al sustrato y con mayor sensibilidad al inhibidor BW284C51. Se encontraron diferencias significativas en el tejido de músculo entre el sitio muestreado ubicado en el municipio de Tecoh y el grupo control (condiciones de laboratorio). No se considera al sexo ni a la longitud total del pez, ni a la interacción de éstos como factores al analizar la actividad de AChE medida. Se realiza la importancia de la caracterización de ChE antes de utilizarla como biomarcador. Con lo reportado se pretende contribuir en estudios de biomonitoreo posteriores y en la implementación de nuevas estrategias de manejo de cultivos.

I. Introducción

Las colinesterasas (ChE) son enzimas pertenecientes al grupo de las esterasas. En vertebrados se presentan dos tipos AChE (acetilcolinesterasa) y BChE (butirilcolinesterasa) y su distribución en el tejido es específico de cada especie (Mack y Robitzki, 2000). La medición de la actividad de estas enzimas se propone como biomarcador de exposición ante la presencia de plaguicidas y otros contaminantes en estudios ambientales para evaluar el estado del ecosistema sujeto a impactos por actividades antropogénicas como la agricultura.

En el estado de Yucatán la superficie cultivada ha tenido un incremento del 18.12 % del 2010 al 2014, lo que representa más del 19% del territorio estatal (INEGI, 2014). Esto supone un incremento en el consumo de agroquímicos y aunque no se tienen datos del uso de plaguicidas organofosforados en el estado, entre 1999 y 2002 se registró un consumo máximo de 1.8 toneladas por mil hectáreas en el país (SEMARNAT, 2005).

Dadas las características del suelo que presenta el estado de Yucatán, el agua subterránea y sus componentes bióticos se consideran en riesgo por la presencia de plaguicidas. El objetivo de este trabajo es caracterizar bioquímicamente la actividad de colinesterasas (ChE) presentes en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana* utilizando sustratos e inhibidores selectivos para determinar su posible uso como biomarcador en estudios de evaluación ambiental en cuerpos de agua de Yucatán, México. Se pretende contribuir al establecimiento de futuros estudios de biomonitoreo en ecosistemas relacionados con actividades agrícolas.

II. Antecedentes

Ecotoxicología

La Ecotoxicología es el estudio de la contaminación y sus efectos sobre los organismos de un ecosistema, ya sea en la estructura, la función y la biodiversidad de un ecosistema. A pesar de que estos estresores pueden ser físicos, químicos, biológicos o una combinación de estos, el campo de esta ciencia a menudo se reduce a los efectos de sustancias químicas (sintéticas o vertidas por el hombre) sobre el sistema y sus componentes (Versonnen *et al.*, 2014) y como surge la necesidad de entender y tomar decisiones acerca de los contaminantes en el ambiente. La ecotoxicología es un estudio sintético que combina explicaciones causales (paradigmas) con la información de otras ciencias, en particular, biogeoquímica y ecología para desarrollar una evaluación de consecuencias por xenobióticos y posibles remediaciones (Newman, 2008). Es considerada además, como una ciencia aplicada con diferentes enfoques. Por ejemplo, para el caso de un objetivo de protección, esta disciplina tiene un impacto en cómo los efectos de xenobióticos en el ecosistema son estudiados en un contexto regulatorio, estimando riesgos a partir de una base de información de amenazas y exposición haciendo uso de análisis estadísticos. Su meta es utilizar la ciencia y tecnología existentes para documentar y evaluar el estado en el que se encuentra el ecosistema y con ello tener herramientas para proponer medidas de acción más completas ante una problemática.

Biomarcadores

Los biomarcadores en términos de ecotoxicología son parámetros biológicos que están sujetos a alteraciones por la exposición continua a contaminantes. Según la definición de Depledge (1994), es una variación bioquímica, celular, fisiológica o conductual que puede ser medida en muestras de tejido o fluidos corporales, o a nivel de todo el organismo para proveer evidencia de la exposición/efecto de uno o más contaminantes. Una de las características para el uso de los biomarcadores como herramienta para una evaluación ambiental, es que deben de ser de fácil medición para un análisis rápido y previo a estudios más complejos. Sin embargo no se debe de limitar su uso ya que este diseño de evaluación rápida no es definitivo y puede contribuir para una prueba posterior más

detallada, una vez que se asegure que una amenaza está provocando un impacto, evitando una inversión de esfuerzo y recursos que no sea necesaria.

Los biomarcadores proporcionan información que se puede utilizar para evaluar el riesgo al que están expuestos los organismos y el ecosistema a uno o varios contaminantes. Se sugiere seleccionar biomarcadores adecuados al mecanismo de respuesta del organismo ante el xenobiótico, además de que se deben considerar las posibles variaciones en la respuesta del biomarcador por los factores bióticos y abióticos (Bodin *et al.*, 2004 en Hagger *et al.*, 2006).

Para la evaluación de riesgos ambientales, los biomarcadores proveen información importante en la identificación de una amenaza y podrían explicar posibles mecanismos de acción. Los biomarcadores se clasifican en tres tipos: de exposición, de efecto y susceptibilidad. El biomarcador de efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a un xenobiótico. La inhibición de enzimas es un clásico biomarcador de efecto (Hagger *et al.*, 2006).

Las colinesterasas (ChE) tienen un potencial como biomarcador de efecto para el monitoreo de contaminación ambiental por la exposición de varios compuestos como plaguicidas organofosforados (OF) y carbamatos (CB), metales pesados, efluentes de minas y detergentes (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2012). Las ChE son utilizadas desde hace ya varias décadas y su evaluación es considerada de mucha utilidad para estimar impactos, principalmente en los procesos metabólicos involucrados en la actividad de este grupo de enzimas.

Colinesterasas

Las colinesterasas (ChE) son enzimas que pertenecen a la familia de las esterasas, con la capacidad de hidrolizar ésteres carboxílicos. Existen diferentes tipos de ChE que pueden ser distinguidos por su función, afinidad a un sustrato específico y por su susceptibilidad a ciertos inhibidores (Monteiro *et al.*, 2005).

Los vertebrados presentan dos tipos de ChE: acetilcolinesterasas (AChE) EC 3.1.1.7 y butirilcolinesterasas (BChE) EC 3.1.1.8 o también conocidas como pseudocolinesterasas, que difieren en su especificidad al sustrato (Mora *et al.*, 1999 y Sturm *et al.*, 1999).

Para entender mejor la importancia de las enzimas ChE hay que entender el papel que juega la AChE en el proceso de transmisión de impulsos nerviosos (Fig. 1). La acetilcolina es un neurotransmisor que, una vez que ha mediado el paso del impulso a través de la sinapsis, se hidroliza en ácido acético y colina, reacción que es catalizada por la enzima AChE lo cual permite que la membrana del tejido regrese a su estado de reposo ya que la sinapsis queda libre y lista para recibir un nuevo impulso nervioso (Pohanka, 2011 en Alves *et al.*, 2015).

La BChE es considerada una esterasa inespecífica por hidrolizar una gran variedad de sustratos ésteres; la BChE desintoxica (por secuestro) antes de que la AChE se inhiba en sitios fisiológicos importantes (Pezzementi *et al.*, 1991), y también está relacionada con el metabolismo de lípidos, regeneración celular, neurogénesis, regulación de proliferación celular, y en el inicio de la diferenciación neuronal durante el desarrollo temprano (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2013).

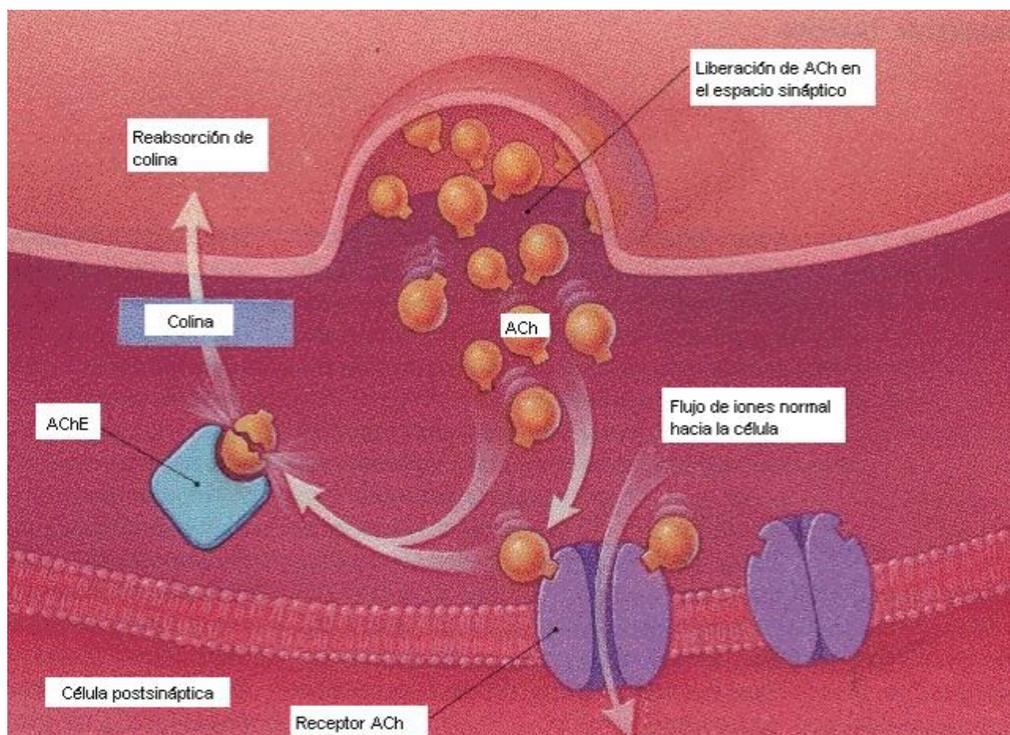


Figura 1. Representación esquemática de la función de la AChE en terminaciones nerviosas. Tomado de Rodríguez, 2005

La actividad de las colinesterasas ha sido utilizada ampliamente como marcador de cambios neuronales en un organismo (Howcroft *et al.*, 2011) y son biomarcadores potenciales para el monitoreo de la contaminación ambiental por múltiples compuestos como los plaguicidas organofosforados y carbamatos.

Uso de colinesterasas como biomarcador en sistemas acuáticos

Los ecosistemas acuáticos son los principales y los últimos sistemas receptores de contaminantes, estos tienen altos niveles de perturbación, por lo que es necesario comprender y evaluar los efectos biológicos que éstos podrían tener en la biota acuática. Para ello pueden emplearse a los biomarcadores como herramientas funcionales para la generación de información del estado de un sistema.

La medición de la inhibición de la actividad de ChE como biomarcador es una opción apropiada para evaluar la exposición de un organismo a plaguicidas (Viarengo *et al.*, 2007), su medición funciona como un índice de alerta temprana de la exposición de plaguicidas y puede representar un importante soporte para el manejo de acciones ante un impacto ambiental (Valbonesi *et al.*, 2011).

La relación entre la presencia de estos compuestos en ambientes acuáticos y la actividad de ChE en el tejido ha sido ampliamente estudiada y empleada en especies acuáticas de vertebrados e invertebrados (Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008; Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot, 2004; Tortelli *et al.*, 2006) ya que es uno de los biomarcadores empleados más antiguos (Payne *et al.*, 1996). Diversos estudios han reportado que la inhibición de enzimas AChE es responsable de una reducción en la actividad locomotora del pez (Kavitha y Rao, 2007)

Son varios los estudios que han utilizado la evaluación de actividad de ChE como un biomarcador. Por ejemplo, Coppage y Braidech (1976) reportaron que el efecto de la descarga de fluidos de un productor de plaguicidas OF y CB era factor en la reducida actividad de AChE en el cerebro en peces del río Missouri, Kansas. Por otro lado Rodríguez-Fuentes y Gold-Bouchot (2000) midieron la inhibición de AChE *in vitro* para evaluar el efecto de plaguicidas organofosforados en *Oreochromis niloticus* de dos lagunas en el

estado de Tabasco; encontraron inhibiciones de AChE del 3-21%. Se incorporó a las ChE como biomarcador en el programa de monitoreo del Sistema Arrecifal Mesoamericano (Rodríguez-Fuentes, 2005). También se ha evaluado la actividad enzimática ChE y la sensibilidad a plaguicidas en *Anguilla anguilla* en la laguna Comacchio, Italia y el impacto en la salud de los reproductores (Valbonesi *et al.*, 2011). De acuerdo con lo mencionado por estos autores, los peces se han convertido en organismos muy útiles para la evaluación cuantitativa de xenobióticos en ambientes acuáticos, actuando como indicadores de contaminación ambiental. Sin embargo, es necesario obtener información científica acerca de los efectos de plaguicidas OF y CB en especies locales para mejorar y proponer estudios de evaluación de riesgo y biomonitoreo que permitan prevenir efectos irreversibles en los ecosistemas.

Caracterización bioquímica de colinesterasas en organismos acuáticos

La AChE y la BChE pueden ser distinguidas con base en su especificidad por el sustrato y el uso de inhibidores. La AChE hidroliza acetilcolina (ACh) más rápido que los otros ésteres de colina y virtualmente se inactiva con el sustrato butirilcolina (BCh). La BChE es mucho menos selectiva con el tamaño del grupo acilo, hidrolizando ambos sustratos a velocidades comparables (Rodríguez-Fuentes, 2005), así la especificidad que presentan por el sustrato se puede utilizar para la distinción de estas dos enzimas.

En peces, la AChE es predominante en tejido cerebral y muscular. Algunos ejemplos de lo reportado, en cerebro de peces: *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Serranus cabrilla* (Sturm *et al.*, 1999), *Sparus auratus* (Romani *et al.*, 2003) y en la cabeza de *Gambusia yucatanana* (Rendón-von Osten *et al.*, 2005), en donde se ha determinado la presencia exclusiva de AChE. Mientras que la BChE está presente más en el hígado y plasma (Habig y DiGiulio, 1991 en Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008). Pero según Mack y Robitzki (2000), se sabe que tiene una amplia distribución a través de diferentes tipos de tejido: corazón, cerebro, endotelio vascular y en el sistema nervioso. Tan amplia distribución puede sugerir que la BChE tiene diferentes funciones a través de los diferentes tejidos en

el organismo. La presencia de la BChE se ha reportado en músculo, branquias e hígado en el pez *Gasterosteus aculeatus* (Wogram *et al.*, 2001).

La constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) son parámetros enzimáticos que brindan información necesaria para la clasificación de ChE (Fig. 2). La V_{max} es la velocidad máxima teórica en la que todos los centros activos están ocupados con sustrato. La K_m es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato ($K_m =$ la concentración de sustrato a la cual la velocidad de la reacción es $\frac{1}{2} V_{max}$), entonces entre menor es K_m , mayor es la afinidad de la enzima por el sustrato.

Ambas enzimas también pueden ser distinguidas con inhibidores específicos. Para determinar la sensibilidad de la enzima a los inhibidores y continuar con su caracterización, se utilizan diferentes inhibidores específicos y se calcula el valor de concentración inhibitoria media (IC_{50}), valor que representa la concentración a la cual se inhibe el 50% de la actividad (Fig. 2), por lo que entre menor sea el valor de IC_{50} la enzima tendrá mayor sensibilidad al compuesto inhibitorio.

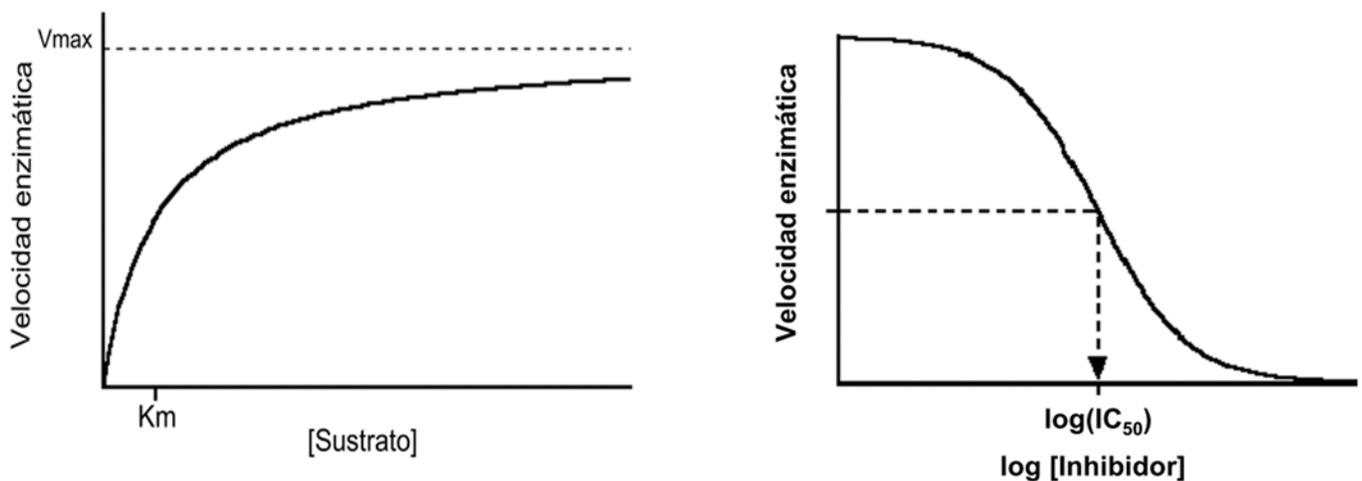


Figura 2. Representación gráfica: cinética enzimática de K_m y V_{max} (Michaelis-Menten) y de concentración inhibitoria media (IC_{50})

En general la AChE presenta inhibición por exceso de sustrato mientras que BChE presenta activación por sustrato (Pezzementi *et al.*, 1991), ya que se piensa que su sitio activo es mayor que el de AChE, por lo que permite acomodar una mayor cantidad de sustratos

mientras que AChE es más específica. En la Tabla 1 se presentan los criterios para su clasificación según Pezzementi *et al.* (1991,2002).

Ambos tipos de enzimas son inhibidas por Eserina. La AChE es preferentemente inhibida por BW284c51 (dibromo 1,5-bis(4- alildimetilamoniofenil)pentano-3-ona) y propidium, mientras que la BChE es inhibida por Iso-OMPA (tetraisopropil pirofosfamida).

Tabla 1. Criterios para caracterización de ChE

| | <i>AChE</i> | <i>BChE</i> |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|
| Especificidad de sustrato | | |
| ASChI | Sí | Si |
| BChI | No | Si |
| <i>Inhibición por sustrato</i> | Sí | No |
| <i>Activación por sustrato</i> | No | Sí |
| Inhibición | | |
| Eserina | Si | Si |
| BW284C51 | Si | No |
| Iso-OMPA | No | Si |
| Relación BChI/ASChI | | |
| V_{max} | < 1 | ≥ 1 |
| Km | ≥ 1 | < 1 |

Ya que las ChE pueden presentarse en diferentes formas en los tejidos del pez y pueden tener diferente sensibilidad a agentes anticolinesterásicos, la caracterización de enzimas presentes en cada especie y tejido es de suma importancia antes de establecer la actividad enzimática como biomarcador en pruebas de toxicidad en laboratorio, ya que si no se consideran estos factores de variación se pueden hacer interpretaciones incorrectas de los resultados obtenidos derivando en conclusiones erróneas.

Plaguicidas organofosforados y carbamatos: efecto inhibitorio de ChE

Los plaguicidas se definen como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales (FAO, 1990). Éstos forman parte indispensable de la agricultura comercial ofreciendo beneficios de corto a mediano plazo, como el incremento de los campos de cultivo y mejoramiento de la calidad producida (Jordaan, M., *et al.*, 2013).

La prohibición de algunos plaguicidas como los organoclorados, dado su alto grado de toxicidad y persistencia en el ambiente, dio paso al uso de nuevos compuestos como los organofosforados y carbamatos que si bien, poseen una alta toxicidad aguda, son menos persistentes en el ambiente.

Los organofosforados son ésteres del ácido fosfórico (unión de un ácido y un alcohol) y una variedad de alcoholes, generalmente liposolubles. Los carbamatos son ésteres N-metilados y N,N-dimetilados del ácido carbámico. Al igual que los primeros, éstos son fácilmente hidrolizables en soluciones alcalinas y se usan ampliamente en la agricultura. Son de amplio espectro y debido a sus características químicas, en su mayoría son degradados por microorganismos del suelo mediante oxidación o hidrólisis, por lo que no persisten mucho tiempo en el ambiente (Henaó y Nieto, 2008).

Ambos compuestos actúan sobre el sistema nervioso central inhibiendo la acetilcolinesterasa ya que se adhieren a la enzima evitando el rompimiento de acetilcolina. Entonces, conforme la acetilcolina se va acumulando, los impulsos nerviosos son transmitidos en sucesiones rápidas por lo cual, nervios, músculos y otros órganos son sobreestimulados. A diferencia de los organofosforados, en la presencia de carbamatos la enzima permanece inactiva por un tiempo menor y se regenera rápidamente (Botello *et al.*, 2005).

Acorde al trabajo de Benítez *et al.* (1996) y retomado en Rodríguez-Fuentes (2005), uno de los plaguicidas que más se emplea en la zona costera del Golfo de México pertenece al grupo de los organofosforados por lo que es necesario el estudio del impacto que pueden causar al ambiente, pues esta zona posee hábitats esenciales para la reproducción, crecimiento y la protección de innumerables recursos naturales, muchos de ellos de importancia comercial y ecológica (Botello *et al.*, 2005).

El uso indiscriminado de plaguicidas, la falta de control estricto en su venta, el mal manejo que se les da por el desconocimiento del potencial tóxico, su movilidad biológica y sus translocaciones en los diferentes ambientes, así como la naturaleza misma del plaguicida (Cremllyn, 1986 en Alvarado-Mejía *et al.*, 1994) hacen que su uso sea objeto de estudio dada la amenaza que representan para el ambiente.

***Gambusia yucatanana*: organismo modelo para el monitoreo de contaminantes en cuerpos de agua de la península de Yucatán**

Son pocos los estudios que se han realizado con *Gambusia yucatanana* en aspectos ecotoxicológicos para la evaluación de un ecosistema. Lo que se pretende realizar con este trabajo es una aproximación más precisa para el establecimiento de un biomarcador de efecto en la especie ante la presencia de plaguicidas con la medición de la actividad enzimática de ChE en peces de cuerpos de agua de la península de Yucatán. El género *Gambusia* (Teleostei: Poeciliidae) es el más abundante y frecuente en la ictiofauna de la península de Yucatán. Este género incluye peces de talla pequeña (2-7 cm), 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-Leon y Schmitter-Soto, 2007)

Gambusia yucatanana conocido comúnmente como guayacón yucateco o pez mosquito se distribuye desde Veracruz hasta Guatemala y Belice, y en toda la península de Yucatán, incluso en cenotes tierra adentro, aunque tiende a ser costero. Esta especie nada en cardúmenes bajo la película superficial, cerca del mangle, para refugiarse. Es la especie más eurihalina del género y existen incluso poblaciones marinas (Miller *et al.* 2005 en

Pérez-Leon y Schmitter-Soto, 2007). Presenta un dimorfismo sexual notable, aparte de ser los machos más pequeños que las hembras, presentan una característica peculiar en la modificación de los radios tercero, cuarto y quinto de la aleta anal, como un dispositivo móvil.

Gambusia yucatanana ha sido seleccionado como bioindicador debido a su amplia distribución en los cuerpos de agua de la Península de Yucatán. Carece de valor comercial, sin embargo, tiene un relevante papel ecológico, al servir de alimento de peces mayores y regular poblaciones de otros organismos acuáticos. Además su fácil cultivo en laboratorio lo convierte en una especie potencial para uso regional como bioindicador de contaminantes ambientales (Mondragón Sánchez y Rodas Regil, 2011).

Así mismo *Gambusia affinis* es otra especie que se ha utilizado como bioindicador por sus características biológicas-ecológicas en diversos estudios y debido a que pertenece al mismo género que *Gambusia yucatanana*, se ha tomado como referencia en diversos estudios. Por ejemplo, - Chambers (1976) estudió la relación de esterasas con la tolerancia a plaguicidas organofosforados en la especie. También se ha utilizado como especie centinela en los Estudios Geológicos de Estados Unidos (USGS por sus siglas en inglés) en el sur de California, E.U. para el análisis de contaminantes, entre ellos, compuestos organoclorados (Jenkins *et al.*, 2006) y Jaksić *et al.* (2008) realizaron un estudio de monitoreo de exposición de compuestos organoclorados con esta especie en Italia.

Se encontró un estudio realizado con la especie por Rendón-von Osten *et al.* (2005) en el estado de Campeche, donde se caracterizó y midió la actividad de ChE en *Gambusia yucatanana* para evaluar el efecto de plaguicidas *in vivo* a diferentes concentraciones, dos de los compuestos de plaguicidas utilizados indujeron una significativa inhibición de ChE. Pero la obtención de más información científica de los efectos de xenobióticos en especies locales es necesaria para mejorar los estudios de evaluación de riesgo y así prevenir efectos irreversibles en poblaciones. Este estudio pretende ser un primer paso para proponer la actividad de ChE como biomarcador y a *Gambusia yucatanana* como bioindicador para evaluaciones posteriores y así poder proponer un programa de biomonitoreo en el estado de Yucatán.

La península de Yucatán presenta un suelo con características kársticas, donde el agua permea rápidamente en un complejo sistema de ríos subterráneos. Por lo tanto esta característica del suelo hace altamente susceptible a la contaminación del acuífero (Marin y Perry, 1994). El agua subterránea es la principal fuente de agua para consumo humano así como para su uso en actividades industriales y agrícolas (Escolero *et al.* 2002). Tomando en cuenta estas actividades, las características del suelo (alta permeabilidad y porosidad) y el complejo sistema hidrológico interconectado, la calidad del agua se pone en riesgo así como el estado de salud del ecosistema (Arcega-Cabrera *et al.*, 2014; Derrien *et al.*, 2015). Por lo que es importante investigar la presencia de contaminantes y el análisis de las posibles causas.

III. Justificación

El biomarcador AChE ha sido ampliamente utilizado para detectar efectos en especies acuáticas por la exposición de plaguicidas OF y CB. Su caracterización es fundamental para validarlo como biomarcador de efecto y para realizar un buen análisis de los resultados ya que la actividad de estas enzimas depende de la especie, tejido y morfología del pez. Además proporcionan una primera evaluación del impacto en la especie utilizada como bioindicador. Son considerados como una herramienta útil para la rápida y sencilla evaluación del estado de un ecosistema y así posteriormente proponer estudios de evaluación complementarios y programas de biomonitoreo que permitan tomar medidas de manejo adecuadas al estado del sistema y los componentes causales.

IV. Hipótesis

La medición de la actividad de colinesterasas ha sido utilizada como biomarcador potencial para el monitoreo de la presencia de plaguicidas OF y CB. El tipo de colinesterasas depende de la especie y del tejido del organismo analizado por lo que es necesaria la

caracterización de la enzima. De acuerdo a varios estudios se espera encontrar los dos tipos de colinesterasas (AChE y BChE), que exista un efecto morfométrico y de sexo en la actividad de ChE en la cabeza y el músculo de *Gambusia yucatanana*.

También reportes recientes indican que existe la presencia de xenobióticos, entre ellos plaguicidas en los cuerpos de agua de la zona Anillo de Cenotes en el estado de Yucatán. Se espera que exista diferencia entre la actividad de ChE medida en los organismos provenientes de los diferentes cuerpos de agua muestreados y en los organismos del grupo control provenientes del laboratorio.

V. Objetivos

Objetivo General

- Caracterizar bioquímicamente las colinesterasas (ChE) presentes en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana* utilizando sustratos e inhibidores selectivos para determinar su posible uso como biomarcador en estudios de evaluación ambiental en cuerpos de agua de Yucatán, México.

Objetivos Particulares

- Determinar los valores de velocidad máxima y la constante de Michaelis-Menten con sustratos acetiltiocolina y butiriltiocolina en las ChE presentes en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana*.
- Obtener valores de concentración inhibitoria media (IC₅₀) con Eserina, BW534C51 e Iso-OMPA para las ChE presentes en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana*.

- Determinar si existe relación entre la morfometría, el sexo y la actividad de ChE en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana*.
- Determinar si hay diferencias en la actividad de ChE en los diferentes cuerpos de agua de la Península de Yucatán y el grupo control.

VI. Material y Métodos

Zona de estudio

El estado de Yucatán se localiza el sureste de México. Se caracteriza por un clima cálido, con un gradiente de precipitación promedio anual de 200-400 mm en la región noroeste del estado y de 1000-1200 mm en el sureste (SEDUMA, 2010). De acuerdo a Graniel *et al.* (1999) la región presenta tres temporadas hidrológicas anuales principalmente, temporada de lluvias (junio a septiembre), temporada de "Nortes", caracterizada por vientos fuertes del norte (octubre a diciembre) y temporada de secas (diciembre a mayo). Debido a las características kársticas de la roca carbonatada, Yucatán es una zona de alta permeabilidad cuyo flujo de agua subterránea en forma muy general se presenta de sureste hacia el noroeste de la península (Escolero *et al.* 2002).

Para fines de este estudio se realizó el muestreo de 43 peces *Gambusia yucatanana* (Anexo 4) que fueron colectados durante la campaña de muestreo en mayo de 2014 en cinco cuerpos de agua ubicados estratégicamente en diferentes municipios a lo largo del Anillo de Cenotes (Fig. 3).

Los sitios de muestreo (Anexo 3) se encuentran dentro de la denominada zona Anillo de Cenotes (AC), un patrón geomorfológico de forma semicircular que presenta una alta densidad de cenotes y que está ubicado en la parte Noroeste del estado de Yucatán. Se extiende de los municipios de Celestún hasta Dzilam de Bravo (Pérez-Ceballos *et al.*, 2012). Además es importante señalar que el AC aloja comunidades ecológicas con alguna

categoría de riesgo en la normativa nacional, referida a la NOM-059-SEMARNAT-2001. El agua proveniente de los cuerpos de agua que conforman el AC se utiliza en tres actividades principalmente: abrevaderos para la ganadería, como fuente de riego de cultivos agrícolas y para consumo humano (FIR, 2010).

Preparación de tejido de peces *Gambusia yucatanana*

Se preparó un homogenizado de cada tejido (cabeza y músculo) para la determinación de los parámetros bioquímicos con una concentración de 100 mg/mL disueltos en Tris pH 8 con una concentración 0.05M. Se utilizó un homogenizador con pistón de teflón mientras la muestra se mantenía en hielo, una vez homogenizado el tejido se colocó en tubos Eppendorf para centrifugarlos a 10,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se separó en un tubo de Eppendorf nuevo y se congeló a -20°C para la lectura posterior de la actividad enzimática.

Caracterización bioquímica de colinesterasas

Para la caracterización de ChE, se utilizó el tejido homogenizado de muestras aleatorias de los cinco sitios de muestreo (Tabla 2) con organismos cercanos a la media de longitud total ($n=6$, LT 31.55 ± 2 mm) y se utilizaron como sustratos selectivos solución Ioduro de Acetilcolina (ASChI) e Ioduro de Butirilcolina (BSChI) en concentraciones de 0.001, 0.010, 0.1, 1 y 10 nM para determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} .

La actividad enzimática de ChE se calculó mediante el método Ellman (1961) adaptado a una microplaca de 96 pozos (Rodríguez-Fuentes, 2005) (Anexo I), donde en cada pozo se colocaron 20 μ l del homogenizado y 170 μ l de la solución DTNB/bufer Tris 7.4. Se agitó la microplaca para mezclar todo y, antes de iniciar la lectura, se agregaron 10 μ l de solución de ASChI o BSChI de la concentración correspondiente en cada pozo. La actividad enzimática fue medida por triplicado para cada muestra para cada sustrato respectivamente. La absorbancia fue medida a 405 nm por 60 segundos.

La determinación de la concentración de proteína se realizó con el método de Bradford (1976) (Anexo 2). Se utilizó como solución estándar albúmina sérica bovina fracción V. La actividad fue calculada y expresada en U/g de proteína.

Las pruebas de inhibición se realizaron con el incremento de concentraciones de Eserina de 0.000019 a 0.193 mM, con BW284C51 con concentraciones de 8.3×10^{-6} a 0.088 mM y con Iso-OMPA con concentraciones de 1.56 a 0.156 mM como inhibidores selectivos para la actividad de AChE y BChE, respectivamente. Las pruebas con los inhibidores se llevaron a cabo en microplacas de 96 pozos, en donde cada uno contenía 170 μ l de 0.5 mM de DTNB/buffer Tris pH 7.4, 10 μ l de homogenizado y 10 μ l de cada inhibidor a diferentes concentraciones. Después de 30 min de incubación se agregaron 10 μ l de ASChI o BSChI (concentración final de 1 mM) para medir la actividad ChE restante. La reacción se iniciaba con la adición de 10 μ l de sustrato. La tasa de formación de producto se midió a 405 nm por 120 segundos.

Determinación de la actividad de colinesterasas en organismos de diferentes cuerpos de agua

Los organismos fueron capturados y se mantuvieron vivos en peceras portátiles para su traslado al laboratorio de Química en la Unidad Académica de Sisal donde se midieron, se identificó su sexo y se disectaron. La cabeza se cortó detrás del opérculo y el músculo debajo de la aleta dorsal.

Seis peces seleccionados de manera aleatoria se mantuvieron en condiciones de laboratorio con una densidad de 1 pez/litro, con aireación constante a una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, un pH de 8 ± 0.5 y una conductividad de $600 \pm 50 \mu\text{S/cm}$ por seis semanas para su depuración y poder utilizarlos como grupo control. La actividad enzimática de los organismos colectados en los cuerpos de agua y el grupo con condiciones de laboratorio fue medida utilizando el método de Ellman (1961) con el sustrato ASChI y la determinación de la concentración de proteína se realizó con el método de Bradford (1976) como se describió anteriormente.

Tabla 2. Resumen de organismos analizados por sitio de muestreo

| Sitio de muestreo | Municipio | No. de peces |
|-------------------|-------------|--------------|
| E6 | Celestún | 5 |
| E10 | Umán | 8 |
| E13 | Tecoh | 9 |
| E19 | Homún | 8 |
| E22 | Buctzotz | 8 |
| C | Laboratorio | 5 |
| Total | | 43 |

Análisis estadístico

Las preferencias de sustratos de ChE y los valores de K_m , V_{max} e IC_{50} se calcularon utilizando una regresión no lineal con el software GraphPad PRISM versión 6 (GraphPad Software, Inc. USA). Se elaboraron gráficos de dispersión de las actividades de AChE en cabeza *versus* longitud total para visualizar la distribución de los datos y probar linealidad entre la actividad enzimática y talla del pez.

Se realizó la prueba de Bartlett para evaluar la homogeneidad de varianza. Para evaluar las diferencias entre los sitios de muestreo en la actividad de ChE y analizar si el sexo del pez se consideraba un factor, se utilizó una prueba de ANOVA factorial. Estos análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Statistica versión 10 (StatSoft Inc., USA)

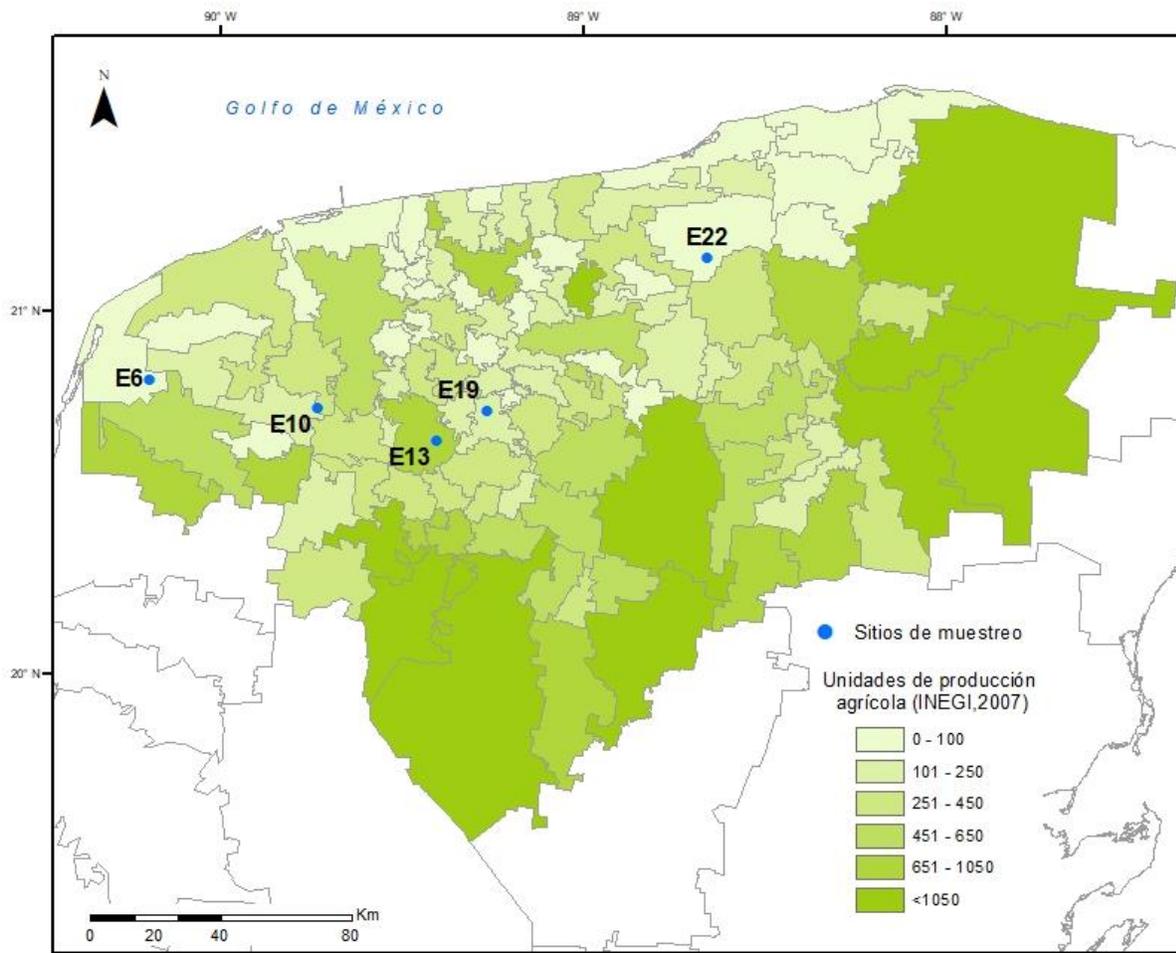


Figura 3. Sitios de muestreo durante la campaña Mayo 2014 y la actividad agrícola del estado de Yucatán por municipio según el Sistema de Consulta de Información Geoestadística Agropecuaria (SCIGA)

VII. Resultados

Caracterización bioquímica de colinesterasas en *Gambusia yucatana*

Preferencia de sustrato

De acuerdo a los resultados obtenidos, la ChE en músculo presentó la mayor velocidad de hidrólisis con el sustrato ASChI, mientras que en la cabeza presentó la menor velocidad con el sustrato BSChI. Los valores de Km más bajos se presentaron en músculo con el sustrato BSChI con un valor de 0.55 mM mostrando mayor afinidad a este sustrato. El valor más alto de Km con ASChI en músculo se encuentra una menor afinidad a este

sustrato. No se detectó inhibición de la actividad de ChE en ninguno de los tejidos con ninguno de los sustratos. Los resultados de preferencia de sustrato por tejido del grupo de peces homogenizados así como la relación de parámetros cinéticos y sustratos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos Michaelis-Menten de ChE en cabeza y músculo de *Gambusia yucatana*

| Sustrato | | Cabeza | Músculo |
|----------|-------------------------|------------------------|------------------------|
| ASChI | V_{\max} U/g proteína | 96.41 (93.52-99.29) | 140.5 (133.3-147.8) |
| | Km mM | 2.38 (2.14-2.61) | 5.47 (4.76-6.18) |
| BSChI | V_{\max} U/g proteína | 5.41 (5.0-5.82) | 6.02 (5.83-6.21) |
| | Km mM | 1.25 (0.89-1.5) | 0.55 (0.47-0.62) |
| Relación | V_{\max} BSChI/ASChI | 0.05 | 0.04 |
| | Km BSChI/ASChI | 0.52 | 0.010 |

Se presentan valores de Intervalos de confianza de 95% y media. Bondad de ajuste ASChI ($r^2=0.998$ y 0.992) y BSChI ($r^2=0.987$ y 0.997) en cabeza y músculo respectivamente.

En la Figura 4 se muestra gráficamente la preferencia de ChE por sustrato a diferentes concentraciones en cabeza y músculo de *Gambusia yucatana*, donde se aprecia una mayor preferencia por el sustrato ASChI a la concentración máxima de 10 mM, mientras que con el sustrato BSChI la preferencia por el sustrato fue menor.

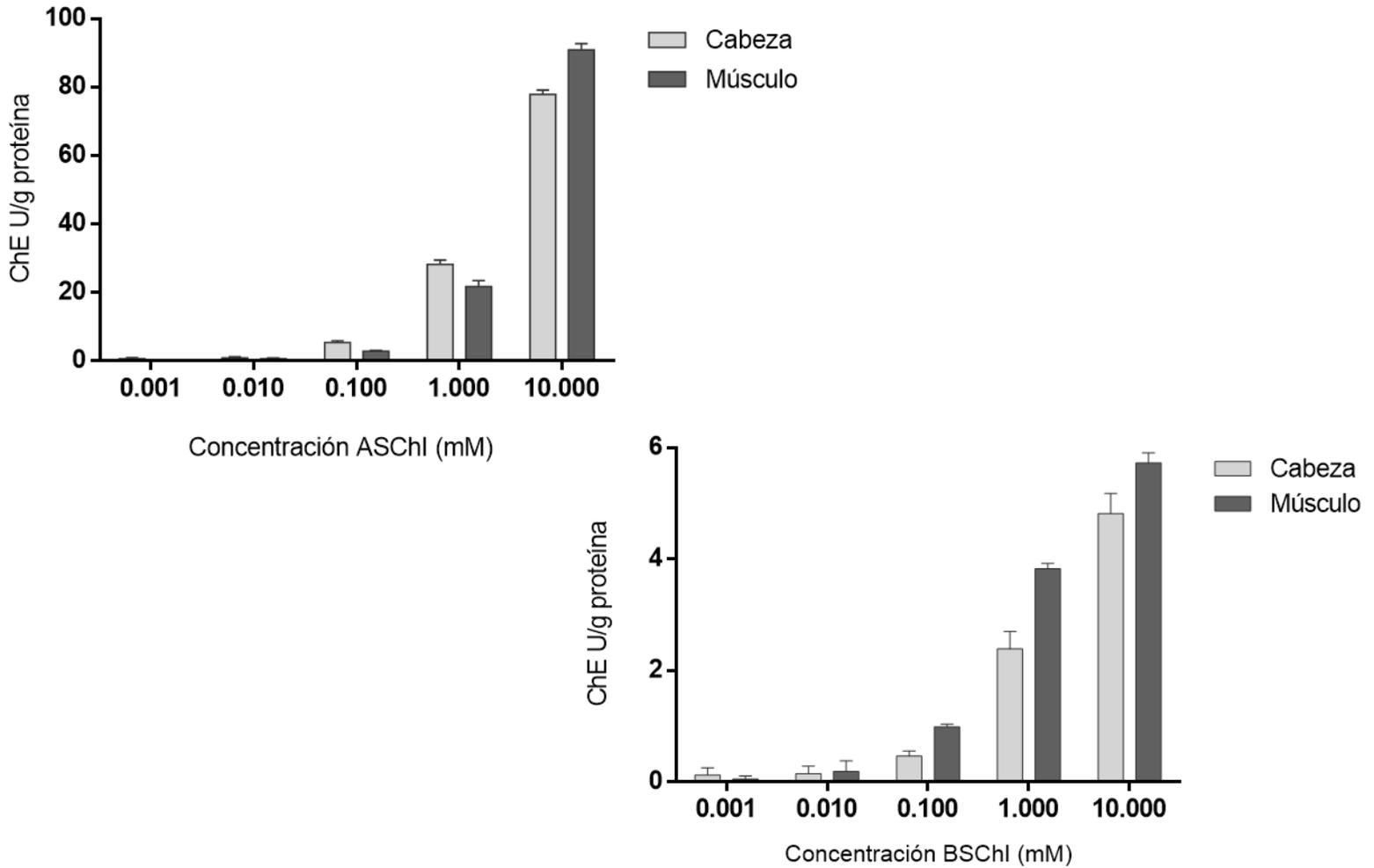


Figura 4. Preferencia de ChE por sustrato ASChI y BSChI en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana*

Con la caracterización por afinidad a sustrato no se lograron obtener resultados que permitieran determinar el tipo de ChE presente en los tejidos de *Gambusia yucatanana* ya que no se cumple con lo reportado por Pezzementi *et al.* (1991) en la relación de parámetros cinéticos, por lo cual se realizaron pruebas con inhibidores específicos para poder continuar con la caracterización de la ChE y seguir con el análisis.

Inhibidores específicos

Para la caracterización de ChE en pez *Gambusia yucatanana* se utilizaron inhibidores específicos: Eserina (inhibidor de ChE), BW284c51 (inhibidor de AChE) e Iso-OMPA (inhibidor de BChE).

Los resultados se muestran en la tabla 4. La ChE en cabeza y músculo presentó una mayor sensibilidad al inhibidor BW284c51 con el sustrato ASChI con un valor de IC₅₀ de 0.05 y 0.06, respectivamente. Los valores de IC₅₀ no se pudieron calcular con el inhibidor Iso-OMPA para ninguno de los sustratos en ambos tejidos, ya que la inhibición fue casi cero y no se pudieron ajustar los valores al modelo utilizado.

Tabla 4. Valores de IC₅₀ para la actividad de ChE con inhibidores específicos en tejidos de *Gambusia yucatanana*

| IC ₅₀ μM | Cabeza | | Músculo | |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| | ASChI | BSChI | ASChI | BSChI |
| Eserina | 0.22 (0.17 - 0.27) | 0.05 (0.03 - 0.09) | 0.33 (0.25-0.43) | 0.09 (0.05-0.2) |
| BW284c51 | 0.05 (0.04 - 0.06) | 0.37 (0.02 - 4.9) | 0.06 (0.05-0.06) | 0.14 (0.04-0.57) |
| Iso-OMPA | NC | NC | NC | NC |

Se presentan valores de intervalo de confianza de 95% y media. (NC= no calculado). Bondad de ajuste: ASChI ($r^2=0.993$ y 0.991), BSChI ($r^2=0.981$ y 0.98) en cabeza y músculo respectivamente

De acuerdo con lo observado en los resultados de las pruebas de afinidad al sustrato y sensibilidad a inhibidores específicos y lo reportado por Pezzementi *et al.*, 1991 y 2002, la ChE presente en *Gambusia yucatanana* es AChE con características atípicas, con mayor afinidad al sustrato BSChI y mayor sensibilidad al inhibidor BW284c51 con el sustrato ASChI.

Actividad de AChE en *Gambusia yucatanana* de cuerpos de agua

Después de determinar que la ChE presente en *Gambusia yucatanana* es una AChE atípica, se midió su actividad en la cabeza y músculo de los peces colectados de diferentes cuerpos de agua. Los resultados indican que los machos de los cinco sitios de muestreo presentan una longitud total inferior a la de las hembras. El rango de longitud total de los peces capturados está entre 25 y 35 mm. No se encontraron diferencias significativas en la longitud total medida en los peces entre sexos. Y la actividad enzimática de AChE medida en cabeza y músculo no muestra linealidad con respecto a la longitud total del pez en ninguno de los sexos como se muestra en la figura 5.

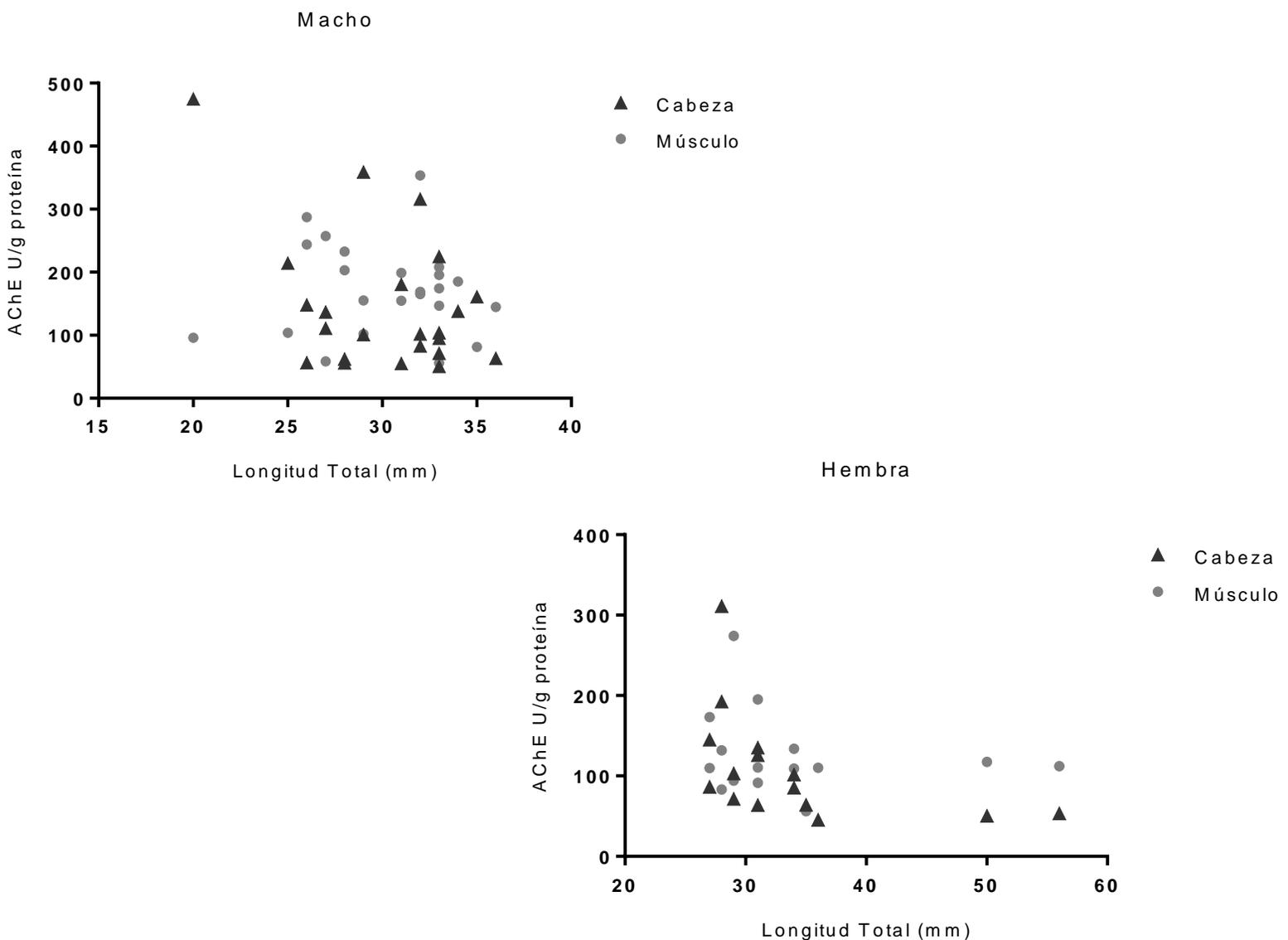


Figura 5. Gráfico de dispersión de la actividad de AChE en cabeza de *Gambusia yucatanana* de los cinco diferentes sitios de muestreo. Datos agrupados por sexo

En la Figura 6 se muestra gráficamente la actividad de AChE medida en ambos tejidos de *Gambusia yucatanana* y a través de un análisis de varianza factorial (Tabla 5) se determinó que no existen diferencias significativas en la actividad de AChE en cabeza en los sitios de muestreo y el grupo control. No hay un efecto del sexo ni de la interacción Sitio:Sexo en la actividad de AChE medida en la cabeza. Para el caso del tejido de músculo los resultados tampoco indican que exista un efecto del sexo ni de la interacción Sitio:Sexo, sin embargo sí se encontraron diferencias significativas entre el sitio de muestreo E13 ubicado en el municipio de Tecoh y el grupo control con condiciones de laboratorio ($p=0.04$).

Tabla 5. Análisis de varianza de AChE en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana*

| Cabeza | g.l. | CM | F | p |
|----------------|------|-------|-------|------|
| Sitio muestreo | 5 | 9902 | 0.985 | 0.45 |
| Sexo | 1 | 12496 | 1.243 | 0.27 |
| LT | 1 | 34502 | 3.432 | 0.07 |
| Sitio:Sexo | 5 | 4223 | 0.420 | 0.82 |
| Sexo:LT | 1 | 2199 | 0.219 | 0.64 |

| Músculo | g.l. | CM | F | p |
|----------------|------|-------|-------|-------|
| Sitio muestreo | 5 | 10494 | 2.806 | 0.04* |
| Sexo | 1 | 3819 | 1.021 | 0.32 |
| LT | 1 | 554 | 0.148 | 0.70 |
| Sitio:Sexo | 5 | 3381 | 0.904 | 0.49 |
| Sexo:LT | 1 | 286 | 0.077 | 0.78 |

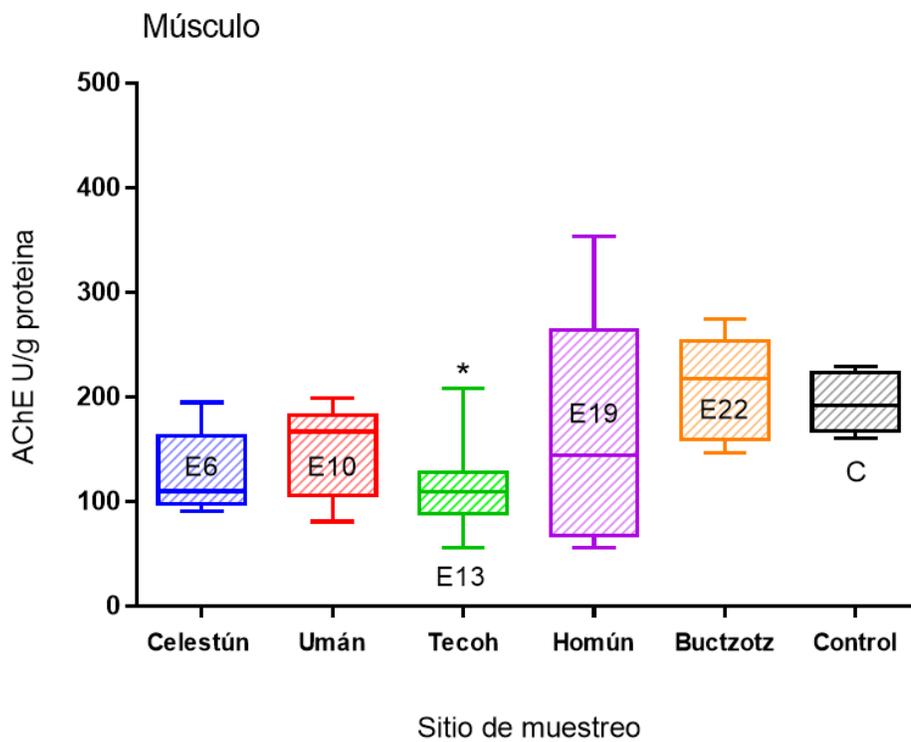
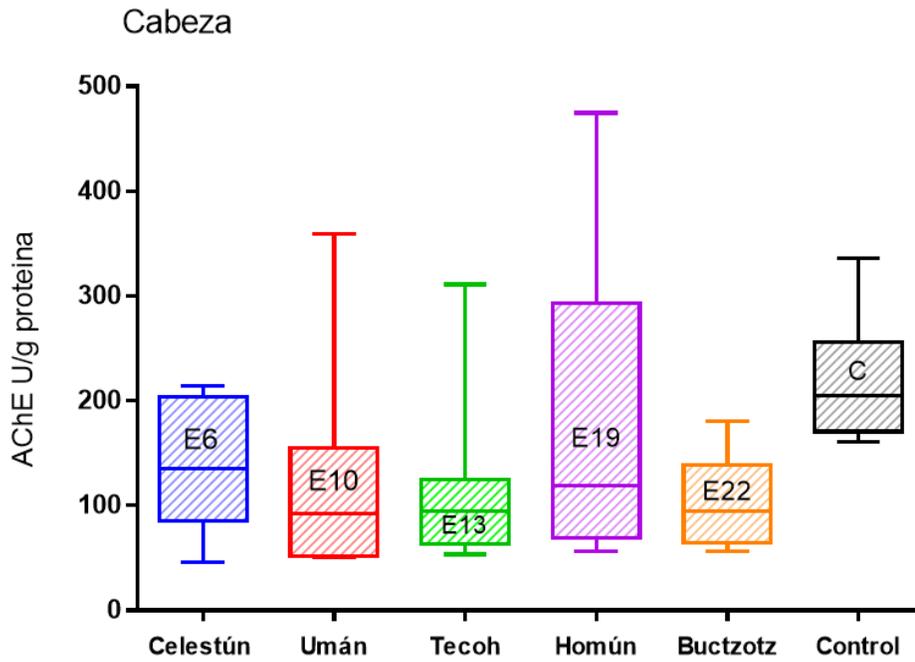


Figura 6. Actividad de AChE en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana* en los cinco sitios de muestreo y el grupo control. Las barras indican media \pm SD, * indica diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control

VIII. Discusión

A partir de los valores obtenidos en la cinética de Michaelis-Menten para los diferentes sustratos, la ChE presente en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana* presentó un valor mayor de V_{max} con el sustrato ASChI en ambos tejidos, mientras que con el sustrato BSChI presentaron valores de K_m menores, lo que sugiere una mayor afinidad por BSChI.

De acuerdo al criterio de clasificación de Pezzementi *et al.* (1991) con base en la relación de los parámetros cinéticos y los sustratos (Tabla 1), los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica de ChE en el homogenizado de la cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana* solo cumplen con uno de estos criterios (Tabla 2) y además no hubo evidencia de inhibición de la enzima con las concentraciones utilizadas. Sin embargo en el estudio de Rendón-von Osten *et al.*, (2005), en donde se utilizan concentraciones mayores de sustrato se reportó inhibición de la actividad enzimática en músculo con las concentraciones más altas de ASChI (20.48 mM).

Las relaciones de parámetros cinéticos no permiten diferenciar el tipo de ChE presente en los tejidos del pez, pero pueden indicar la presencia de una ChE atípica. Estas relaciones atípicas en sustrato y parámetros cinéticos se han descrito anteriormente en otras especies (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2013)

Los valores obtenidos con el inhibidor específico Eserina confirman que las actividades medidas son por la presencia de ChE y no por esterasas no específicas. Esto es importante durante la caracterización de la enzima ya que los tejidos pueden presentar diferentes tipos de esterasas y se pueden tomar en cuenta en la actividad enzimática medida sin tener la certeza de a qué grupo pertenecen, lo que puede llevar a una interpretación errónea de los resultados.

La ChE medida en ambos tejidos de *Gambusia yucatanana* presenta una mayor sensibilidad al inhibidor de AChE (BW284C51) que al inhibidor de BChE (Iso-OMPA), el cual presentó prácticamente una inhibición de cero. Los resultados de la caracterización sugieren que la ChE presente en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana* es una AChE con características atípicas, debido a la alta especificidad de la hidrólisis del sustrato BSChI. Este resultado concuerda parcialmente con lo reportado por Rendon Osten *et al.* (2005)

que establece que la ChE predominante en *Gambusia yucatanana* es AChE. Otros estudios también reportan que AChE es predominante en *Poecilia reticulata* (Garcia *et al.*, 2000) y *Gambusia holbrooki* (Nunes *et al.*, 2003), *Cnesterodon decemmaculatus* (De la Torre *et al.*, 2002) especies pertenecientes a la familia *Poeciliidae*, (Rendon Osten *et al.*, 2005; Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008).

El término "atípico" se usó previamente por Strum *et al.* (1999) para describir ChE con comportamiento diferente en preferencia de sustrato e inhibidores con respecto a las colinesterasas presentes en humanos. Hay ejemplos de ChE atípicas en peces marinos como en *Limanda limanda*, *Platichthys flesus* y *Serranus cabrilla* (Strum *et al.*, 1999) en *Haemulon plumieri* (Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008), especie propuesta como bioindicador en el programa de Monitoreo Sinóptico en el Sistema Arrecifal Mesoamericano y en *Abudefduf saxatilis* (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2013), ambas especies marinas y presentes en la península de Yucatán.

Tabla 6. Comparación de valores de Km, V_{max} e IC₅₀ para ChE en Cerebro de diferentes especies utilizando ASChI como sustrato y Eserina como inhibidores específicos

| Especie | Km | V_{max} | IC₅₀ | Referencia |
|------------------------------------|-------------|------------------------|------------------------|---|
| <i>Odonthestes bonaeriensis</i> | 0.040 | 260 | 0.001 | Monserrat <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Abudefduf saxatilis</i> * | 0.098 | 26.51 | 0.01 | Rodríguez-Fuentes <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | 0.102 | 229.3 | 0.0009 | Rodríguez-Fuentes y Gold Bouchout, 2004 |
| <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> | 0.170 | 464.6 | 0.0014 | De la Torre <i>et al.</i> , 2002 |
| <i>Cathorops spixii</i> | 0.196 | 21.1 | 0.07 | Tortelli <i>et al.</i> , 2006 |
| <i>Haemulon plumieri</i> | 0.31 | 237.8 | 0.001 | Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008 |
| <i>Gambusia yucatanana</i>* | 2.38 | 96.41 | 0.22 | Este trabajo |

Las especies están ordenadas de forma creciente de acuerdo al valor de Km

* Los valores cinéticos y de inhibición del homogenizado son de cabeza.

Los valores de K_m e IC_{50} con Eserina en *Gambusia yucatanana* son mayores a los reportados en varias especies que se muestran en la Tabla 6. Fourier y Mutaro (1994) observaron que valores altos de K_m en la actividad de ChE, pueden reflejar menor afinidad al sustrato natural ACh y por esto, a sustratos análogos como los plaguicidas organofosforados y carbamatos, por lo que presentan una baja sensibilidad a estos compuestos (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2016).

Según Monserrat y Bianchini (2001), valores bajos en IC_{50} con Eserina pueden indicar una alta sensibilidad a inhibición por plaguicidas; sin embargo los valores de AChE reportados para la especie *Gambusia yucatanana* (0.22 y 0.33 μM en cabeza y músculo respectivamente) muestran que es menos sensible a la inhibición de la enzima que las otras especies, lo que sugiere es la razón por la cual no se encuentran diferencias significativas en la medición de AChE en *Gambusia yucatanana* de los cuerpos de agua muestreados y el grupo control, además de que la AChE caracterizada presentó características atípicas.

Los resultados obtenidos de la medición de la actividad de AChE en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana* en los cinco cuerpos de agua, indican que no hay un efecto de los factores de longitud total y el sexo ni de su interacción en la actividad de AChE. Concuere da con lo reportado por Pacheco-Garrido *et al.* (2014), en donde en temporada de secas no se detectaron efectos significativos del sexo. Lo mismo que indican Gruber y Munn (1998) quienes no encontraron una relación entre la longitud, sexo y la actividad de ChE en *Cyprinus carpio*. Sin embargo en otras especies se han encontrado situaciones distintas en donde hay relación entre la longitud y/o sexo y la actividad de ChE; como se reportó en *Leusiscus cephalus* (Flammarion *et al.*, 2002), *Oreochromis niloticus* (Rodríguez-Fuentes, 2005) y en *Pleuronectes vetulus* donde se identificó una correlación en la longitud del pez y la actividad de ChE. En *Pleuronectes verticalis* se reportaron diferencias significativas en la actividad de ChE y el sexo, la actividad enzimática en machos fue menor y no se encontró una correlación con la longitud total del pez (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2008).

La karsticidad que presentan las rocas carbonatadas que conforman a la Península de Yucatán hacen que el agua permee rápidamente de la parte superior del suelo hacia el

agua subterránea (Escolero *et al.*, 2000), lo que hace altamente vulnerable al acuífero a la contaminación generada en la superficie (Bakalowicz, 2005), principalmente por compuestos utilizados en actividades agrícolas y ganaderas. Y dado que el agua subterránea es la principal fuente de consumo humano, al igual que para actividades agrícolas (Perry *et al.*, 2002), debe de estar sujeta a atención y análisis para detectar amenazas e impactos.

La agricultura es una actividad importante a considerar en el análisis de los resultados del biomarcador AChE dada la relación que tiene como posible fuente de contaminantes neurotóxicos al acuífero. De los cuerpos de agua muestreados, la mayor actividad agrícola se presenta en el sitio E13 en el municipio de Tecoh con 736 unidades de producción agrícola (INEGI, 2007), este sitio presentó diferencias significativas en la actividad de AChE y el grupo control (Fig. 6). Se debe de tener en cuenta que el muestreo se realizó en la temporada de secas, por lo que se piensa no hubo transporte por escorrentía de contaminantes de menor persistencia en el ambiente, y en los cuerpos de agua muestreados con menor actividad agrícola no se aprecia un efecto en la actividad de AChE.

La figura 7 muestra un mapa del área de estudio donde se expresa la relación geográfica de otros estudios de contaminación realizados en la zona y se representa la actividad agrícola del estado con el análisis de datos estadísticos disponibles en el portal del Sistema de Consulta de Información Geoestadística Agropecuaria (SCIGA) de los tipos de cultivos presentes en el estado de Yucatán.

Polanco-Rodríguez *et al.* (2015) reportan que el AC está contaminado por plaguicidas organoclorados a concentraciones por encima de los límites permisibles de acuerdo a la NOM-127-SSA1 (1994) y según su análisis espacial de distribución de los plaguicidas, permite determinar que las concentraciones más altas se localizan en la zona de descarga en los municipios de Celestún y en Dzilam González y en el centro en el municipio de Tecoh durante la temporada de secas. Además Hernández-Márquez (2017) identificó que en el sitio E13 ubicado en el municipio de Tecoh fue uno de los sitios en donde se observaron las mayores concentraciones de plaguicidas OCL totales (Fig. 7).

Lo reportado por Polanco-Rodríguez *et al.* (2015) solo se puede relacionar de manera indirecta con este estudio dado que se analizaron plaguicidas organoclorados y estos no inhiben a la AChE; aun así, dado que los plaguicidas OF y CB tienen menor persistencia en el ambiente que los OCL, los OCL pueden ser utilizados como rastreadores ya que de acuerdo a lo reportado por Hernández-Márquez (2017) en su estudio realizado en la misma zona se identifica la presencia en sedimento de plaguicidas OCL y OF en concentraciones que rebasan el Límite Umbral de Riesgo en sedimento (Fig.7).

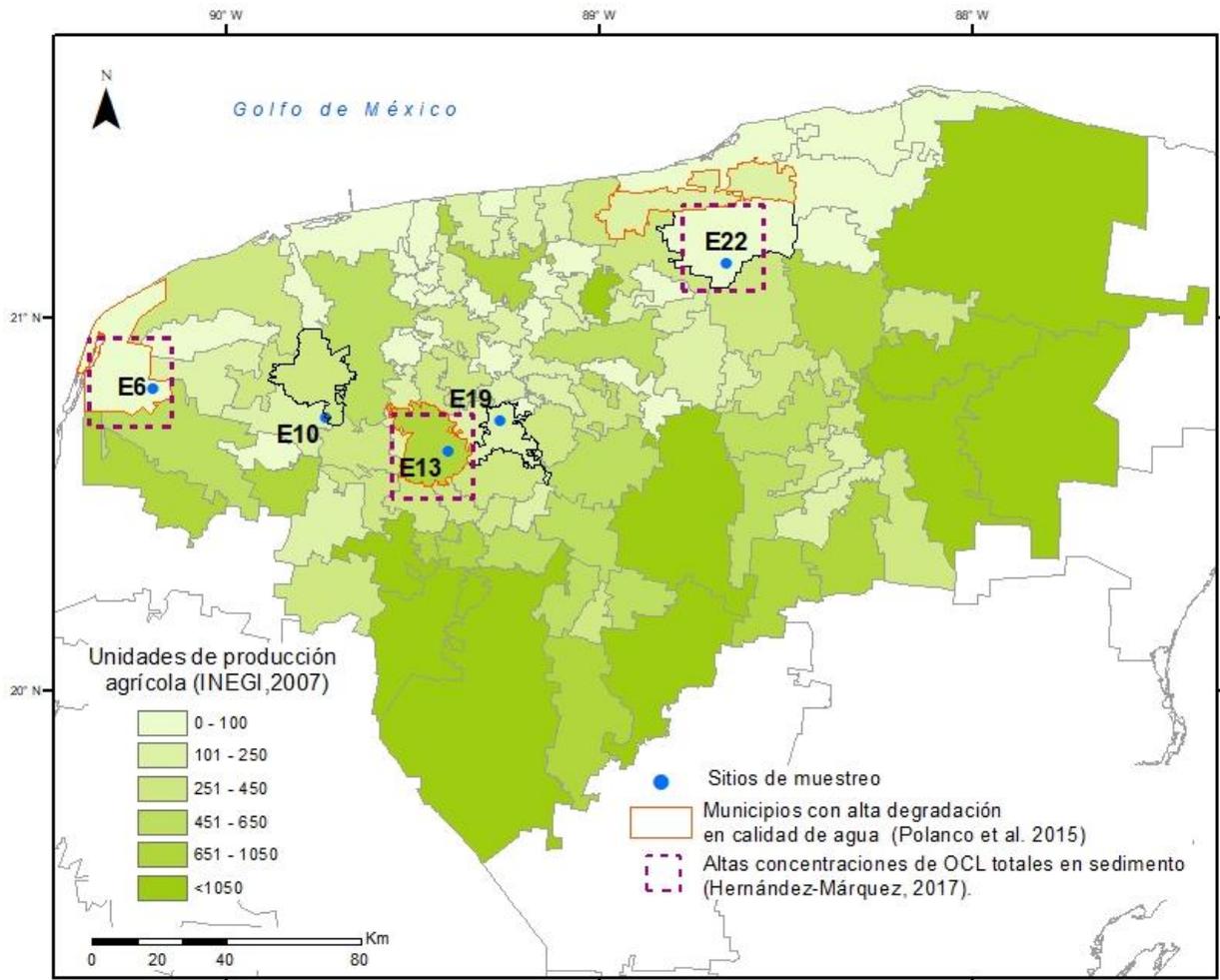


Figura 7. Relación de la actividad agrícola y estudios de contaminación realizados en el estado de Yucatán

De acuerdo a los estudios anteriormente mencionados y a los resultados obtenidos en este trabajo, se identifica al municipio de Tecoh como una zona de atención. En el sitio de muestreo E13 localizado en el municipio de Tecoh se observó una actividad de AChE en músculo significativamente menor ($\bar{x}=114.23$) con respecto al grupo control ($\bar{x}=194.81$). Para el caso de la AChE medida en la cabeza de *Gambusia yucatanana* no se identifican diferencias significativas entre los sitios de muestreo. Las mediciones de AChE en cabeza presentan un valor de desviación estándar con respecto a la media mayor ($\sigma=92.82$) que el observado en el tejido del músculo ($\sigma=66.67$), estos valores indican que hay una mayor variación en las mediciones de AChE en cabeza. También se debe de tener en cuenta que se analizó la cabeza entera del pez. En la cabeza están presentes diferentes tipos de tejido, lo que puede ocasionar que la medición de AChE no sea representativa. Para futuros estudios se recomienda seleccionar el cerebro de los organismos para medir la actividad de AChE.

Con los resultados del biomarcador si bien no es posible determinar el compuesto responsable de los efectos observados, indican la importancia de estudiar y caracterizar los biomarcadores en especies originarias de la región para evaluar el riesgo al ambiente por el uso de plaguicidas y así proponer estudios complementarios con la incorporación de otras variables como la temporalidad en el análisis, ya que los flujos de agua relacionados con las temporadas de secas y lluvias, presentan un efecto de dilución y movimiento en los contaminantes presentes en los cuerpos de agua, característica importante a tomar en cuenta. También sería útil la identificación de los principales plaguicidas organofosforados y carbamatos y su relación de uso en los cultivos presentes en la zona. Lo cual brindaría la oportunidad de proponer programas de monitoreo, en donde se integren los aspectos sociales, económicos de la población y los aspectos técnicos-productivos del uso de plaguicidas.

Como lo mencionan White *et al.* (2004) es innegable que para un manejo ambiental exitoso se requiere un conocimiento profundo del área, programas de monitoreo que consideren las transformaciones biogeoquímicas de los compuestos de entrada y estudios de largo plazo que permitan identificar amenazas al ecosistema. De allí la importancia de contar con un buen manejo y regulación de plaguicidas. En México poco se ha trabajado de manera integral en los componentes antes mencionados para un buen manejo, por lo

que las estrategias implementadas son poco exitosas. Estudios como el realizado pueden brindar una señal de atención temprana para continuar con la evaluación de contaminantes con un biomarcador y con el complemento de estudios como los realizados por Albert, L.A. (2013), Polanco-Rodríguez *et al.* (2015), Hernández-Márquez (2017) entre otros, en la identificación y uso de plaguicidas y así contribuir a mejorar la regulación, asegurar la calidad del agua y el estado de los ecosistemas asociados.

Es necesario el establecimiento de nuevas prácticas, procedimientos y estrategias orientadas hacia un manejo sustentable de la actividad agrícola para reducir el uso de plaguicidas, adoptando diferentes técnicas que tengan menor impacto tanto en el ambiente como en la salud humana. Una alternativa para reducir el uso de plaguicidas es la estrategia de Manejo Integral de Plagas (MIP) la cual, según la Extensión del Comité en Organización y Políticas de E.U. (ECOP por sus siglas en inglés) se define como un proceso que consiste en uso balanceado de procedimientos culturales, biológicos y químicos que sean ambientalmente compatibles, económicamente factibles y socialmente aceptados para reducir las poblaciones de plagas que son tratados como sistemas ecológicos y por ende disminuir el uso de plaguicidas.

La estrategia está basada en tomar medidas preventivas, monitorear los cultivos, evaluar el daño por la plaga y en seleccionar las acciones apropiadas estableciendo umbrales económicos o umbrales de acción, ya que éstos toman en cuenta la susceptibilidad y el estado de desarrollo del cultivo, el estado biológico de la plaga y la disminución del rendimiento que puede causar, y por consiguiente, el impacto de la plaga a nivel producción.

Los métodos de control de plagas que son más recomendables según la ficha técnica de SAGARPA desde el punto de vista del MIP son los basados en:

- Prácticas culturales: es indispensable tener conocimiento del desarrollo del cultivo.
- Características de tolerancia o resistencia de las plantas al ataque y daño por las plagas: es necesario conocer cuáles son los límites de tolerancia a las plagas para no aplicar plaguicida antes de que sea necesario.

- Control biológico: cuidar y reforzar la acción de los agentes de control biológico que normalmente están presentes en el ecosistema o pueden liberarse en el campo organismos producidos en centros de reproducción o laboratorios especializados.
- Métodos de interferencia como la aplicación de feromonas y repelentes de insectos.

La combinación de métodos puede maximizar los beneficios del MIP y su adopción como estrategia integral. Es posible entonces, planear acciones de control con mayor oportunidad y probabilidad de éxito con el fin de disminuir el uso de plaguicidas y con ello lograr una reducción de los residuos tóxicos y así contribuir a preservar la salud del hombre, proteger al medio ambiente en zonas agrícolas, conservar la diversidad biológica y evitar la dependencia en un solo método de control. Cabe destacar que además es potencialmente más barato, sobre todo a mediano y largo plazo.

Se han realizado estudios prácticos de la implementación de MIP en algunos cultivos con resultados positivos. Trumble y Alvarado (1993) reportaron el éxito del MIP en un cultivo de tomate en México, en donde se alcanzó una reducción del 90% en la aplicación de plaguicidas con una producción similar que la alcanzada en cultivos utilizando plaguicidas. Fernández-Cornejo (1998) trabajaron con los viticultores en E.U. mismos que adoptaron estrategias de MIP para insectos y para enfermedades utilizaron significativamente menos aplicaciones de plaguicidas que los que no adoptaron esta estrategia. Así mismo tanto la toxicidad media como el cociente de impacto ambiental disminuyeron. Por otra parte Miranda *et al.* (2005) reporta que en un cultivo de tomate analizado en Brasil, las plagas fueron eficientemente controladas con el MIP a precios más bajos, con una producción similar y un 65% menos aplicaciones de plaguicidas que el cultivo con prácticas habituales de manejo. Y de acuerdo con el estudio realizado por Muriithi *et al.* (2016) en Kenia, el uso de la estrategia de MIP en un cultivo de mango redujo en 17% las pérdidas en la producción, además de obtener resultados de una disminución promedio del 45% en la compra de plaguicidas a través de todos los métodos de MIP analizados en el estudio.

En vista de que la estrategia está basada en tomar medidas preventivas, monitoreo de cultivos, evaluar el daño por la plaga y en seleccionar acciones y componentes del MIP apropiados, se reconoce la importancia y necesidad de generar y poner a disposición la información, el constante ejercicio de monitoreo y el conocimiento de las percepciones de

riesgo de la población involucrada, para asegurar un buen diseño y así lograr un compromiso social que contribuya a la adopción e implementación exitosa de la estrategia y así lograr la disminución del uso de plaguicidas (Silva-Dreyer *et al.* 2011).

Estrategias integrales para la protección del ambiente y reducción de riesgos incluyen la zonificación del uso de suelo, evaluación y manejo de riesgos de contaminación, desarrollo de un código de prácticas, lo que incluye la revisión de catálogos de plaguicidas registrados y la capacitación y recomendaciones para los agricultores en el uso de plaguicidas y el desarrollo de sistemas de monitoreo (Escolero *et al.* 2002). Además es importante el reforzamiento del marco legal existente en materia de medio ambiente para mejorar la regulación del uso de plaguicidas. Para esto es necesario el trabajo conjunto e integral entre instituciones de gobierno, academia, así como de la comunidad.

IX. Conclusión

A partir de los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica de ChE en cabeza y músculo de *Gambusia yucatanana* se concluye

- La presencia de una AChE atípica con alta sensibilidad a BW284C51 y valores bajos de Km con el sustrato BSChI en cabeza y músculo del pez.
- No se encontró una relación en la talla y sexo del pez con la actividad de AChE medida.
- Los resultados indican que la actividad de AChE medida en músculo de *Gambusia yucatanana* en el sitio E13 es significativamente menor a la medida en el grupo control.

La caracterización de las ChE presentes en *Gambusia yucatanana* proporciona información sólida para realizar una correcta interpretación de resultados. En la utilización del biomarcador de AChE para la determinación de un efecto por la presencia de plaguicidas organofosforados y carbamatos. Estos resultados sugieren que el sitio E13 ubicado en el municipio de Tecoh puede tener un impacto en la actividad de AChE por contaminación de plaguicidas, además de que permite poner en el mapa el riesgo de contaminación al

acuífero reconociéndolo como ecosistema integrado y complejo dada su relación con el ambiente y su respuesta a las actividades humanas (Drew y Hölitz, 1999).

Es necesario el diseño e implementación de un sistema de monitoreo en la región donde se utilicen biomarcadores en diferentes niveles tróficos y de diferente tipo y ensayos químicos complementarios para la identificación y determinación de la concentración de los plaguicidas que permitan obtener más información sobre su impacto. Así como incluir en estos estudios estrategias que permitan evaluar características como el uso de suelo, el código de prácticas y los reglamentos asociados al uso de plaguicidas para que se logre un análisis más completo de los impactos al ambiente y la introducción de nuevas tácticas de manejo de cultivos para disminuir el riesgo de contaminación por plaguicidas.

X. Referencias

- Albert, L. A., 2013. Uso de plaguicidas en las zonas costeras del Golfo de Mexico e investigaciones sobre su impacto. p. 265-284. En: A.V. Botello, J. Rendon von Osten, J. A. Benitez y G. Gold-Bouchot (eds.). Golfo de Mexico. Contaminacion e impacto ambiental: diagnostico y tendencias. uac, unam-icmyl, cinvestav-Unidad Merida. 1176 p. isbn 978-607- 7887-71-3.
- Alpuche-Gual, L., & Gold-Bouchot, G. (2008). Determination of esterase activity and characterization of cholinesterases in the reef fish *Haemulon plumieri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 787–797. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.01.024>
- Alvarado-Mejia, J., Victor, C.-G., & González-Navarrete, L. (1994). Insecticidas y herbicidas de mayor uso en los horticultores de Yucatán. Implicaciones a la salud y al ambiente. *Rev Biomed*, 180–190.
- Alves, L. M., Lemos, M. F. L., Correia, J. P. S., da Costa, N. a. R., & 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*, 465, 49–55. <http://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.01.006>
- Arcega-Cabrera, F., Velázquez-Tavera, N., Fargher, L., Derrien, M., & Noreña-Barroso, E. (2014). Fecal sterols, seasonal variability, and probable sources along the ring of cenotes, Yucatan, Mexico. *Journal of Contaminant Hydrology*, 168, 41–49. <http://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2014.08.007>
- Botello, A. V., Rendón-von Osten, J., Gold-Bouchot, G., & Agraz-Hernández, C. (2005). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón de México, Instituto Nacional de Ecología.*
- Chambers, J. E. (1976). The relationship of esterases to organophosphorus insecticide tolerance in mosquitofish. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 6(6), 517–522.

[http://doi.org/10.1016/0048-3575\(76\)90075-4](http://doi.org/10.1016/0048-3575(76)90075-4)

- Coppage, D. L., & Braidech, T. E. (1976). River pollution by anticholinesterase agents. *Water Research, 10*(1), 19–24. [http://doi.org/10.1016/0043-1354\(76\)90152-4](http://doi.org/10.1016/0043-1354(76)90152-4)
- Derrien, M., Cabrera, F. A., Tavera, N. L. V., Kantún Manzano, C. A., & Vizcaino, S. C. (2015). Sources and distribution of organic matter along the Ring of Cenotes, Yucatan, Mexico: Sterol markers and statistical approaches. *Science of The Total Environment, 511*, 223–229. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.053>
- Hagger, J. a., Jones, M. B., Leonard, D. R. P., Owen, R., & Galloway, T. S. (2006). Biomarkers and integrated environmental risk assessment: Are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management, 2*(4), 312–329. <http://doi.org/10.1002/ieam.5630020403>
- Henao, S., & Nieto, O. (2008). *Plaguicidas de tipo organofosforados y carbamatos*.
- Howcroft, C. F., Gravato, C., Amorim, M. J. B., Novais, S. C., Soares, A. M. V. M., & Guilhermino, L. (2011). Biochemical characterization of cholinesterases in *Enchytraeus albidus* and assessment of in vivo and in vitro effects of different soil properties, copper and phenmedipham. *Ecotoxicology (London, England), 20*(1), 119–30. <http://doi.org/10.1007/s10646-010-0562-4>
- Jaksić, Z., Hamer, B., Landeka, N., & Batel, R. (2008). Western mosquitofish as a bioindicator of exposure to organochlorine compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 71*(2), 426–35. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.11.006>
- Jenkins, B. J. A., Draugelis-dale, R. O., & Survey, U. S. G. (2006). Bioindicators from Mosquitofish (*Gambusia affinis*) Sampled from the Imperial Valley in Southern California U . S . Geological Survey, 1–43.
- Jordaan, M. S., Reinecke, S. A., & Reinecke, A. J. (2013). Biomarker responses and morphological effects in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus* following sequential exposure to the organophosphate azinphos-methyl. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands), 144–145*, 133–40. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.007>

- Kavitha, P., & Venkateswara Rao, J. (2007). Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *87*(2), 182–188. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.07.008>
- Mondragón-Sánchez, A., & Rodas-Regil, O. (2011). Hábitos alimentarios de *Gambusia yucatanensis* en la División Académica de Ciencias Biológicas (UJAT), Villahermosa Tab. *Kuxulkab' Revista de Divulgación División Académica de Ciencias Biológicas*, *XVII*, 68–109.
- Newman, M. C. (2008). Encyclopedia of Ecology. In *Encyclopedia of Ecology* (pp. 1195–1201). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00431-6>
- Payne, J. F., Mathieu, A., Melvin, W., & Fancey, L. L. (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, *32*(2), 225–231. [http://doi.org/10.1016/0025-326X\(95\)00112-Z](http://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00112-Z)
- Pérez-Leon, S, Schmitter-Soto, J. J. (2007). DISTRIBUCIÓN Y TAXONOMÍA DEL GÉNERO GAMBUSIA (TELEOSTEI: POECILIIDAE) EN EL NORTE Y ORIENTE DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN , Distribution and taxonomy of the genus *Gambusia* (Teleostei: Poeciliidae) in northern and eastern Yucatan peninsula , Mexico. *Universidad Y Ciencia, UJAT*, *23*(2), 167–171.
- Polanco-Rodríguez, A. G., Navarro-Alberto, J. A., Solorio-Sánchez, J., Mena-Rejón, .J., Marrufo-Gómez, J., & Del Valls-Castillas, T. A. (2015). Contamination by organochlorine pesticides in the aquifer of the Ring of Cenotes in Yucatan, Mexico. *Water and Environment Journal*, *29*(1), 140–150. <http://doi.org/10.1111/wej.12080>
- Rendón-von Osten, J., Ortíz-Arana, A., Guilhermino, L., & Soares, A. M. V. M. (2005). In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatanensis*) exposed to pesticides. *Chemosphere*, *58*(5), 627–36. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.065>
- Rodríguez-Fuentes, G. (2005). *Caracterización de las colinesterasas en diferentes órganos*

de la tilapia nilótica (Oreochromis niloticus): Aplicación para Ecotoxicología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Mérida. Retrieved from http://www.mda.cinvestav.mx/ecohum/tesis_estudiantes/TesisRMurguia12.pdf

- Rodríguez-Fuentes, G., Armstrong, J., & Schlenk, D. (2008). Characterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *69*(3), 466–471. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.06.008>
- Rodríguez-Fuentes, G., Luna-Ramírez, K. S., Soto, M., & Richardson, K. L. (2012). Gene expression in caged fish as indicators of contaminants exposure in tropical karstic water bodies. *Marine Environmental Research*, *75*, 62–6. <http://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.09.016>
- Rodríguez-Fuentes, G., Soto, M., & Luna-Ramírez, K. (2013). Characterization of cholinesterases in the damselfish Sergeant major (*Abudefduf saxatilis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *96*, 99–102. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.06.023>
- Rodríguez-Fuentes, G., & Gold-Bouchot, G. (2000). Environmental monitoring using acetylcholinesterase inhibition in vitro. A case study in two Mexican lagoons. *Marine Environmental Research*, *50*(1), 357–360. [http://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00062-3](http://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00062-3)
- Rodríguez-Fuentes, G., & Gold-Bouchot, G. (2004). Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Marine Environmental Research*, *58*(2), 505–509. <http://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.037>
- Silva-Dreyer, A., Arancibia-Heger, M., Arnao-Fernández, M., Cavieres-Fernandez, M. F., & Lopez-Orellana, P. del R. (2011). *Percepción de riesgo de plaguicidas en pequeños agricultores y agricultoras de tres comunas de la V Región Valparaíso.*
- Sturm, A., da Silva de Assis, H. ., & Hansen, P.-D. (1999). Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, *47*(4), 389–398. [http://doi.org/10.1016/S0141-1136\(98\)00127-5](http://doi.org/10.1016/S0141-1136(98)00127-5)

- Tortelli, V., Colares, E. P., Robaldo, R. B., Nery, L. E. M., Pinho, G. L. L., Bianchini, A., & Monserrat, J. M. (2006). Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. *Chemosphere*, *65*, 560–566. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.02.047>
- Valbonesi, P., Brunelli, F., Mattioli, M., Rossi, T., & Fabbri, E. (2011). Cholinesterase activities and sensitivity to pesticides in different tissues of silver European eel, *Anguilla anguilla*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *154*(4), 353–359. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.07.003>
- Versonnen, B., Sobanska, M., & Cesnaitis, R. (2014). *Ecotoxicology, Aquatic. Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00495-4>
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., & Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: C*, *146*(3), 281–300. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.04.011>
- White, D.A. Hood, C.S. (2004). Vegetation patterns and environmental gradients in tropical dry forest of the northern Yucatan. *Journal of Vegetation Science*, *15*. pp. 151-160.
- Wogram, J., Sturm, A., Segner, H., Liess, M., (2001). Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* *20*, 1528–1531.

ANEXOS

1. Método de Ellman, 1961 adaptado a microplaca (Rodríguez-Fuentes, 2005)

Preparación del tejido

1. Preparar bufer Tris pH 8.0 con una concentración 0.5M (0.709 g en 100ml de agua destilada)
2. Pesar aproximadamente 200 mg de tejido 3. Agregar bufer Tris pH 8.0 frío con una proporción de 1 ml por cada 100 mg de tejido
4. Utilizar el homogenizador con pistón de teflón hasta que el tejido quede totalmente desbaratado, el contenedor de tejido/bufer se deberá mantener con hielo para mantenerlo frío.
5. Colocar el homogeneizado en tubos para centrífuga o en tubos Eppendorf
6. Centrifugar a 10 000 rpm por 5 minutos 7. Recuperar el sobrenadante y colocarlo en un nuevo tubo Eppendorf
8. Congelar a -20°C hasta su uso

Actividad de Colinesterasas

Solución DNTB/Tris pH 7.4

1. Pesar 0.758g de Bufer Tris pH 7.4
2. Disolver en agua destilada y aforar a 100 ml
3. Pesar 0.0099 g de DTNB
4. Disolver en la solución de bufer Tris pH 7.4 y aforar a 100 ml

Solución de Ioduro de Acetilcolina (ASChI) 0.1 M

1. Pesar 0.0578 gr de ASChI

2. Disolver con agua destilada y aforar a 10 ml

Solución de Ioduro de Acetiltiocolina (BSChI) 0.1 M

1. Pesar 0.06344 gr de BSChI

2. Disolver con agua destilada y aforar a 10 ml

Método

1. Descongele el tubo que contiene el homogeneizado

2. Coloque en un pozo de la microplaca 170 μ l de la solución DTNB/bufer Tris 7.4 y 20 μ l de homogenizado

3. Agite para mezclar todo

4. Antes de iniciar la lectura agregue 10 μ l de solución de ASChI y BSChI para cada placa respectivamente

5. Leer la absorbancia en un lector de placas 405 nm por 1 minuto, utilizando el módulo de cinética. Obtener el parámetro $\Delta A/\text{min}$

Cálculo de la Actividad de Colinesterasas

Obtenga el contenido de proteína del homogeneizado por el método de Bradford

Aplique la siguiente fórmula

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{1}{10000} \times \frac{\Delta A/\text{min}}{\left(\frac{Vh}{Vt}\right) \times Cp} \times 1000000$$

Donde

$\Delta A/\text{min}$ = cambio de Absorbancia en el tiempo (se obtiene de la cinética)

$V_h/V_t = \text{Volumen del homogeneizado} / \text{Volumen total de reacción} = 20 \mu\text{l} / 200\mu\text{l}$

$C_p = \text{Concentración de proteína mg/ml}$

2. Método Bradford, 1976

1. Pipetee 10 μl de cada una de las soluciones estándar de albúmina sérica bovina fracción V (concentraciones de 0, 0.1, 0.5, 0.9, 1.3, 1.7 y 2 mg/ml).
2. Pipetear 2 μl de muestra y agregar 8 μl de agua en el pozo apropiado
3. Agregar 140 μl de reactivo de Bradford en cada uno de los pozos
4. Colocar la placa en el agitador por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Remover la placa y lea absorbancia a 595 nm en un lector de placas

Análisis de resultados

1. Reste la absorbancia del pozo que contiene 0 mg/ml de proteína a todas las muestras y estándares.
2. Graficar como variable dependiente la concentración de la muestra en mg/ml y como variable independiente la absorbancia corregida
3. Obtener la ecuación de la curva de ajuste utilizando como modelo un polinomio grado dos.
4. Calcular la concentración de proteína utilizando la absorbancia corregida y la curva de ajuste obtenida en el paso 3.
5. Multiplicar el contenido de proteína por el factor de dilución (5).

3. Sitios de muestreo

| Estación | Latitud | Longitud | Municipio |
|----------|------------|--------------|-----------|
| E6 | 20.8133056 | -90.19633333 | Celestún |
| E10 | 20.7364722 | -89.7320555 | Umán |
| E13 | 20.6465 | -89.4046111 | Tecoh |
| E19 | 20.727 | -89.26813888 | Homún |
| E22 | 21.1483889 | -88.657833 | Buctzotz |

4. Datos de peces muestreados

| Estación | Muestra | LT | LP | A | Cabeza | Músculo | Sexo |
|----------|---------|----|----|----|------------|------------|--------|
| 6 | 1 | 31 | 25 | 6 | 125.695419 | 104.140656 | Hembra |
| 6 | 2 | 25 | 19 | 5 | 214.205797 | 131.927374 | Macho |
| 6 | 3 | 31 | 24 | 7 | 135.148366 | 195.139073 | Hembra |
| 6 | 4 | 28 | 20 | 6 | 192.447317 | 91.3881068 | Hembra |
| 6 | 5 | 36 | 27 | 8 | 45.6189992 | 110.081161 | Hembra |
| 10 | 2 | 31 | 25 | 8 | 55.3147666 | 101.887746 | Macho |
| 10 | 3 | 32 | 25 | 7 | 101.790955 | 198.774433 | Macho |
| 10 | 4 | 35 | 28 | 8 | 161.019851 | 168.864836 | Macho |
| 10 | 5 | 33 | 25 | 8 | 50.5939905 | 165.31495 | Macho |
| 10 | 6 | 29 | 23 | 6 | 359.125652 | 174.313271 | Macho |
| 10 | 7 | 32 | 24 | 7 | 83.304155 | 185.103713 | Macho |
| 10 | 8 | 50 | 40 | 12 | 50.3337243 | 81.3686976 | Hembra |
| 10 | 9 | 34 | 26 | 7 | 138.177487 | 117.611116 | Macho |
| 13 | 1 | 34 | 28 | 7 | 101.937054 | 109.83626 | Hembra |
| 13 | 2 | 29 | 22 | 7 | 71.6350254 | 56.1781264 | Hembra |
| 13 | 4 | 31 | 24 | 7 | 63.9712593 | 83.2172965 | Hembra |
| 13 | 5 | 33 | 27 | 7 | 103.832004 | 94.1868464 | Macho |
| 13 | 6 | 28 | 23 | 7 | 311.07281 | 208.224576 | Hembra |
| 13 | 7 | 33 | 27 | 8 | 95.1871097 | 144.766906 | Macho |
| 13 | 8 | 36 | 28 | 8 | 63.5350986 | 110.525511 | Macho |
| 13 | 9 | 56 | 47 | 15 | 53.5105198 | 109.01614 | Hembra |
| 13 | 10 | 27 | 22 | 6 | 145.233068 | 112.145978 | Hembra |
| 19 | 1 | 27 | 21 | 5 | 136.997062 | 96.0264623 | Macho |
| 19 | 2 | 33 | 26 | 6 | 224.752501 | 287.132815 | Macho |
| 19 | 4 | 26 | 21 | 5 | 56.4776805 | 58.7352362 | Macho |
| 19 | 6 | 32 | 26 | 6 | 315.974266 | 155.332287 | Macho |
| 19 | 7 | 20 | 17 | 3 | 474.779948 | 353.500231 | Macho |
| 19 | 8 | 29 | 24 | 5 | 100.879066 | 195.462822 | Macho |
| 19 | 9 | 34 | 27 | 7 | 85.4625251 | 133.899398 | Hembra |
| 19 | 10 | 35 | 28 | 8 | 64.033465 | 56.2720506 | Hembra |
| 22 | 2 | 27 | 22 | 5 | 111.096301 | 173.299398 | Macho |
| 22 | 3 | 31 | 26 | 6 | 180.463577 | 274.296859 | Macho |
| 22 | 4 | 28 | 23 | 5 | 55.9790697 | 244.135658 | Macho |
| 22 | 5 | 29 | 24 | 5 | 103.182762 | 257.333724 | Hembra |
| 22 | 6 | 28 | 24 | 5 | 62.1368547 | 203.093806 | Macho |
| 22 | 7 | 33 | 27 | 6 | 71.3912411 | 232.724206 | Macho |
| 22 | 9 | 27 | 19 | 4 | 86.5510248 | 154.728903 | Hembra |
| 22 | 10 | 26 | 22 | 5 | 147.955361 | 146.712718 | Macho |