



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

Esterasas presentes en diferentes órganos en el pez "*Poecilia velifera*" y su sensibilidad a plaguicidas organofosforados durante exposiciones a diferentes condiciones de salinidad

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
GISSELA ESTEFANIA MORENO ORTIZ**

TUTORA PRINCIPAL

**Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes
Unidad de Química en Sisal-UNAM**

COMITÉ TUTOR

**Dra. Elsa Noreña Barroso UQS, FQ-UNAM
Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui UMDI, FC-UNAM
Dr. Miguel Betancourt Lozano CIAD
Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez FC-UNAM**

Sisal-Yucatán, diciembre 2019



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.



TÍTULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Esterasas presentes en diferentes órganos en el pez "*Poecilia velifera*" y su sensibilidad a plaguicidas organofosforados durante exposiciones a diferentes condiciones de salinidad

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
Con énfasis en
Química acuática

PRESENTA:
Gissela Estefania Moreno Ortiz

TUTORA PRINCIPAL

Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes
Unidad de Química en Sisal-UNAM

COMITÉ TUTOR

Dra. Elsa Noreña Barroso UQS, FQ-UNAM
Dra. Maite Mascaró Miquelajauregui UMDI, FC-UNAM
Dr. Miguel Betancourt Lozano CIAD
Dra. Ruth Cecilia Vanegas Pérez FC-UNAM

Sisal-Yucatán, diciembre 2019

La cosa más hermosa que podemos experimentar es el misterio.

Es la fuente de toda arte y toda ciencia

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la vida por cumplir uno de mis sueños más grandes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a todos los ciudadanos mexicanos por la beca que me proporcionaron para poder realizar mis estudios de posgrado. A la Universidad Nacional Autónoma de México por poder continuar con mi formación académica, ha sido un verdadero orgullo pertenecer a esta gran casa de estudios. Al posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por las oportunidades y ayuda que recibí.

A la Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes, gracias por su paciencia y apoyo, por confiar en mí. Gracias por ser una gran inspiración para mi vida profesional y personal. A la Dra. Elsa Noreña Barroso, gracias por guiarme y apoyarme en todo momento. A la Dra. Maite Mascaró por su apoyo en el análisis de datos. A la Dra. Cecilia Vanegas y al Dr. Miguel Betancourt por sus comentarios muy acertados en la revisión de mi documento.

A Marco por su apoyo, paciencia y cariño en su enseñanza en el mundo de la Ictiología. A Pili, me faltan palabras para expresar mi cariño hacia ti. Gracias por tu apoyo en todo momento, por preocuparte y siempre abrirme las puertas de tu casa. Un agradecimiento a tu familia por considerarme parte de la suya y siempre cuidar de mí. Sin duda Uds. son los mejores.

A Xime y Abraham, por su cariño, por todas las risas y momentos compartidos. Por todas sus ocurrencias y apoyo en el cuidado de Sirius, los quiero. A Oscar, gracias por las conversas en el muelle, el mejor lugar. A una gran amiga, Paty, gracias por las experiencias, ánimos y apoyo. ¡Gracias por tus consejos, te extraño!

A mis amigas de laboratorio Karen, Esperanzita y Raque gracias por hacer del laboratorio un ambiente cálido. A mis amigos Heber, Rafa, Marce, Álvaro, Kenya, Pame, Fer, Rodri, Lau, Luis sin duda las mejores anécdotas con Uds.

A Gaby, gracias por tu amistad y cariño. A Natasha, ñaña gracias por estos casi 20 años de amistad y porque a pesar de la distancia siempre hemos estado apoyándonos. A David y Eli, por recibirme en su casa y siempre consentirme con golosinas, mis ñaños para siempre.

DEDICATORIA

A mi mamá, por apoyarme e impulsarme en este sueño. Por sus consejos y amor incondicional. A mi hermana, eres mi ángel en la tierra. A mi sobrinita, Amalita, por tu dulzura mi chiquita.

A mi abuelito Víctor, por su cariño y dulzura. A mi abuelita Rosita, por cuidarme desde el cielo.

A mi papá, a pesar de que en silencio nos comunicamos mejor, gracias por su amor y preocupación.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	V
DEDICATORIA.....	VI
ÍNDICE.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES.....	14
III. JUSTIFICACIÓN.....	17
IV. OBJETIVOS.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Particulares.....	19
V. HIPÓTESIS.....	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
1. Origen de los organismos.....	21
2. Caracterización bioquímica de colinesterasas.....	22
Caracterización por sustratos.....	22
Caracterización por inhibidores.....	23
3. Efecto <i>in vivo</i> de la exposición a plaguicidas organofosforados Clorpirifos y Metamidofos en la actividad de B-esterasas bajo condiciones diferentes de salinidad.	
24	
Determinación de colinesterasas (ChEs).....	26
Determinación de carboxilesterasas (CbE).....	27
4. Análisis Bioquímicos.....	28
5. Análisis Estadístico.....	30
VII. RESULTADOS.....	33
1. Caracterización bioquímica de ChEs presentes en el pez <i>Poecilia velifera</i>	33
Preferencia de sustratos:.....	33
Inhibidores específicos.....	36

2. Efecto de la exposición <i>in vivo</i> a los plaguicidas Clorpirifos y Metamidós en la actividad de Esterasas bajo diferentes condiciones de salinidad.....	39
Colinesterasas:	41
Carboxilesterasas:	46
DISCUSIÓN	52
1. Caracterización bioquímica de Colinesterasas	52
2. Efecto de la exposición <i>in vivo</i> a los plaguicidas Clorpirifos y Metamidós en la actividad de Esterasas.....	57
CONCLUSIONES:	66
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Función de la AChE en las terminaciones nerviosas.	5
Figura 2. Inhibidores de enzimas.....	6
Figura 3. Estructura de los compuestos organofosforados	7
Figura 4. a) Plaguicida fosforotioato, b) Oxon	7
Figura 5. Estructura de Clorpirifos.....	8
Figura 6. Representación del mecanismo de acción del Clorpirifos en el nervio sináptico.	9
Figura 7. Estructura del Metamidofos. (* Indica el centro quiral).....	10
Figura 8. Pez <i>Poecilia velifera</i> , macho.	11
Figura 9. Distribución de <i>Poecilia velifera</i>	12
Figura 10. Aclimatación y depuración de peces <i>P. velifera</i>	21
Figura 11. Exposición a CPR bajo condiciones estáticas	25
Figura 12. Representación gráfica de los parámetros de cinética enzimática de Michaelis-Menten (Km) y Velocidad máxima (Vmax)	29
Figura 13. Inhibidores específicos de ChEs	30
Figura 14. Representación gráfica de la caracterización de ChEs por sexo en los diferentes órganos de <i>P. velifera</i> con sustratos específicos	34
Figura 15. Porcentaje de inhibición de ChEs con respecto al control con inhibidores selectivos y usando como sustrato ASChI. Las barras representan las medias \pm desviación estándar.....	37
Figura 16. . Porcentaje de inhibición de ChEs con respecto al control con inhibidores selectivos y usando como sustrato BSChI. Las barras representan las medias \pm desviación estándar.....	38
Figura 17. Análisis de Componentes Principales Actividad enzimática de colinesterasas.	41
Figura 18. Análisis de Centriodes de la actividad enzimática de ChEs.....	42
Figura 19. Porcentajes de inhibición con respecto a los peces control para las ChEs presentes en cerebro, branquia, hígado y músculo del pez <i>P. velifera</i> para los diferentes tratamientos con Clorpirifos.	45

Figura 20. Porcentajes de inhibición con respecto a los peces control para las ChEs presentes en cerebro, branquia, hígado y músculo del pez P. velifera para los diferentes tratamientos con Metamidofos.	45
Figura 21. Análisis de Componentes Principales Actividad enzimática de carboxilesterasas.	46
Figura 22. Análisis de Centriodes de la actividad enzimática de CbEs.	48
Figura 23. Porcentajes de inhibición con respecto a los peces control para las CbEs presentes en cerebro, branquia, hígado y músculo del pez P. velifera para los diferentes tratamientos con Clorpirifos.	51
Figura 24. Porcentajes de inhibición con respecto a los peces control para las CbEs presentes en cerebro, branquia, hígado y músculo del pez P. velifera para los diferentes tratamientos con metamidofos.	51
Figura 25. Diagrama de flujo para la caracterización de ChEs.	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especificidad de sustrato en cerebro, branquia, hígado y músculo de machos y hembras de <i>P. velifera</i> . Vm: Velocidad máxima, Km: Constante de Michaels-Menten. 35	
Tabla 2. Representación de los porcentajes de inhibición de la actividad de ChEs usando inhibidores selectivos con el uso de sustratos específicos (ASChI y BSChI). MNS: Metil sulfato de neogstigmina,- Poca o nula inhibición, + Baja inhibición, ++ Inhibición muy marcada..... 36	36
Tabla 3. Valores de la actividad de Colinesterasas (nmol/min/mg de proteína) en los diferentes órganos de <i>P. velifera</i> . Valores en media \pm Desviación estándar 39	39
Tabla 4. Valores de la actividad de Carboxilesterasas (nmol/min/mg de proteína) en los diferentes órganos de <i>P. velifera</i> . Valores en media \pm Desviación estándar..... 40	40
Tabla 5. Resultados de Permanova de la actividad enzimática de ChEs..... 43	43
Tabla 6. Prueba pareada de la interacción (PI x Tr) para Clorpirifos. 44	44
Tabla 7. Prueba pareada de la interacción (PI x Tr) para Metamidofos. 44	44
Tabla 8. Resultados de Permanova de la actividad enzimática de CbEs..... 49	49
Tabla 9. Prueba pareada de la interacción (PI x Tr) dentro del factor CPR..... 49	49
Tabla 10. Prueba pareada de la interacción (PI x Tr) dentro del factor MET..... 50	50

RESUMEN

El presente estudio evaluó el efecto combinado de plaguicidas organofosforados (OP): Clorpirifos y Metamidofos y del factor ambiental salinidad sobre la actividad enzimática de las esterasas (ChEs y CbEs) en el pez *Poecilia velifera*. Las esterasas son enzimas responsables de la hidrólisis de un gran número de ésteres y amidas de ácidos carboxílicos estructuralmente diversos, así como algunos tioésteres.

Las ChEs presentan dos grupos homólogos: la acetilcolinesterasa (AChE) y la butirilcolinesterasa (BChE), la distribución de éstas en los diferentes tejidos varía en las especies. En la primera parte del trabajo se caracterizaron las ChEs presentes en cerebro, branquias, hígado y músculo del pez eurihalino *P. velifera*. Los resultados indicaron la presencia de una AChE en cerebro mientras que los otros órganos se encontró la presencia de una BChE atípica.

Dado que las condiciones de variabilidad de salinidad como compuestos organofosforados pueden ocurrir en los hábitats de *P. velifera* y estos afectan la actividad enzimática de ChEs y CbE, en la segunda parte del experimento, se expuso a los peces a dos diferentes compuestos OP (Clorpirifos y Metamidofos) a diferentes concentraciones en salinidades diferentes.

A partir de los resultados obtenidos, se determinó que la inhibición de esterasas es dependiente de la concentración de OP, es decir a mayor concentración, mayor inhibición de actividad enzimática. El porcentaje de inhibición de actividad enzimática fue mayor con CPR que con MET, esto debido a la estructura química de cada uno y los mecanismos de bioactivación y/o eliminación de cada plaguicida. La salinidad no potenció la inhibición de la actividad enzimática de los plaguicidas OP.

Este trabajo permitió resaltar la importancia de cómo los diferentes plaguicidas OP afectan la actividad enzimática dependiendo de su estructura y que la inhibición es dependiente de la concentración de los mismos.

ABSTRACT

Two cholinesterases (ChEs) are present in vertebrates, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The distribution of these enzymes is tissue and species-specific. In this work, the ChEs present in brain, gill, liver and muscle of the euryhaline fish *Poecilia velifera* were characterized. Results indicate that one ChEs was present in brain an AChE. In gill, liver and muscle there was a ChE with characteristics of both AChE and BChE, and was classified as an atypical BChE because it is not possible to classify this enzyme according to its substrate preference.

The effect in B-esterase family (cholinesterases, ChE and carboxylesterases, CbE) activity of the organophosphate pesticides Chlorpyrifos and methamidophos were tested in vivo in brain, gill, liver and muscle, with different doses and in a time-course exposition under different salinity conditios (8 and 24 PSU).

Both, salinity conditions and pesticides concentrations had an effect on the ChE and CbE activity. Each pesticide had a different effect; chlorphyrifos was more potent inhibitor than Methamidophos. One of the factors determining the toxicity of chlorpyrifos, is the difference between their chemical structurcs and CPR require its biotransformation.

The ChE in tissues had different levels of inhibition with a different effect in brain in comparison with gill, liver and muscle, indicating a possible protective role of the BChE to the AChE present in the nervous system. In CbE activity, muscle had a different effect in comparison with the other organs.

This work highlights the importance of deepening knowledge in the way of how salinity enhances the inhibition of organophosphorus pesticides on the activity of esterases in euryhaline species.

I. INTRODUCCIÓN

La zona costera es un área estratégica debido a su importancia ambiental, ecológica y socioeconómica. Esta zona, interfaz entre el mar y la tierra, así como el borde de las cuencas continentales, es particularmente sensible a las perturbaciones naturales y antropogénicas. Estas áreas reciben grandes cargas de contaminantes como nutrientes, plaguicidas, hidrocarburos, entre otros.

Dentro de estos contaminantes, los plaguicidas requieren atención especial ya que su uso y distribución implica riesgos para la salud humana y el ambiente. Entre los diferentes plaguicidas que existen, los plaguicidas organofosforados (OP) constituyen un amplio grupo de compuestos xenobióticos usados contra plagas en los cultivos debido a sus altas propiedades insecticidas, baja toxicidad a los mamíferos, baja persistencia y rápida biodegradabilidad en el ambiente en comparación con las plaguicidas organoclorados (Wu, et al., 2011).

Los plaguicidas OP pueden llegar al agua y sedimentos a través de la lixiviación, percolación y escorrentía en los suelos, en donde pueden ser extremadamente tóxicos de manera directa o indirecta para organismos acuáticos que no son objetivo principal como peces, afectando su salud a través del deterioro del metabolismo y algunas veces provocando la muerte de éstos (Murthy et al., 2013).

Los principales objetivos enzimáticos de los OP se han identificado la familia de proteínas serina-hidrolasa (B-Esterasas, Aldrige 1953). Estas enzimas son responsables de la hidrólisis de un gran número de ésteres y amidas de ácidos carboxílicos estructuralmente diversos, así como algunos tioésteres (Franklin, 2007).

Dentro de la familia B-esterasas se encuentran las carboxil- y colin- esterases. Las carboxilesterasas (CbE, EC 3.1.1.1) carecen de especificidad de sustrato lo que se atribuye a un gran sitio activo lo cual permite la entrada de numerosos sustratos estructuralmente diversos, incluyendo endobióticos y xenobióticos.

Las CbE están involucradas en varios procesos fisiológicos y toxicológicos como la participación en el metabolismo lipídico, participan en la desintoxicación o activación metabólica de varias drogas, carcinógenos y compuestos tóxicos ambientales, sin embargo, los OP inhiben de forma irreversible las CbE durante el intento de

renovación catalítica de los sustratos (Ross et al., 2010). Están presentes en diversos tejidos y en el plasma de vertebrados e invertebrados.

Por otra parte, las colinesterasas (ChEs) presentan dos grupos homólogos: la acetilcolinesterasa (AChE; EC 3.1.1.7) llamada colinesterasa verdadera y la butirilcolinesterasa (BChE; EC 3.1.1.8), también llamada pseudocolinesterasa o colinesterasa plasmática. La AChE se encuentra en muchos tipos de tejidos conductores como nervios y músculos, tejidos centrales y periféricos, fibras motoras y sensoriales y fibras colinérgicas y no colinérgicas, mientras que la BChE se encuentra principalmente en el hígado (Čolović et al., 2013).

La AChE es una enzima esencial para el funcionamiento normal del sistema nervioso del cuerpo humano y de otros vertebrados, aves, e insectos. En el cuerpo, la AChE inactiva el químico mensajero acetilcolina, el cual es normalmente activo en las uniones entre nervios y músculos, entre nervios y glándulas, y en las sinapsis entre ciertos nervios en el sistema nervioso central.

El éster acetilcolina es el responsable de la transmisión fisiológica del impulso nervioso. Este neurotransmisor se libera en las terminaciones de las fibras colinérgicas, como respuesta a la conducción de un potencial de acción y contacta con los receptores colinérgicos, produciéndose la transmisión del impulso (Figura 1).

El papel fisiológico de las pseudocolinesterasas es menos claro, pero algunos estudios señalan su participación en los procesos de desintoxicación, regeneración celular, metabolismo lipídico, neurogénesis y desarrollo neuronal (Solé et al., 2008). Algunos trabajos indican que una de las funciones de la BChE es la de proteger a la AChE de agentes anticolinesterásicos (Rodríguez-Fuentes, 2005), como es el caso de los OP que se asocia a la AChE inhibiendo la transmisión nerviosa.

Cuando los niveles de AChE son bajos por la excesiva inhibición, la acetilcolina acumulada en la sinapsis causa repetidas e incontroladas estimulaciones del axón post-sináptico, por lo tanto, el sistema nervioso puede funcionar mal, produciendo varios efectos adversos en el organismo llegando inclusive a producir la muerte del mismo.

Debido a que se ha encontrado que un mismo organismo puede tener más de una ChE presente y que su distribución en los tejidos varía entre las especies

presentando diferente sensibilidad ante diferentes estresores (Barron, et al., 1999), es importante caracterizar las formas presentes de las ChEs en los diferentes tejidos.

Las ChEs se diferencian con base en su especificidad por el sustrato y de acuerdo con su susceptibilidad a inhibidores específicos, ya que éstos pueden impedir que la enzima desarrolle su actividad catalítica, ralentizando o paralizando la reacción enzimática como se indica en la figura 2.

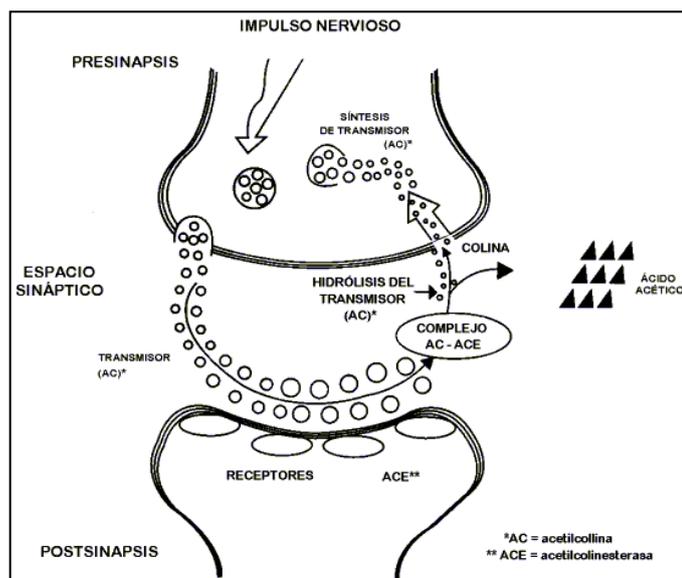


Figura 1. Función de la AChE en las terminaciones nerviosas.

Tomado de: Colinesterasas e inhibidores (González, 2009)

La inhibición de las B-esterasas por un OP tiene lugar a través de una reacción química en la cual un grupo hidroxilo del aminoácido serina, situado en el lugar activo de la enzima, es fosforilado de una manera análoga a la acetilación de la enzima por la acetilcolina (Benabent Rubio, 2015). Por lo tanto, la estructura química de cada compuesto OP tiene importancia respecto a su efecto sobre la enzima, al aumentar o disminuir la competencia con el sustrato, es decir, la estructura química influye sobre la toxicidad (Battershill et al., 2004).

La clase general de OP incluye varios tipos de estructuras útiles, entre los que se encuentran los OP que son derivados del grupo funcional del ácido fosfórico. En la figura 3 se muestra la estructura general de los OP. Los radicales R1 y R2 pueden ser

arilo o alquilo (Mangas et al., 2017). El grupo "X" se denomina "grupo saliente" debido a que está unido a través del enlace menos estable de los tres enlaces simples, y es el sustituyente que se elimina cuando el compuesto fosforila la enzima blanco o cuando el compuesto es hidrolizado o se escinde oxidativamente (Albedín-García, 2009).

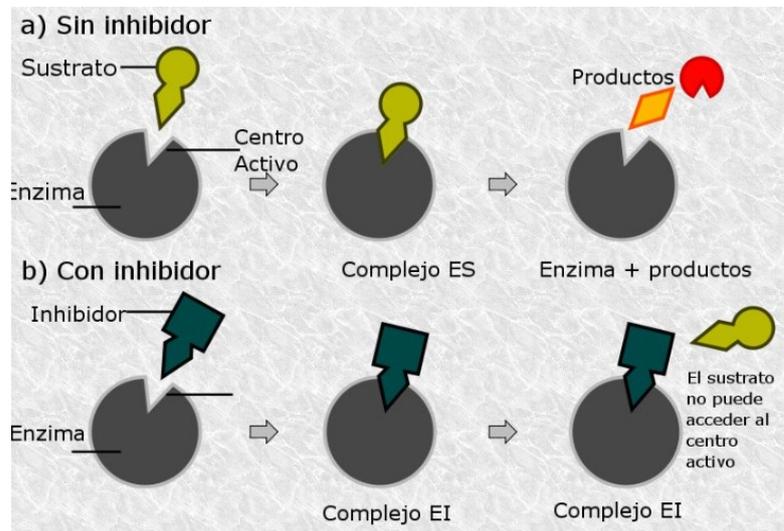


Figura 2. Inhibidores de enzimas

a) Formación del complejo enzima - sustrato (ES), b) Formación del complejo enzima – inhibidor (EI)

Tomado de: <http://bionova.org>

Los compuestos OP pueden variar en grupos fosforilo ($P = O$) o como tiofosforilo ($P = S$). Estas diferencias atómicas conducen a una amplia gama de tipos estructurales que varían dramáticamente en sus propiedades químicas, físicas y bioquímicas. Para que los insecticidas OP tiofosforilo impartan su acción, primero requieren un cambio en la estructura de un tionato a un oxón (Figura 4), llegando a ser extremadamente potentes (Timchalk, 2010).

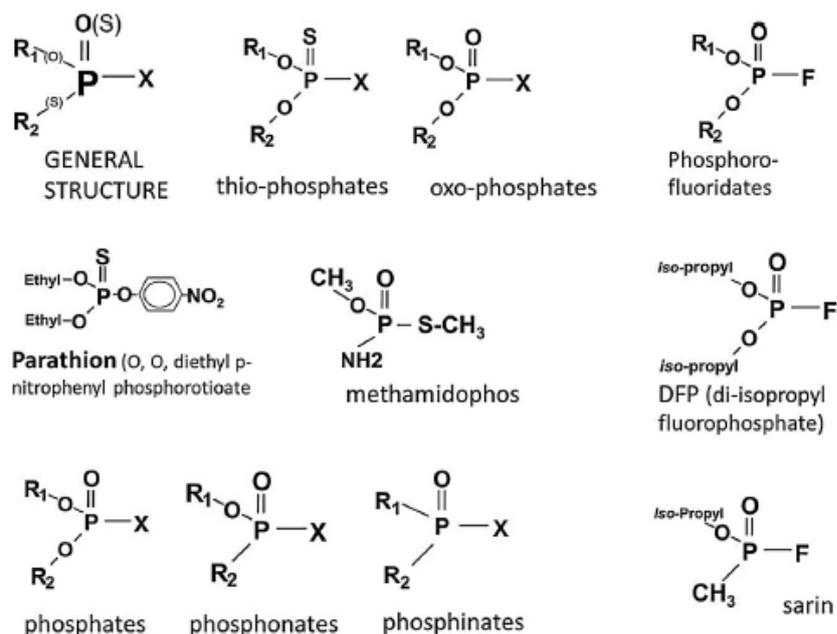


Figura 3. Estructura de los compuestos organofosforados

Tomado de (Costa, 2006)

El oxón es notablemente más reactivo y probablemente la principal especie química responsable de la mayoría de las interacciones con las biomoléculas, así como un intermediario clave en la ruta hacia los metabolitos hidrolíticos (Thompson, et al., 2010). Después de que un insecticida OP se biotransforma en el oxón, se sabe que reacciona rápidamente con ciertas proteínas para formar aductos OP.

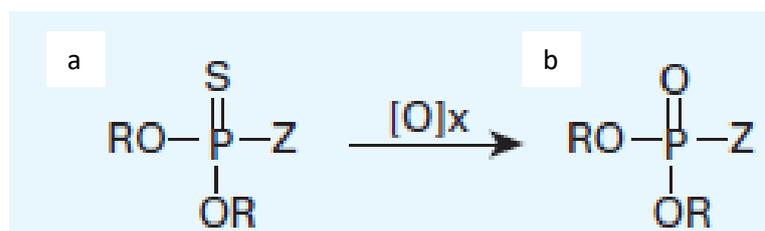


Figura 4. a) Plaguicida fosforotioato, b) Oxon

Tomado de (Battershill, et al., March 2004)

Muchos estudios han indicado que la oxidación de estos compuestos es llevada a cabo por las monooxigenasas de citocromo P450 (CYP). Sin embargo, estudios

recientes en mamíferos sugieren que las flavin monooxigenasas (FMO) pueden también bioactivar los OP a inhibidores más potentes (Schlenk, 2005).

Un ejemplo de insecticida tiofosforilo es el Clorpirifos (CPR), éste es un insecticida clorado de amplio espectro cuya estructura se indica en la figura 5. Es tóxico para la mayoría de grupos de animales, sin embargo, las diferencias en toxicocinética (adsorción, distribución, metabolismo y excreción) explican las diferencias en la susceptibilidad entre especies (Thompson & Fukuto, 1982).

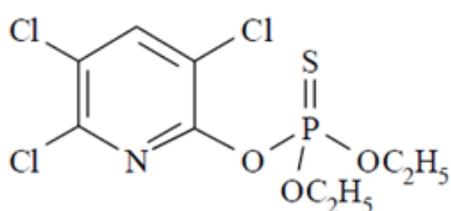


Figura 5. Estructura de Clorpirifos

El mecanismo de acción del CPR conlleva la activación por transformación biótica a Clorpirifos-Oxón, seguido por un enlace covalente a la hidroxil-serina en el sitio activo de la molécula de la AChE (Figura 6). En los animales, esta reacción es catalizada por enzimas oxidasas (FMO) y son importantes en el modo de acción del CPR (Giesy & Solomon, 2014).

El CPR por si solo no es un fuerte inhibidor de la AChE, pero cuando se transforma a Clorpirifos-oxón, el átomo de fósforo en la molécula llega a ser más susceptible para el ataque nucleofílico por la hidroxil serina en el sitio activo de la AChE (Smegal, 2000).

El CPR es convertido en varios metabolitos en peces, incluyendo 3,5,6-tricloro-tricloropiridinol (TCP), metoxitricloropiridina y conjugados glucoronidos. El grupo saliente, TCP es varios órdenes de magnitud menos tóxico que el CRP o el Clorpirifos-oxón y no tiene importancia toxicológica (Giesy & Solomon, 2014). El TCP es el mayor metabolito de CPR, en el caso del pez mosquito (*Gambusia affinis*) se encontró que convirtió 29 % de CPR a TCP (Schlenk, 2005).

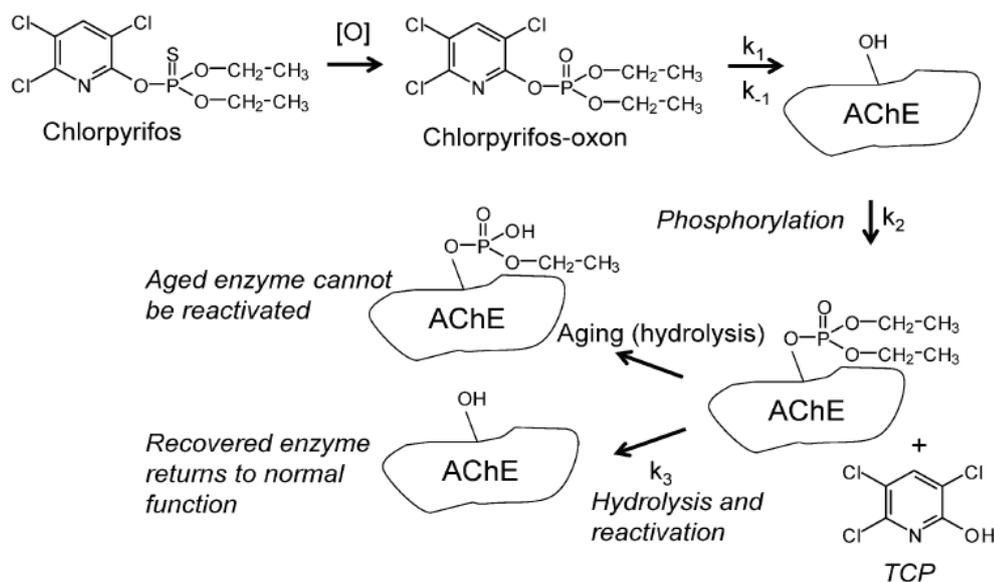


Figura 6. Representación del mecanismo de acción del Clorpirifos en el nervio sináptico.

Tomado de: Properties and Uses of Chlorpyrifos in the United States (Giesy & Solomon, 2014)

Un número limitado de plaguicidas OP tienen una estructura quiral con el átomo de fósforo como un lugar de estereoisomerismo. Para muchos plaguicidas OP comunes, los grupos R1 y R2 son idénticos; cuando difieren entre sí y con el grupo "X", existe un centro de quiralidad en el átomo de fósforo (Battershill et al., 2014). Un ejemplo de estos compuestos OP es el Metamidofos (Figura 7). El MET se forma a partir de la biotransformación de otro insecticida organofosforado, el acefato.

El Metamidofos (MET) es un potente inhibidor directo de la acetilcolina. Este plaguicida se puede absorber fácilmente, se distribuye bastante bien en todos los tejidos, con una acumulación marcada en el hígado, riñón y tejido adiposo, por lo cual su uso ha sido prohibido en varias países (FAO, 2012). La excreción en la orina es la principal vía de eliminación.

En organismos acuáticos como peces y algas el riesgo de exposición a MET es bajo, por ejemplo para la trucha arcoíris su LC₅₀ es de 40 mg/L a las 96 horas de exposición, pero para organismos como la *Daphnia* el riesgo es alto teniendo su EC₅₀ de 0.27 mg/L a las 48 h de exposición (FAO, 2012).

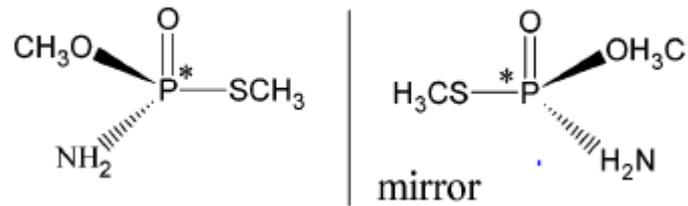


Figura 7. Estructura del Metamidofos. (* Indica el centro quiral)

Tomado de: (Kunde, et al., Sentiembre 2006)

Factores ambientales como la temperatura, el pH, el contenido de oxígeno disuelto, la dureza y la salinidad pueden afectar la bioconcentración y toxicidad de OP en los organismos acuáticos. Dentro de estos parámetros, la salinidad es un factor crítico que influye en la distribución y mantenimiento de la vida acuática en las zonas costeras, las cuales se caracterizan por las fluctuaciones de salinidad. Dentro de estas zonas, la Península de Yucatán (PY) localizada en el sureste de México es un área de producción agrícola, en donde para controlar plagas, los OP son aplicados de manera intensiva sobre los cultivos.

Diversos factores de manejo y protocolos de disposición final inadecuados han contribuido a la infiltración y acumulación de plaguicidas OP en sitios cerca de fuentes de agua, potenciando el ingreso de OP a los cuerpos de agua (Ucan-Marin, et al., 2013). En la PY el empleo de OP con ingredientes activos restringidos o prohibidos por las Naciones Unidas y Estados Unidos como el Metamidofos es común (Pérez-Herrera, et al., s.f.).

La PY posee condiciones geográficas e hidrológicas que crean un ambiente acuático único, teniendo una variedad de especies endémicas de peces y ecosistemas acuáticos (Ucan-Marin, et al., 2013). Una especie endémica del lugar es el pez *Poecilia velifera* (figura 8), especie que es muy sensible a contaminación de las aguas por lo que se encuentra actualmente en la lista de especies en riesgo en la Norma Oficial Mexicana 059 (NOM-059-SEMARNAT 2010) de protección a especies nativas de México (Schmitter-Soto, 2016).

P. velifera es una especie eurihalina que se distribuye tanto en humedales como en cenotes costeros, desde la laguna de Términos, Campeche, hasta Tulum y Quintana

Roo (Figura 9). El pez *P. velifera* es una especie muy tolerante a cambios de salinidad; se puede encontrar tanto en aguas dulces como salobres e inclusive marinas, a temperaturas de 25° a 30°C.

La combinación de los factores salinidad y OP son de especial interés, en el caso de intoxicación por metales pesados, varios estudios han demostrado que el agua hipersalina modifica la especiación de los mismos debido al material en suspensión y sedimento, modificando la toxicidad y/o biodisponibilidad de los metales para los organismos acuáticos (Martínez, et al., 2006). Sin embargo, en la interacción con contaminantes orgánicos como es el caso de los plaguicidas OP, su efecto es menos claro.

En ciertos peces eurihalinos, esta condición ambiental ha indicado una elevación significativa en la toxicidad de plaguicidas de tio-éter como el CPR, debido a la formación de metabolitos de sulfóxido que pueden ser más tóxicos que los compuestos originales (Bawardi, et al., 2007). Otros estudios, en contraste, han encontrado que el tiempo de muerte a una exposición con CPR fue más rápido en agua dulce que en peces aclimatados a agua salada (Maryoung, 2014).



Figura 8. Pez *Poecilia velifera*, macho.

Tomado de <https://acuariodictos.com/poecilia-velifera/>

Conocer cómo los plaguicidas OP afectan las reacciones enzimáticas de esterasas en esta especie es muy importante. Por lo cual, para poder medir los procesos biológicos normales de un organismo o la respuesta frente a la exposición a un contaminante ambiental se utilizan biomarcadores.



Figura 9. Distribución de *Poecilia velifera*

Tomado de: Los peces dulceacuícolas de México (Schmitter-Soto, 2016).

En ecosistemas acuáticos, los biomarcadores son respuestas o alteraciones de los organismos en fluidos corporales, células o tejidos que indican modificaciones bioquímicas o celulares debido a la presencia y magnitud de sustancias tóxicas (van der Oost, et al., 2002). El proceso de selección y validación de los biomarcadores requiere de una consideración cuidadosa de especificidad y sensibilidad de los mismos como una medida de la exposición a un resultado de salud adverso observado (WHO, 1993).

En los peces hay tejidos y órganos principales para medir estas respuestas, debido a que la penetración de los tóxicos en la sangre de los organismos acuáticos tiene lugar a través de la piel, branquias y del tubo digestivo; pasando a las células de los órganos blancos por difusión simple o mediante mecanismos especiales que requieren energía (Espina & Vanegas, 2005).

Las branquias son uno de los principales órganos para la medición de contaminantes, debido a la osmorregulación, que es un mecanismo clave en los organismos acuáticos, por lo que es considerado uno de los principales sitios de intercambio de contaminantes presentes en el agua, además que la persistencia ambiental y las propiedades físico químicas de los OP afectarán significativamente la absorción por medio de este órgano (Schlenk, 2005)

La biotransformación de plaguicidas OP puede permitir la bioactivación y desintoxicación en los organismos. En un esfuerzo para mejorar la solubilidad de lo OP en el agua, son necesarias alteraciones radicales en las reacciones iniciales de la fase I y II (Schlenk, 2005). En el caso de la biotransformación y/o eliminación de OP, el hígado

es el órgano principal para llevar a cabo este proceso, por lo tanto, es muy importante monitorear este órgano.

Las funciones del sistema nervioso son complejas y los biomarcadores pueden variar desde los efectos de las sustancias químicas en los procesos celulares y moleculares neurales hasta las mediciones neurofisiológicas y neuro-conductuales de entidades de funciones complejas (WHO, 1993). La inhibición de AChE en el cerebro de los peces es un buen biomarcador de efecto para el sistema nervioso central (SNC) (Ucan-Marín, 2013), mientras que la inhibición de pseudocolinesterasa solo reflejará exposición a OP, pero no es un marcador de los efectos en el SNC (WHO, 1993).

El músculo es un órgano que es de especial interés ya que el sistema muscular permite la locomoción como resultado de los movimientos ondulatorios producidos por la contracción de bloques de segmentos musculares, por lo cual su monitoreo es importante además que el tamaño de este órgano lo hace de fácil monitoreo.

Tomando en cuenta lo anterior, este trabajo se dividió en dos partes: la primera parte este trabajo consistió en caracterizar las colinesterasas (AChE y BChE) presentes en diferentes órganos (cerebro, branquia, hígado y músculo) del pez *Poecilia velifera*, con base en su preferencia a sustratos y su sensibilidad a inhibidores específicos. La segunda parte del trabajo consistió en determinar la sensibilidad de CbE y ChEs frente a la exposición de dos plaguicidas OP con diferentes estructuras químicas (Clorpirifos y Metamidofos) de manera independiente bajo diferentes condiciones de salinidad.

II. ANTECEDENTES

En estudios de ecotoxicología se ha incluido la caracterización de ChEs en los diferentes órganos debido a que se reportado que en un mismo organismo pueden existir más de una ChE presente y que éstas presentan diferente sensibilidad a los contaminantes (Sturm, et al., 1999).

Los criterios de clasificación de las ChEs fueron hechos para mamíferos, pero han sido utilizados para una gran variedad de organismos vertebrados e invertebrados, en donde la función de la AChE en los organismos acuáticos está relacionada con el neurotransmisor acetilcolina, mientras que se desconoce cuál es el sustrato natural de la BChE (Rodríguez-Fuentes, 2005).

En el caso de los peces, la distribución de ChEs varía en los tejidos y en las especies. Varios estudios indican la presencia de ChEs con propiedades catalíticas intermedias entre una AChE y una BChE, la cual ha sido denominada como una BChE atípica debido a que esta enzima satisface varios de los criterios para ChEs no específicas, pero presenta preferencia por el sustrato acetilcolina y posee varias de las características de la AChE (Rodríguez-Fuentes, 2005).

La presencia de esta ChE atípica ha sido reportada en varias especies, se encontró en el músculo de *Platichthys flesus* (Stieger et al., 1989) y en el pez cirujano (*Acanthurus dussumieri*) (Leibel, 1988). Algunas especies poseen en músculo dos ChEs, una AChE y una BChE atípica como por ejemplo *Limanda limanda*, *Platichthys flesus* y *Serranus cabrilla* (Sturm, 1999).

Varias investigaciones han demostrado que los peces tienen una alta actividad de ChE, éstas son receptoras de contaminantes éster en el ambiente como son los plaguicidas OP (Barron M. et al., 2009). Los cuales ocupan el lugar del sitio activo de los sustratos. Se ha reportado inhibición por OP y carbamatos en las especies *Danio rerio* (Küster E., 2005) y en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*).

Los plaguicidas OP además de alterar el control neuroendócrino pueden alterar el proceso de osmorregulación (Mojazi Amiri, et al., 2017), debido a que varios estudios señalan que una de las funciones fisiológicas de las FMO puede ser la osmorregulación. Las FMO son una familia polimórfica de enzimas que se encuentran

en el retículo endoplasmático liso de la célula, que principalmente catalizan la oxidación de sustratos nucleófilos blandos que contienen heteroátomos (N, S y P) a sus óxidos respectivos.

Las FMO, pertenecen a una gran superfamilia de hemo-proteínas-tiolato y por monooxigenasas que contienen flavina o también conocidas como flavin mono-oxigenasas (FMO) y que junto con las enzimas citocromo P450 (CYP) participan en la oxidación de plaguicidas tio-éter, como es en el caso de la bioactivación de CPR.

En estudios realizados con trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se encontró que la actividad de las FMO no fue sólo inducida por la salinidad en las células rojas de la sangre, fue inducida en los órganos involucrados en la osmorregulación (branquias, riñones y estómago). Los órganos que no están involucrados en la osmorregulación como hígado, corazón o cerebro no indicaron cambios significativos en la actividad.

Estudios previos han indicado que la aclimatación a condiciones hipersalinas incrementa la toxicidad aguda de ciertos plaguicidas organofosforados y carbamatos. Una revisión realizada por Maryoung, (2014) sobre la influencia de la salinidad en la toxicidad de varias clases de productos químicos para organismos acuáticos encontró una correlación directa entre la toxicidad de los OP y la salinidad en un 65% de los estudios.

Un ejemplo es un estudio realizado en salmónidos aclimatados a condiciones hipersalinas, en donde ciertos organofosforados de tio-éter y carbamatos mostraron un aumento significativo en la toxicidad aguda.

Se ha demostrado que las FMO son inducidas en peces eurihalinos y sufren una aclimatación más lenta a condiciones de hipersalinidad, por lo cual se puede explicar la mayor toxicidad de los compuestos tio-éter en estas especies. La oxidación de estos compuestos a menudo conduce a la formación de sulfóxidos quirales con diferentes potencias para la inhibición de ChEs para cada enantiómero (Bawardi O. *et al.*, 2007).

La actividad de las FMO ha sido reportada en varias especies de peces teleósteos, pero la actividad ha sido restringida a especies marinas estenohalinas y eurihalinas. Wang et al. (2001) realizaron un estudio con dos especies de peces eurihalinos, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) un osmoconformador lento a agua salada y el bajo rayado híbrido (*Morone saxatilis x chrysops*) un osmoconformador rápido, en

donde fueron aclimatados a diferentes condiciones de salinidad con el plaguicida aldicarb.

La salinidad potenció significativamente la toxicidad del aldicarb y la inhibición de ChEs en la trucha arcoíris, pero no así en el rayado híbrido. En la trucha arcoíris, la salinidad incrementó la expresión de FMO y la actividad catalítica en microsomas de hígado, branquia y riñones mientras que esta actividad no se vio afectada en el rayado híbrido.

La actividad de FMO, en el rayado híbrido en condiciones de agua de mar fue baja en comparación con la aclimatación en agua dulce. Por el contrario, en el caso de la trucha se encontró una sobrerregulación de FMO en respuesta a las altas salinidades. Schlenk, et al., (1996) indicaron que la actividad de las FMO generalmente es más alta en teleósteos que se adaptan a agua de mar, que pueden ser inducidos, y además es correlacionado con la salinidad externa en la cual los peces residen.

III. JUSTIFICACIÓN

En las zonas costeras, las fluctuaciones de salinidad ejercen una notable influencia sobre varias respuestas de los organismos, a la vez que interfieren en los análisis químicos. Por esta razón es necesario enfatizar la influencia de los factores del medio para poder detectar la acción tóxica de los contaminantes y poder correlacionar esta respuesta con el fin de explicar lo que realmente ocurre.

La combinación de ésta variable ambiental frente a la exposición de OP ha hecho que especies de peces eurihalinos importantes tanto económica como ecológicamente lleguen a estar en la lista de especies amenazadas o en peligro como es el caso de los salmónidos en Estados Unidos ya que son especies sensibles frente a esta exposición.

Varios estudios han demostrado que la aclimatación a condiciones hipersalinas potencia la toxicidad aguda de ciertos plaguicidas OP, por ejemplo, el CPR. En contraste, otros estudios han encontrado que el tiempo de muerte a una exposición con OP fue más rápido en agua dulce que en peces aclimatados a agua salada.

Para determinar el efecto de la exposición a plaguicidas OP de diferentes especies en ambientes acuáticos, se han usado por muchos años biomarcadores de efecto, este es el caso de las mediciones de las actividades de las colinesterasas (ChEs) y carboxilesterasas (CbE). En el caso de las ChEs (AChE y BChE), se sabe que pueden llegar a existir ambas en un mismo organismo, por lo tanto, es necesario caracterizarlas mediante el uso de sustratos e inhibidores específicos para poder validar a estas enzimas como biomarcadores confiables en estudios ecotoxicológicos.

Por esta razón es necesario caracterizar las ChEs presentes en cerebro, branquias, hígado y músculo del pez *Poecilia velifera* mediante su especificidad por sustratos e inhibidores específicos, determinando las constantes cinéticas velocidad máxima (V_{max}) y constante de Michaelis-Menten (K_m).

Una vez caracterizadas las ChEs se puede realizar una exposición aguda a OP, para determinar los efectos de los OP sobre estas enzimas. Al realizar una exposición aguda se evita la posibilidad que los organismos expuestos a largo plazo se adapten o se aclimaten a la presencia de contaminantes y se pierda el objetivo de determinar el efecto de los plaguicidas OP sobre estas actividades.

Para determinar la toxicidad a diferentes concentraciones de OP (Clorpirifos y Metamidofos) en la aclimatación a diferentes salinidades en el pez *P. velifera*, es necesario evaluar la inhibición de la actividad enzimática de ChEs y CbE en cerebro, branquias, hígado y músculo para conocer la sensibilidad de la especie frente a la exposición combinada de salinidad y OP.

La información generada en este trabajo permitirá conocer las concentraciones a las cuales existe una disminución en la actividad enzimática de ChEs y CbE y en qué condiciones de salinidad esta especie es más vulnerable frente a la exposición de OP.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar las ChEs presentes en cerebro, branquia, hígado y músculo del pez *Poecilia velifera* y determinar la respuesta de esterasas (ChEs y CbE) a la exposición de plaguicidas organofosforados Clorpirifos y Metamidofos en condiciones de diferentes salinidades.

Objetivos Particulares

- Determinar los valores de velocidad máxima (V_{max}), la constante de Michaelis-Menten (K_m) para los sustratos acetiltiocolina (ASChI) y butiriltiocolina (BSChI) de las colinesterasas presentes en cerebro, branquia, hígado y músculo de *P. velifera*.
- Determinar la sensibilidad de las ChEs presentes en los órganos de *P. velifera* mediante el uso de inhibidores selectivos: metil sulfato de neogstigma (MSN), BW284c51 e Iso-OMPA
- Caracterizar la relación concentración-respuesta de los plaguicidas organofosforados Clorpirifos y Metamidofos y la actividad de las ChEs y CbEs presentes en músculo, cerebro, branquias, hígado y músculo del pez *P. velifera* bajo condiciones diferentes de salinidad.

V. HIPÓTESIS

Se estima que en el pez *P. velifera* existan dos colinesterasas: AChE y BChE distribuidas de diferente manera en cerebro, branquia, hígado y músculo. Esto se verá reflejado en las respuestas de especificidad usando sustratos e inhibidores selectivos para cada una de las ChEs.

Las actividades de ChEs y CbE presentes en cerebro, branquia, hígado y músculo de *P. velifera* serán inhibidas al estar expuestos a diferentes concentraciones de OP, clorpirifos y metamidofos, presentándose una mayor inhibición al OP Clorpirifos debido a su estructura química y viéndose potenciada por el efecto de la salinidad en los dos plaguicidas. Así mismo, la respuesta de las ChEs frente a la exposición de plaguicidas OP dependerán de la distribución de las mismas en los diferentes órganos del pez *P. velifera*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Origen de los organismos

Los organismos fueron capturados en el estanque de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación y en la Ciénega de Sisal, Yucatán, bajo la autorización de la SEMARNAT con oficio No. F00.9DRPYyCM.UTCMR.626/2018, ver Anexo I. Se capturaron 230 organismos en total, éstos se encontraban en su medio natural a una salinidad entre 36-38 unidades prácticas de salinidad (UPS). Se los trasladó al laboratorio de Ecotoxicología en la Unidad de Química en Sisal para su aclimatación y, posteriormente, proceder con la parte experimental.

Los organismos fueron aclimatados en peceras de 40 L durante dos semanas, se los mantuvo con aireación constante a una temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, se realizaron cambios de agua cada día de 10 L, para esto se utilizó agua de mar filtrada. Ésta agua se obtuvo del laboratorio de pulpo de la UMDI, la cual es tratada con filtro de fondo lechoso para eliminar materia orgánica y sedimentos, adicional tiene un tratamiento UV para eliminar microorganismos y contaminantes orgánicos. A los organismos se los mantuvo con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad. Se les proporcionó alimento comercial en hojuelas básicas marca LOMAS dos veces por día, en la figura 10 se puede observar el sistema montado.

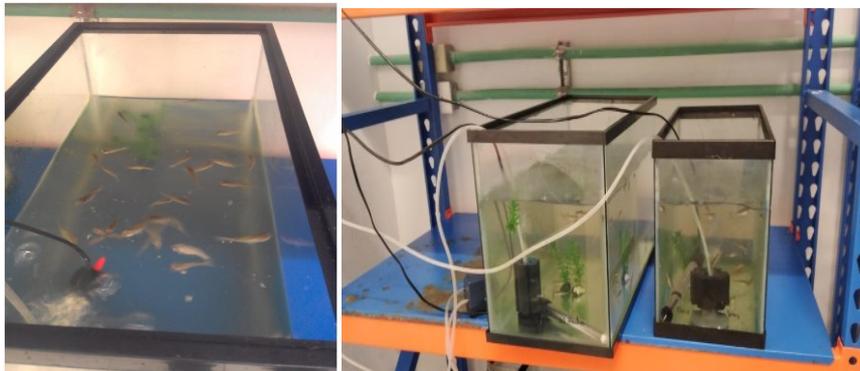


Figura 10. Aclimatación y depuración de peces *P. velifera*.

Para alcanzar los valores de salinidades requeridas para los diferentes tratamientos en los experimentos, se procedió disminuir la salinidad realizando cambios paulatinos de agua con agua de garrafón de consumo humano para asegurar un ambiente libre de contaminantes. La salinidad inicial fue de 36 (UPS), a partir de la cual, se bajó 3 UPS cada 24 horas para que los organismos no sufrieran estrés osmótico.

2. Caracterización bioquímica de colinesterasas

Caracterización por sustratos

Para la caracterización de ChEs, los organismos se aclimataron a una salinidad de 8 UPS como se mencionó en el apartado anterior. Se utilizó un lote de diez peces (cinco hembras y cinco machos), con una talla entre 4.5 a 5.5 cm. Para el sacrificio de los mismos, se realizó mediante choque hipotérmico en un recipiente con agua y hielo.

Para la obtención de los órganos se procedió de la siguiente manera: se cortó su cabeza detrás del opérculo para separar el cerebro, posteriormente se separaron las branquias, luego se procedió a abrir el pescado para obtener el hígado y finalmente, el músculo se muestreó por debajo de la aleta dorsal. Los tejidos fueron pesados y homogeneizados a una concentración de 50 mg de tejido/mL de solución tampón que contenía Trizma® Pre-set crystals pH 7.4 a una concentración de 0.05 M. Los homogeneizados se centrifugaron a 10 000 x g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante que contenía las enzimas se congeló a -80°C para su análisis posterior.

La clasificación de ChEs en *P. velifera* se basó la metodología propuesta por Sturm *et al.* (1999), en la cual se utiliza yoduro de acetiltiocolina (ASChI; C₇H₁₆NOSI), yoduro de propioniltiocolina (PSChI; C₈H₁₈NOSI) y yoduro de butiriltiocolina (BSChI; C₉H₂₀NOSI) para AChE, PChE y BChE respetivamente. Se utilizaron concentraciones finales crecientes de 0.001 a 10 mM de ASChI, PSChI y BSChI. La preparación de las soluciones se describe en el Anexo II. Las soluciones con los sustratos deben ser frescas por lo que se prepararon el día del análisis.

La medición de la actividad enzimática se efectuó con una modificación del método de Ellman *et al.* (1961) por Rodríguez-Fuentes *et al.* (2008). La determinación

de la actividad se realizó en microplacas de 96 pocillos en donde cada celda contenía un volumen final de 200 μL . En cada pocillo se colocó 10 μL de homogeneizado, 180 μL de tampón de reacción de ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) 0,5 mM en Trizma® Pre-set crystals pH7.4 0,05 M.

La reacción inició con la adición de 10 μL de sustrato. La velocidad de formación del producto se midió a 405 nm en 9 lecturas cada 15 segundos. La AChE presenta inhibición por sustrato, mientras que la BChE presenta activación por sustrato (Pezzementi *et al.*, 1991)

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (1976) con albúmina de suero bovino como patrón (Anexo III). Las actividades enzimáticas se calcularon y expresaron en U/g de proteína; una unidad enzimática (U) hidroliza 1 μmol de acetilcolina a colina y acetato por minuto.

Caracterización por inhibidores

Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo usando concentraciones crecientes de metilsulfato de neostigmina (concentraciones finales de 7.48×10^{-5} , 1.495×10^{-4} , 7.48×10^{-4} , 1.495×10^{-3} , 7.48×10^{-3} mM) como inhibidor de ChEs total; BW284c51 (1.5 - bis- (4 - alil - dimetil -dibromuro de amoniofenil) -pentan-3-ona, concentraciones finales de 4.42×10^{-5} a 0.44 mM) e Iso-OMPA (tetraisopropil-pirofosforamida, concentraciones finales de 6.73×10^{-5} a 0.67 mM) como inhibidores específicos de actividades de AChE y BChE, respectivamente. La preparación de soluciones se encuentra a detalle en el Anexo IV.

Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos que contenían 170 μL de DTNB 0.5 mM en Tris pH 7.4 con una concentración de 0.05M, se añadió 10 μL de homogeneizado y 10 μL del inhibidor a diferentes concentraciones. Después de 30 minutos de incubación, se añadió 10 μL de ASCh y BSChI (concentraciones finales de 1 mM) para medir la actividad restante de ChEs.

Se registró el cambio de absorbancia a 405 nm y se realizaron 20 lecturas cada 15 segundos con un retraso inicial de 10 segundos.

3. Efecto *in vivo* de la exposición a plaguicidas organofosforados Clorpirifos y Metamidofos en la actividad de B-esterasas bajo condiciones diferentes de salinidad.

Para los bioensayos, las salinidades requeridas fueron de 8 y 24 UPS, salinidades que en dónde es más común encontrar a esta especie. Una vez que se alcanzaron las salinidades de aclimatación previas mediante las condiciones mencionadas en el apartado anterior, los peces se aclimataron con agua salada preparada con agua de garrafón de consumo humano y sal marina marca OCEANIC durante una semana antes de iniciar el bioensayo, de la misma manera, el bioensayo se llevó a cabo con agua sal preparada.

La sal usada tenía un alto contenido de calcio y magnesio, libre de fosfatos y nitratos y contaba con un pH normalizado optimizando así un medio adecuado para los organismos. Para obtener las salinidades deseadas, se realizaron los cálculos mediante las indicaciones del fabricante y éstas se verificaron mediante el uso de un hidrómetro marca CORAL LIFE.

Los bioensayos correspondieron a una exposición estática y sin recambio de 96 h a diferentes concentraciones de plaguicidas OP Clorpirifos y Metamidofos PESTANAL® de la marca Sigma-Aldrich grado reactivo, en los cuales se utilizaron 108 peces por plaguicida.

Para la preparación de las soluciones de clorpirifos y metamidofos, se utilizó etanol como disolvente portador a una concentración de 0.01%. Las unidades experimentales fueron peceras redondas de 2.5 L, en cada una se colocó 2.0 L de agua. Las concentraciones de cada plaguicida en cada bioensayo fueron de 0.0029 μM , 0.0143 μM , 0.0285 μM y 0.0713 μM , adicionalmente, el bioensayo contó con un tratamiento control (agua) y un control solvente (agua más etanol al 0.01%), éste último, se requiere para verificar que el efecto que se da sobre la actividad de esterazas es por el efecto de plaguicidas y no por efecto del portador en este caso etanol.

Para cada tratamiento se utilizaron tres peceras y cada una contó con tres organismos. Transcurrido el tiempo de exposición a los plaguicidas, los peces fueron

sacrificados por choque hipotérmico en un recipiente con agua y hielo. En la figura 11 se observa los bioensayos de exposición para Clorpirifos, para la exposición a Metamidofos se siguió el mismo procedimiento.

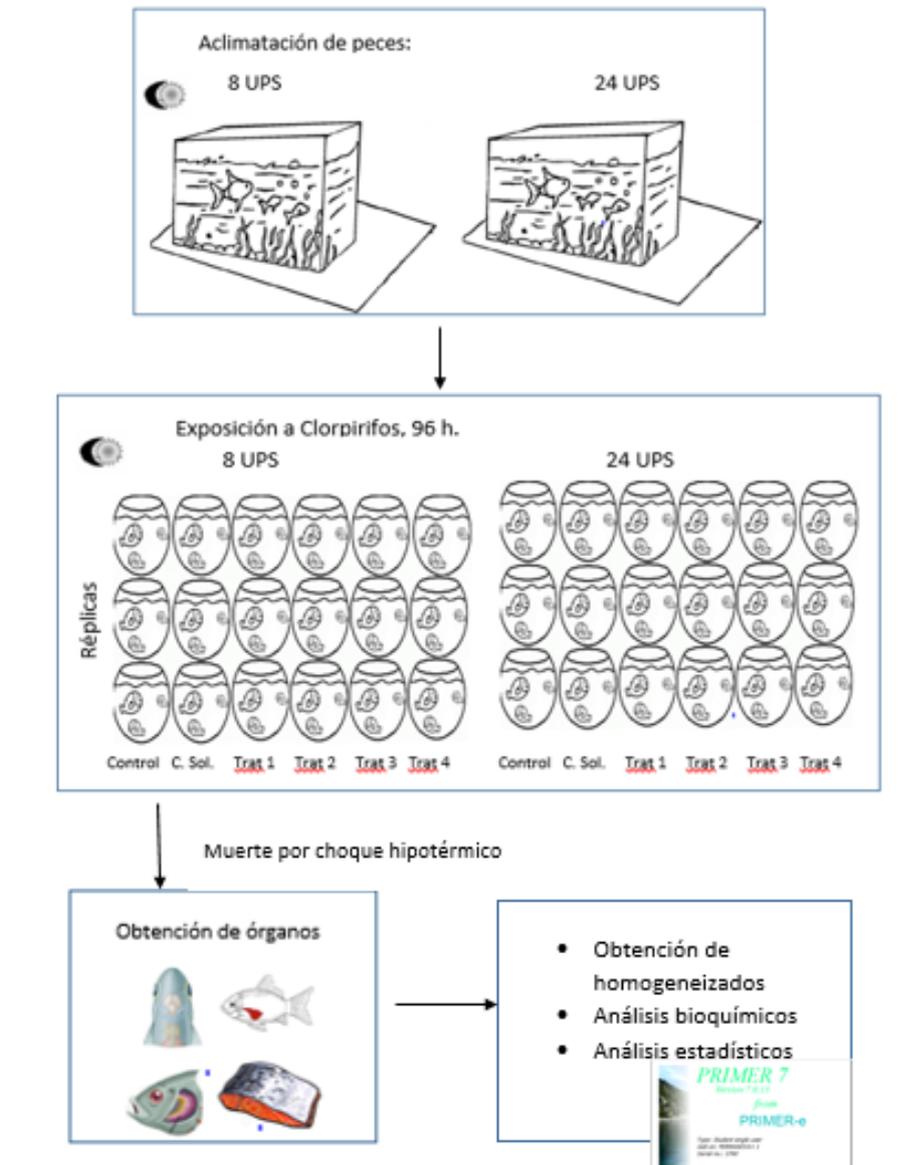


Figura 11. Exposición a CPR bajo condiciones estáticas

*C.Sol: control solvente, Trat 1: 0.0029 μM , Trat 2: 0.0143 μM , Trat 3: 0.0285 μM y Trat 4: 0.0713 μM

Una vez obtenidos los órganos, las muestras se homogeneizaron con un homogeneizador de punta teflón, a una concentración de 50 mg de tejido/ mL de buffer. El homogeneizado fue centrifugado a 10000 x g durante 10 min a 4°C, posteriormente se separó el sobrenadante y se almacenó a -80°C para su posterior análisis.

Determinación de colinesterasas (ChEs)

La actividad de ChEs fue medida usando una modificación del método de (Ellman, *et al.*, 1961) adaptado a microplaca (Rodríguez-Fuentes, *et al.*, 2008). En cada pozo se agregaron 10 µL del homogeneizado centrifugado, y 180 µL de 5, 5'-ditiobis (2 nitrobenzoic acid) (DTNB) en Buffer Tris pH 7.4, 0.05 M. Esta operación se realizó por triplicado. La reacción inició agregando 10 µL de ioduro de acetilcolina (1mM). El resultado de la reacción se midió a una absorbancia de 405 nm durante 120 s, en el módulo de cinética.

La actividad de ChEs se calculó mediante la siguiente fórmula:

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

Donde:

$$\frac{1}{10000} = \text{Coeficiente de extinción para ChEs}$$

$$\frac{\Delta A}{\text{min}} = \text{Cambio de absorbancia en el tiempo (se obtiene de la cinética)}$$

$$\frac{Vh}{Vt} = \frac{\text{Volumen del homogeneizado}}{\text{Volumen total de reacción}} = \frac{10 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}}$$

$$Cp = \text{Concentración de proteína mg/mL}$$

$$\frac{1}{10000} = \text{Coeficiente de extinción del TNB por pozo de microplaca.}$$

Determinación de carboxilesterasas (CbE)

La actividad de CbE fue medida usando el método de Hosokawa y Satoh (2001), utilizando acetato de p-nitrofenil (pNPA) como sustrato. Se trabajó en microplacas de 96 pozos, en cada pozo se agregó 10 μL de muestra, cada una por duplicado. La reacción inició agregando 190 μL de solución buffer tris pH 7.4/pNPA. La cinética se midió a una absorbancia de 405 nm con 20 lecturas cada 15 segundos. La preparación de las soluciones se encuentra en el anexo V.

Las actividades de CbE se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{1}{18300} * \frac{\Delta A/\text{min}}{\left(\frac{Vh}{Vt}\right) * Cp} * 1000000$$

Donde:

$$\frac{1}{18300} = \text{Coeficiente de extinción para CbEs}$$

$$\frac{\Delta A}{\text{min}} = \text{Cambio de absorbancia en el tiempo (se obtiene de la cinética)}$$

$$\frac{Vh}{Vt} = \frac{\text{Volumen del homogeneizado}}{\text{Volumen total de reacción}} = \frac{10 \mu\text{L}}{200 \mu\text{L}}$$

$$Cp = \text{Concentración de proteína mg/mL}$$

$$\frac{1}{10000} = \text{Coeficiente de extinción del TNB por pozo de microplaca.}$$

Los resultados obtenidos de ChEs y CbEs se multiplicaron por 1000000 para convertir de Moles/min/g de proteína a nmol/min/mg de proteína. La actividad se expresó como nanomoles de sustrato hidrolizado por minuto por miligramo de proteína. Estos datos fueron ingresados en el programa GraphPad Prism 6.0 para ser procesados y posteriormente analizados.

4. Análisis Bioquímicos

Caracterización de ChEs usando sustratos específicos:

Las ChEs se clasificaron con base en su especificidad por el sustrato y de acuerdo con su susceptibilidad a inhibidores específicos (Cuadro 1). La AChE hidroliza acetilcolina (ACh) más rápido que los otros ésteres de colina y es virtualmente inactiva con el sustrato butirilcolina (BCh). La BChE es mucho menos selectiva con el tamaño del grupo acilo aumentando la actividad a medida que progresa la longitud de la cadena acilo, en la dirección $C_2 \rightarrow C_4$, para disminuir cuando la longitud de la cadena es más larga, hidrolizando ambos sustratos a velocidades comparables, por lo que la especificidad del sustrato puede ser usada para distinguir entre las dos enzimas (Lenhinger, 1978).

Característica	AChE	BChE
Especificidad de sustrato		
Acetilcolina	Sí	Sí
Butirilcolina	No	Sí
Inhibición por sustrato	Sí	No
Activación por sustrato	No	Sí
Inhibición		
Metil sulfato de neogstigmina	Sí	Sí
Iso-OMPA	No	Sí
BW284c51	Sí	No
Bambuterol	No	Sí

Cuadro 1. Características de la AChE y BChE en vertebrados.
Tomado de Rodríguez-Fuentes, 2005.

Para la caracterización de las ChEs se utiliza la información proporcionada por el análisis de los parámetros enzimáticos de la cinética de Michaels-Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}).

La V_{max} se obtiene cuando la velocidad de reacción se hace independiente de la concentración de sustrato; cuando esto ocurre, la velocidad alcanza un valor máximo. Este valor depende de la cantidad de enzima que se tiene.

La K_m indica la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Este parámetro es independiente de la concentración de enzima y es característico de cada enzima según el sustrato utilizado (si tiene varios). La K_m también indica la afinidad que posee la enzima por el sustrato, cuanto menor sea la K_m menor será la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima (Figura 12), por lo que mayor será la afinidad de la enzima hacia ese sustrato.

Para el análisis de datos se utilizó la relación K_m a V_{max} para la hidrólisis de ASChI y BSChI, en general la AChE presenta inhibición por sustrato, tiene un valor de $V_{MÁX}BSChI/V_{MÁX}ASChI < 1$ y un valor de $K_m BSChI/K_m ASChI \geq 1$. Por otro lado, BChE no presenta inhibición por exceso de sustrato, tiene $V_{MÁX} BSChI / V_{MÁX} ASChI \geq 1$ y $K_mBSChI/K_mASChI < 1$ (Pezzeменти *et al*, 1991).

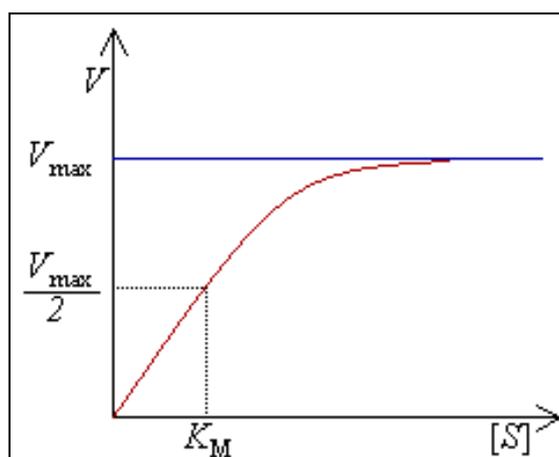


Figura 12. Representación gráfica de los parámetros de cinética enzimática de Michaelis-Menten (K_m) y Velocidad máxima (V_{max})

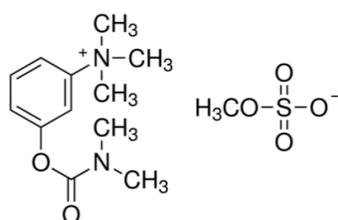
Inhibición de ChEs mediante el uso de inhibidores selectivos:

Como inhibidor selectivo de la actividad de las ChEs presentes en los tejidos se utilizaron los siguientes compuestos:

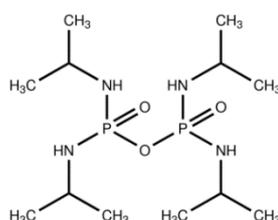
- Metil sulfato de neostigmina (Metil sulfato de 3-[[[(dimetilamino)carbonil]oxi]-N,N,N- trimetilbencenamónio, $C_{13}H_{22}N_2O_6S$) que contiene un grupo carbamato que se hidroliza más lentamente con el grupo éster de ACh (figura 13-a).

- Iso-OMPA (tetraisopropil pirofosfamida, $C_{12}H_{32}N_4O_3P_2$) que se usa como inhibidor selectivo e irreversible de la butirilcolinesterasa o pseudocolinesterasa es un compuesto hidro y lipo soluble (figura 13-b).
- BW284c51 (dibromo 1,5-bis (4 alildimetilamoniofenil) pentano-3-ona, $C_{27}H_{38}N_2OBr_2$) como inhibidor selectivo de la acetilcolinesterasa (figura 13-c), es un inhibidor reversible que afecta principalmente a los receptores nicotínicos de acetilcolina.

a) Metil sulfato de neostigmina



b) iso OMPA



c) BW284c51

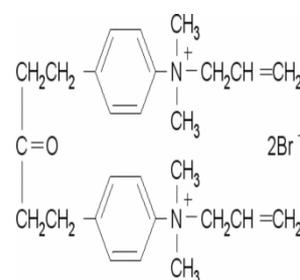


Figura 13. Inhibidores específicos de ChEs

Tomado de: (Benabent Rubio, 2015)

5. Análisis Estadístico

Caracterización de ChEs

Para el análisis de datos de ChEs a partir de sustratos específicos (ASChI, BSChI y PSChI para AChE, BChE y PChE respectivamente), se calcularon los parámetros de cinética enzimática de Michaelis-Menten (K_m) y velocidad máxima (V_{max}) mediante regresión no lineal en el programa GraphPad PRISM versión 6.0. La especificidad del sustrato de los ChEs se estableció mediante la información proporcionada en la sección de análisis bioquímicos.

Para el análisis de inhibición de actividad de ChEs mediante el uso de inhibidores selectivos, se determinó el porcentaje de inhibición de actividad con base en el grupo

control, los cálculos se realizaron en GraphPad PRISM versión 6.0 y los gráficos en el programa Microsoft Excel.

Para identificar si existían o no diferencias entre sexos en cada uno de los órganos, se utilizó la prueba estadística U de Mann-Whitney, que es una prueba no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Esta prueba se realizó en el programa de lenguaje de programación de análisis estadístico "R".

Análisis de datos para el bioensayo con plaguicidas organofosforados:

Para evaluar la actividad enzimática de colinesterasas y carboxilesterasas en los cuatro tejidos, considerando potenciales diferencias entre salinidades, tipos y concentraciones de plaguicidas, se utilizó una aproximación multivariada. Esta estuvo basada en un método de ordenación por escalamiento multidimensional métrico o análisis de coordenadas principales (PCO), seguido de un método de análisis de varianza multivariada con permutaciones. El análisis fue llevado a cabo con el programa PRIMER Versión 7 (Anderson, 2001a; Anderson, 2001b; Anderson et ál., 2008).

Esta aproximación, computacionalmente intensiva, se basa en la partición de la variación multidimensional, que se construye a partir de matrices de distancia cuya hipótesis nula se crea con permutaciones. El método permite descomponer la variación total como en los ANOVA paramétricos univariados. Las ventajas de este método respecto a otros multivariados radican en que: (1) permite la partición de la variación en diseños complejos de la misma forma en que lo hace una prueba paramétrica, (2) carece de las condicionantes como distribución normal/multinormal de datos, independencia entre variables, relación número de variables/número de réplicas (principal problema de las pruebas paramétricas multivariadas como MANOVA), (3) admite el uso de covariables y (4) permite el cálculo de componentes de variación (Anderson *et al.*, 2008).

El PCO se aplicó a una matriz de distancias euclidianas sobre los datos previamente transformados mediante logaritmo ($\log(x+1)$) y normalizados. El modelo estadístico subyacente utilizó 4 factores: Plaguicida (Pl: con dos niveles Clorpirifos y

Metamidofos); tratamiento de concentración de plaguicida (Tr: con 6 niveles; Control, Control solvente, Tr 1: 0.0029 μM , Trat 2: 0.0143 μM , Trat 3: 0.0285 μM y Trat 4: 0.0713 μM); Salinidad (Sa con 2 niveles: A: 8 ups y B: 24 ups); y pecera (Pe con 3 niveles). El tipo, concentración de plaguicida y salinidad fueron factores fijos ortogonales entre sí, mientras que pecera fue un factor aleatorio anidado dentro de la interacción $\text{Pl} \times \text{Sa} \times \text{Tr}$. Las distribuciones empíricas de pseudo-F utilizaron 9999 permutaciones de los residuales bajo el modelo reducido.

VII. RESULTADOS

1. Caracterización bioquímica de ChEs presentes en el pez *Poecilia velifera*

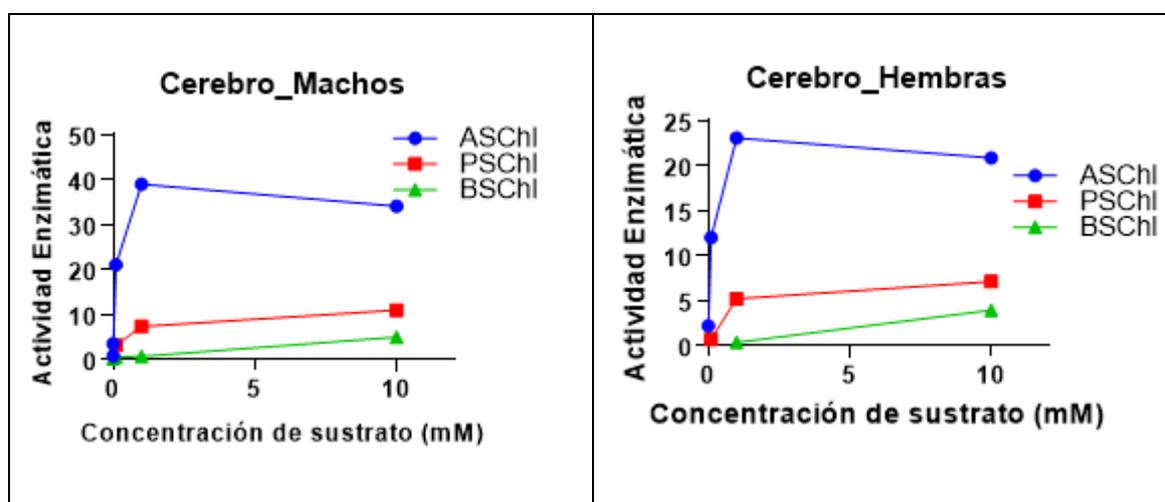
Preferencia de sustratos:

En la tabla 1 se presentan los valores de los resultados de ChEs en cerebro, branquia, hígado y músculo de machos y hembras de *Poecilia velifera*, utilizando los sustratos ASChI, PSChI y BSChI.

La ChE presente en cerebro de macho y hembra registró la mayor velocidad de hidrólisis con el sustrato de ASChI (36.62 y 23.14 U/mg de proteína respectivamente) y se observa una disminución de la actividad al utilizar una concentración de 10 mM (Figura 14) en machos y hembras. En los dos sexos no fue posible detectar actividad en cerebro con el sustrato BSChI, el menor valor de K_m se obtuvo con ASChI (Tabla 1).

En músculo de ambos sexos la mayor velocidad de hidrólisis se tiene con el sustrato ASChI y el menor valor de K_m se obtuvo con BSChI. En branquia e hígado de los dos sexos se observa una mayor velocidad de hidrólisis con el sustrato PSChI y no se observa una disminución de actividad con la concentración de sustrato de 10 mM. Estos dos órganos tienen una relación $V_{max} P/A > 1$. En hígado en los dos sexos se presenta el menor valor de K_m con BSChI.

En general, el órgano que presentó mayor actividad enzimática tanto en hembras como en machos fue músculo.



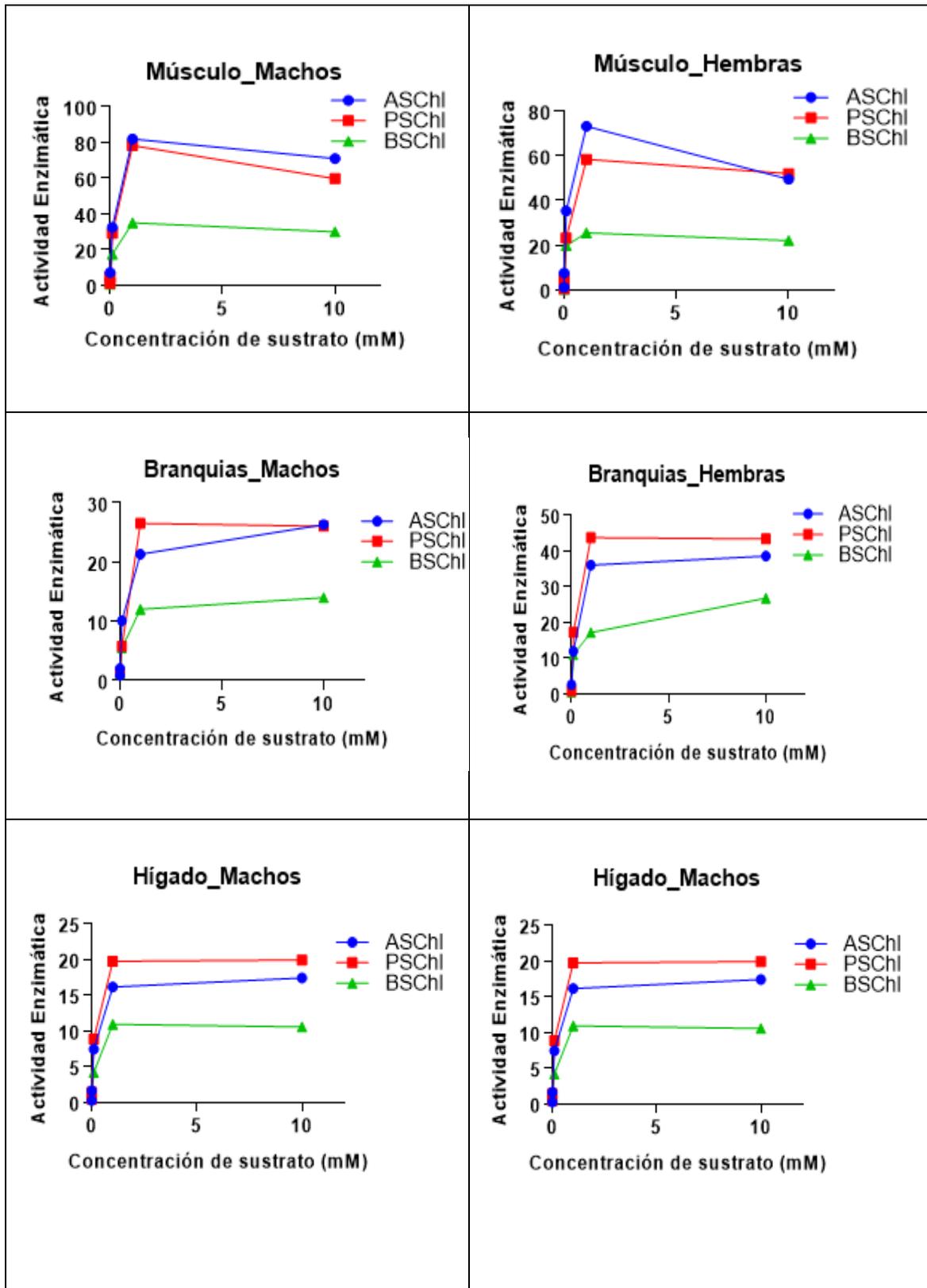


Figura 14. Representación gráfica de la caracterización de ChEs por sexo en los diferentes órganos de *P. velifera* con sustratos específicos

Tabla 1. Especificidad de sustrato en cerebro, branquia, hígado y músculo de machos y hembras de *P. velifera*. Vm: Velocidad máxima, Km: Constante de Michaelis-Menten.

Especificidad de sustrato (Machos)		Cerebro	Branquia	Hígado	Músculo
ASChI (A)					
Vm	nmol/min mg prot	37,62 (34,58-40,66)	26,01 (23,90-28,11)	17,82 (16,90-18,74)	79,71 (68,84-90,57)
Km	mM	0,075 (0,042-0,107)	0,168 (0,099-0,237)	0,134 (0,100-0,168)	0,120 (0,036-0,203)
Bondad de ajuste		0,9671	0,9711	0,9892	0,9123
PSChI (P)					
Vm	nmol/min mg prot	10,94 (8,75-13,14)	28,82 (24,64-33,00)	21,00 (15,57-22,42)	71,19 (58,44-83,94)
Km	mM	0,362 (0,019-0,706)	0,25 (0,071-0,429)	0,128 (0,084-0,172)	0,113 (0,009-0,217)
	Vmax P/A	0,291	1,108	1,144	0,893
	Km P/A	4,83	1,49	0,96	0,94
Bondad de ajuste		0,8515	0,9325	0,9788	0,8677
BSChI (B)					
Vm	nmol/min mg prot	nd	14,08 (12,99-15,16)	11,40 (9,74-13,07)	33,38 (30,21-36,55)
Km	mM	nd	0,160 (0,097-0,222)	0,147 (0,037-0,258)	0,084 (0,042-0,127)
	Vmax B/A	-	0,541	0,621	0,419
	Km B/A	-	0,95	1,11	0,70
Bondad de ajuste		0,9502	0,9081	0,8917	0,9542
Especificidad de sustrato (Hembras)					
ASChI (A)					
Vm	nmol/min mg prot	23,14 (20,21-26,07)	40,78 (35,03-46,52)	26,91 (23,91-29,90)	62,10 (51,86-72,35)
Km	mM	0,087 (0,033-0,141)	0,209 (0,062-0,356)	0,114 (0,049-0,179)	0,064 (0,005-0,122)
Bondad de ajuste		0,9335	0,9249	0,9310	0,8689
PSChI (P)					
Vm	nmol/min mg prot	7,66 (6,34-8,98)	46,50 (42,61-50,40)	33,83 (29,79-37,87)	57,81 (52,07-63,55)
Km	mM	0,596 (0,180-1,012)	0,155 (0,090-0,221)	0,125 (0,049-0,201)	0,125 (0,061-0,188)
	Vmax P/A	0,33	1,14	1,26	0,93
	Km P/A	6,85	0,742	1,096	1,95
Bondad de ajuste		0,9670	0,9712	0,9314	0,9564
BSChI (B)					
Vm	nmol/min mg prot	nd	25,21 (20,36-30,06)	19,93 (18,42-21,44)	24,99 (22,21-27,77)
Km	mM	nd	0,238 (0,0-0,491)	0,086 (0,052-0,121)	0,040 (0,0134-0,067)
	Vmax B/A	-	0,62	0,66	0,41
	Km B/A	-	1,095	0,429	0,188
Bondad de ajuste		0,9772	0,8639	0,9834	0,9479

Inhibidores específicos

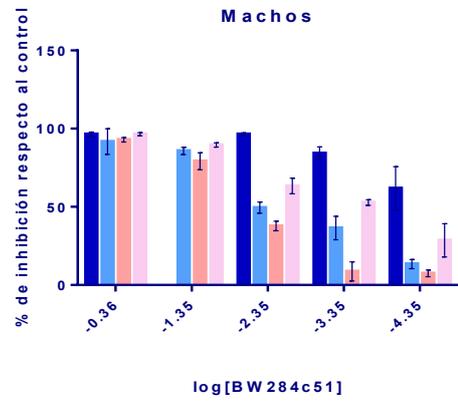
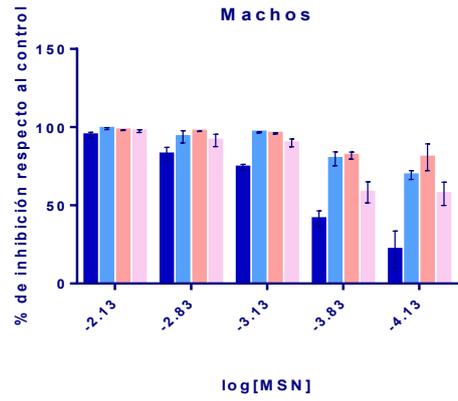
Los resultados del porcentaje de inhibición de la actividad de ChEs en los diferentes órganos, usando los inhibidores específicos y los sustratos ASChI y BSChI tanto en machos como en hembras se presentan en la tabla 2 y en las figuras 15 y 16. Se observa que hubo inhibición con el inhibidor Metil sulfato de neostigmina (MSN) al utilizar los sustratos ASChI y BSChI en cada órgano, lo que indica que la actividad medida es por colinesterasas y no por alguna otra esterasa.

Tabla 2. Representación de los porcentajes de inhibición de la actividad de ChEs usando inhibidores selectivos con el uso de sustratos específicos (ASChI y BSChI). MNS: Metil sulfato de neostigmina, - Poca o nula inhibición, + Baja inhibición, ++ Inhibición muy marcada

Sustrato	Órgano	Hembras			Machos		
		Inhibidores selectivos					
		MSN	BW284c51	iso_OMPA	MNS	BW284c51	iso_OMPA
ASChI	Cerebro	++	++	-	++	++	-
	Branquias	++	++	+	+	++	+
	Hígado	++	++	+	+	++	+
	Músculo	++	++	+	+	++	+
BSChI	Cerebro	-	+	-	-	+	-
	Branquias	++	+	+	++	+	+
	Hígado	++	+	+	++	+	+
	Músculo	++	+	+	++	+	+

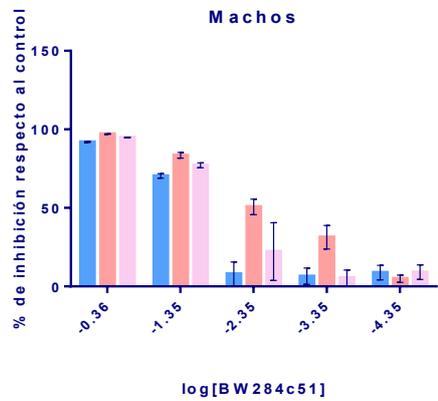
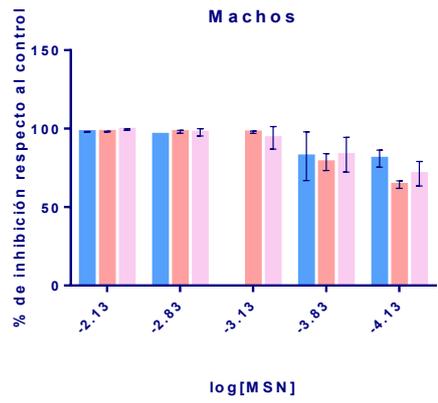
Para determinar si existían diferencias entre las actividades enzimáticas en los diferentes órganos entre machos y hembras se realizó una prueba de U de Mann-Whitney. Esta prueba se realizó con base en las actividades enzimáticas obtenidas con los sustratos ASChI, PSChI y BSChI a la concentración de 1 mM.

Se realizaron un total de 12 pruebas (4 órganos y 3 sustratos), en donde se obtuvo el resultado que no existen diferencias estadísticamente significativas para cada órgano entre sexos con cada uno de los sustratos trabajados ($p > 0.05$).



■ Cerebro ■ Branquia ■ Hígado ■ Músculo

Figura 15. Porcentaje de inhibición de ChEs con respecto al control con inhibidores selectivos y usando como sustrato ASChI. Las barras representan las medias \pm desviación estándar.



■ Branquia ■ Hígado ■ Músculo

Figura 16. . Porcentaje de inhibición de ChEs con respecto al control con inhibidores selectivos y usando como sustrato BSChI. Las barras representan las medias \pm desviación estándar.

2. Efecto de la exposición *in vivo* a los plaguicidas Clorpirifos y Metamidofos en la actividad de Esterasas bajo diferentes condiciones de salinidad.

Una vez obtenidos los valores de las actividades de esterases por inhibición de plaguicidas organofosforados bajo diferentes condiciones de salinidad se obtuvieron los valores de media \pm desviación estándar para cada grupo y para cada órgano. Estos valores se encuentran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Valores de la actividad de Colinesterasas (nmol/min/mg de proteína) en los diferentes órganos de *P. velifera*. Valores de media \pm desviación estándar

Plaguicida: CPR=Clorpirifos; MET=Metamidofos; Salinidad: A = 8 ups, B = 24 ups. Tratamientos: Control (agua), Control solvente (agua más etanol al 0.01%), Trat 1= 0.0029 μ M, Trat 2=0.0143 μ M, Trat 3=0.0285 μ M, Trat 4=0.0713 μ M

ACTIVIDAD DE COLINESTERASAS						
Plaguicida	Salinidad (UPS)	Tratamiento	Órgano			
			Cerebro	Branquia	Hígado	Músculo
CPR	A.	Control	89.55 \pm 40.93	45.60 \pm 22.39	54.54 \pm 33.09	132.11 \pm 58.70
	A.	Control solv	83.23 \pm 61.52	41.50 \pm 14.31	33.82 \pm 18.63	113.67 \pm 50.82
	A.	Trat 1	83.80 \pm 38.15	19.10 \pm 18.68	9.13 \pm 5.15	72.91 \pm 40.89
	A.	Trat 2	61.46 \pm 38.44	8.34 \pm 3.99	4.80 \pm 3.04	30.17 \pm 14.52
	A.	Trat 3	48.75 \pm 27.48	8.14 \pm 3.62	5.42 \pm 4.68	25.62 \pm 7.40
	A.	Trat 4	34.31 \pm 9.04	7.85 \pm 4.83	4.71 \pm 2.35	21.17 \pm 7.82
	B.	Control	84.37 \pm 33.81	29.79 \pm 7.80	36.35 \pm 18.98	174.66 \pm 50.11
	B.	Control solv	96.24 \pm 40.52	35.53 \pm 14.44	39.06 \pm 13.97	162.41 \pm 85.63
	B.	Trat 1	93.87 \pm 54.11	16.63 \pm 8.81	7.88 \pm 4.31	151.61 \pm 70.98
	B.	Trat 2	64.92 \pm 23.67	5.90 \pm 2.28	6.07 \pm 3.07	69.04 \pm 23.86
	B.	Trat 3	37.71 \pm 20.01	2.30 \pm 0.96	3.79 \pm 3.89	57.96 \pm 15.84
	B.	Trat 4	33.48 \pm 17.75	3.15 \pm 0.55	2.34 \pm 1.09	56.11 \pm 32.59
MET	A.	Control	58.23 \pm 10.00	37.17 \pm 14.93	70.83 \pm 38.67	164.78 \pm 56.15
	A.	Control solv	57.27 \pm 11.54	35.51 \pm 17.55	67.84 \pm 29.54	165.95 \pm 53.41
	A.	Trat 1	53.67 \pm 17.07	24.73 \pm 15.03	67.75 \pm 23.77	155.56 \pm 55.77
	A.	Trat 2	47.79 \pm 14.73	19.60 \pm 9.30	59.95 \pm 21.78	146.85 \pm 93.95
	A.	Trat 3	38.23 \pm 15.99	19.97 \pm 7.33	44.86 \pm 10.28	92.451 \pm 26.11
	A.	Trat 4	34.22 \pm 6.91	18.90 \pm 7.57	36.60 \pm 22.01	89.78 \pm 50.49
	B.	Control	46.98 \pm 12.95	26.83 \pm 7.96	73.35 \pm 34.86	145.50 \pm 39.11
	B.	Control solv	44.88 \pm 11.29	26.06 \pm 13.15	74.47 \pm 41.52	147.79 \pm 33.51
	B.	Trat 1	44.76 \pm 8.44	17.41 \pm 6.73	65.94 \pm 27.61	144.05 \pm 77.84
	B.	Trat 2	42.80 \pm 15.26	17.67 \pm 6.24	57.89 \pm 27.59	121.87 \pm 39.11
	B.	Trat 3	39.14 \pm 31.75	16.07 \pm 7.68	54.29 \pm 30.51	113.40 \pm 36.87
	B.	Trat 4	21.81 \pm 7.58	15.77 \pm 6.15	48.42 \pm 29.24	101.73 \pm 33.32

Tabla 4. Valores de la actividad de Carboxilesterasas (nmol/min/mg de proteína) en los diferentes órganos de *P. velifera*. Valores de media \pm desviación estándar.

Plaguicida: CPR=Clorpirifos; MET=Metamidofos; Salinidad A = 8 ups, B = 24 ups. Tratamientos: Control (Agua), Control solvente (Agua más etanol al 0.01%), Trat 1= 0.0029 μ M, Trat 2=0.0143 μ M, Trat 3=0.0285 μ M, Trat 4=0.0713 μ M

ACTIVIDAD DE CARBOXILESTERASAS							
Plaguicida	Salinidad	Tratamiento	Órgano				
			Cerebro	Branquia	Hígado	Músculo	
CPR	A.	Control	5.45 \pm 2.95	1.98 \pm 1.05	43.61 \pm 20.26	4.64 \pm 0.79	
	A.	Control solv	4.68 \pm 3.66	2.09 \pm 1.22	43.05 \pm 13.82	4.03 \pm 0.75	
	A.	Trat 1	3.62 \pm 2.11	1.39 \pm 0.73	29.36 \pm 14.42	2.38 \pm 1.14	
	A.	Trat 2	3.28 \pm 1.38	1.66 \pm 2.35	27.57 \pm 21.17	1.89 \pm 1.07	
	A.	Trat 3	2.43 \pm 1.73	1.83 \pm 1.18	29.88 \pm 12.31	1.34 \pm 0.44	
	A.	Trat 4	2.35 \pm 1.19	1.74 \pm 0.91	24.91 \pm 9.36	1.28 \pm 0.48	
	B.	Control	3.11 \pm 1.26	1.38 \pm 0.79	51.34 \pm 7.87	8.03 \pm 1.66	
	B.	Control solv	3.01 \pm 1.27	1.57 \pm 0.711	52.97 \pm 11.63	6.93 \pm 1.89	
	B.	Trat 1	2.09 \pm 0.75	0.76 \pm 0.45	35.29 \pm 14.38	5.74 \pm 1.55	
	B.	Trat 2	1.95 \pm 1.48	0.95 \pm 0.46	33.52 \pm 9.92	3.63 \pm 2.12	
	B.	Trat 3	1.25 \pm 0.72	0.49 \pm 0.24	33.74 \pm 6.72	3.56 \pm 0.97	
	B.	Trat 4	1.22 \pm 0.75	0.79 \pm 0.425	31.19 \pm 5.71	2.96 \pm 0.63	
	MET	A.	Control	6.83 \pm 1.28	7.34 \pm 3.92	71.89 \pm 15.86	6.07 \pm 2.39
		A.	Control solv	6.34 \pm 2.43	6.67 \pm 1.68	68.08 \pm 27.42	5.97 \pm 2.45
A.		Trat 1	5.82 \pm 2.76	4.55 \pm 1.82	66.81 \pm 13.62	5.30 \pm 2.91	
A.		Trat 2	5.89 \pm 1.45	4.08 \pm 1.59	66.38 \pm 15.06	4.94 \pm 2.45	
A.		Trat 3	5.44 \pm 1.75	7.13 \pm 3.64	65.54 \pm 17.70	4.63 \pm 1.05	
A.		Trat 4	5.76 \pm 2.58	4.70 \pm 2.30	58.16 \pm 18.41	3.81 \pm 1.96	
B.		Control	11.34 \pm 2.92	5.38 \pm 2.34	72.73 \pm 15.63	5.48 \pm 1.95	
B.		Control solv	10.73 \pm 3.52	6.54 \pm 3.30	68.35 \pm 24.82	5.79 \pm 1.28	
B.		Trat 1	9.96 \pm 2.71	6.98 \pm 3.07	58.04 \pm 13.41	5.04 \pm 1.71	
B.		Trat 2	9.14 \pm 2.86	4.65 \pm 1.31	54.83 \pm 16.33	4.18 \pm 1.44	
B.		Trat 3	8.17 \pm 2.68	4.19 \pm 2.25	57.59 \pm 23.68	3.08 \pm 1.50	
B.		Trat 4	8.34 \pm 2.95	4.56 \pm 1.25	44.91 \pm 14.59	2.88 \pm 2.22	

Para determinar si existían o no diferencias de inhibición de esterases en los diferentes grupos bajo las condiciones de diferente salinidad, se analizaron las actividades enzimáticas de ChEs y CbEs por separado.

Colinesterasas:

En el análisis de coordenadas principales (PCO) explicó el 82.1% de la variación total de los datos entre la primera y segunda coordenadas principales (figura 17).

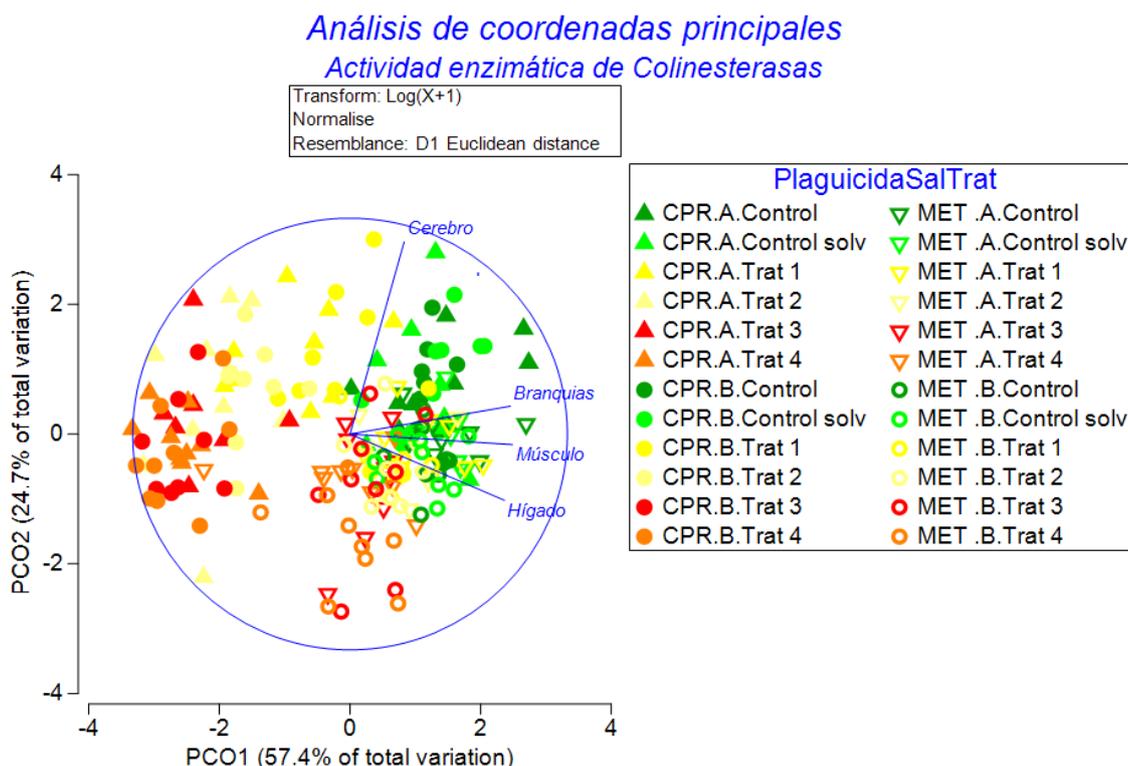


Figura 17. Análisis de Componentes Principales Actividad enzimática de colinesterasas.

Plaguicida: CPR=Clorpirifos; MET=Metamidofos; Salinidad A = 8 ups, B = 24 ups. Tratamientos: Control (Agua), Control solvente (Agua más etanol al 0.01%), Trat 1= 0.0029 μ M, Trat 2=0.0143 μ M, Trat 3=0.0285 μ M, Trat 4=0.0713 μ M

En la primera coordenada (horizontal), la ordenación mostró que la actividad enzimática de las colinesterasas es fuertemente dependiente de la concentración de CPR en las branquias, músculo e hígado, pues las muestras se ordenaron de mayor actividad en los controles a la derecha, y fue disminuyendo hacia la izquierda conforme aumenta la concentración de plaguicida en los diferentes tratamientos. Por su parte, la actividad enzimática de las ChEs dependió más claramente de la concentración de MET en el cerebro (coordenada vertical), separándose las muestras desde los controles y el tratamiento 1 con mayor actividad en la zona central y disminuyendo hacia abajo en

las muestras con mayor concentración de este plaguicida. El mapa no mostró una separación clara entre muestras tomadas a salinidades distintas para ninguno de los dos plaguicidas. En este PCO no se puede apreciar un patrón muy claro en cuanto al efecto de la salinidad.

En el mapa de proyección de centroides de los grupos de interacción de PI x Sal x Tr (figura 18), mostró que en general, las diferencias en la actividad de ChEs fueron más marcadas para el plaguicida CPR, mientras que para MET las diferencias fueron más graduales, separándose menos en los diferentes tratamientos. Asimismo, en el cerebro se registró mayor actividad enzimática del plaguicida CPR que de MET.

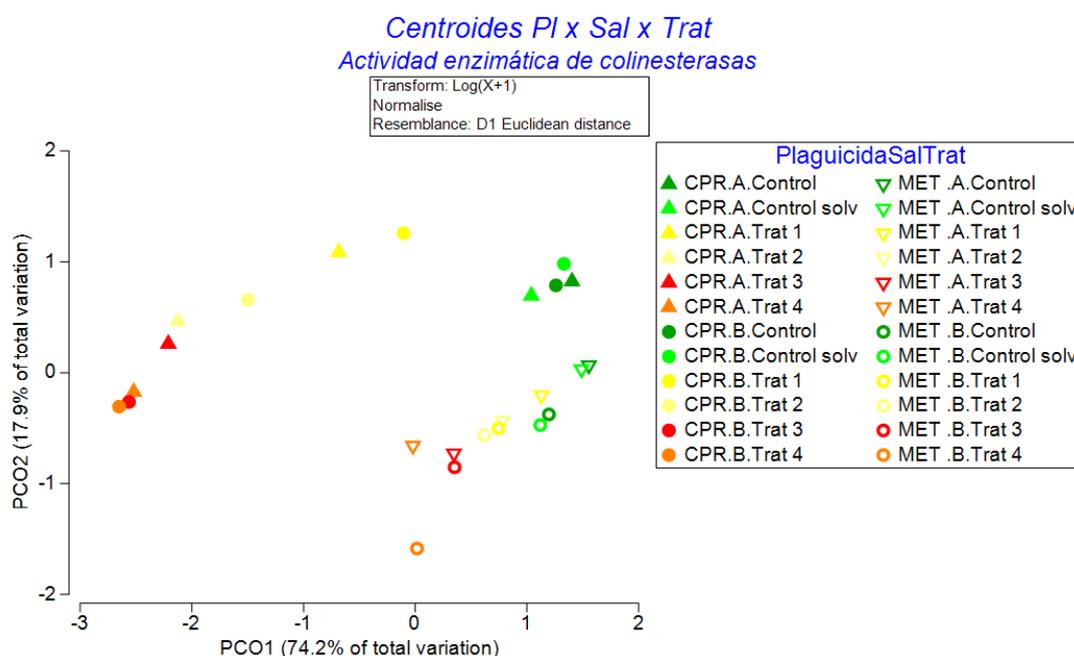


Figura 18. *Análisis de Centroides de la actividad enzimática de ChEs.*

Plaguicida: CPR=Clorpirifos; MET=Metamidofos; Salinidad A = 8 ups, B = 24 ups. Tratamientos: Control (Agua), Control solvente (Agua más etanol al 0.01%), Trat 1= 0.0029 μ M, Trat 2=0.0143 μ M, Trat 3=0.0285 μ M, Trat 4=0.0713 μ M

El análisis de varianza multivariado (Tabla 5) mostró que la triple interacción PI x Sal x Tr no fue significativa, por lo que se procedió a analizar los siguientes términos. La doble interacción PI x Tr fue significativa, lo que indicó que la actividad enzimática de las colinesterasas en los tejidos disminuyó conforme aumento la concentración del plaguicida CPR en los distintos tratamientos, y que la manera como se presentó ésta

disminución fue diferente a aquella ante los tratamientos de MET. Algo similar ocurrió en el caso de la interacción significativa de PI x Sal, que indicó que el CPR (en cualquier concentración) afectó la actividad de las colinesterasas de una manera distinta dependiendo de la salinidad, y que esa diferencia no fue similar cuando se trataba de MET. La interacción Tr x Sal no fue significativa, mostrando que la actividad de ChEs disminuyó conforme aumentaba la concentración de cualesquiera de los plaguicidas, y que la forma de disminuir fue similar en ambas salinidades. Finalmente, se encontraron diferencias entre peceras dentro de cada combinación, mismas que no afectan la interpretación de los resultados del análisis dado que fueron adecuadamente controladas a partir del término anidado. En resumen, el efecto del CPR y MET sobre la actividad de ChEs en los cuatro tejidos analizados difiere entre sí, y depende de la concentración y la salinidad a la que éstos fueron expuestos.

Las interacciones significativas de (PI x Tr) y (PI x Sa) obligaron a realizar pruebas pareadas para determinar las diferencias entre tratamientos de CPR y MET en cada salinidad por separado.

Tabla 5. Resultados de Permanova de la actividad enzimática de ChEs.

G.L: Grados de libertad, S.C: Suma de cuadrados, Perm: permutaciones, PI: plaguicida, Sa: salinidad, Tr: tratamiento, Pe: Pecera

Fuente	G.L.	S.C	C.M	Pseudo-F	P(perm)	# Perm
PlxSa	1	13.942	13.942	8.0195	0.0003	9949
PlxTr	5	74.006	14.801	8.5439	0.0001	9921
SaxTr	5	7.914	1.5828	0.91876	0.5578	9910
PlxSaxTr	5	7.3814	1.4763	0.8576	0.6285	9904
Pe(PlxSaxTr)	48	82.583	1.7205	1.282	0.0225	9782
Res	140	187.88	1.342			
Total	211	844				

Los resultados de las pruebas pareadas para CPR y MET mostraron que no existe diferencias significativas entre control y control solvente en ninguno de los casos, lo cual indica que no hubo efecto por el conductor (etanol) en la actividad de ChEs.

Para los demás grupos las respuestas varían, la tabla 6 indica que los tratamientos 3 y 4 son iguales; todos los demás grupos varían entre sí. En la tabla 7, se observa que los tratamientos 1 y 2 no presentan diferencias significativas, al igual que

los grupos 3 y 4. Sin embargo, los grupos 2 y 3 son iguales, presentándose una falta de resolución de la prueba para saber si el grupo dos tiene más relación con el grupo 1, o con los grupos 3 y 4.

Tabla 6. Prueba pareada de la interacción (PI x Tr) para Clorpirifos.

Grupos	t	P(perm)	# perms
Control, Control solv	0.47695	0.8968	8883
Trat 1, Trat 2	3.228	0.0021	9887
Trat 1, Trat 3	4.7106	0.0028	9937
Trat 1, Trat 4	5.825	0.0021	9886
Trat 2, Trat 3	1.8383	0.0404	9933
Trat 2, Trat 4	2.8029	0.0027	8909
Trat 3, Trat 4	1.1703	0.2717	9932

Tabla 7. Prueba pareada de la interacción (PI x Tr) para Metamidofos.

Grupos	t	P(perm)	# perms
Control, Control solv	0.46792	0.9083	9892
Trat 1, Trat 2	0.61501	0.8045	9922
Trat 1, Trat 3	1.6468	0.0495	9924
Trat 1, Trat 4	2.9885	0.0019	9908
Trat 2, Trat 3	1.0996	0.3143	8940
Trat 2, Trat 4	2.4832	0.0047	8905
Trat 3, Trat 4	1.251	0.192	8933

En las gráficas 19 y 20 se observa el efecto inhibitorio de los diferentes tratamientos con CPR y MET con respecto al control en los diferentes órganos estudiados bajo las dos condiciones de salinidad. Para el tratamiento con CPR, la actividad de AChE presente en cerebro presenta niveles de inhibición menores al 60% en todos los tratamientos. Para las ChEs de branquias hígado y músculo existe una inhibición mayor al 50% en todos los tratamientos.

Para el hígado la inhibición es casi del 90% en todos los tratamientos y en las dos condiciones de salinidad, indicando que este órgano es muy sensible ante la exposición de CPR.

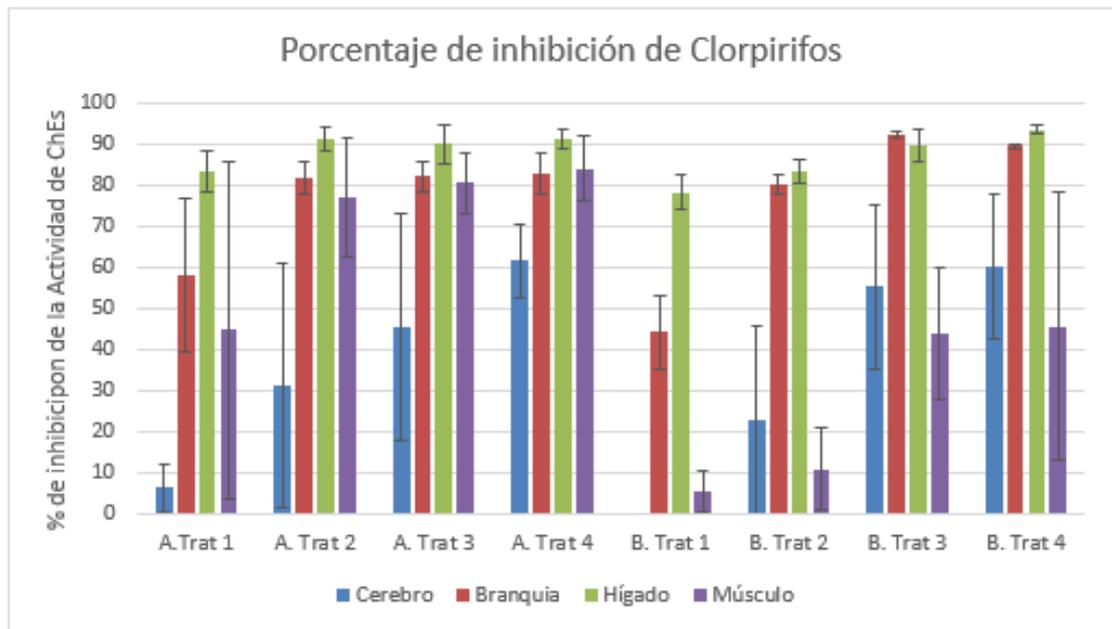


Figura 19. Porcentajes de inhibición con respecto a los peces control para las ChEs presentes en cerebro, branquia, hígado y músculo del pez *P. velifera* para los diferentes tratamientos con Clorpirifos.

Las barras muestran los porcentajes promedio \pm la desviación estándar. Salinidad A = 8 ups, B = 24 ups, Trat 1= 0.0029 μ M, Trat 2=0.0143 μ M, Trat 3=0.0285 μ M, Trat 4=0.0713 μ M

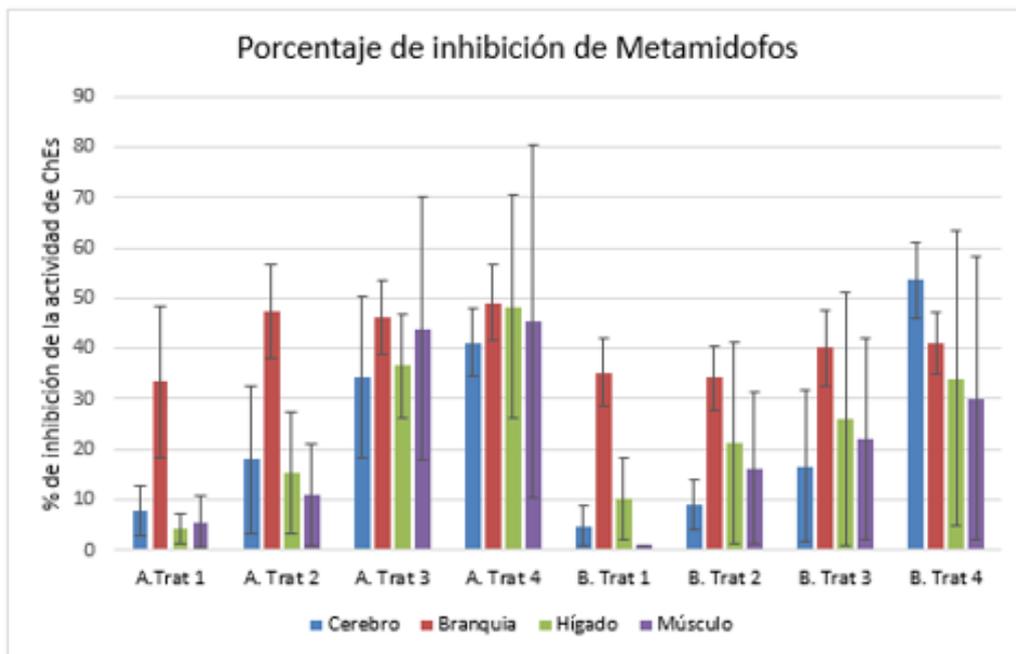


Figura 20. Porcentajes de inhibición con respecto a los peces control para las ChEs presentes en cerebro, branquia, hígado y músculo del pez *P. velifera* para los diferentes tratamientos con Metamidofos.

Las barras muestran los porcentajes promedio \pm la desviación estándar. Salinidad A = 8 ups, B = 24 ups, Trat 1= 0.0029 μ M, Trat 2=0.0143 μ M, Trat 3=0.0285 μ M, Trat 4=0.0713 μ M.

Para el tratamiento 1 en la salinidad de 24 UPS, la concentración de CPR no afecto la actividad de AChE en el cerebro por lo tanto no hubo inhibición enzimática.

Los porcentajes de inhibición con respecto al control para el OP Metamidofos muestran que este compuesto tiene un efecto menos inhibitorio (figura 21). En el caso de las ChEs de todos los órganos, en ningún tratamiento se inhibió sobre el 50% la actividad enzimática en ninguna condición de salinidad.

Carboxilesterasas:

En el Análisis de Coordenadas Principales (PCO) (Figura 21), entre la primera y la segunda coordenadas principales se explicó el 79.6% de la variación total de los datos.

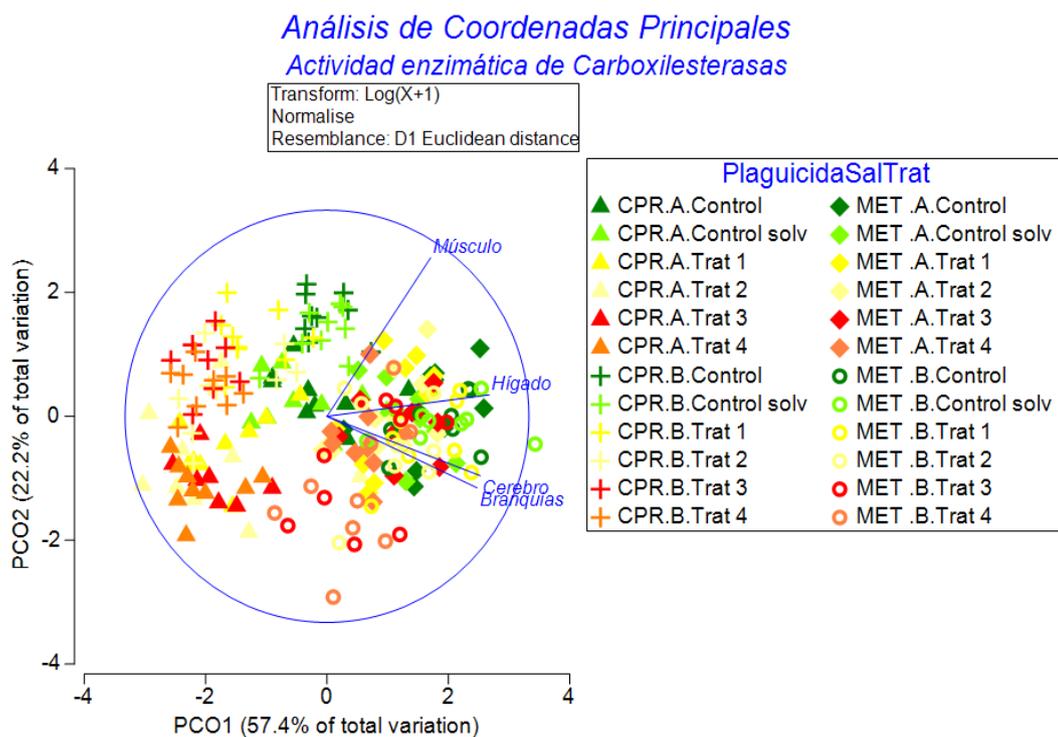


Figura 21. Análisis de Componentes Principales Actividad enzimática de carboxilesterasas.

Plaguicida: CPR=Clorpirifos; MET=Metamidofos; Salinidad A = 8 ups, B = 24 ups. Tratamientos: Control (Agua), Control solvente (Agua más etanol al 0.01%), Trat 1= 0.0029 μ M, Trat 2=0.0143 μ M, Trat 3=0.0285 μ M, Trat 4=0.0713 μ M

En la primera coordenada (horizontal), la ordenación mostró que la actividad enzimática de las CbE que es dependiente de las concentraciones de MET y CPR, teniendo mayor actividad en los controles y disminuyendo al aumentar la concentración de los plaguicidas OP. El hígado fue el órgano que más marcadamente responde a los tratamientos con los plaguicidas, pues las muestras se ordenaron de mayor actividad en los controles a la derecha sobre el eje horizontal, y fue disminuyendo hacia la izquierda conforme aumenta la concentración de plaguicidas OP. En cuanto a la comparación entre plaguicidas, la actividad enzimática de CbE dependió más claramente de la concentración de CPR en el músculo, separándose las muestras desde los controles hasta las concentraciones más altas de CPR, observándose mayor actividad enzimática en la parte superior y disminuyendo hacia abajo en las muestras con mayor concentración de plaguicidas. La actividad enzimática de CbE dependió de la concentración de MET en cerebro y branquias, aunque la disminución de la actividad es gradual para este plaguicida.

En contraste con la actividad de las ChEs, en este caso fue posible reconocer una diferencia entre salinidades para los dos plaguicidas, siendo ésta más marcada para CPR, mientras que para MET esta diferencia es muy baja.

En el mapa de proyección de centroides de los grupos de interacción de PI x Sal x Tr (figura 22), mostró que existe una disminución marcada de la actividad de CbE para el plaguicida CPR, mientras que para MET esta disminución es gradual. Se observa una diferencia entre salinidades muy clara para CPR, mientras que para MET estas diferencias fueron más graduales.

Centroides interacción PI x Sa x Tr
Actividad enzimática de Carboxilesterasas

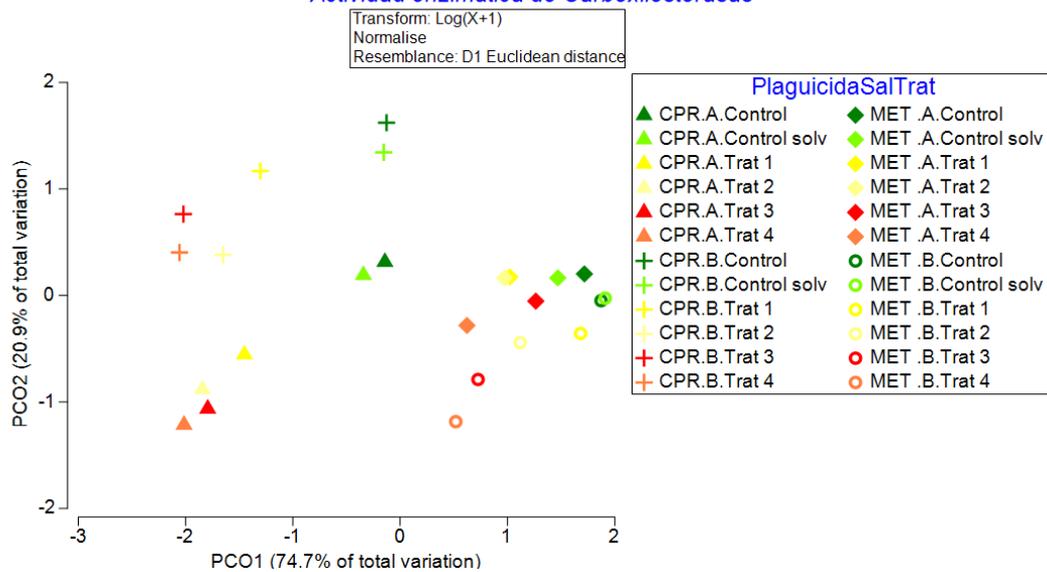


Figura 22. Análisis de Centroides de la actividad enzimática de CbEs.

Plaguicida: CPR=Clorpirifos; MET=Metamidofos; Salinidad A = 8 ups, B = 24 ups. Tratamientos: Control (Agua), Control solvente (Agua más etanol al 0.01%), Trat 1= 0.0029 μ M, Trat 2=0.0143 μ M, Trat 3=0.0285 μ M, Trat 4=0.0713 μ M.

El análisis de varianza multivariada (Tabla 8) mostró que la triple interacción PI x Sal x Tr no fue significativa, por lo que se procedió a analizar los siguientes términos. La doble interacción PI x Tr significativa indicó que la actividad enzimática de las CbE en los tejidos disminuyó conforme aumentó la concentración del plaguicida CPR en los distintos tratamientos, y que la manera como se presentó esta disminución fue diferente a aquella con los tratamientos de MET. En la interacción significativa de PI x Sa, indicó que el CPR en cualquier concentración afectó la actividad de CbE de una manera distinta dependiendo de la salinidad, y que esa diferencia no fue similar cuando se trataba de MET. La interacción Tr x Sal no fue significativa, mostrando que la actividad de las CbE disminuyó conforme aumentaba la concentración de cualesquiera de los plaguicidas, y que la forma de disminuir fue similar en ambas salinidades.

Finalmente, se encontraron diferencias entre peceras dentro de cada combinación, mismas que no afectan la interpretación de los resultados del análisis dado que fueron adecuadamente controladas a partir del término anidado.

En resumen, el efecto de del CPR y MET sobre la actividad de las CbE en los cuatro tejidos de los peces analizados difiere entre sí, y depende de la concentración

de plaguicidas y la salinidad a la que éstos fueron expuestos al igual que la actividad de las ChEs.

Las interacciones significativas de (Pl x Tr) y (Pl x Sa) obligaron a realizar pruebas pareadas para determinar las diferencias entre tratamientos de CPR y MET en cada salinidad por separado.

Tabla 8. Resultados de Permanova de la actividad enzimática de CbEs.

G.L: Grados de libertad, S.C: Suma de cuadrados, Perm: permutaciones

Source	GL	SC	CM	Pseudo-F	P(perm)	perm
PlxSa	1	60.725	60.725	31.978	0.0001	9960
PlxTr	5	17.022	3.4043	1.8054	0.0318	9927
SaxTr	5	7.1032	1.4206	0.75692	0.7577	9897
PlxSaxTr	5	5.4676	1.0935	0.58361	0.9211	9909
Pe(PlxSaxTr)	48	90.125	1.8776	1.2639	0.0259	9780
Res	140	207.98	1.4856			
Total	211	844				

Los resultados de las pruebas pareadas (tabla 9 y 10) mostraron que no existen diferencias significativas entre control y control solvente, por lo cual se asegura que el efecto sobre la disminución de la actividad de CbE fue a causa de los plaguicidas y no como resultado del efecto del solvente.

En la tabla 9, se observa que en todos los casos el tratamiento 1, resultó diferente de los demás tratamientos, mientras que éstos difirieron entre sí.

Tabla 9. Prueba pareada de la interacción (Pl x Tr) dentro del factor CPR.

Grupos	t	P(perm)	perm
Control, Control solv	0.76048	0.5948	8928
Trat 1, Trat 2	1.2334	0.2287	9888
Trat 1, Trat 3	2.072	0.0081	9947
Trat 1, Trat 4	2.6093	0.0041	9906
Trat 2, Trat 3	0.89333	0.5759	9941
Trat 2, Trat 4	1.0397	0.4062	8915
Trat 3, Trat 4	0.95492	0.4855	9935

De nuevo se encontró ambigüedad en el tratamiento 2, sin que las pruebas tuvieran suficiente poder de resolución para definir diferencias y similitudes entre este y los tratamientos 3 y 4.

Tabla 10. Prueba pareada de la interacción (Pl x Tr) dentro del factor MET.

Grupos	t	P(perm)	perm
Control, Control solv	0.85309	0.569	9909
Trat 1, Trat 2	0.77614	0.6446	9918
Trat 1, Trat 3	0.868	0.4927	9904
Trat 1, Trat 4	1.7558	0.0557	9896
Trat 2, Trat 3	0.93962	0.4654	8887
Trat 2, Trat 4	1.9075	0.0129	8921
Trat 3, Trat 4	1.0314	0.3776	8925

En los gráficos 23 y 24 se observan los porcentajes de inhibición de la actividad enzimática de CbEs con respecto al grupo control tanto para CPR como para MET. En el caso de CPR se observa un efecto inhibitorio mayor a la condición de salinidad de 24 UPS en el caso del cerebro.

Para branquias, hígado y músculo el porcentaje de inhibición es similar en las dos condiciones de salinidad, en los cuales no supera el 80% de inhibición de la actividad.

El efecto inhibitorio en el caso de MET es menor al 50% en todos los órganos y en las dos condiciones de salinidad respecto al grupo control. En el caso de las branquias en el tratamiento 1 de la salinidad B (24 UPS), no existió efecto inhibitorio de MET en la actividad de CbE.

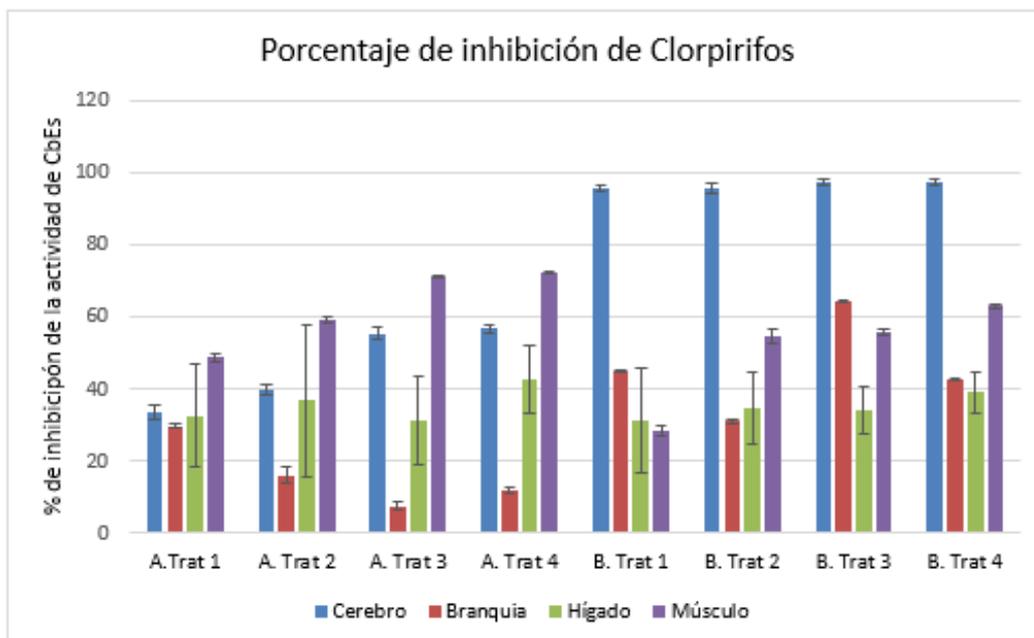


Figura 23. Porcentajes de inhibición con respecto a los peces control para las CbEs presentes en cerebro, branquia, hígado y músculo del pez *P. velifera* para los diferentes tratamientos con Clorpirifos.

Las barras muestran los porcentajes promedio \pm la desviación estándar. Salinidad A = 8 ups, B = 24 ups, Trat 1= 0.0029 μ M, Trat 2=0.0143 μ M, Trat 3=0.0285 μ M, Trat 4=0.0713 μ M

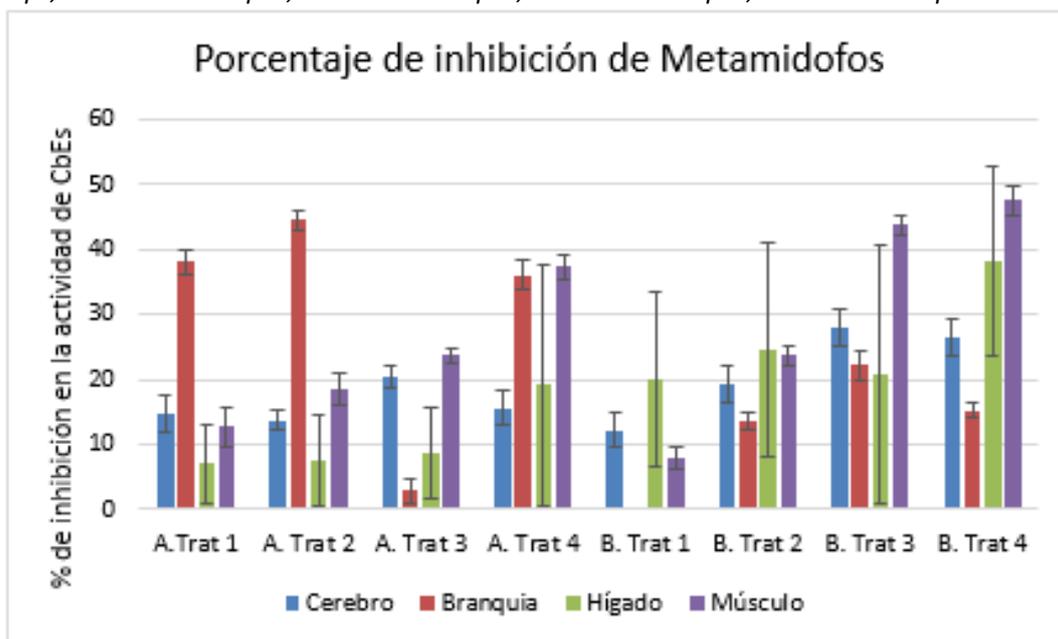


Figura 24. Porcentajes de inhibición con respecto a los peces control para las CbEs presentes en cerebro, branquia, hígado y músculo del pez *P. velifera* para los diferentes tratamientos con metamidofos.

Las barras muestran los porcentajes promedio \pm la desviación estándar. Salinidad A = 8 ups, B = 24 ups, Trat 1= 0.0029 μ M, Trat 2=0.0143 μ M, Trat 3=0.0285 μ M, Trat 4=0.0713 μ M

DISCUSIÓN

1. Caracterización bioquímica de Colinesterasas

La caracterización bioquímica de colinesterasas con base en sustratos e inhibidores específicos se determinó utilizando el diagrama de flujo presentado en la figura 25. Para el cerebro, las curvas de preferencia del sustrato indican la presencia de un efecto inhibitorio con ASChI para concentraciones altas (10 mM) para los dos sexos; no se pudo detectar actividad enzimática medible utilizando el sustrato de BSChI. Por lo cual, no fue posible utilizar el criterio de Pezzementi *et al.*, 1991 para la relación V_{max} y K_m ; sin embargo, la incapacidad de utilizar a la BSChI como sustrato nos hace pensar que la ChE predominante en cerebro es una AChE. Al utilizar el criterio de clasificación utilizando los parámetros de cinética de Michaelis-Menten se tiene que la ChE presente en cerebro tiene mayor $V_{m\acute{a}x}$ y menor K_m utilizando como sustrato ASChI en comparación al sustrato PSChI el cual se diferencia de la BSChI por tener un carbono menos.

Los valores obtenidos con los inhibidores específicos indican que es fuertemente inhibido con metilsulfato de neogstigmaína lo que indica que se trata de una ChE y no otro tipo de esterasa. Al comparar las gráficas con BW284c51 e iso-OMPA, se observa que existe una mayor afinidad con el inhibidor de AChE (BW284c51), mientras que con el inhibidor iso-OMPA esta afinidad es muy baja.

Durante la caracterización de ChEs es importante que éstas sean inhibidas por metilsulfato de neogstigmaína ya que ciertos tejidos pueden presentar diferentes tipos de esterasas y puede llevar a una interpretación errónea de resultados al momento de calcular la actividad enzimática, por lo que no se sabría con certeza a que grupo de esterasas pertenecen.

Toda la información de la caracterización sugiere que la ChE predominante en cerebro es una AChE al tener una preferencia por el sustrato ASChI y una fuerte inhibición con el inhibidor BW284c51. Estudios anteriores han reportado la presencia exclusiva de AChE en el cerebro en los peces *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*,

Serranus cabrilla (Sturm *et al.*, 1999), *Oreochromis niloticus* (Rodríguez-Fuentes, 2005), *Poecilia reticulata* (García *et al.*, 2000), *Gambusia holbrooki* (Nunes *et al.*, 2003).

En el caso del músculo, las curvas de preferencia del sustrato indican la presencia de un efecto inhibitorio del sustrato ASChI para concentraciones altas (10 mM) para los dos sexos. La ChE presente en el músculo muestra hidrólisis con los tres sustratos, pero presenta mayor V_{max} con el sustrato ASChI y menor K_m utilizando como sustrato BSChI lo que sugiere mayor afinidad por BSChI. Se tienen las relaciones $V_{max}BSChI/V_{max}ASChI < 1$ (machos=0.419, hembras=0.41) y $K_{mBSChI}/K_{mASChI} < 1$ (machos=0.70 y hembras=0.188) por lo que de acuerdo a la clasificación de Pezzementi *et al.* (1991) sólo cumple con uno de los criterios, es decir, no es posible clasificarla de acuerdo a su preferencia por sustrato.

Tampoco presenta una relación $V_{max}PSChI/V_{max}ASChI > 1$, por lo cual no puede ser clasificada como una propionilcolinesterasa (PChE). En la figura 16 se observa mayor sensibilidad con el inhibidor de AChE (BW284c51). Al no poder ser clasificada de acuerdo a la preferencia por sustrato se trata de una BChE diferente a las BChEs presentes en mamíferos ya que presenta características intermedias entre AChE y BChE, al presentar mayor velocidad de hidrólisis con el sustrato ASChI y mayor afinidad con BSChI. Estos resultados sugieren que la ChE presente en músculo de *P. velifera* es una BChE atípica.

Estas características de BChE atípicas en músculo de peces han sido reportadas anteriormente en el músculo de *Gambusia Yucatana* (Osten *et al.*, 2005; Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2016), *Pleuronectes vetulus*, *Pleuronichthys verticalis* (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2007), *Serranus cabrilla* (Sturm *et al.*, 1999), *Haemulon plumieri* (Alpuche-Gual y Gold-Bouchot, 2008).

En el hígado y las branquias al clasificar las ChEs mediante las curvas de preferencia por sustrato, no se observa inhibición por exceso de sustrato con ASChI. Presentan una mayor V_{max} con el sustrato PSChI y un menor K_m con BSChI con valores muy cercanos a los de ASChI, una relación $V_{max}PSChI/V_{max}ASChI > 1$ en los dos órganos para los dos sexos. Los dos órganos presentan una relación $V_{max}BSChI/V_{max}ASChI < 1$, y la relación K_{mBSChI}/K_{mASChI} con valores menores a 1 o muy cercanos al límite que van en

el rango de 0.95 para branquias y 1.11 para hígado en machos y 1.095 en branquias y 0.429 en hígado en el caso de las hembras.

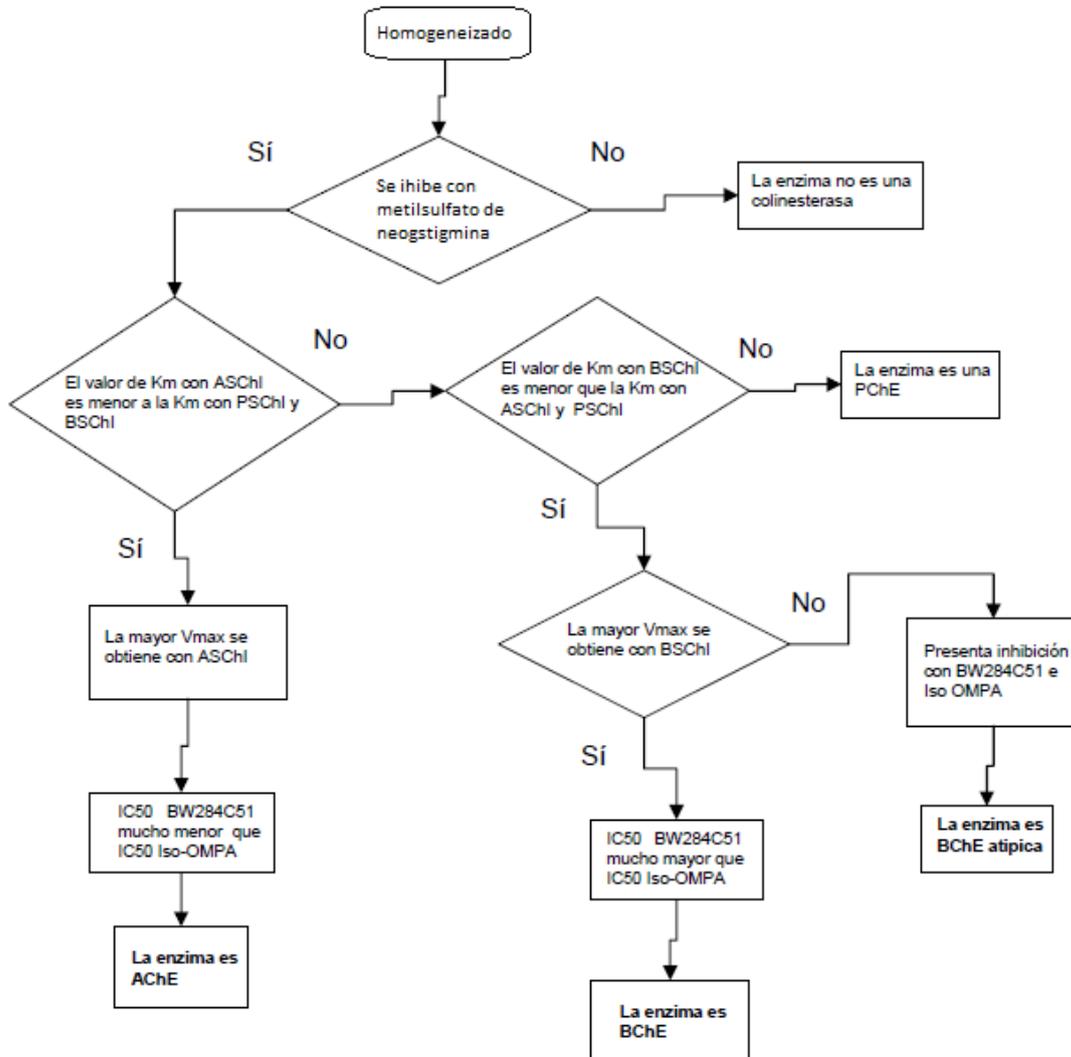


Figura 25. Diagrama de flujo para la caracterización de ChEs.

Tomado de: (Rodríguez-Fuentes, 2005)

Utilizando la analogía al criterio descrito anteriormente, estas ChEs serían clasificadas como PChE, pues presentan una relación $V_{maxPSChI} / V_{maxASChI} > 1$, y una relación K_{mPSChI} / K_{mASChI} con valores muy cercanos a 1 (1.49 (hembras) y 0.74 (machos) para branquias y 0.96(hembras) y 1.09 (machos) para hígado); es decir, tienen valores muy cercanos al límite de clasificación, lo que indica gran afinidad por ASChI y PSChI.

Cabe resaltar que la propionilcolinesterasa ha sido denominada como una ChE de invertebrados, se ha reportado en el molusco *Corbicula fluminea* (Mora *et al.*, 1999) y en el anélido *Hirudo medicinalis* (Principato *et al.*, 1981).

Al analizar las figuras 15 y 16 de los porcentajes de inhibición con respecto al grupo control se observa que el hígado presenta inhibición con los dos sustratos utilizados (ASChI y BSChI) y el inhibidor metil sulfato de neogstigmina y presenta una inhibición muy marcada con el inhibidor de BChE (iso-OMPA). En el caso de las branquias, de igual manera se presenta inhibición con los dos sustratos, siendo más sensible con el inhibidor de AChE (BW284c51). Las características de no tener preferencia por sustrato y presentar inhibición con los dos inhibidores selectivos, indican la presencia de una BChE atípica para branquias e hígado, anteriormente fue reportada la presencia de esta ChE para *Oreochromis niloticus* (Rodríguez-Fuentes, 2005).

El término “atípico” se usó previamente por Sturm *et al.* (1999) para describir ChEs con comportamiento diferente en preferencia de sustrato e inhibidores con respecto a las colinesterasas presentes en humanos (Marín-López, 2018).

La presencia de ChEs con propiedades catalíticas intermedias entre AChE y BChE, es denominada BChE atípica debido a que satisface varios de los criterios para ChEs no específicas, pero presenta como sustrato preferencial a la acetilcolina y posee varias de las características de la AChE (Rodríguez-Fuentes, 2005). Lo que implica que existen diferencias estructurales entre la BChE de mamíferos y la BChE atípica en peces.

La actividad de las ChEs no presenta variaciones con respecto al género, esto se ha reportado en el caso de *Cyprinus carpio*, en donde no se observó diferencias en la actividad de ChEs entre machos y hembras (Gruber & Munn, 1998).

A partir de la información de las curvas de preferencia de sustrato e inhibidores específicos se pueden establecer las condiciones óptimas para cuantificar la actividad de ChEs en estudios ecotoxicológicos con *P. velifera*. Para cuantificar la actividad del cerebro se utilizará como sustrato ASChI, con una concentración de 1mM para evitar la inhibición por exceso del sustrato.

En el caso de utilizar como biomarcador la actividad de ChE presente en branquias, hígado y cerebro, el sustrato a utilizar puede ser ASChI o BSChI, debido a

que las enzimas presentes en estos órganos no presentan una preferencia clara por alguno de estos sustratos.

Adicionalmente, conocer los valores de los parámetros cinéticos e inhibidores es de gran importancia en cuanto a la exposición a plaguicidas OP y carbamatos. Fourier & Muero (1994) reportaron que la resistencia a los plaguicidas OP y carbamatos puede deberse a altos valores de la Km en la AChE. Un alto Km puede reflejar una menor afinidad por el sustrato natural ACh o por sustratos análogos como los plaguicidas.

El valor del IC₅₀ también puede utilizarse como un índice de afinidad, a mayor IC₅₀ se tendrá menor sensibilidad a los sustratos análogos. En el cuadro 2 se observa valores de IC₅₀ y Km en comparación con otras especies. Se observa que *P. velifera* se encuentra en entre las primeras especies, indicando que tiene una fuerte sensibilidad a los compuestos intermedios como son los plaguicidas.

Cuadro 2: Afinidad esperada a los plaguicidas de acuerdo al criterio de clasificación con los parámetros Km utilizando como sustrato ASChI y la IC₅₀ de eserina para diferentes especies, los valores se presentan en orden decreciente de afinidad por los plaguicidas. Tomado de Rodríguez-Fuentes, 2005

Organismo	órgano	Km (mM)	IC ₅₀	Tipo	Referencia
<i>Odontesthes bonaerensis</i>	Larva completa	0.040	7.43 x 10 ⁻⁵	Eurihalino	Montserrat y Bianchini, 2001
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cerebro	0.085	NR	Eurihalino	Sahaoan et al., 2004
<i>P. Velifera</i> *	Cerebro	0.075 0.087	NR	Eurihalino	Machos Hembras
<i>O. niloticus</i>	Cerebro	0.102	9.7 x 10 ⁻⁴	Eurihalino	Rodríguez-Fuentes 2005
<i>Carassius auratus</i>	Cerebro	0.112	NR	Dulceacuícola	Sahaoan et al., 2004
<i>Pseudorasbora parva</i>	Cerebro	0.113	NR	Dulceacuícola	Sahaoan et al., 2004
<i>Ictalurus punctatus</i>	Cerebro	0.200	3 x 10 ⁻⁴	Dulceacuícola	Habig et al., 1988

NR: No reportado

* Presente trabajo

En el cuadro 2 se puede observar que las especies dulceacuícolas son las que presentan mayores valores de Km, mientras que las especies eurihalinas según el criterio de Fourier y Muero (1994) resultarían ser más sensibles a los compuestos OP.

En un estudio realizado por Cleveland y Hamilton (1983) con trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el pez gato (*Ictalurus punctatus*) con el OP S,S,S-tributil fosforotritioato (DEF) en agua dulce en un ensayo de toxicidad aguda, el pez gato fue aparentemente más tolerante al DEF que la trucha arcoíris, ya que el pez gato exhibía una mejor supervivencia y crecimiento.

Esto podría deberse principalmente a dos cosas: la primera que los organismos eurihalinos pueden diferir sustancialmente en su sensibilidad a algunas sustancias tóxicas debido a diferencias inherentes con los organismos de agua dulce. La segunda, que la biodisponibilidad de algunas sustancias tóxicas puede ser diferente en ambientes salobres como estuarios debido a sus características químicas, por lo que su toxicidad se vería afectada (Hall & Anderson, 1995), por lo que se sugiere estudiar la biodisponibilidad de OP en aguas salobres.

La actividad de ChEs fue evaluada en machos y hembras de *P. velifera*, encontrando que no existen diferencias entre sexos, esto coincide con lo reportado por Galgani *et al.*, (1992) en *Limanda Limanda*, en donde no se encontraron diferencias en las actividades de ChEs en cerebro, músculo e hígado relacionado con el sexo o la talla.

Esto es importante ya que para estudios ecotoxicológicos se debe considerar si existen o no variaciones para poder validar la actividad de ChEs como una herramienta de monitoreo biológica.

2. Efecto de la exposición *in vivo* a los plaguicidas Clorpirifos y Metamidós en la actividad de Esterasas

El pez *Poecilia velifera* al ser una especie eurihalina, se encuentra en aguas dulces, salobres e inclusive marinas; por lo que debe adoptar estrategias osmorreguladoras para mantener la homeostasis en su medio interno. Muchas veces,

los cambios de salinidad del medio ambiente pueden ser estresantes y provocar una disminución de la energía requerida en el metabolismo basal de los animales (Espina y Vanegas, 2005).

Los hábitats de *P. velifera* pueden verse afectados por plaguicidas debido a la escorrentía y a la topografía kárstica del suelo de la PY, por lo tanto, es importante entender cómo la exposición combinada del factor ambiental salinidad y OP puede afectar a esta especie que se encuentra en la NOM059 como especie amenazada.

En la exposición aguda a plaguicidas OP durante 96 h, se determinó que las ChEs presentes en branquias, hígado y músculo respondieron de una forma muy similar entre ellas, esto puede ser a que se trata de la misma ChE (BChE atípica). Mientras que la ChE presente en cerebro (AChE) tuvo una respuesta diferente a la ChE presente en los órganos anteriores, ésta respuesta puede ser debido a la especificidad del sitio activo de cada ChE y su interacción con el OP (figura 18).

En un estudio *in vitro* realizado en los peces *Limanda Limanda*, *Platichthys flesus* y *Serranus cabrilla* con el compuesto activo de metil-paratión el paraoxón (Sturm *et al.*, 1999), se determinó que la BChE es más sensible a los plaguicidas OP.

El papel protector de la BChE, es un factor que influye en la diferencia de efecto de las ChEs. La BChE actúa como una enzima escudo absorbiendo el impacto de los xenobióticos resguardando la funcionalidad de la enzima involucrada en funciones fisiológicas y motoras que se dan en cerebro (Rodríguez-Fuentes, 2005).

La ChE predominante en cerebro no supera el 60% de inhibición en ninguno de los tratamientos y su función principal es la de hidrolizar el neurotransmisor ACh. Este neurotransmisor funciona tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el sistema nervioso periférico. Se sabe que el tejido nervioso está protegido de las variaciones en la composición de la sangre y las toxinas por la barrera hematoencefálica (BHE).

Esta capacidad de barrera altamente restrictiva permite a las células controlar la homeostasis del SNC. Un cambio en la composición del fluido intersticial en el SNC podría generar una actividad cerebral descontrolada que iría desde cambios en el comportamiento, alteraciones del metabolismo hepático, disminución en el peso corporal hasta la muerte del organismo (Newman, 2015).

Otro factor que ayuda en la protección de la función del cerebro es una aclimatación previa a agua con salinidades más altas, antes de exponerlos a tratamientos con OP. Lo cual explicaría los efectos protectores en la disminución de la señal neuronal, ya que la "sobrecarga" colinérgica debida a la inhibición de la colinesterasa es el modo de acción predominante. Si la acción neuronal es disminuida por condiciones hipersalinas, el exceso de acetilcolina en las sinapsis neuronales no provocaría toxicidades asociadas con la mortalidad (Amiri, et al., December 2017).

Además, en el caso del CPR, es posible que la presencia de un elevado metabolismo del plaguicida en el hígado y la presencia de mecanismos de protección impidan la llegada del compuesto parental y su metabolito al cerebro. Para el hígado se observa un porcentaje de inhibición mayor al 80% en todos los tratamientos con CPR, esto se puede atribuir a que en exposiciones *in vivo*, cuando el compuesto requiere bioactivarse se utiliza la capacidad metabólica del órgano. El hígado es el órgano en el cual se realiza la biotransformación del CPR.

La oxidación del CPR, un compuesto tio-éter, es un paso fundamental en el proceso de biotransformación. Este proceso es catalizado por las enzimas P450 (CYP) y FMO. Estas enzimas a veces compiten por la oxidación de azufre de los compuestos.

Bawardi *et al* (2007), plantearon la hipótesis que los OP de tio-éter que son biotransformados en compuestos más tóxicos por FMO pueden ser más tóxicos en especies que regulan la sobreexpresión de FMO en respuesta a condiciones hipersalinas, debido a la formación mejorada de metabolitos de sulfóxidos que pueden ser más tóxicos que los compuestos originales.

Schlenk *et al* (2000), reportaron que especies que poseen altos niveles de actividad de FMO son más sensibles a la toxicidad de OP que aquellos que poseen poca o nula actividad. Larsen y Schlenk (2001) encontraron que existe una correlación directa entre la salinidad y la expresión de FMO en varias especies de peces eurihalinos, mientras que la actividad de CYP no se vio influenciada por la salinidad.

Los *P. velífera* son organismos osmorreguladores, por lo que debe presentar actividad de FMO y debe presentar altos niveles, sin embargo, a pesar de que se llegó a un porcentaje de inhibición de ChEs mayor o igual al 80% su toxicidad no llegó a ser letal para los organismos, esto puede deberse a que estos organismos son capaces de

realizar ajustes en su metabolismo bajo éstas concentraciones de exposición evitando la muerte del mismo.

Uno de los órganos encargados de la regulación osmótica es la branquia. Se sabe también que las branquias participan en la biotransformación de CPR a Clorpirifos-oxón, aunque su capacidad de biotransformación es menor a la que se presenta en el hígado (Maryoung, 2014).

Las branquias son la principal vía de absorción de compuestos en disolución, lo cual explicaría que el porcentaje de inhibición de la actividad de la ChE presente en branquias con respecto al grupo control supere el 50% desde el primer tratamiento con CPR llegando al 90% de inhibición en los tratamientos con una concentración más alta de CPR en las dos salinidades.

En una recopilación de información de los efectos de la salinidad en la toxicidad de varios contaminantes realizada por Hall et al. (1995) indican que los peces eurihalinos son más resistentes a condiciones tóxicas en salinidades isosmóticas debido a la minimización del estrés osmótico. Los estudios indicaron que los peces eran más resistentes a los contaminantes en salinidades medias en comparación con los extremos.

Esto se vería reflejado en el caso de la inhibición de la ChE presente en músculo, en dónde se tiene mayor porcentaje de inhibición con respecto al grupo control en la salinidad de 8 UPS que va desde el 40 al 80%, mientras que para la salinidad de 24 UPS no llega al 50% de inhibición en ningún tratamiento.

La disminución de la actividad de ChEs tuvo un efecto más drástico en el caso de CPR que para MET, esto puede ser ya que el CPR necesita ser bioactivado a su oxón más potente (clorpirifos-oxón), mientras que el mecanismo de acción de MET es directo ya que es el oxón más potente del acefato. Por lo que se puede observar que su mecanismo de acción sobre la inhibición de las ChEs es gradual, observándose los grupos de tratamiento más juntos entre sí.

Los tratamientos con MET no superaron el 50% de inhibición en ningún tratamiento en los órganos con respecto al grupo control en la actividad de ChEs (Figura 21). El órgano que presenta mayor porcentaje de inhibición con respecto a los otros es la branquia, esto debido a que es el sitio de entrada de contaminantes siendo

el primero en recibir la acción tóxica del MET. En el caso del cerebro, tiene una respuesta similar a la de las branquias, esto debido a que este compuesto es un inhibidor de la AChE que actúa de manera directa.

El órgano que mejor representa la inhibición de MET es el hígado, esto debido a que éste órgano es el encargado de metabolizar compuestos xenobióticos para eliminarlos del organismo.

En un estudio realizado por Chin Yew y Sudderuddin K. (1979) con alevines de carpa (*Cyprinus Carpio*) el valor de LC₅₀ a las 96 horas de exposición con MET fue de 68 mg/L. Las actividades de las enzimas AChE y CbE de cerebro e hígado fueron monitoreadas durante seis semanas. La CbE del cerebro fue más sensible que la AChE, pero para el hígado sucedió lo contrario. El grado de inhibición enzimática aumentó con el incremento de concentraciones de insecticidas en el agua y el tiempo de exposición.

En este mismo estudio se determinó que luego de 48 horas de exposición a 20 mg/L de MET, las esterasas del hígado se recuperaron más rápido que las esterasas del cerebro. En ambos órganos se recuperó más rápido la CbE que la AChE. Basado en valores de LC₅₀ a las 24 horas, el metamidofos es menos tóxico para las carpas que otros compuestos organofosforados y carbamatos.

Estos reportes explicarían la disminución gradual de la actividad de ChEs en los diferentes órganos, ya que las concentraciones usadas fueron más bajas de las reportadas por Chin Yew y Sudderuddin K. (1979). Sin embargo, existe una diferencia entre las salinidades. Esta diferencia sería explicada en parte por la preferencia de ambientes salinos en los que regularmente se encuentran a los peces.

La falta de resolución en la diferencia entre grupos para MET, puede ser que transcurrido cierto tiempo, la actividad de CbE se recupere, por lo tanto, llega a tener las condiciones iniciales de actividades enzimáticas.

La variación de resultados también puede ser atribuida a que las enzimas de diferentes especies pueden tener sensibilidades opuestas a los dos enantiómeros de metamidofos. Adicionalmente, la toxicidad *in vivo* de los enantiómeros es el resultado de un proceso biológico complejo que puede ser influenciado por otras actividades como transportación, transformación, asimilación, acumulación y metabolismo en el

organismo. La estereoespecificidad de uno o más de estos procesos puede resultar en diferentes cantidades de enantiómeros que alcanzan los sitios activos de las enzimas diana (Kunde, et al., Semtiembre 2006)

La biotoxicidad de OPs quirales es enantioselectiva y solo uno de los enantiómeros contribuyen significativamente a la toxicidad de su mezcla racémica (Bawardi et al., 2007); sin embargo, en el caso de MET aún no existen estudios realizados en cuanto a su enantioselectividad.

El MET es relativamente un anticolinesterásico pobre, pero es altamente tóxico para los animales que mueren por los síntomas colinérgicos típicos de envenenamiento. Además, en su inhibición de la acetilcolinesterasa, no se sabe si el enlace P-O o P-S en el MET se escinde durante el proceso de inhibición (Thompson & Fukuto, 1982).

A pesar de que el uso de Metamidofos está restringido debido a su toxicidad para especies terrestres como es el caso de las aves (LD_{50} 1.78 mg/kg para el mirlo de alas rojas), se reporta que MET es ligeramente tóxico para especies de peces de agua dulce, indicando que existirá un mínimo efecto sobre estas especies (EPA, 1999).

En una comparación entre especies eurihalinas y de agua dulce, las primeras resultaron ser más sensibles a este compuesto como es el caso de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) donde su LC_{50} es de 25000 ug/L (96 h) y para la carpa *Cyprinus carpio*, especie de agua dulce, su LC_{50} es de 68000 ug/L (Bayer, 2007), sin embargo, necesitan de concentraciones muy altas para que MET llegue a ser letal.

En el presente trabajo se obtuvo un porcentaje de inhibición de MET menor al 50% en las actividades de ChEs a diferencia de CPR. Esas diferencias entre plaguicidas OP se pueden deber a sus propiedades físico-químicas, dónde la bioacumulación de MET es casi insignificante para organismos acuáticos (Bayer, 2007), debido a que este compuesto es muy soluble en agua (> 200 g/L) y a que tiene un bajo K_{ow} de 0.16 por lo que la eliminación de este compuesto a través de la orina podría ser alto, mientras que CPR es un compuesto con propiedades lipofílicas tendiendo a acumularse en los organismos acuáticos, además que requiere de un proceso de biotransformación lo cual generaría un gasto energético en el organismo.

Existen varios mecanismos que potencian la toxicidad por salinidad: (1) la salinidad incrementa la absorción y acumulación de xenobióticos; (2) la salinidad altera el destino final de los xenobióticos al inhibir las vías de desintoxicación, mejora las vías de bioactivación o reduce la eliminación; (3) la salinidad incrementa la sensibilidad o susceptibilidad de las moléculas objetivo a los tóxicos (Wang, et al., s.f.).

Lo anterior puede deberse a que las sales neutras ejercen efectos pronunciados sobre la solubilidad de las proteínas que tienen forma globular como las ChEs. A baja concentración, las sales incrementan la solubilidad de muchas proteínas, fenómeno que recibe el nombre “salting in”. Por el contrario, las condiciones hipersalinas alteran la composición iónica del agua haciéndola más ordenada y compresible y el volumen de la cavidad disponible para acomodar solutos orgánicos neutros es reducida. Este cambio en la composición iónica puede dar como resultado el llamado “salting out”.

Uno de los factores que explican este efecto es que la concentración elevada de la sal puede eliminar el agua de hidratación de las moléculas de proteína, reduciendo entonces su solubilidad, por lo cual la salinidad potencia la toxicidad de los plaguicidas OP.

En el presente estudio la actividad enzimática de ChEs presentó mayor actividad que las CbE en los diferentes tejidos. Lo cual concuerda con un estudio realizado por Xing Houjuan et al., (2010) en donde la actividad enzimática de la AChE y la CbE adquirieron diferentes expresiones en cerebro y músculo de la carpa común (*Cyprinus carpio*), presentándose mayor actividad en la AChE que la CbE de ambos órganos.

Los porcentajes de inhibición de CbE para CPR fueron mayores al 80% únicamente para cerebro bajo las condiciones de salinidad de 24 UPS, el resto de órganos tuvieron porcentajes de inhibición menores. Para MET los porcentajes de inhibición fueron menores al 50% en todos los órganos bajo las dos condiciones de salinidad. Sin embargo, al realizar las permutaciones no se obtuvo una diferencia significativa entre salinidades.

La diferencia de porcentajes de inhibición entre ChEs y CbEs puede ser debido a que las CbEs tienen preferencia por ésteres alifáticos, es decir compuestos de cadena abierta, mientras que las ChEs presentan preferencia por sustratos cargados como los ésteres de colina en lugar de ésteres alifáticos (Reis Montella, et al., 2012).

Entre las funciones de la CbE, una de éstas es la de proveer protección ante la acción tóxica de OP (Vanéguas Pérez , et al., 2015), debido a que tienen un papel importante en la desintoxicación y tolerancia a algunos plaguicidas. En la figura 21 se observa que el músculo es el órgano que responde de una manera diferente a los demás órganos, esto podría deberse a que este órgano está involucrado en el rendimiento y resistencia de la natación.

Al presentar las branquias y el cerebro una buena respuesta de la actividad de ChEs y CbE bajo condiciones de diferente salinidad y diferentes tratamientos con plaguicidas, estos órganos pueden ser útiles para determinar la contaminación por OP. Adicionalmente en los órganos osmorreguladores (branquias, riñones y estómago) indican alta actividad de FMO, enzima que está relaciona con la osmorregulación y biotransformación fase I de plaguicidas.

P. velifera es una especie muy tolerante a cambios de salinidades, sin embargo, en el presente trabajo se determinó que es muy sensible a la exposición a OP. Esta sensibilidad también fue encontrada en un estudio por Ucan-Marin et al (2013) en donde se determinó que la LC₅₀ para *P. velifera* con diazinon es de 0.02 mg/L (24 h), mientras que para *P. reticulata* fue de 0.08 mg/L (96 h).

La importancia de trabajar con una especie endémica que se encuentra dentro del listado de especies amenazadas, es que no solo se contribuye al conocimiento de su toxicología, sino que también ayuda a tomar en consideración medidas preventivas para uso de OP ya que se sabe que especies que sean tolerantes a un amplio intervalo de condiciones ambientales pero que sean sensibles a tóxicos son un buen indicador para detectar las primeras etapas del deterioro de un Ecosistema (Espina & Vanegas, 2005).

Por lo tanto, monitorear a esta especie tiene un valor fundamental ya que no sólo alertará sobre la posible contaminación que existe en su hábitat, sino que también ayudará a su conservación y a que la población de la misma se reestablezca. Teniendo en cuenta cómo afecta el factor salinidad en la inhibición de esterasas por OP, el monitoreo de esta especie proporcionará información básica para tomar decisiones de manejo razonables y sustentables en la zona costera de la PY.

En resumen, en este trabajo se determinó que la ChEs predominante en cerebro es una AChE mientras que en branquias, hígado y músculo existe una BChE atípica. Estas actividades enzimáticas no difieren entre sexos en ninguno de los órganos estudiados.

La inhibición de ChEs y CbEs por OP no se vio afectada por las condiciones diferentes de salinidad, pero sí por las concentraciones de plaguicidas OP, siendo más marcada la inhibición de B-esterasas para el CPR debido a que por su estructura químicas se requiere de un proceso de biotransformación a diferencia de MET que es su mecanismo de acción es directo.

En el presente trabajo se observó que existió un mayor porcentaje de inhibición de OP en la salinidad de 8 UPS con respecto a la salinidad de 24 UPS, a pesar de esto, estas variaciones en los porcentajes de inhibición no llegaron a ser significativas.

En el caso de MET, el tiempo de vida media para la degradación de este compuesto a pH alcalino es de 3 días, teniendo en cuenta que las aguas de la PY son duras debido a su tipo de suelo, este plaguicida no tiene un efecto inhibitorio tan fuerte como CPR a las concentraciones trabajadas en este proyecto. Sin embargo, se debe considerar que la toxicidad de los compuestos OP dependerán de la combinación la salinidad y las concentraciones de OP.

CONCLUSIONES:

- La ChE presente en cerebro de *P. velífera* es una AChE. En branquias, hígado y músculo se encontró la presencia de una ChE atípica denominada BChE atípica, no fue posible caracterizarlas en cuanto a su preferencia por sustrato y son sensibles a los inhibidores iso-OMPA y BW284c51.
- Los plaguicidas organofosforados Clorpirifos y Metamidofos inhibieron la actividad de las ChEs y CbEs de manera independiente debido a la estructura química de cada uno y a sus propiedades físico-químicas.
- La toxicidad de los OP en la inhibición de las esterasas es dependiente de la concentración de los mismo, a mayor concentración de OP, mayor inhibición de actividad enzimática.
- El efecto de los OP en las ChEs de *P. velífera* varía en los diferentes órganos. Teniendo una respuesta diferente para cerebro que, para los otros órganos, esto se debe al tipo de ChEs presentes en cada órgano.
- La actividad enzimática de CbEs fue mucho menor que la actividad de ChEs. El órgano que mayor actividad de CbEs presentó es el hígado. El efecto de la salinidad para CbEs fue mucho más marcado para CPR.
- El órgano que mejor indica la variabilidad enzimática de CbEs es el hígado, por lo cual este órgano puede ser utilizado para medir el efecto de OP en la actividad de CbEs.
- La salinidad no influyó en la toxicidad de OP en *P. velivera*, sin embargo, resultó ser muy sensible a la exposición de OP.

BIBLIOGRAFÍA

Amiri, B. M. y otros, December 2017. The effect of chlorpyrifos on salinity acclimation of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*.

Barron, M., Charron, K., William, S. & Duvall, S., 1999. TISSUE CARBOXYLESTERASE ACTIVITY OF RAINBOW TROUT. *Environmental Toxicology and Chemistry*, pp. Vol 18, No11, pp. 2506-2511.

Battershill, J. M., Edwards, P. M. & Johnson, M. K., March 2004. Toxicological assessment of isomeric pesticides: a strategy for testing of chiral organophosphorus (OP) compounds for delayed polyneuropathy in a regulatory setting. *Food and Chemical Toxicology*, pp. 1279-1285.

Bawardi, O., Rimoldi, J. & Schlenk, D., 2007. Impacts of hypersaline water on the biotransformation and toxicity of fenthion on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), striped bass (*Morone saxatilis* X *Morone chrysops*) and tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, pp. 321-327.

Benabent Rubio, M., 2015. *Carboxilesterasas y colinesterasas de cerebro de pollo: interacciones entre sustratos e inhibidores neurotóxicos..* Alicante: Universidad Miguel Hernández.

Bucheli, T. D. & Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology*, pp. 201-268.

Čolović, M. y otros, 2013. Acetylcholinesterase Inhibitors_ Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, pp. 11(3): 315-335.

Costa, L., 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Science Direct*, pp. 1-13.

Emerick, G. L., DeOliveira, G. H., Oliveira Regina V. & Ehrich, M., December 2011. Comparative in vitro study of the inhibition of human and hen esterases by methamidophos enantiomers. *Toxicology*, pp. 145-150.

Espina, S. & Vanegas, C., 2005. Ecotoxicología y Contaminación. En: *Golfo de México. Contaminación e impacto Ambiental*. Ciudad de México: s.n., p. 728.

Esteban Torres, M. d. M., 2014. *Caracterización genética y bioquímica de esterasas de compuestos fenólicos de Lactobacillus plantarum*. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.

FAO, 2012. Operation of the prior informed consent procedure for banned or severely restricted chemicals. *Rotterdam Convention*.

Franklin, M. R., 2007. Phase I Biotransformation Reactions-Esterases, and Amidases. *Elsevier*.

García de la Parra, L. y otros, 2006. Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, pp. 372-380.

Giesy, J. & Solomon, K., 2014. Chlorpyrifos. En: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. s.l.:s.n., p. 282.

Hatfield, J. y otros, 2016. Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chemico-Biological Interactions*.

Hernández Marquez, E., 2017. *Plaguicidas organoclorados en sedimentos y biomarcadores en Gambusia Yucatan*. Sisal-Yucatán: s.n.

Houjuan, X. y otros, March 2010. Effects of atrazine and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and Carboxylesterase in brain and muscle of common carp. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, pp. 26-30.

Iannacone, J., Miglio, M. C. & Alvarino, L., Abril 2007. Environmental risk assessment of the insecticide methamidophos in bioassays with four non-target aquatic organisms. *Research Gate*.

Küçük, S., 2010. The effects of water type on growth, survival and condition of *Poecilia velifera*. *African Journal of Biotechnology*, pp. 9: 760-763.

Kunde, L., Shanshan, Z., Chao, X. & Weiping, L., Septiembre 2006. Enantiomeric Resolution and biotoxicity of Methamidopos. *Agricultural and Food Chemistry*, pp. 8134-8138.

Larsen, B. K. & Schlenk, D., 2001. Effect of Salinity on flavin-containing monooxygenase expression and activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiology*, pp. 421-429.

Lavado, R., Rimoldi, J. M. & Schlenk, D., 2009. Mechanism of fenthion activation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to hypersaline environments. *Toxicology and Applied Pharmacology*, pp. 143-152.

Li, M.-H., January 2008. Effects of nonylphenol on cholinesterase and carboxylesterase activities in male guppies (*Poecilia Reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, pp. 781-786.

Marín-López, V., 2018. *Cracterización bioquímica de Colinesterasas en Gambusia Yucataná y su uso como biomarcador de neurotoxicidad.*, Sisal-Yucatán: s.n.

Martínes-Pereda, J. A., 1996. La perfusión de branquias como modelo de valoración de la calidad de agua y su relación con la producción intensiva de truchas.

Maryoung, L. A., 2014. *Impacts of Hypersaline Acclimation on Chlorpyrifos Toxicity to Salmonids*, California: University of California Riverside.

Mojazi Amiri, B. y otros, 2017. The effect of chlorpyrifos on salinity acclimation of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mukiss*). *Aquatic toxicology*.

Moreno, C. J. V., s.f. Colinesterasas séricas. *Ciencias Médicas*.

Newman, M., 2015. Molecular effects and Biomarkers. En: *Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of Pollution*. s.l.:CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group, p. 193.

Pérez-Herrera, N. y otros, s.f. Efectos reproductivos en agricultores expuestos a plaguicidas en Muna, Yucatán.

Reis Montella, I., Schama, R. & Valle, D., 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, pp. Vol. 107(4): 437-449.

Rendon von Osten, J., 2005. Uso de biomarcadores en sistemas acuáticos. En: *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Campeche: s.n., pp. 121-140.

Rodríguez-Fuentes, G., 2005. *Caracterización de las colinesterasas en diferentes órganos de la tilapia nilótica (Oreochromis niloticus)*. México.

Ross, M., Streit, T., Herring, K. & Xie, S., 2010. Carboxylesterases: dual roles in lipid and pesticide metabolism. *Pesticide Science Society of Japan*, pp. 35(3), 257-264.

Ross, M., Streit, T., Herring, K. & Xie, S., 2010. Carboxylesterases: dual roles in lipid and pesticide metabolism. *Pesticide Science Society of Japan*, pp. 257-264.

Sánchez-Chávez, G. & Salceda, R., 2008. *Enzimas polifuncionales: El caso de la Acetilcolinesterasa*, Ciudad de México: s.n.

Schlenk, D., 2005. Pesticide Biotransformation in fish. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*.

Schlenk, D., Peters, L. & Livingston, D., 1996. Correction of salinity with FMO activity but not Cytochrome P450 activity in the euryhaline fish (*Platichthys flesus*). *Biochemical Pharmacology*, Volumen 52, pp. 815-818.

Schmitter-Soto, J., 2016. *Poecilia velifera*: Topote de aleta grande, Yucatan Molly. En: *Peces de la Península de Yucatán*. s.l.:s.n.

Smegal, D., 2000. Chlorpyrifos. En: *Human Health Risk Assessment*. s.l.:s.n., p. 139.

Sturm, A., da Silva de Assis, H. & Hansen, P., 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, pp. 389-398.

Thompson, C. M. & Fukuto, T. R., 1982. Mechanism of cholinesterase inhibition by Methamidophos. *Agricultural and Food Chemistry*, pp. 282-284.

Thompson, C. M., Prins, J. M. & George, K. M., 2010. Mass Spectrometric Analyses of Organophosphate Insecticide Oxon Protein Adducts. *Environmental Health Perspectives*.

Ucan-Marin, F., Barrientos, R. & Cobos-Gasca, V., 2013. Identification lethal and sub lethal concentrations (LC50) of Organophosphate (OP) pesticide Diazinon using an endemic species. *Journal of Research in Biology*, 3(5), pp. 993-1002.

van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N., 2002. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and Pharmacology* 13, pp. 47-149.

Vanégas Pérez , C. y otros, 2015. Evaluación de la actividad enzimática de esterasas (acetilcolinesterasa y carboxilesterasa) en tejidos de diversos organismos de prueba. En: *Procedimiento para la evaluación bioquímica del efecto tóxico de contaminantes*. Ciudad de México: s.n.

Wang, J., Grisle, S. & Schlenk, D., s.f. Effects of salinity on Aldicarb Toxicity in Juvenile Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Striped Bass (*Morone saxatilis x chrysops*). *Society of Toxicology*.

WHO, 1993. Selection and Validation of Biomarkers. En: *Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles*. s.l.:s.n.

Wu, H. y otros, 2011. Effects of malathion and chlorpyrifos on acetylcholinesterase and antioxidant defense system in *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera: Acrididae). *Chemosphere*, pp. 599-604.

Yung-Che, T. & Pung-Pung, H., 2008. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in a fish. *Elsevier*, pp. 419-429.

Zhang, J., Qiao, C.-L. & Lan, W., 2004. Detoxification of organophosphorus compounds by recombinant carboxylesterase from an Insecticide-Resistant Mosquito and Oxime-Induced amplification of enzyme activity. *Wiley InterScience*.

ANEXOS

I. Permiso de colecta de peces

SEMARNAT SECRETARÍA DEL MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES		SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE Oficio N° SGPA/DGVS/ 010140 /18
Ciudad de México, a 08 de octubre de 2018		
LIC. GUSTAVO RAMÍREZ PÉREZ REPRESENTANTE LEGAL UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO AV COLÓN X62 Y REFORMA No. 503F COLONIA CENTRO MERIDA, YUCATÁN C.P. 97000, MÉXICO Tel: (988) 931 1000, EXT. 7103, e-mail: enorena@yahoo.com		
<p>En atención a la solicitud de Licencia de colecta científica o con propósitos de enseñanza, por proyecto, la cual fue recibida el 03 de abril de 2018, en la Dirección General de Vida Silvestre y se le otorgo la bitácora 31/KS-0157/03/18 y considerando que ha dado cumplimiento a los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestres en territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32 Bis fracciones I, III, XXII, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículo 19 fracción XXV y 32 fracción VI, XVIII, XXI, XXIV del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 26 de noviembre de 2012; 79, 80 fracción I, 82, 83 y 87 párrafo cuarto de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículos 9º. Fracción XII, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre; 12, 123 Fracción IV y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre; Artículo 85, Artículo 88, fracciones I y II, Artículo 105, fracciones II y III del Reglamento la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas (ANP'S); por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional; la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, y el Oficio No. F00.9.DRPYyCM.UTCMR.-626/2018 de fecha 26 de septiembre de 2018, emitido por la Dirección General de Operación Regional de la CONANP, la Dirección General de Vida Silvestre autoriza la licencia de colecta científica o con propósitos de enseñanza en materia de vida silvestre por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico, para desarrollar las siguientes actividades inherentes al proyecto de investigación denominado "Caracterización de las Colinesterasas presentes en diferentes órganos en el pez "Poecilia velífera" y su sensibilidad a plaguicidas organofosforados bajo diferentes salinidades", con el objetivo de caracterizar las ChEs presentes en cabeza, hígado, músculo y branquia del pez Poecilia velífera y su repuesta a la exposición de plaguicidas organofosforados Clorpirifos y Monocrotofos en diferentes salinidades.</p>		
<ul style="list-style-type: none">• Colecta de hasta treinta (30) ejemplares de "Molly de Vela" Poecilia velífera por localidad de colecta, para ser transportados al UNAM en Yucatán sede Sisal.		
<p>Las actividades se llevarán a cabo en las siguientes localidades: Celestún, Sisal y Progreso, estado de Yucatán, dentro de la ANP Península de Yucatán y Caribe Mexicano. La presente autorización tendrá una vigencia de un (01) año.</p>		
<p>Las actividades se realizarán con el aval de la Facultad de Química de la UNAM, con la colaboración de los CC, Elsa Noreña Barroso y Gissela Moreno, el titular y colaboradores deberán sujetarse obligatoriamente a las siguientes condiciones:</p>		
<p>Página 1 de 3 Folclore Nubena: Num. 224. Colonia Anahuac, Delegación Miguel Hidalgo, C.P. 11270, Ciudad de México. Tel: (55) 5490 0900 / 01800 0000 247 www.psbunaf/semarnat</p>		



1.- Cumplir con las disposiciones Administrativas, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes en la materia, sean Federales, Estatales o Municipales, así como con las disposiciones establecidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y su Reglamento en Materia de Áreas Naturales Protegidas y demás disposiciones legales aplicables.

2.- Obligatoriamente y previo al inicio de las actividades de campo en Áreas Naturales Protegidas deberá realizar ante la CONANP el trámite CNANP-00-007, "Aviso para realizar actividades de investigación con colecta o manipulación de ejemplares de flora y fauna silvestre en ANP", deberá contactar al **Biol. Francisco Ricardo Gómez Lozano**, Dirección Regional Península de Yucatán y Caribe Mexicano con domicilio en Calle Venado No. 71, Retorno 8, Supermanzana 20, Manzana 18, C.P. 77500, Cancún, Municipio de Benito Juárez, Quintana Roo, Tel: (998) 887 1997 y 892 1413, e-mail: regiondeyuc@conanp.gob.mx ; y establecer comunicación con el personal de las ANP, para coordinarse y apoyar a la realización de las actividades de campo, presentar su programa de actividades, lista de participantes, indicar la cantidad de ejemplares o muestras que se pretende colectar por sitio, además de indicar la ubicación precisa donde se pretende realizar las actividades de colecta y las fechas en que pretende ingresar, así como especificar el resguardo final de las muestras colectadas durante el proyecto; evitar la manipulación de otras especies u organismos que no se vayan a colectar y remover cualquier organismo que no sea sujeto de la colecta, en el caso de organismos capturados accidentalmente, estos deberán ser liberados en el sitio de captura; también se le asignará el personal del ANP que lo acompañará durante los trabajos de campo y deberá acatar las indicaciones y recomendaciones que le haga dicho personal, al término de su visita y no más de 30 días naturales, deberá enviar informes periódicos e informe final detallado de manera física y electrónica de las actividades realizadas y los resultados obtenidos a la Dirección del ANP, y deberá acatar lo establecido en el programa de manejo y Reglas Administrativas del ANP y a las indicaciones y recomendaciones que realice el personal de la CONANP y del Director o Encargado de la ANP.

3.- La totalidad del material colectado deberá destinarse exclusivamente a los fines específicos del proyecto, objeto de la presente autorización. Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, las muestras y ejemplares serán depositados dentro de la Unidad Académica de Ciencias y Tecnología de la UNAM en Yucatán, asume la responsabilidad de remitir a esta Dirección General, copia de la(s) constancia(s) del(os) depósito(s) debidamente firmado(s), especificando la cantidad del material depositado

4.- En todo momento el investigador será responsable de los impactos significativos que haya sobre las poblaciones de la flora o fauna silvestres y sus hábitats, por lo que deberá considerar el riesgo de perturbación del ecosistema, antes de su ejecución y no llevarlo a cabo si el riesgo es alto.

5.- Previo al inicio de las actividades de campo, deberá enviar obligatoriamente por escrito y utilizando cualquier medio su programa de trabajo a las Delegaciones Federales de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales en el estado de **Yucatán** 01 (999) 942 1307, enviando copia del mismo a la Dirección General de Vida Silvestre. De igual manera, al término de dichas actividades lo notificará a esa Delegación Federal, enviando un reporte detallado por escrito.

6.- Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre, el responsable del proyecto deberá someter a la consideración de la Dirección General de Vida Silvestre, en un plazo no mayor de 30 (TREINTA) días de concluida la vigencia de la presente,



un informe que describa **detalladamente** las actividades realizadas, los resultados obtenidos, la problemática del área trabajada, las potenciales alternativas de solución y -en su oportunidad, la(s) publicación(es) y sobre tiros producto de la investigación.

7.- Queda estrictamente prohibido efectuar cualquier aprovechamiento de las especies de flora y fauna silvestres, cualquiera que sea su estatus, excepto lo aquí autorizado, así como realizar actividades en áreas naturales protegidas de México, sean Estatales o Federales, sin previa autorización.

8.- De acuerdo al Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente al Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, esta autorización no ampara el aprovechamiento de los especímenes colectados para fines comerciales, ni de utilización en biotecnología.

Se recomienda que, durante sus actividades de campo, en el caso de encontrar ejemplares de especies listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, se notifique de ello (la especie, ubicación geográfica y la fecha) a esta Dirección General, en el informe de actividades antes mencionado.

La presente autorización es personal e intransferible y habrá de mostrarse a las Autoridades Federales, Estatales y Municipales cuantas veces lo soliciten.

El incumplimiento de las condiciones aquí establecidas, dará origen a la instauración de un procedimiento administrativo ante la autoridad competente, para proceder a la cancelación de la autorización y a la aplicación de la legislación correspondiente, según sea el caso.

Notifíquese la presente resolución al **LIC. GUSTAVO RAMÍREZ PÉREZ, REPRESENTANTE LEGAL DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**, por alguno de los medios legales previstos por el Artículo 35 y demás relativos y aplicables de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo.

**ATENTAMENTE
EL DIRECTOR GENERAL**

LIC. JOSÉ LUIS PEDRO FUNES IZAGUIRRE

"Por un uso eficiente del papel, las copias de conocimiento de este asunto son remitidas vía electrónica".

C.c.p- C. Joel González Moreno - Director General de Inspección de Vida Silvestre, Recursos Marinos y Ecosistemas Costeros, PROFEPA. - e-mail: vida_silvestre@profepa.gob.mx, jmeja@profepa.gob.mx
C. Jorge Carlos Berlín Montero - Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Yucatán - e-mail: carlos.berlin@yucatan.semarnat.gob.mx
C. José Lafontaine Hamui - Delegado de la PROFEPA en Yucatán - e-mail: jlafontaine@profepa.gob.mx
C. Cinthya Aurora Pérez Tirado - Directora General de Operación Regional de la CONANP - e-mail: cinthya.perez@conanp.gob.mx
C. Amado Ríos Valdez - Coordinador de Asesores de la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental. - e-mail: coordinacion.sgpa@semarnat.gob.mx
Subdirección de Comercio Nacional, Internacional y Otros Aprovechamientos

Archivo General (31/K5-0157/03/18, DGVS-03282/1807, DGVS-02127/1805, DGVS-03912/1808, DGVS-04538/1810)
madian/colectacientifica/Gustavo Ramírez Pérez (pez-CP)SUNIVS(10-09-18)

II. Caracterización de Colinesterasas por sustratos

Soluciones:

- Buffer Tris pH 7.4 con una concentración de 0.05M
Pesar 0.758 g. de Buffer para aforar en 100 ml de agua destilada.
- 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) DTNB/Tris pH 7.4
Pesar 0.758g de Buffer Tris pH7.4 para aforar en 100 ml de agua destilada.
Pesar 0.0099g de DTNB se disuelve con la solución antes aforada.
- Preparar soluciones 10 mM de ASChI, PSChI y BSChI, esta va a ser la concentración final, las soluciones deben ser fresas por lo que se deben preparar el mismo día de análisis.
Pesar 0.5784 g de ASChI, 0.6344 g de BSChI y 0.6064 g de PSChI y aforar a 10 ml. A partir de la solución madre preparar disoluciones de 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 mM.

Procedimiento:

- a) Colocar 10 μ l de muestra (homogeneizado de cerebro, branquias, hígado y músculo) en placas de 96 pozos, cada muestra irá por triplicado
- b) Colocar 180 μ l de de DNTB/Tris.
- c) Colocar 10 μ L de los diferentes sustratos de manera ascendente
- d) Leer en el lector de placas a 405 nm, 9 lecturas cada 15 segundos en el módulo cinética.

III. Determinación de proteína por el método de Bradford, 1976 adaptado a microplaca de 96 pocillos.

Utilizar un estándar de proteína *Sigma* (2mg proteína/ml)

Preparación de curva tipo

Pipetear 10 μ l de cada uno de los puntos de la curva tipo como se indica a continuación. Enseguida en pozos diferentes pipetear 2 μ l de muestra por triplicado, agregar 8 μ l de agua destilada a los pozos con muestra. Agregar en todos los pozos 190 μ l de reactivo de Bradford, después se coloca la placa en el agitador por 10 minutos a temperatura ambiente, leer la absorbancia a punto final a 595 nm en un lector de placas.

La curva tipo puede conservarse durante 3 meses a 4 °C.

Preparación de la curva tipo:

A \rightarrow serum

B \rightarrow 100 μ L A + 100 μ l dH₂O (AGITAR)

C \rightarrow 100 μ L B + 100 μ l dH₂O (AGITAR)

D \rightarrow 100 μ L C + 100 μ l dH₂O (AGITAR)

E \rightarrow 100 μ L D + 100 μ l dH₂O (AGITAR)

F \rightarrow 100 μ L E + 100 μ l dH₂O (AGITAR)

G \rightarrow 100 μ L F + 100 μ l dH₂O (AGITAR)

H \rightarrow BLANCO

Análisis de datos

Restar la absorbancia del punto H de la curva tipo a todas las muestras y estándares, siendo esta la absorbancia corregida, después graficar en el eje de las Y la concentración de la muestra en mg/ml y en el eje X la absorbancia corregida. Obtener la ecuación de la curva de ajuste utilizando como modelo un polinomio grado dos, enseguida calcular la concentración de proteína utilizando la absorbancia corregida y la curva de ajuste obtenida anteriormente. Finalmente calcular el contenido de proteína real multiplicando por el factor de dilución, para este caso es de 5.

IV. Caracterización de colinesterasas por inhibidores

Soluciones:

- Sustratos ASChI, y BSChI 1mM (preparados el mismo día)
Disolver 0.0578 g de ASChI y aforar a 10 ml.
Disolver 0.06344 de BSChI y aforar a 10 ml.
- Inhibidores Iso-Ompa, BW2c54 y metil sulfato de neogstigma, con sus correspondientes diluciones

Procedimiento:

- a) Colocar 5 μ l de muestra (homogeneizado de cerebro, branquias, hígado y músculo) en placas de 96 pozos, cada muestra irá por triplicado.
- b) Colocar 180 μ l de de DNTB/Tris.
- c) Colocar 5 μ l de inhibidor, incubar las placas por media hora.
- d) Colocar los sustratos 10 μ l ASChI y BSChI.
- e) Leer en el lector de placas a 405 nm, 20 lecturas cada 15 segundos en el módulo cinética.

V. Determinación de carboxilesterasa (CbE) (basado en Mastropaolo &Yournno, 1981)

Soluciones

- Sustrato esterasa 4-Nitrofenil acetato (pNPA)
Pesar 0.018g de pNPA y disolver en 1 ml de metanol
- Buffer triz 7.4/ pNPA
Pesar 0.758g de Buffer Tris pH7.4 para aforar en 100 ml de agua destilada.
Disolver 250 µl de pNPA en 50 ml del buffer triz 7.4, al mezclarlos se observa un color amarillo pálido, al paso de unos minutos el color del reactivo se intensifica.

Procedimiento:

Colocar 10 µl de cada muestra por triplicado, más un blanco con 10 µl de agua destilada por triplicado. Agregar 190 µl de la solución buffer triz 7.4/ pNPA en cada pozo. Leer la absorbancia en un lector de placas a 405 nm cada 15 segundos por 5 minutos, en el módulo de cinética.