

6
2eje



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**



V N A M

**“EFECTO DEL PLOMO SOBRE EL METABOLISMO
DEL P-NITRO ANIZOL EN EL TUBIFICIDO
(Limnodrilus hoffmeisteri)”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

MARIA ALEJANDRA CARDENAS ANGULO

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LAURA MARTINEZ TABCHE

COASESORA : Q. F. I. LETICIA ZUÑIGA RAMIREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.B. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: "Efecto del plomo sobre el metabolismo del p - Nitro anizol en el tnbificido (Limondrilus hoffmeisteri)".

que presenta la pasante María Alejandra Cárdenas Angulo
con número de cuenta: 8754144-1 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Biológica

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 24 de Febrero de 1994

PRESIDENTE	<u>H.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.I. Leticia Zúñiga Ruiz</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Ma. Esther Rovnelta Miranda</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.B. Virginia Olivá Arellano</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Sofía González Gallardo</u>	

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A la Dra. Laura Martínez Tabche, con reconocimiento especial a su ayuda incondicional para la realización de este trabajo.

A la E. N. C. B. por permitirme llevar a cabo esta investigación.

A la U. N. A. M. por brindarme la oportunidad de una superación académica y a todos aquellos maestros que contribuyeron a mi formación profesional: José Proal, Anita Velazquez, René Miranda, Enrique Angeles, Alvaro Leo, Francisco Montiel, Ma. Esther Revuelta, Francisco López, Maricela Noe, Santa Quiroz, Gerardo Cruz, Leticia Zúñiga, Vicente Alonso, Cristina Reyes, Beatriz Ramírez, David Quintanar, Fernando Alvarez, Rodolfo Cruz...

Gracias

A mis hermanas Adriana y Andrea por el tiempo que hemos compartido juntas y con un cariño especial a Hebraicaz Vázquez por su apoyo incondicional.

A mis amigos por estar conmigo en las buenas y en las malas: Tere y Gustavo, Italo y Fam. Menconi, Karim, Briseida, Gerardo, Carlos, David, Ray, Rodolfo, Julia...

Y a todas aquellas personas que contribuyeron de alguna manera a mi superación.

ALEJANDRA

En memoria de mi abuela Concepción Villa como homenaje a tu fortaleza, tus sacrificios y confianza permanente, al tiempo que compartimos juntas y en agradecimiento a tu invaluable apoyo, con admiración y respeto.

TE AMO

ALEJANDRA

INDICE

	Página
1. LISTA DE ABREVIATURAS	1
2. INTRODUCCION	2
2.1. CLASIFICACION DE LOS CONTAMINANTES	5
3. OBJETIVOS	12
3.1. OBJETIVO GENERAL	12
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	12
4. GENERALIDADES	13
4.1 OLIGOQUETOS	13
4.1.1. Clasificación taxonómica	14
4.1.2. Anatomía externa	15
4.1.3. Pared corporal y celoma	17
4.1.4. Locomoción	17
4.1.5. Nutrición	18
4.1.6. Intercambio de gases	23
4.1.7. Circulación	24
4.1.8. Excreción	25
4.1.9. Tejido cloragógeno	26
4.1.10. Sistema nervioso	26
4.1.11. Organos de los sentidos	29
4.1.12. Reproducción y desarrollo	30

4.1.13. Ecología y distribución	36
4.2. METABOLISMO	38
4.2.1. Cinética enzimática	39
4.2.2. Inhibición de la actividad enzimática	40
4.3. PLOMO	46
4.3.1. Toxicidad en humanos	48
4.3.2. Toxicidad crónica	49
4.3.3. Toxocinética	50
4.3.4. Toxodinamia	54
4.3.5. Efectos producidos en sistemas específicos	54
4.3.6. Carcinogenicidad y teratogenicidad	58
4.3.7. Tratamiento	59
4.4. p - NITRO ANIZOL	59
4.5. p - NITRO FENOL	60
5. MATERIAL Y METODOS	62
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO	62
5.2. MATERIAL QUÍMICO	62
5.3. EQUIPO DE LABORATORIO	63
5.4. ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO	63
5.5. CULTIVO DEL TUBIFICIDO	64
5.6. TRATAMIENTOS	64

5.7.	CUANTIFICACION DE PROTEINAS	65
5.8.	EFECTO DEL PLOMO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS OXIDASAS DE FUNCION MIXTA (F M O) EN <i>L. Hoffmeisteri</i>	65
5.9.	TRATAMIENTO ESTADISTICO	66
6.	RESULTADOS	67
6.1.	BIOTRANSFORMACION DEL p - NITRO ANIZOL EN <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	67
6.2.	EFECTO DEL PLOMO SOBRE LA CINETICA DE BIOTRANSFORMACION DEL p - NITRO ANIZOL	72
7.	DISCUSION	79
8.	CONCLUSIONES	85
9.	RESUMEN	87
10.	REFERENCIAS	89

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		Página
A - 1	Clasificación de los contaminantes químicos	6
B - 1	Fotografía de microscopio de <i>L. hoffmeisteri</i>	13
B - 2	Superficie anteroventral de la lombriz	16
B - 3	Vista dorsal de las estructuras internas anteriores de dos oloquetos	21
B - 4	Vista lateral de sistema nervioso	27
B - 5	Sistema reproductor	31
B - 6	Segmentos reproductores	33
B - 7	Copulación	35
C - 1	Sistema microsomal Función mixta oxidasa	45
D - 1	Modelo del metabolismo del plomo en el humano	53
D - 2	Reacción de O - desmetilación llevada a cabo	61
E - 1	Biotransformación del PNA en <i>L. hoffmeisteri</i> (lotes control)	69
E - 2	Metabolismo del PNA en <i>L. hoffmeisteri</i>	70
E - 3	Efecto del plomo sobre el metabolismo del PNA en <i>L. hoffmeisteri</i>	71
E - 4	Efecto del plomo sobre la Km del metabolismo del PNA en <i>L. hoffmeisteri</i>	75
E - 5	Efecto del plomo sobre la V _{max} . del metabolismo del PNA en <i>L. hoffmeisteri</i>	76
E - 6	Porcentaje de inhibición producida por el plomo sobre el metabolismo del PNA en <i>L. hoffmeisteri</i>	78

INDICE DE TABLAS

TABLA		Página
1	Efecto del plomo sobre el metabolismo del PNA en <i>L. hoffmeisteri</i> (in vitro)	68
2	Efecto del plomo sobre la cinética de biotransformación del PNA	74
3	Porciento de inhibición de la Función Mixta Oxidasa	77

LISTA
DE
ABREVIATURAS

1.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA - D - Acido delta amino levulinico deshidratasa

Actividad = nmoles/mg proteina/g tejido/minuto

DL₅₀ - Dosis letal 50

E - Enzima

ENCB - Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

EI - Complejo enzima - inhibidor

ES - Complejo enzima - sustrato

ESI - Complejo enzima - sustrato - inhibidor

FMO - Función mixta de oxidación

I - Inhibidor

K_i - Constante de inhibición

K_M - Constante de Michaelis - Menten

LTB - Limite de tolerancia biológica

NADPH - Nicotin adenin difosfo nucleótico

PNA - Para nitro anizol

PNF - Para nitro fenol

S - Sustrato

SNC - Sistema nervioso central

V_{max.} - Velocidad máxima

X - xenobiótico

INTRODUCCION

Debido al aumento en el proceso de industrialización tanto en países desarrollados como en aquellos que se encuentran en una fase de desarrollo, los problemas ecológicos y toxicológicos se han visto incrementados [14 y 15]. La contaminación en países como México, es un problema que aunado a factores como son; la explosión demográfica, la falta de planeación en el uso del suelo de las grandes urbes, el elevado nivel de contaminación producido por las industrias y el gran número de medios de transporte, está alcanzando proporciones desastrosas. Esto ha llegado a afectar gravemente los tres principales vectores de la naturaleza: agua, aire y suelo [93].

La biósfera está constituida por agua en un 70 %, se ha calculado que la mayor cantidad de esta se encuentra en los océanos, siendo aproximadamente el 97.2 %. El agua dulce ocupa el 2.8 % del total y gran parte de este porcentaje se encuentra en los casquetes polares y en las nieves eternas de las montañas; así, el agua disponible en el mundo se reduce al reciclaje de poco menos del 1.0 % del agua total del planeta. El volumen de agua natural que conducen anualmente los ríos, también llamado escurrimiento virgen; es del orden de 13,002 metros cúbicos por segundo.

Los usos que la humanidad ha dado al agua, el gran solvente universal, son múltiples: como medio de transporte, base

alimenticia, riego, aseo en general, como fuente precursora de energía y para fines recreativos. En base a lo anterior, se hace necesaria la obtención de agua de óptima calidad, dependiendo del uso al cual sea destinada. Desafortunadamente el hombre ha abusado del agua del planeta utilizándola como vehículo del material de desecho en tal forma que sus actividades particularmente en los últimos tiempos, han ido degradando paulatinamente los diversos mantos acuíferos [60].

El agua, al igual que el aire, se transforma en una fuente de contaminación para la flora y la fauna acuática, así como para el hombre en la medida que sea contaminada por actividades antropogénicas. En algunas regiones los niveles de contaminación son muy variables e incluso pueden elevarse mucho, con respecto al límite permisible (6 $\mu\text{g/L}$. para aguas costeras [92]), se han encontrado niveles de hasta 100 $\mu\text{g/L}$. Las concentraciones de plomo en agua potable también han variado, se han verificado niveles desde 3.7 hasta 139 $\mu\text{g/L}$, sobrepasando en ocasiones el límite máximo permisible de 50 $\mu\text{g/L}$ establecidas por la OMS [68].

La contaminación de los ecosistemas acuáticos causa un gran impacto sobre las comunidades que los habitan, ya que prácticamente todas las cosechas generadas por las actividades humanas llegan directa o indirectamente a sus habitantes. Por tal motivo, los contaminantes ejercen su efecto nocivo sobre los seres vivos; de esta forma se ven afectadas la reproducción, crecimiento y sobrevivencia de las diferentes especies acuáticas.

Se ha demostrado que la introducción de contaminantes en las fuentes acuíferas está relacionada con la lluvia, la naturaleza geológica de la cuenca colectora o del manto acuifero y las actividades de la naturaleza y la población humana [44].

Para proteger la vida acuática de este grave daño, es necesario adoptar actitudes responsables y tomar medidas efectivas basadas en tecnologías resultantes de la investigación, como por ejemplo: implementar programas de monitoreo para evaluar periódicamente el grado de contaminación y de esta manera impedir o limitar el ingreso de sustancias tóxicas a los mantos acuiferos, o en su caso contrarrestar el efecto de dichas sustancias; para lo cual es importante analizar los cambios producidos por los contaminantes sobre el ecosistema, ya que no es posible basar un diagnóstico ambiental, considerando exclusivamente características físicas, químicas y biológicas del agua [55 y 92], las cuales definen un ambiente adecuado para los organismos acuáticos, además del estado fisiológico y nutricional en que se encuentren [60]. Entre las condiciones físicas están: la presión, presión osmótica, luz, turbidez, dureza, temperatura, entre otros; Cairns, et al., (1975), señala que existe una relación compleja entre la temperatura y los compuestos tóxicos, ya que a altas temperaturas disminuye o aumenta la toxicidad de algunos de ellos, debido a que reducen los procesos de excreción y detoxificación [20 y 82], además de aumentar la solubilidad de las sustancias y acelerar reacciones químicas que se llevan a cabo en el agua [70]. Entre las condiciones químicas se encuentran la dureza [2], salinidad, oxígeno disuelto, entre otras [30] y el pH, el cual juega un

papel muy importante [88]; en las aguas naturales este valor se encuentra entre 6 y 8, ya que poseen un efecto propio de tamponeo (buffer), este equilibrio entre el entorno acuático, la atmósfera y la litósfera podría desaparecer gracias a la descarga sin control de desechos industriales. En el caso de organismos acuáticos se ha observado que un pH bajo inhibe su actividad enzimática [44].

2.1. CLASIFICACION DE LOS CONTAMINANTES ACUATICOS.

De acuerdo a sus características y naturaleza, los contaminantes vertidos al agua se clasifican de la siguiente manera [63 y 94].

- 1.- Compuestos químicos orgánicos e inorgánicos. Son los más abundantes y de mayor importancia. Una clasificación adicional de estos contaminantes se presenta en la fig. A - 1.
- 2.- Compuestos con actividad genotóxica. Incluye algunos compuestos de origen industrial como: hidrocarburos y pesticidas con propiedades mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas.
- 3.- Microorganismos patógenos. Incluye virus, bacterias y parásitos relacionados con la contaminación fecal y causantes de enfermedades.

4.- Compuestos radiactivos. Incluye a todos los radioisótopos sintéticos. Tienen su origen en actividades como la minería y refinación de petróleo. Poseen propiedades tóxicas y mutagénicas.

5.- Efluentes térmicos. Son el resultado del uso de agua en sistemas de enfriamiento, como es el caso de termoeléctricas.

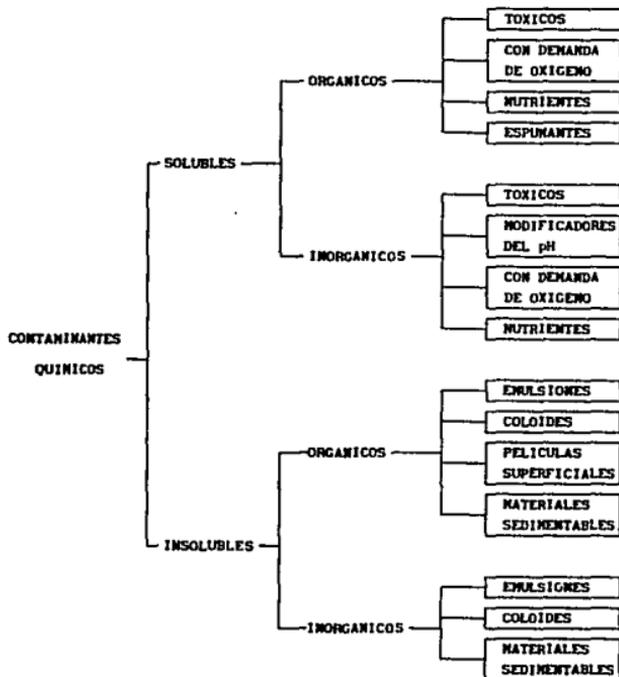


FIG. A - 1. CLASIFICACION DE LOS CONTAMINANTES QUINICOS.
 (MODIFICACION DE WALDICHUCK) [44 y 62]

Estos contaminantes pueden estar disueltos o suspendidos en el agua así como en los sedimentos, de tal manera que pueden dañar a la vida acuática en forma directa o indirecta ocasionando que el crecimiento y reproducción de estos se vea seriamente afectada.

Los diversos bioensayos que se pueden realizar principalmente para determinar la toxicidad de compuestos químicos sobre los organismos acuáticos que se presentan en los diferentes niveles tróficos¹, permiten tener una estimación de la toxicidad en los ecosistemas naturales o en aquellos modificados por el hombre. Para estos ensayos se han utilizado diversos tipos de organismos como indicadores: bacterias, algas, invertebrados bentónicos (como larvas de quironómidos) [7], oligoquetos acuáticos [25 y 95] y peces [71].

Los organismos bentónicos están expuestos a contaminantes por el agua que los rodea, por la ingestión de sedimento, de partículas suspendidas y por el alimento. Los isópodos, caracoles, larvas de insectos y los oligoquetos, almacenan grandes cantidades de metales pesados, plaguicidas e hidrocarburos [77], pasando posteriormente a peces o aves acuáticas, las cuales a su vez, son consumidas por el hombre como alimento [80].

¹ Una cadena trófica es una secuencia coordinada de organismos, en la que unos comen a (o comen de) los otros antes de ser comidos a su vez, donde los productores representan el punto inicial de la cadena (30); por ejemplo, los organismos más grandes emplean algas y bacterias como alimento, y a su vez se convierten en alimento de formas superiores de vida [44].

Se han realizado estudios en los que se demuestra que estos organismos además de bioconcentrar los diferentes contaminantes liposolubles, pueden ser dañados gravemente.

Es importante mencionar que muchos contaminantes se bioconcentran a lo largo de la cadena alimenticia, ya que aún cuando los organismos primarios son expuestos a concentraciones muy bajas de xenobióticos, estos se encuentran en concentraciones elevadas en los niveles más altos de las cadenas tróficas [80]. La facultad de concentrar contaminantes, varía entre las especies y esto puede afectar a los que se encuentran en un nivel más alto de la cadena, ya que la ingestión de partículas en suspensión o alimentos contaminados depende de los hábitos alimenticios de cada uno de los hidrobiontes [77].

Sin embargo, existe poca información acerca de los efectos bioquímicos que pueden generar los diferentes contaminantes en los distintos niveles tróficos, como resultado de la bioconcentración que se lleva a cabo en cada uno de ellos [83 y 86].

Los efectos tóxicos de los contaminantes químicos, dependen de su biodisponibilidad y persistencia, de la capacidad de los organismos para acumularlos o eliminarlos y de la interferencia de tales compuestos con procesos bioquímicos, fisiológicos y/o ecológicos específicos [22].

De acuerdo al tipo de efecto producido por los compuestos tóxicos, estos pueden ser de acción local o sistémica, los cuales

involucran la interacción del tóxico con enzimas, membranas protoplasmáticas, entre otros, dando como resultado que una misma sustancia actúe de diferentes formas, dependiendo principalmente de la concentración y del tiempo de exposición [63].

Otro aspecto de importancia toxicológica, es la formación de sustancias más activas en dichos reservorios, debido a que los xenobióticos² sufren biotransformaciones que pueden llevarse a cabo con los organismos presentes, lo cual puede dar como resultado que el contaminante se active o desactive, y por consiguiente su vida media se altere, modificando la respuesta tóxica que produciría un contaminante en la vida acuática.

El *Limnodrilus hoffmeisteri*, lombriz acuática es un organismo bentónico ampliamente distribuido, se encuentran grandes cantidades en sustratos enriquecidos por materia orgánica biodegradable, como es el caso de la basura [51] y metales pesados [77]. Sin embargo, a pesar de su distribución cosmopolita, de su importancia económica y ecológica desde el punto de vista de contaminación [51], pocos estudios toxicológicos se han realizado sobre esta especie [45], a pesar de ser organismos muy tolerantes a diferentes contaminantes [51] principalmente al plomo y zinc, (en cuanto a metales pesados se refiere) [45 y 77], probablemente porque formen un complejo con una metaloproteína del cuerpo de la lombriz.

² Un xenobiotico es toda sustancia ajena al ser vivo, incluyendo agentes benignos, dañinos o inactivos, excepto vitaminas y hormonas, que normalmente son sustancias endogenas [53].

En los efluentes orgánicos que reciben los lagos y ríos existe una alta densidad de tubificidos, probablemente porque eliminan a los depredadores de los mismos o a causa de que en estos organismos se estimula su sistema de detoxificación; sin embargo se ha presentado una disminución de la especie, pero hasta el momento no existen investigaciones al respecto para explicar dicho fenómeno.

Los principales contaminantes son los metales pesados, hidrocarburos y compuestos orgánicos, encontrándose en este grupo los plaguicidas [62], los cuales son utilizados por algunos organismos acuáticos como macro y micronutrientes para su crecimiento [60].

Los contaminantes interactúan física, química y biológicamente con los ecosistemas, produciendo modificaciones en ambos sentidos [61]. Algunos de ellos, en cantidades reducidas tienen efectos bioestimuladores que se traducen en incrementos de la productividad de los ecosistemas, sin embargo, la mayoría de estos xenobióticos tienen con frecuencia efectos nocivos aun en pequeñas concentraciones, tal es el caso de pesticidas, hidrocarburos, compuestos radiactivos [60] y metales pesados como el plomo, ya que puede ser absorbido por los niveles tróficos inferiores y pasar consecutivamente a los niveles superiores, el cual produce respuestas tóxicas biomagnificadas³ [94].

Los problemas toxicológicos son muy diversos, pero los más

graves y que requieren mayor atención y estudio son: la biomagnificación³, la bioacumulación⁴ y por consiguiente el incremento de la respuesta tóxica producida por los diferentes contaminantes y sus mezclas en hidrobiontes y por lo tanto en el hombre (17). La bioacumulación depende de varios factores: la persistencia y estabilidad del compuesto, su biodisponibilidad, su potencial de concentración, su metabolismo y las diferentes afinidades de los tejidos a acumularlo (72). Estos procesos que se llevan a cabo con diferentes contaminantes e hidrobiontes, pueden dar como resultado que las concentraciones se incrementen, lo que alcanza cantidades que representan un peligro no sólo para el que las consume, sino también causar la extinción de algunas especies, sobrepoblación de otras y en general, un daño sobre los ecosistemas acuáticos [17].

³ Biomagnificación es el proceso total de la bioacumulación en el cual los residuos tóxicos presentes en los tejidos se incrementan al pasar el material a través de dos o más niveles tróficos.

⁴ La bioacumulación es el incremento en la concentración de xenobioticos en un organismo a través del contacto constante con el medio contaminado así como de la ingestión de agua y alimentos contaminados [17].

OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

demostrar que el *Limnodrilus hoffmeisteri* presenta el sistema de biotransformación de xenobióticos, el cual permitirá determinar si es posible utilizarlo como detoxificante natural de mantos acuíferos, ya que directa o indirectamente el hombre se ve afectado por la contaminación de estos.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

demostrar que el tubificido (*Limnodrilus hoffmeisteri*) contiene el sistema de detoxificación Función Mixta Oxidasa (FMO).

Determinar como afecta el plomo al sistema función mixta oxidasa del tubificido.

Establecer los parámetros de la cinética enzimática del sistema función mixta oxidasa (V_{max} , K_M), en el tubificido, así como el tipo de inhibición que lleva a cabo el plomo.

GENERALIDADES

Comunmente se conocen con el nombre de " gusano tubifex " o " gusano de lodo o sedimento " [80], se distribuyen ampliamente en el mundo [51], son utilizados como alimento de peces [59 y 80], camarones y ranas [59]. Estos invertebrados acuáticos son fácilmente identificados observando las características abajo descritas al microscopio [80], (fig. B - 1).

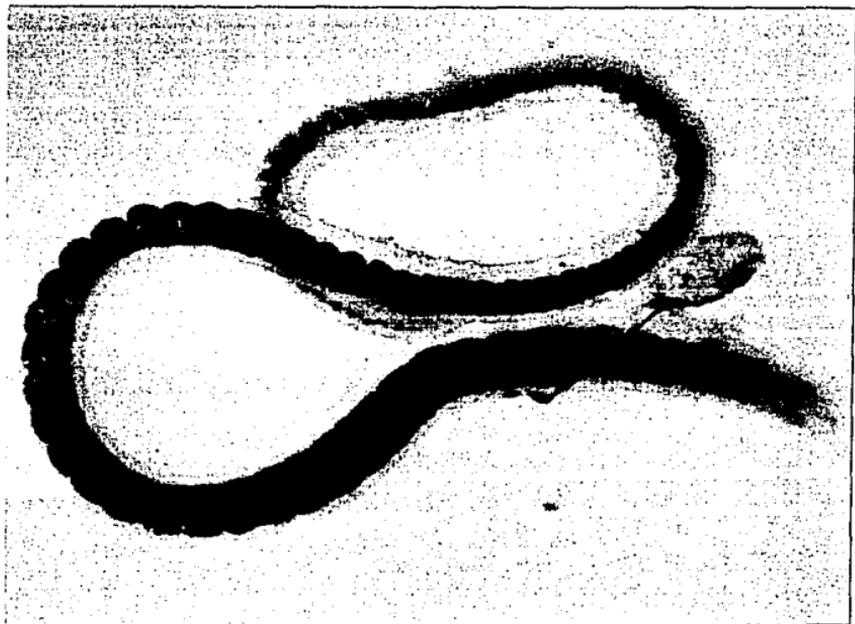


FIG. B - 1. FOTOGRAFIA DE MICROSCOPIO DE L. HOFFMEISTERI.

4.1.1. CLASIFICACION TAXONOMICA.

Orden: Lumbriculida. Cuatro cerdas por segmento. Al menos un par de embudos masculinos en el mismo segmento que los gonoporos masculinos. Clitelo del grueso de una célula, incluyendo gonoporos masculino y femenino. Una sola familia de oligoquetos de agua dulce, la Lumbriculidae, *Lumbriculus* [12].

Suborden: Tubificina. Poseen cerdas numerosas. Un par de testículos y ovarios, y gonoporos masculinos en el segmento inmediatamente después del segmento testicular. Clitelo del grueso de una célula [12].

Familia: Tubificidae. Gusanos acuáticos muy pequeños [12], segmentados [80], algunos con una probóscide alargada [12], que van de 2 mm de largo hasta 18 cm cuando han madurado [80].

Suborden: Lumbricina. Ocho cerdas por segmento. Poros masculinos al menos dos segmentos detrás de aquellos que contienen los dos pares de testículos. Este suborden contiene tres familias de lombrices que comprenden también algunos habitantes de agua dulce y tierras pantanosas [12].

Phylum: Anelida. Gusano segmentado: sanguijuela, lombriz de tierra, especies marinas y de agua dulce. El PHYLUM contiene 8700 especies, que se clasifican en: *Polychaeta*, *Oligochaeta* e *Hirudina*.

Especie: Oligochaeta. En esta especie se encuentran los anélidos dulceacuicolas y lombrices terrestres, ascendiendo a un total de 3100 especies de oligoquetos [80], entre las cuales se encuentra el *Limnodrilus hoffmeisteri*, objeto de este estudio.

4.1.2. ANATOMIA EXTERNA.

Es posible que los oligoquetos provinieran directamente de los anélidos marinos ancestrales. El metamerismo está muy desarrollado y el prostomio suele ser un pequeño lóbulo redondeado o un pequeño cono, sin apéndices sensoriales (fig. B - 2), que puede alargarse en forma de hocico o trompa. Poseen cerdas en forma de S, que pueden ser largas o cortas, gruesas o delgadas como alfiler, derechas o curvadas y romanas, puntiagudas, ahorquilladas, pectinadas o plumosas y son características de las especies nadadoras acuáticas. De cada lado de un segmento hay sacos sedales, en los que se secretan las cerdas y de los que estas emergen en grupos o haces; el número de cerdas por haz varía de una a veinticinco; su número es menor que en los poliquetos, de aquí el origen del nombre Oligochaeta, que quiere decir " pocas cerdas " [12].

En oligoquetos maduros, algunos segmentos adyacentes están engrosados y aumentados de volumen por glándulas que secretan moco para la copulación y también el capullo. La zona glandular de estos segmentos recibe el nombre de clitelo, (fig B - 2), cuya

posición en el tronco es variable, pero siempre localizada en la mitad anterior del verme [12].

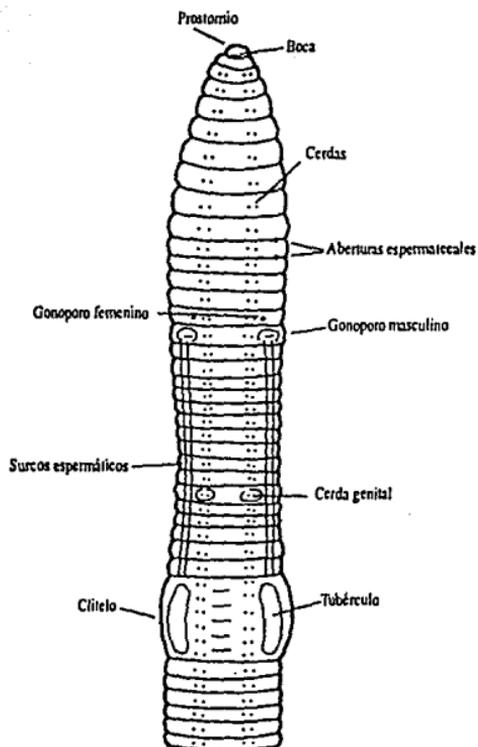


FIG. B - 2. SUPERFICIE ANTEROVENTRAL DE LA LOMBRIZ.

Las especies acuáticas son pequeñas y frágiles, algunos de ellas tienen ojos generalmente de color rojo, aunque puede haber de color oscuro [16].

4.1.3. PARED CORPORAL Y CELOMA.

El celoma está dividido en tabiques transversales, compuesto cada uno por una capa doble de peritoneo, el cual presenta una perforación provista de un esfínter donde pasa el cordón nervioso ventral que controla el flujo del líquido celómico de un segmento a otro [12].

La pared corporal es una capa de epitelio cilíndrico, cubierta por una delgada cutícula, debajo del epitelio se encuentra una capa de tejido conectivo, otra de fibra muscular circular, otra de fibra longitudinal y una de peritoneo, las cuales ayudan a regular la presión del líquido celómico durante la contracción muscular [12].

4.1.4. LOCOMOCION.

Su locomoción es ciliar sobre el prostomio y el extraordinario Opistocystidae [16]. El movimiento tiene lugar por contracciones peristálticas. La contracción de la musculatura circular y el alargamiento consiguiente de los segmentos son muy importantes en el reptar y producen siempre una pulsación de presión del líquido celómico. La contracción de la musculatura longitudinal es más importante en el amadrigamiento, y ensancha la madriguera o ancla los segmentos en la pared de esta [12].

Las cerdas se extienden durante la contracción longitudinal y se retraen durante la contracción circular. Cada segmento se mueve hacia adelante en pasos de dos a tres centímetros a la velocidad de siete a diez pasos por minuto. Un modo ondulatorio de progresión es característico de unos cuantos gusanos que pueden nadar [12].

4.1.5. NUTRICION.

Los oligoquetos son organismos saprófitos* [55 Y 51], se alimentan de materia orgánica muerta [12] biodegradable [51]; pero en especial microflora obtenida del sedimento [80], de vegetales, de materia en descomposición, incluso pueden arrastrar cosas hacia la madriguera [12]; algas y microorganismos constituyen su principal fuente de alimento [12 y 16]. Estos microorganismos actúan como intermediarios para la transferencia de metales pesados de efluentes líquidos a depósitos alimenticios (ya que almacenan los metales que se encuentran en el medio), constituyendo una valiosa fuente de alimento para el tubífido [77]. En general, la cantidad y calidad de materia orgánica obtenida en el sedimento juega un papel dominante, el cual es determinado por las especies tubífidas [16]. Se han realizado estudios, los cuales demuestran que los oligoquetos tienen la

* Organismos que se alimentan de materia en descomposición.

capacidad de producir las enzimas catalasa y quitinasa (enzimas para digerir polisacáridos) [57]. Para alimentarse, el animal saca del tubo el extremo anterior del cuerpo y mueve las cerdas en diversas direcciones en el agua. Los detritus acumulados en las cerdas son depositados periodicamente en la boca del animal; son rapaces y cazan ambas, ciliados, rotíferos y larvas de tremátodo mediante actividad succionante de su faringe [12].

A) **Faringe.** Al ingerir alimento, la faringe entra en eversión y el disco muscular se aplica a la superficie de las partículas alimenticias como una copa de aspiración . El moco que cubre el disco, hace que las partículas se adhieran a su superficie, y entonces la faringe se retrae experimentando una serie de contracciones que bombean el alimento hacia la boca. Las glándulas faríngeas producen una secreción salival que contiene moco y una proteasa [12].

B) **Esófago.** La faringe desemboca en un esófago tubular estrecho que forma un estómago como de dos a diez buches que actúan como cámara de almacenamiento o una molleja que utiliza el animal para triturar las partículas alimenticias. En las especies acuáticas, el esófago se dilata en su parte posterior para formar un estómago. Sin embargo, la función del estómago es dudosa, ya que, histológicamente es muy parecido al intestino [12].

C) **Glándulas calcíferas.** Un rasgo característico del esófago de los oligoquetos es la presencia de glándulas calcíferas situadas en invaginaciones especiales de la pared esofágica (fig. B - 3a y B - 3b). La región glandular se separa completamente de la luz del esófago y puede aparecer externamente como inchazones laterales o dorsales, conservando los orificios de comunicación con la luz del esófago para permitir el paso de los productos glandulares. Las glándulas calcíferas son órganos más bien excretorios que digestivos y funcionan para liberar el cuerpo del exceso de calcio absorbido con el alimento y para mantener un pH constante en la sangre y el líquido celómico, controlando los niveles de calcio y de iones carbonato. Cuando el nivel de CO_2 en sangre se hace excesivo (con una baja consiguiente del pH) el ión carbonato se liga al calcio en las glándulas calcíferas y es excretado en el esófago en forma de calcita que no es absorbida durante su tránsito intestinal [12].

D) **Intestino.** Es la porción restante del aparato digestivo, se extiende como un tubo recto por toda la longitud del cuerpo; es la sede principal de la digestión y absorción, y su epitelio consta de células secretorias y absorbentes. Los alimentos absorbidos pasan a los senos sanguíneos que se encuentran entre el epitelio mucoso y los músculos intestinales [12].

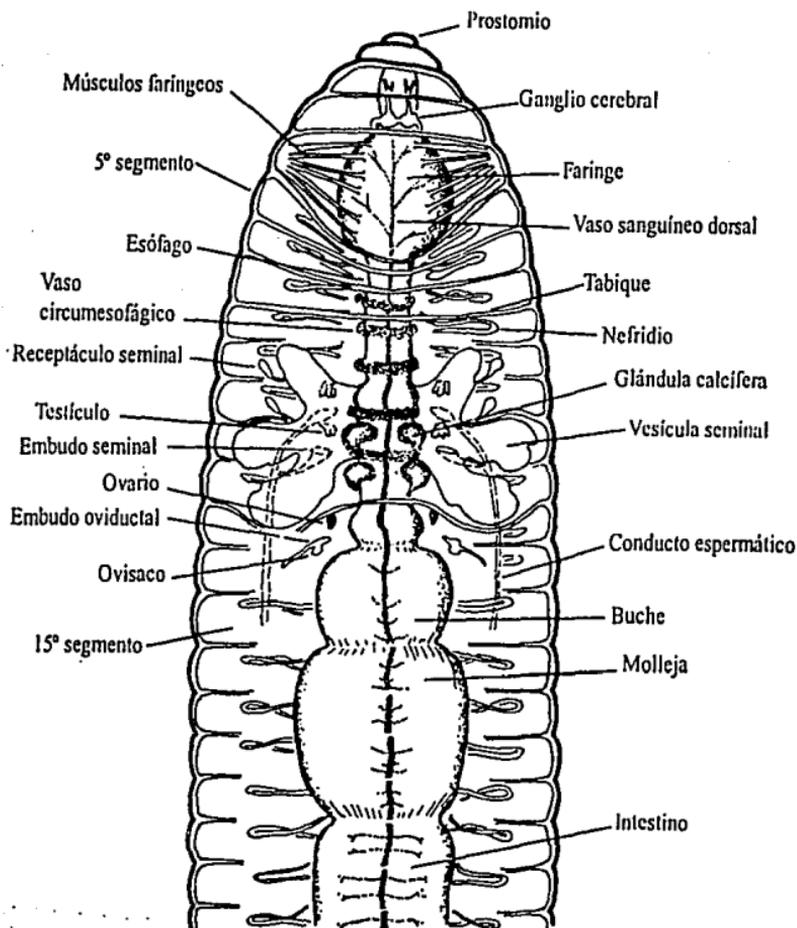


FIG. B - 3a. VISTA DORSAL DE LAS ESTRUCTURAS INTERNAS ANTERIORES DE DOS OLIGOQUETOS (12).

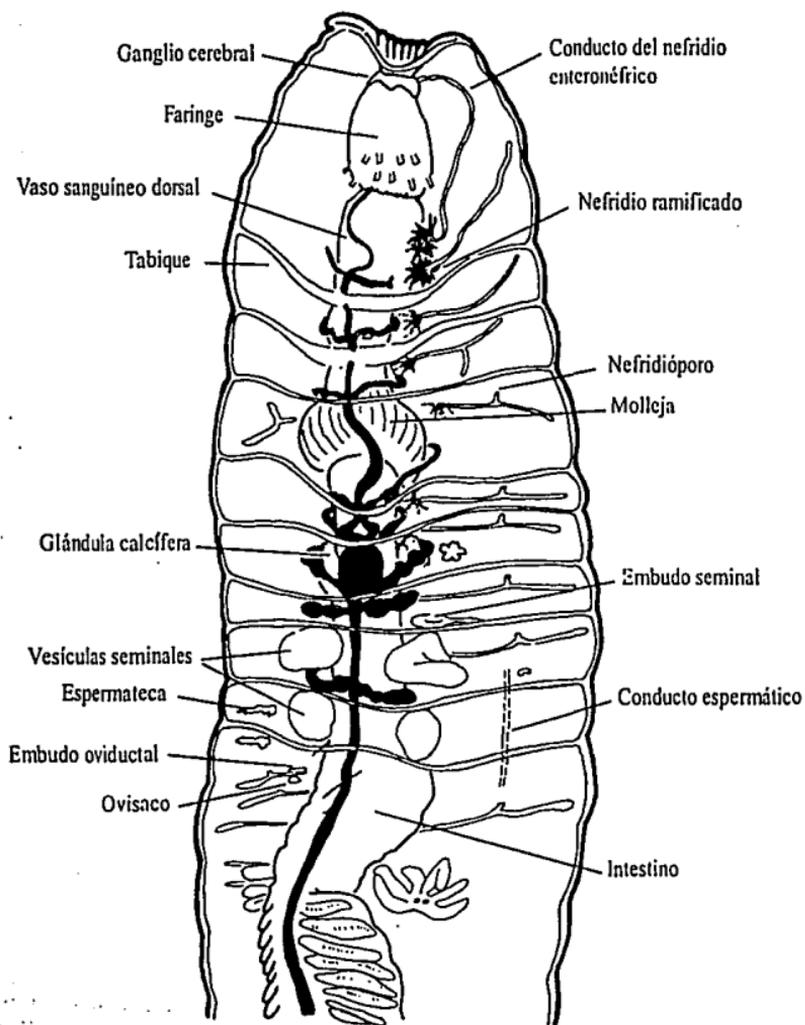


FIG. 8 - 3b. CONTINUACION.

4.1.6. INTERCAMBIO DE GASES.

Se produce intercambio de gases en la mayor parte de los oligoquetos por difusión de los mismos. Rara vez se observan branquias verdaderas en los oligoquetos; tienen unos círculos de branquias digitiformes en la parte posterior del cuerpo, un largo filamento que parte desde las superficies laterales de cada segmento; presenta también branquias filamentosas pero localizadas dorsal y ventralmente y no laterales; además de estar restringidas a los segmentos del cuarto posterior del cuerpo [12].

Otros oligoquetos tienen hemoglobina disuelta en el plasma. Cuando los oligoquetos con hemoglobina son expuestos al monóxido de carbono, se observa una disminución del consumo de oxígeno como prueba de la función de transporte de este último gas por parte del pigmento respiratorio. Muchos oligoquetos acuáticos, poseen una gran habilidad de tolerar concentraciones relativamente bajas de oxígeno, incluso la carencia del mismo [16], por ejemplo, la familia Tubificidae, como: *Tubifex tubifex*, mueren a consecuencia de la exposición prolongada de oxígeno [12].

Los tubificidos se enrollan para facilitar el intercambio de oxígeno entre el cuerpo y el agua, ayudando a que tome únicamente pequeñas cantidades, esta oxigenación es también necesaria para eliminar el mal olor producido por la contaminación [80].

4.1.7. CIRCULACION.

El vaso dorsal comienza sobre la parte anterior del intestino y vacía en el seno intestinal. Dos pares de vasos comisurales rodean el intestino en su origen y conectan los vasos ventral y dorsal, estos brindan la única comunicación entre los dos vasos longitudinales, aparte del drenaje hacia el seno intestinal y el que procede del mismo. En la mayoría de los oligoquetos los vasos dorsal y ventral no están asociados a los senos y están conectados uno a otro mediante vasos laterales en cada segmento (fig. B - 3); las ramas procedentes de los vasos segmentarios riegan el tegumento y también los diversos órganos de los segmentos. El vaso dorsal de los oligoquetos recibe sangre del seno intestinal y de los vasos segmentarios y la lleva en dirección anterior; este es contráctil y representa el medio más importante de propulsión de la sangre. El vaso ventral se encarga de transportar la sangre a la parte posterior del cuerpo y de distribuirla al seno intestinal y a los vasos segmentarios. Los vasos comisurales anteriores son netamente contráctiles y reciben el nombre de corazones; en *Tubifex* sólo se observa un par. Estos corazones figuran como órganos accesorios para la propulsión de la sangre, y poseen valvas en forma de pliegues endoteliales [12].

4.1.8. EXCRESION.

Los órganos excretorios son un par de metanefridios por segmento llamados holonefridios excepto en los extremos anterior y posterior; antes de abrirse al exterior el túbulo nefridal suele dilatarse para formar una vejiga. Los nefridióporos están situados en las superficies ventrales de cada segmento. Los holonefridios, meronefridios y nefridios ramificados, pueden abrirse al exterior por nefridióporos, o bien desembocan en diversas partes del aparato digestivo en cuyo caso reciben el nombre de enteronefridios [12].

El equilibrio de agua y sal es regulado por los nefridios. La orina contiene sales en menor concentración que la sangre y el líquido celómico, por lo que debe producirse considerable resorción de sales a medida que el líquido pasa por los túbulos nefridiales; los nefridios enteronéfricos representan una adaptación para la retención de agua. Al pasar la orina al aparato digestivo casi toda el agua remanente puede resorberse a medida que discurre por el intestino [12].

Los nefridios se utilizan también para eliminar los productos resultantes de la destrucción de la hemoglobina. Los oligoquetos acuáticos excretan amoníaco y las especies terrestres urea [12].

4.1.9. TEJIDO CLORAGÓGENO.

En torno al intestino y revistiendo el vaso dorsal de los oligoquetos existe una capa de células amarillentas, llamadas cloragógenas o eleocitos, que desempeñan un papel vital en el metabolismo, parecido al del hígado en los vertebrados. El tejido cloragógeno es el principal centro de síntesis y almacenamiento de grasa y glucógeno; también tiene lugar en estas células la desaminación de las proteínas, la formación de amoníaco y la síntesis de urea [12].

4.1.10. SISTEMA NERVIOSO.

Los dos cordones ventrales se fusionan y sitúan en el interior de las capas musculares de la pared corporal. El cerebro de los oligoquetos se ha desplazado en dirección posterior (fig. B - 4). Casi todos los oligoquetos acuáticos tienen cuatro pares de nervios laterales por segmento. Los nervios segmentarios poseen fibras sensitivas y motoras; las fibras sensitivas de cada nervio inervan secciones epidérmicas de los segmentos inmediatos precedente y siguiente, además de las secciones epidérmicas de los segmentos en el que el nervio se encuentra situado [12].

Existen en los oligoquetos fibras nerviosas gigantes, algunas agrupadas en el lado medio dorsal del cordón nervioso ventral y otras menos visibles situadas en la zona ventral media,

ampliamente separadas; las primeras de estas fibras descargan por estimulación anterior, y las segundas por estimulación posterior (12).

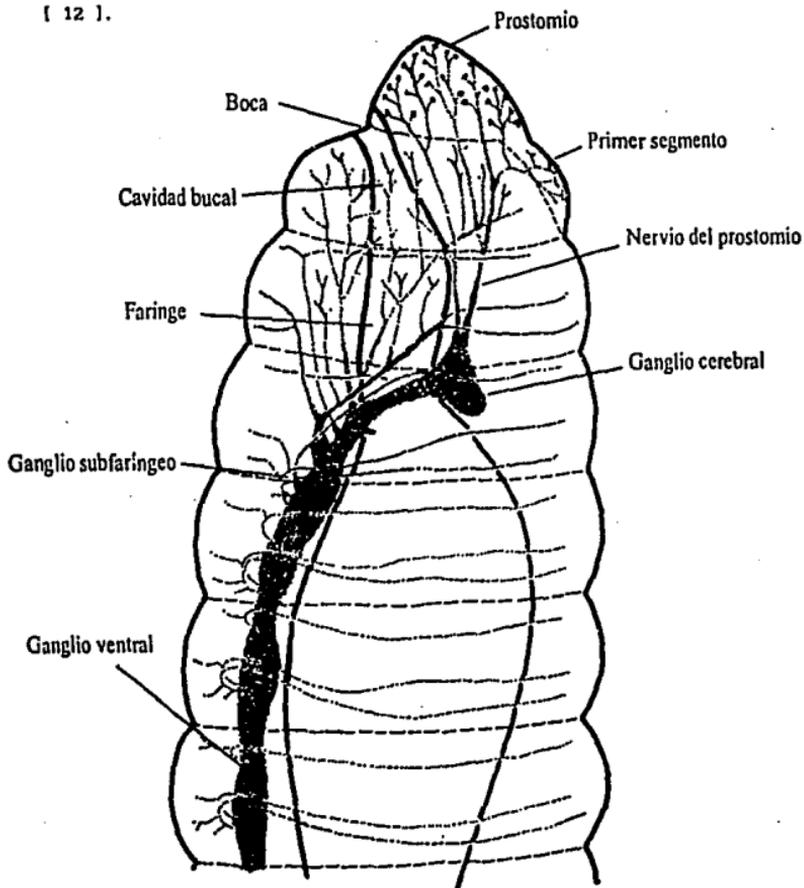


FIG. B - 4. VISTA LATERAL DEL SISTEMA NERVIOSO. LA ACTIVIDAD FUNCIONAL DE CADA NERVIOS NO SE LIMITA A SU PROPIO SEGMENTO, SI NO TAMBIEN A LOS SEGMENTOS VECINOS, ANTERIOR Y POSTERIOR (SEGUN PROSSER) (12).

La contracción puede iniciarse indirectamente por arcos nerviosos reflejos que involucran neuronas sensitivas en la pared corporal. Una onda de contracción de los músculos longitudinales ejerce tracción sobre los segmentos siguientes, lo cual estimula a las neuronas sensitivas de dichos segmentos, iniciándose en esta única forma una acción refleja que da origen a la contracción de la capa de músculos circulares y el alargamiento de los segmentos [12].

El ganglio subfaringeo es el centro principal del control motor y de los reflejos vitales y domina los ganglios sucesivos de la cadena. Después de la extirpación del cerebro el control motor continúa normalmente, pero el verme pierde su capacidad para establecer relación de sus movimientos con las condiciones ambientales externas. La relación del ganglio subfaringeo con el cerebro es análoga a la existente entre el bulbo raquídeo y los centros cerebrales superiores de los vertebrados [12].

Una serie de ganglios faríngeos forman un centro de relevo para los impulsos motores que desde el cerebro y ganglio subfaringeo se dirigen a las fibras musculares de la pared intestinal [12].

Las fibras sensitivas procedentes del aparato digestivo ingresan al sistema nervioso central siguiendo la vía de estos ganglios. En el interior de cada segmento existe también un sistema doble de fibras motoras que nacen del cordón nervioso

ventral e inervan los músculos de la pared del intestino [12].

Una serie de fibras, que abandonan el cordón nervioso ventral por los dos nervios segmentarios posteriores, son excitadoras, habiéndose comprobado que secretan acetilcolina; las otras fibras asociadas con los tres nervios segmentarios, ejercen efecto inhibitor sobre la transmisión del impulso nervioso y secretan noradrenalina [12].

4.1.11. ORGANOS DE LOS SENTIDOS.

Los oligoquetos carecen de ojos [12], excepto algunos acuáticos [16], poseen ocelos simples en copa de pigmento; tienen un sentido dérmico de la luz, porque el integumento está provisto de fotorreceptores situados en la parte interna de la epidermis. Cada una de estas células tiene forma de lente con una prolongación basal que ingresa en el plexo nervioso subepidérmico; no se observan células fotorreceptoras en la superficie ventral del cuerpo, y son más abundantes en el segmento anterior y en el posterior o terminal del verme. Estos invertebrados muestran fototropismo negativo a la luz fuerte y positivo a la débil [12].

Las demás estructuras sensoriales adoptan una distribución más o menos general en el tegumento, el cual es muy rico en terminaciones nerviosas libres, cuya función puede ser táctil.

Los acúmulos de células sensoriales que forman un tubérculo prominente con prolongaciones que se extienden por encima de la cutícula son quimiorreceptores [12].

4.1.12. REPRODUCCION Y DESARROLLO.

Su ciclo de vida requiere de 1960 a 2800 días para completarse [51].

A) Sistema reproductor. Los oligoquetos son hermafroditas, poseen gónadas separadas y el número de segmentos reproductores es limitado y primitivo; suele observarse un segmento ovárico y uno testicular que se encuentran en la mitad anterior del verme; y el segmento o segmentos femeninos están siempre situados inmediatamente delante de los segmentos masculinos (fig. B - 5 y B - 6) [12].

Los ovarios y testículos, siempre en pares, están situados en los segmentos fértiles en la parte inferior del tabique anterior y se proyectan en el celoma; ambos son pequeños y a menudo en forma de pera, especialmente los ovarios; los testículos pueden ser lobulados o digitados. Los gametos son liberados a partir de las gónadas como gametogonias, y la maduración tiene lugar principalmente en el celoma donde los gametos no están adheridos [12].

Los tubificidos poseen, además, un segundo par de vesículas seminales más pequeñas que nacen en el tabique anterior del segmento masculino y se proyectan hacia adelante en el segmento precedente [12].

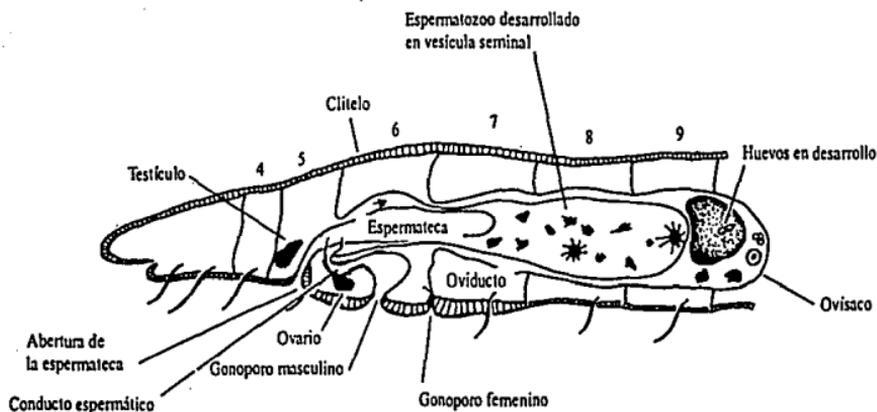


FIG. B - 5. SISTEMA REPRODUCTOR.

Los segmentos reproductores, masculinos o femeninos están provistos de un par de oviductos o conductos deferentes, para la salida de los óvulos o espermatozoides respectivamente (el conducto espermático puede ser enrollado o recto). Los conductos masculino y femenino son análogos en su plan básico y muy parecidos a los de un nefridio. La

abertura interna tiene lugar a través de un esbudo ciliado localizado en el tabique posterior del segmento fértil [12].

El tejido glandular, denominado glándulas prostáticas, suele estar asociado con los gonoductos masculinos. La porción posterior de la pared del conducto espermático es glandular y forma la próstata, esta es una masa glandular separada que drena en el conducto deferente en un punto cercano al gonoporo.

Los oviductos, organizados bajo el mismo plan que los conductos espermáticos, son más pequeños y sencillos, abriéndose por dos poros genitales femeninos en el segmento que sigue al ovárico (fig. B - 6). Los receptáculos o vesículas seminales forman parte del sistema reproductor femenino, aunque completamente separados de los gonoductos [12].

- B) Clitelo.** Es una estructura reproductiva característica de los oligoquetos. El clitelo puede estar formado por una sola célula; el desarrollo del clitelo generalmente coincide con la madurez sexual, pero en algunos vermes solo se manifiesta netamente durante la estación de crianza. Las glándulas del clitelo producen moco para la copulación, y secretan la pared capullo, además de albumina en la cual son depositados los huevos dentro de éste [12].

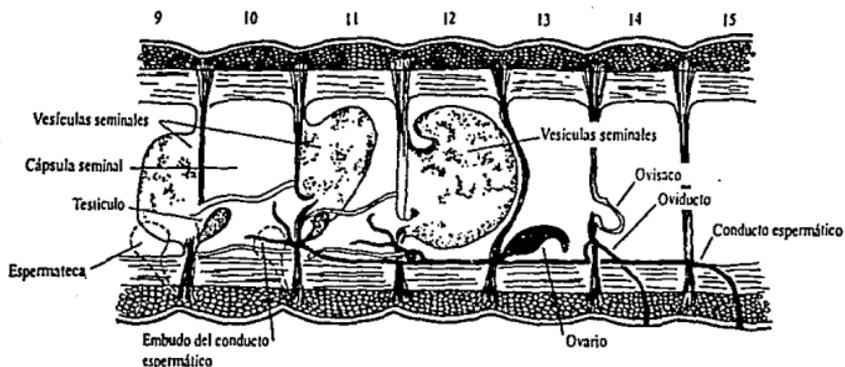


FIG. B - 6. SEGMENTOS REPRODUCTORES.

- C) **Copulación.** En los oligoquetos la copulación es la regia, con diseminación mutua de espermatozoos; durante la misma se ponen en contacto las superficies ventrales anteriores de un par de gusanos, con la parte anterior de uno de ellos dirigida hacia la posterior del otro; los poros genitales masculinos de un verme se yuxtaponen directamente con los receptáculos seminales del otro, siendo mantenidos en posición por una envoltura mucosa común secretada por el clitelo, en ocasiones quedan fijos y unidos gracias a la acción de cerdas genitales (fig. B - 7a y B - 7b) [12].

D) **Capullo.** Algunos días después de la copulación, es secretado un capullo para el depósito de los huevos [12]. Tienen una alta fecundidad de 92 a 340 huevos, con la capacidad de reproducirse en un rango de temperatura de 0.5 a 30°C [59]. Primero aparece un tubo mucoso alrededor de los segmentos anteriores, incluso el clitelo, a continuación, este secreta un material quitinoide que lo circunda como una sortija de cigarro puro; este material es el que forma el capullo. La capa profunda de las glándulas del clitelo secreta albúmina en el espacio situado entre la pared del capullo y el clitelo; los huevos son eliminados por los gonoporos femeninos, y de alguna forma penetran en el capullo antes de que abandone el clitelo. Los espermatozoos son depositados en el capullo a medida que pasan sobre los receptáculos seminales. Una vez que el capullo desliza sobre la cabeza del gusano y queda liberado el cuerpo, se desintegra rápidamente el tubo mucoso y los extremos del capullo experimentan constricción y se cierran por si mismos. Los capullos miden 1.6 x 0.85 mm. Cada capullo contiene de uno a veinte huevos según la especie. Los tubificidos y los lumbricúlidos sólo se reproducen una vez al año. El sistema reproductor es resorbido luego y vuelve a formarse al año siguiente. En algunos casos aislados se sabe que ocurre autofecundación la cual tiene lugar en el interior del capullo [12].



Pene insertado en el receptáculo seminal

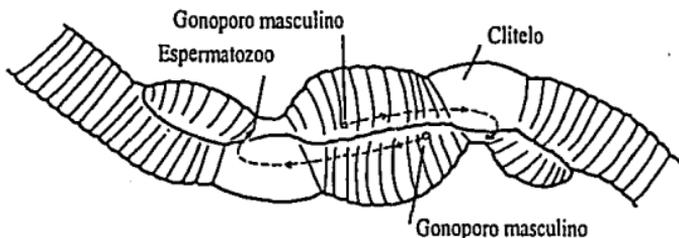


FIG. B - 7a. COPULACION POR TRANSMISION DIRECTA DE ESPERMA.

FIG. B - 7b. COPULACION POR TRANSMISION INDIRECTA DE ESPERMA.

E) Embriogenia. Los huevos de los grupos acuáticos, especialmente las familias primitivas, poseen una cantidad relativamente grande de vitelo; la albúmina abundante en el capullo satisface la mayor parte de las necesidades nutricionales del embrión, el desarrollo es directo, sin etapas larvarias, produciéndose totalmente en el interior del capullo. La cría del oligoqueto madura en el capullo después de ocho días a diez semanas de desarrollo, la cual depende no

sólo de la especie sino también de las condiciones ambientales [12].

F) Reproducción. Su forma de reproducción es asexual [16]; la cual es muy frecuente en muchas especies de oligoquetos acuáticos; algunos se reproducen asexualmente en verano y sexualmente en otoño. La reproducción asexual implica siempre división transversal del gusano progenitor en dos o más nuevos individuos. En dos meses un sólo verme puede producir 15,000 descendientes. Es mucho más frecuente observar división por zonas de fisión; antes de la cual aparece una zona de células nuevas en algún punto del cuerpo del progenitor, dando lugar a la formación de cabeza y cola nuevas con destino a cada descendiente. La división se produce siempre a nivel de la zona de fisión, incorporándose unas células germinativas a un individuo y otras a otro. Los oligoquetos poseen gran capacidad de regeneración, muchos de ellos viven hasta seis años en acuarios [12].

4.1.13. ECOLOGIA Y DISTRIBUCION.

Son organismos de distribución cosmopolita [51]. Viven en todo tipo de agua dulce [12], ya sea productiva e improductiva [51] pero son más abundantes en aguas superficiales, disminuyendo visiblemente a profundidades mayores de un metro, excepto los tubificidos que habitan en el fondo de lagos profundos en concentraciones hasta de 8,000 individuos por metro cuadrado

[12], así como en estuarios, aguas frescas [80], sobre litorales, estantes continentales, camas de arena y sobre todo en sedimentos blandos [16]. La abundancia de estos invertebrados en sitios con sedimento muy fino puede explicarse por el elevado contenido de nutrientes, por la habilidad que tienen para cavar y para alimentarse de partículas muy pequeñas [77]. La presencia de grandes cantidades de diversas especies de oligoquetos acuáticos es indicativo de contaminación del agua [12, 16, 45, 51, 59, 77 y 80] siendo únicamente los tubificidos tolerantes a la alta contaminación de materia orgánica, metales pesados, insecticidas, herbicidas y fungicidas; incrementando esta tolerancia gracias a su habilidad de sobrevivir en aguas de baja o nula oxigenación, ya que el bajo contenido de oxígeno es una característica de contaminación acuática [80 y 28]. Gracias a su elevada resistencia estas especies se han encontrado en la "purificación" de medios sumamente contaminados [16]. La mayoría de las formas acuáticas excavan en el lodo y desechos, habitando los reservorios de agua de vegetales epífitos bromeliáceos que viven en troncos y ramas de árboles tropicales [12]. Hay una gran variedad de lumbricidos en America del Norte, de estos aproximadamente 60 son tubificidos, de los cuales hay 20 especies significativas, en las que se encuentran los generos *Tubifex*, *Limnodrilus*, *Pelosclex*, *Potamothrrix*, *Rhyacadrilus*, *Branchiura*, *Aulodrilus* y *Bothioneurum* [16 y 77].

No hay oligoquetos parásitos, pero algunas especies son comensales de caracoles acuáticos [12].

Los sistemas vivos, poseen mecanismos metabólicos para procesar tanto los nutrientes que necesitan como las sustancias extrañas que ingresan al organismo. Estos mecanismos son:

- A. **Catabolismo**, que consiste en la degradación o transformación de moléculas complejas en otras más sencillas, con liberación de energía que se almacena como enlaces de fosfato [91].

- B. **Anabolismo**, que constituye la biosíntesis de los componentes celulares a partir de moléculas simples utilizando la energía liberada en los procesos catabólicos [91].

Tanto las reacciones metabólicas como la biotransformación de xenobióticos sufren cambios en su estructura química por la acción de enzimas; lo cual indica el potencial para degradar compuestos (naturales y xenobióticos) [19, 25 y 79].

Los ensayos enzimáticos comunes, involucran dos aspectos principales:

- a) La tasa de desaparición de un sustrato.
- b) La tasa de formación de un producto.

La velocidad a la que se efectúan los procesos anteriores está determinada por factores como: pH, fuerza iónica y

temperatura del medio [78 y 91]. La cinética observada para un tipo de enzima puede dar información acerca del mecanismo de inhibición ejercido por un contaminante tóxico sobre la reacción enzimática; para ésto, se considera a un inhibidor, como aquella sustancia que reduce la velocidad de la reacción enzimática [78].

Para su funcionamiento, las enzimas forman complejos con iones (Na^+), metales (Fe^{2+}) o compuestos orgánicos (como nucleótidos) llamados cofactores enzimáticos o coenzimas [91].

4.2.1. CINÉTICA ENZIMÁTICA.

La velocidad de las reacciones enzimáticas dependen de la concentración del sustrato, siempre y cuando ésta sea baja, ya que a concentraciones mayores ocurre una saturación de la enzima; en estas condiciones, la velocidad de reacción se acerca a una constante y pierde su dependencia en relación a la concentración del sustrato [90].

La tasa de una reacción enzimática está regulada de acuerdo a los mecanismos de cinética propuestos por Michaelis - Menten, en una reacción enzimática el sustrato S se combina con la enzima E para formar el complejo enzima - sustrato ES [78 y 91].

La constante de Michaelis - Menten (K_M) equivale a la concentración del sustrato cuando la velocidad de la reacción es igual a la mitad de la velocidad máxima; la forma matemática que describe este proceso se llama ecuación de Michaelis - Menten:

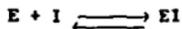
$$V_0 = \frac{V_{max} \cdot S}{K_M + S}$$

4.2.2. INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

La actividad enzimática puede inhibirse de dos formas:

1. **Inhibición reversible:** en ésta, el inhibidor se combina reversiblemente con la enzima o con el complejo enzima - sustrato; existen tres tipos de inhibición enzimática reversible:

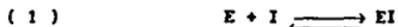
- a) **Competitiva,** un inhibidor I reacciona con la enzima y se reduce la afinidad por el sustrato



- b) **Acompetitiva,** el inhibidor se combina con el complejo enzima - sustrato y se forma un complejo enzima - sustrato - inhibidor que reduce la velocidad de reacción.



- c) No competitiva, el inhibidor puede combinarse con la enzima libre (1) para que el complejo enzima - sustrato no se forme a la velocidad normal, o bien, se combina con el complejo enzima - sustrato (2), para que el complejo resultante no se descomponga a la velocidad normal [9, 37 y 64].



2. Inhibición irreversible: se caracteriza por la unión covalente del inhibidor al centro activo de la enzima, al cual modifica en forma permanente; el aumento en la actividad enzimática se debe a la estimulación de la síntesis del citocromo P450, la reductasa de este citocromo y de otras enzimas [9, 37 y 64].

Además de este sistema, la biotransformación constituye los cambios estructurales que sufren los xenobióticos por efecto del metabolismo, término más sencillo para referirse a los mecanismos llevados a cabo en la degradación de compuestos extraños, el cual está constituido por varios procesos: absorción, distribución, metabolismo y excreción. La velocidad relativa de esos procesos, determina el tiempo, el curso del xenobiótico en el organismo, y de mayor importancia aún, el sitio receptor del mismo, estas acciones son las responsables de la acción farmacológica del xenobiótico [11].

Las conversiones metabólicas se llevan a cabo en el hígado principalmente, aunque también tienen lugar en el músculo, riñón, intestino y plasma [9]. En los hepatocitos se lleva a cabo en el retículo endoplásmico liso, este sistema tubular intracelular se rompe por efecto de homogenización y los fragmentos se denominan microsomas, que pueden dividirse en lisos y rugosos [37], en los cuales se realizan estudios de sistemas enzimáticos que catalizan reacciones de oxidación de xenobióticos [91], estando localizadas en el lumen del retículo endoplásmico o en los remanentes de lípidos de membranas [37], como lo es el presente trabajo.

En el cuerpo se llevan a cabo cuatro tipos de reacciones: oxidación, reducción, hidrólisis, y reacciones de síntesis o conjugación. Las reacciones de oxidación incluyen: oxidación alifática, hidroxilación aromática, N - dealquilación, O - dealquilación, S - demetilación, desaminación formación de sulfóxidos, desulfuración, N - oxidación y N - hidroxilación [9].

Los componentes de estos sistemas son el citocromo P450, el oxígeno y el dinucleótido de nicotinamida - adenina [9]. El citocromo P450 es un compuesto de la familia de las hemoproteínas (complejo de hierro - porfirina) en el que P se refiere a pigmento y 450 a su absorción de la luz de esa longitud de onda cuando se une al monóxido de carbono [9 y 91]. El citocromo P450 y monooxigenasas, son de los sistemas metabólicos más

importantes en la detoxificación y activación de xenobióticos, biosíntesis de hormonas, inducción, carcinogénesis y otras áreas [4, 31 y 52].

El oxígeno molecular y el NADPH caracterizan el sistema enzimático como una función mixta de oxidación, también llamado monooxigenasa [9].

En el sistema microsomal ocurren una serie de reacciones que conducen a la oxidación de un xenobiótico. Por un lado, el nucleótido reducido (NADPH) se oxida y los electrones que cede son transferidos a una flavoproteína denominada NADP - citocromo c reductasa. Por otro lado el xenobiótico X se enlaza al citocromo P450 oxidado. Es la molécula de hierro del citocromo del complejo P450 - X la que se reduce por la flavoproteína. La forma reducida del citocromo P450 - X acepta una molécula de oxígeno y se forma un complejo terciario citocromo P450 - X - O₂, aquí se introduce a la reacción otro electrón proveniente probablemente del NADPH, y el O₂ se activa - transfiriéndose uno de sus átomos al xenobiótico, que se convierte en metabolito oxidado, mientras que el otro forma una molécula de agua. Entre tanto, el citocromo P450 se regenera por oxidación de la molécula de hierro, como se muestra en la fig. C - 1 [9, 52 y 91].

En la fracción microsomal también se encuentran reductasas que catalizan reacciones de azo y nitro reducción con la participación de citocromo P450, NADPH y flavoproteínas como

donadores de electrones. Aunque también ocurren en el hígado, estas reducciones se llevan a cabo principalmente en la luz intestinal por medio de la flora correspondiente [9].

Mediante las reacciones de *oxidación, reducción e hidrólisis*, se lleva a cabo la primera fase o *fase I* de la biotransformación de xenobióticos. Algunos metabolitos resultantes son menos liposolubles y más polares que los originales, y por lo general pierden su actividad. En ocasiones, sin embargo, se forman metabolitos más activos que los compuestos originales o incluso más tóxicos. La mayoría de los metabolitos que se forman en la *fase I*, e incluso compuestos originales, se combinan con sustancias endógenas (ácido glucurónico, glicinas, metilos, etc.) para dar origen a compuestos sin actividad farmacológica y muy polares. Los compuestos conjugados se excretan definitiva y casi totalmente por vía renal. Las reacciones de conjugación constituyen la *fase II* de la biotransformación. La incorporación de los xenobióticos a las reacciones de *fase I* o a las de *fase II* depende de la presencia en su molécula de grupos químicos susceptibles de reaccionar. Estos *grupos funcionales* pueden ser amino ($-NH_2$), carboxilo ($-COOH$), hidroxilo ($-OH$) o sulfhidrilo ($-SH$) [9 y 91].

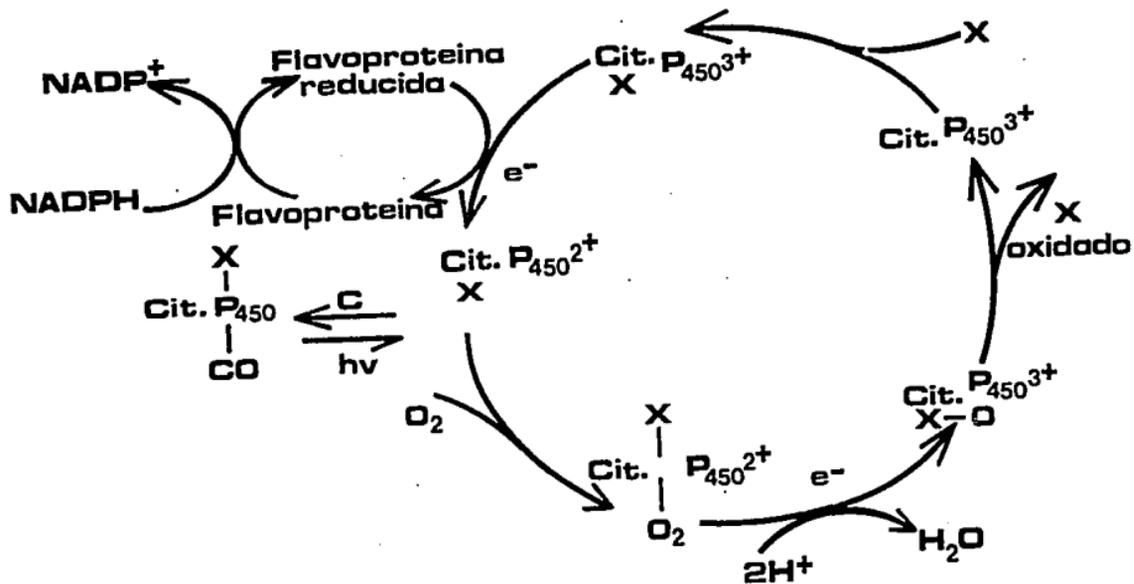


FIG. C - 1. SISTEMA MICROSONAL FUNCION MIXTA OXIDASA [10].

X = XENOBIOTICO.

4.3.

PLOMO

Es uno de los metales más conocidos en el mundo, considerado desde la antigüedad como nocivo⁷ [40]; se localiza extendido en la corteza de la tierra (rocas ígneas) en concentraciones estimadas de 12.5 mg/Kg, ocupando el 36° lugar de los elementos en orden de abundancia. El contenido de plomo en las rocas sedimentarias es aproximadamente de 7 mg/Kg (rocas) y 20 mg/Kg (sales). Las estimaciones de las concentraciones de plomo en los sedimentos de las profundidades marinas son de 9 mg/Kg (arcilla) y 80 mg/Kg (carbonatos) [67], se encuentra principalmente como sulfuro en galena y otros minerales incluidos: anglesita ($PbSO_4$), cerussita ($PbCO_3$), mimetita [$PbCl_2 \cdot 3Pb_3 - (AsO_4)_2$] y piromorfita [$PbCl_2 \cdot 3Pb_3 (PO_4)_2$]. Puede encontrarse de color blanco - azulado, plateado o gris metálico [87]. El plomo inorgánico se encuentra en compuestos químicos en un estado de oxidación de +2 y +4 [58 y 92]; tiene un peso molecular de 207.2; forma cristales cúbicos, funde a 327.4°C, ebulle a 1740°C, tienen una densidad de 11.34. Es uno de los metales más blandos y pesados, se corta, lamina y estira fácilmente, pero en pequeñas cantidades de antimonio, arsénico, cobre y metales alcalinotérreos aumenta su dureza, [1]; su

⁷ Un metal tóxico o nocivo, es aquel que pertenece al grupo de elementos que no son necesarios para el organismo y que son capaces de provocar efectos indeseables aun a bajas concentraciones [85].

temperatura de vaporización es de 1740°C (206 cal/g), su capacidad calorífica a 20°C es de 0.031 cal/g/°C; su resistividad (μ - ohm - cm) a 20°C : 20.65, 100°C : 27.02, 320°C : 54.76 y a 330°C : 96.74; su presión de vapor a 1000°C es de 1.77 mm Hg; su conductividad térmica a 50°C : 0.083 y a 225°C : 0.077; su viscosidad (cps) a 327.4°C : 3.2, a 400°C : 2.32, a 600°C : 1.54, a 800°C : 1.23. Reacciona con ácido nítrico concentrado caliente y con ácido hidroclicórico o sulfúrico concentrado hirviendo, es atacado por agua pura y ácidos orgánicos débiles en presencia de oxígeno [87]. Se obtiene por reducción de su principal mineral la galena. Se purifica por oxidación y refinación electrolítica separándolo de la plata que contiene [65].

El plomo es un elemento metálico que ha recibido mayor atención por los numerosos problemas que puede ocasionar, tanto en lo que respecta a la multiplicidad de vías de acceso al organismo como a su elevada toxicidad en un amplio espectro de órganos y sistemas afectados. Es un elemento que se encuentra invariablemente en la atmósfera y alimentos [33], incluyendo al agua potable, (cuyos límites permisibles establecidos son de 0.05 ppm [44]) como contaminante de los mismos, de manera que la alimentación humana contiene siempre plomo (trazas) en mayor o menor proporción [33].

La presencia de plomo en agua dulce, generalmente indica contaminación con desechos metalúrgicos o con venenos industriales que contienen plomo, como el arsenato de plomo; pero también

aparece como resultado de la corrosión de amalgamas que contienen plomo, como las soldaduras [44].

El plomo tiene diversos usos, como en construcción de material para líneas de tanques, pipas y otros equipos usados para líquidos y gases corrosivos, en la manufactura de ácido sulfúrico, purificación de petróleo, halogenación, sulfonación, extracción, condensación, protección de rayos X y radiación atómica; manufactura de tetraetilación, pigmentos para pintura y otros compuestos principalmente orgánicos e inorgánicos, producción de metales y aleaciones; baterías de acumuladores, en cerámica, plásticos y aparatos electrónicos, en construcción caliente, en soldadura, en metalurgia, entre otros [5, 65 y 87].

4.3.1. TOXICIDAD EN HUMANOS

Es más común la intoxicación en niños, presentando síntomas como: anorexia, vómito, estupor, somnolencia, apatía, hiperactividad, ataxia, convulsiones debidas al incremento de la presión intracraneal y otros síntomas neurológicos; produce enfermedad cerebral permanente [23]. Se han reportado signos como faringitis, disturbios del sueño y constipación seguida de cólicos, anemia y neuritis [87]. Los efectos más severos de intoxicación por plomo se presentan en el sistema hematopoyético [5]. En algunos países se han descrito cuadros de saturnismo

atribuidos a concentraciones de plomo en agua potable de hasta 2.6 mg/L. [90].

4.3.2. TOXICIDAD CRONICA

En niños causa pérdida de peso y de apetito, sabor metálico, malasia, constipación, insomnio, debilidad, anemia [23] y retraso mental; usualmente en adultos causa envenenamiento ocupacional, produciendo parálisis de los músculos de la mano debido a envenenamiento plúmbico [87], algunos casos desarrollan debilidad en músculos extensores, lo cual se aprecia como gota en mano y pie; a menudo se encuentra indefinido en SNC, produciendo irritabilidad nerviosa, pérdida de la memoria, temblores, encefalopatías [58 y 87] y alteraciones en sistema gastrointestinal. En cantidades mayores a 0.05 mg % en sangre y 0.08 mg/litro en orina da un diagnóstico de envenenamiento por plomo [87]. El nivel máximo aceptable en sangre es de 30 µg/dL [23].

4.3.3. TOXOCINETICA

A. Absorción.

El plomo es absorbido por ingestión e inhalación principalmente. En adultos es aproximadamente de un 10 % vía oral, incrementándose en niños (aproximadamente 50 %); la absorción por inhalación es más complicada, ya que las partículas pueden ser depositadas en la nasofaringe, la tráquea, los bronquios y los alveolos, parte de las partículas inhaladas ascienden por acción de los cilios, pasan al esófago y se absorben principalmente en el tracto gastrointestinal. Las partículas restantes que llegan hasta los alveolos, son absorbidos y pasan a la sangre. El tránsito a través de la vías broncopulmonares depende del tamaño de partícula y de la solubilidad del compuesto (13, 21, 23, 27 y 34).

La absorción por vía digestiva, se realiza de acuerdo con la naturaleza del compuesto plomado, siendo aproximadamente de un 10 % del plomo inorgánico ingerido [33].

La absorción del plomo depende de factores propios del organismo, tales como la edad, el estado fisiológico y la integridad de los tejidos. La vía de acceso, el tamaño de partícula y el tipo de compuesto (orgánico o inorgánico), determinan la concentración y la posibilidad de difusión del plomo hacia el organismo [24, 33 y 59].

B. Distribución.

1.- General.

De un 90 a 95 % del plomo en el cuerpo es depositado en el esqueleto, la vida media de eliminación en el hueso es mayor a los 20 años, el resto se distribuye de manera general en todo el organismo y se acumula en ciertos compartimentos [23, 24 y 68].

2.- Sangre y tejidos blandos.

Se disuelve en el plasma y se une a la hemoglobina de los eritrocitos, en donde rápidamente establece un equilibrio entre eritrocitos - plasma en una proporción de 16 : 1 respectivamente; Snyder, et al. (1975). estimaron 1.4 mg de plomo en sangre total, 1.2 mg en eritrocitos y 0.14 mg en plasma, tomando como referencia un individuo de 70 Kg, a su vez llega a tejidos blandos como médula ósea, hígado, riñones y testículos; su vida media en estos tejidos es aproximadamente de 30 a 35 días [23, 75 y 90]. El plomo traspasa fácilmente barrera placentaria, acumulándose en líquido amniótico y membranas fetales habiéndose encontrado que la concentración de plomo en sangre materna y cordón umbilical es similar [47 y 49].

3.- Tejido adiposo.

Snyder, et al. (1975), estimaron una cantidad de 0.6 mg de

plomo en tejido adiposo, tomando como referencia un individuo de 70 Kg.

C. Metabolismo.

Rabinowitz, et al. (1976), sugirieron un modelo de tres compartimentos para el metabolismo del plomo (fig. D - 1).

El primer compartimento corresponde a la sangre, en donde el plomo tiene una vida media de 35 días. Este compartimento se encuentra comunicado directamente con el plomo absorbido, el plomo excretado (orina) y los otros compartimentos.

En el segundo compartimento, compuesto de tejidos blandos, tiene una vida media de 40 días, el cual da origen a plomo en pelo, uñas, excreción salival, gástrica, pancreática y biliar [23 y 67].

El tercero, reside principalmente en el esqueleto, contiene la mayor parte de plomo en el cuerpo y tiene una vida media de 10,000 días [67].

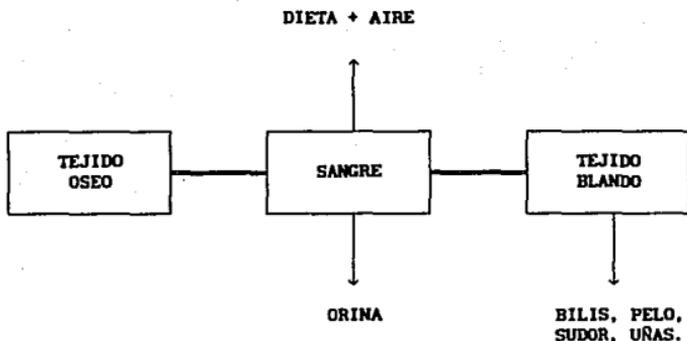


FIG. D - 1. MODELO DEL METABOLISMO DEL PLOMO EN EL HUMANO [67].

D. Eliminación.

El mecanismo de eliminación del plomo es básicamente por riñón, aunque también se excreta por sistema gastrointestinal, sudor, leche materna y pulmones [23 y 68].

En estudios realizados en animales intoxicados con plomo, se han reportado concentraciones de plomo en bilis y heces [68].

4.3.4. TOXODINAMIA.

Está dada por tres modalidades:

- 1.- Compitiendo con los metales esenciales, en particular calcio y zinc en sus sitios de inserción [68].
- 2.- Mediante su afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas, lo que significa alteración de su forma y función (ya que gran cantidad de proteínas, entre ellas enzimas, poseen grupos -SH); las alteraciones fisiológicas pueden ser generalizadas [47 y 67].
- 3.- Altera el transporte de iones esenciales. El plomo es un inhibidor competitivo del calcio y tiene gran afinidad por los fosfatos, con el cual se precipita o se une a los huesos, sucediendo lo mismo con la hidroxapatita y fluoruros de los dientes [47 y 67].

4.3.5. EFECTOS PRODUCIDOS EN SISTEMAS ESPECIFICOS.

A. Sangre.

Los eritrocitos son órganos críticos afectando a bajas dosis; los mecanismos tóxicos involucrados son inhibición de ferroquelatasa (hemo sintetasa), eritrocito 5' -

nucleotidasa, ácido δ - aminolevulinico deshidratasa (ALA - D), [5 y 58] y otras enzimas, incluyendo algunas involucradas en el transporte de fierro; esto da como resultado descenso de eritropoiesis, así como descenso de la vida de los eritrocitoscausando anemia y palidez. Otros efectos son basofilia difusa, reticulocitosis, aumento del ácido δ - aminolevulinico, coproporfirina en orina y ascenso de porfirina libre en eritrocitos (protoporfirina IX) [23 y 58]. Los límites de tolerancia biológica (LTB) para plomo son de: 40 $\mu\text{g}/100$ mL. para hombres adultos y 30 $\mu\text{g}/100$ mL. para mujeres en edad fértil (OMS 1980) y 25 $\mu\text{g}/100$ mL. para niños (CDC, U.S.A. 1978), [24].

B. Reumatológicos.

En estudios recientes, se han encontrado problemas de gota asociados a la intoxicación con plomo, ya que este interfiere con la excreción de ácido úrico. Causante de artralgia [23].

C. Riñón.

Es común encontrar casos de nefrotoxicidad por intoxicación durante la infancia, puede ser tanto aguda como crónica, causa disfunción tubular con cambios ultraestructurales en mitocondria [23], lo cual resulta en aminoaciduria acompañada de

hipofosfatemia, hiperfosfaturia relativa y glucosuria [24]. Se forman inclusiones intranucleares en el tubo proximal lo que ha manifestado síndrome de nefropatía crónica que se caracteriza por retraso renal de desarrollo lento, con alteraciones arteroescleróticas, atrofia glomerular y degeneración hialina de los vasos que culmina en insuficiencia renal [6, 18, y 58]; habiéndose encontrado también un aumento en la excreción renal de ácido amino levulinico [56].

D. Sistema endócrino y reproductor.

El plomo está asociado con la depresión de muchas funciones endócrinas, particularmente con la tiroidea y adrenal, pero no hay más detalles al respecto [23].

Se han encontrado evidencias de que el plomo está asociado con una alta incidencia de abortos espontáneos y partos prematuros [73], así como en la supresión de la función testicular produciendo esterilidad en el hombre [23]. Del mismo modo, se ha demostrado tanto en el hombre como en animales que el plomo atraviesa barrera placentaria, encontrándose concentraciones muy semejantes a las de la madre, causando severos daños a los diversos órganos del recién nacido [3 y 73].

E. Sistema cardiovascular.

La exposición a plomo está directamente relacionada con la hipertensión. Dietas deficientes en calcio incrementan la absorción de plomo y decrecen su excreción, debido a que ambos siguen rutas metabólicas similares produciendo una competencia entre ellos. Tanto el calcio como el zinc tienen efectos fisiológicos y metabólicos importantes, ya que interactúan con el plomo, oponiéndose a los efectos tóxicos de éste, sin embargo, los bajos niveles de zinc por si solo, no están asociados con la hipertensión [26 y 41].

F. Sistema nervioso.

Los efectos del plomo en el S.N.C., involucran el cerebro, medula espinal, principales nervios motores y sensores [26 y 36], observándose un decremento en la velocidad de conducción nerviosa y debilidad muscular [23]. El plomo en SNC presenta un mecanismo triple:

- a) Acción directa sobre el tejido cerebral.
- b) Acción sobre sistema vascular cerebral que conduce a trastornos en la oxidación en la célula por la falta de oxígeno, daños en la barrera hematoencefálica los cuales permiten la penetración de mayor cantidad de líquido, dando como consecuencia edema cerebral por lo tanto muerte neuronal [26].

- c) El cerebro ya dañado, produce efectos secundarios en órganos vitales como hígado y riñón [26].

El plomo inorgánico, produce efectos en la actividad colinérgica del nervio, reemplazando competitivamente al calcio en los sitios presinápticos de estas células, afectando la liberación de acetil colina y la ruptura de colina [24].

4.3.6. CARCINOGENICIDAD Y TERATOGENICIDAD

Se ha informado de resultados preliminares de un estudio de mortalidad en trabajadores expuestos al tetraetilo de plomo, el cual indica un aumento de diez veces más la presencia de mieloma múltiple [43], así como aberraciones cromosómicas [23].

En animales se han observado síntomas como convulsiones, temblores e hipoactividad, además de graves daños a nivel renal como neoplasmas renales [23 y 68].

4.3.7. TRATAMIENTO

El método más efectivo para remover el plomo es mediante la administración parenteral de un agente quelante^B. Los fármacos más usados son: etilen diamino tetra acetato de calcio (EDTA) dimercaptopropanol y D - penicilamina (PCA) [23, 24 y 58].

Los niveles de absorción de plomo decrecen a medida que incrementan los niveles de calcio, y viceversa [58], ya que el plomo puede precipitar en forma de carbonatos [92].

4.4.

p - NITRO ANIZOL

Metoxinitrobenzeno, nitrofenil metil eter, 4 - nitro anizol; tiene un peso molecular de 153.13; una densidad de 1.233; funde a 54°C, y ebulle a 260 - 274°C. Es insoluble en agua, soluble en alcohol, éter y éter de petróleo caliente. Se usa como o - isómero de colorantes intermediarios y en síntesis orgánica [87].

^B Un agente quelante es una sustancia que tiene posibilidad de enlazar principalmente ciertos iones metálicos polivalentes, en forma relativamente selectiva, con lo cual estos pierden su actividad biológica. Tal es el caso del quelato formado por EDTA con Pb⁺² que es eliminado fácilmente por el riñón [53].

Isómero de o - nitrofenol; cristales de incoloro a amarillo, algo dulce con sabor picante, tiene una densidad de 1.27, funde de 113 a 114°C, es altamente sublimable, ligeramente soluble en agua fría, soluble en alcohol, cloroformo, éter; únicamente soluble en mezclas hidroxialcalinas y carbonatos. DLso oral en ratones y ratas es de 467 y 616 mg/kg de peso respectivamente. Se utiliza en la manufactura de indicadores en solución alcalina al 0.1 %; es incoloro a pH 5.6 y amarillo a pH 7.6 [87].

Considerando que el principal objetivo de este estudio es demostrar que el *Limnodrilus hoffmeisteri* biotransforma los xenobióticos, se utilizó el p - Nitro anizol (PNA) como sustrato, ya que es un " sustrato modelo " para demostrar que diferentes organismos, en este caso el gusano, puede O - desmetilar al PNA y probablemente a otros compuestos, como ácidos fenólicos. La utilidad de la O - desmetilasa es que permite demostrar en primer término la presencia del Sistema Mixto de Oxidación (FMO), además de que el metabolito oxidado producido por esta (fig. D - 2) es fácil de evaluar, es aplicable a muchos xenobióticos que sufren O - desmetilación como es el caso de la brucina, alcaloides, etc. La sensibilidad de la enzima es determinada por la velocidad de desmetilación del PNA [48].

MATERIAL

Y

METODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Como organismo de experimentación se utilizaron unos invertebrados acuáticos conocidos como *Limnodrilus hoffmeisteri*, cultivados en el Laboratorio de Toxicología Acuática de la sección de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

5.2. MATERIAL QUÍMICO

- Acido tricloro acético 30 % (p/v) (J. T. Baker)
- Albúmina de suero bovino estándar 1 mg/mL. (Sigma)
- Buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.4 (J. T. Baker)
- Hidróxido de sodio 2 N (J. T. Baker)
- Reactivo de Bradford [80]
- Solución hidroalcohólica (40 : 60) de p - Nitro anizol 11.7 mg/mL. (Merck)
- Solución hidroalcohólica (40 : 60) de p - Nitro fenol 7×10^{-3} mg/mL. (50.687 nmol/mL.) (Merck)
- Solución de melaza al 5 %
- Solución de Nitrato de plomo 0.1 ppm de plomo (J. T. Baker)
- Solución de Nitrato de plomo 0.5 ppm de plomo (J. T. Baker)

5.3. EQUIPO DE LABORATORIO

- Balanza analítica Mettler H 10
- Balanza digital Brainweigh^o B 3000 D Ohaus
- Bombas de oxígeno
- Centrifuga refrigerada Hermle Z 360 K
- Espectrofotómetro DMS 90 (UV - visible)
- Homogenizado potter modelo S 63 C
- Material de vidrio
- pH metro Beckman ϕ 10

5.4. ESTANDARIZACION DEL METODO.

El método para la biotransformación del PNA se llevó a cabo de acuerdo a Edelson, J. y McMullen, J. 1976; considerando las siguientes variantes:

- Se incubó a temperatura ambiente durante 150 minutos.
- Se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 15 minutos para precipitar proteínas.

Se realizaron cinco repeticiones por cada experimento.

5.5. CULTIVO DEL TUBIFICIDO

El tubificido fue colectado del lago de Texcoco (hábitat natural) y cultivado en el laboratorio en cristalizadores con arena y agua desionizada, provistos de oxigenación continua; se les alimentó con melaza al 5.0 % (p/v); a la cual se le indujo a fermentación aerobia (por medio de una bomba de oxígeno durante 48 horas) esta solución se mantuvo en congelación para evitar contaminación microbiana.

5.6. TRATAMIENTOS

Se distribuyeron 15 lotes al azar de tubi, de 3 gramos cada uno; éstos a su vez se subdividieron en 5 lotes para los tratamientos con 0.1 ppm de plomo, 5 más para los tratados con 0.5 ppm de plomo y 5 lotes control. Se les adicionó 50 mL. de la solución de plomo y 50 mL. de agua desionizada respectivamente. Pasadas las 48 horas con la oxigenación respectiva y en la obscuridad, se realizó la cuantificación de proteínas y la biotransformación de PNA, para posteriormente determinar la actividad enzimática y por consiguiente la inhibición de la misma.

5.7. CUANTIFICACION DE PROTEINAS (METODO DE BRADFORD)

La cuantificación de proteínas se realiza para determinar la actividad enzimática, que posee el organismo debido a su metabolismo.

A cinco lotes de 1.5 g de tubi cada uno, previamente lavados con agua desionizada y buffer de fosfatos, se le adicionó un mL del mismo buffer, se homogenizó y centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C; se tomaron 100 µL. del sobrenadante y se llevaron a la marca de aforo de 10 mL. con agua desionizada; a 100 µL. de esta solución, se le adicionaron 2.5 mL. de reactivo de Bradford⁹, después de cinco minutos se cuantificó espectrofotométricamente la cantidad de proteína a 595 nm [74].

5.8. EFECTO DEL PLOMO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS OXIDASAS DE FUNCION MIXTA (FMO) EN *L. hoffmeisteri*

Se distribuyeron 15 lotes de lombriz al azar de tres gramos cada uno, diez lotes se expusieron a dos dosis de plomo: 0.1 y 0.5 ppm, durante 48 horas; y cinco lotes fueron control terminado el período de intoxicación, se pesaron 1.5 g de tubi de cada lote previamente lavados con agua destilada y buffer de fosfatos 0.1 M

⁹ Reactivo de Bradford. 100 mg de azul brillante (azul de Coomassie) se disolvieron en 50 mL. de etanol al 95.0 %, en seguida se adicionaron 100 mL. de ácido fosfórico al 85.0 % y se llevó a 1000 mL. con gua destilada [74].

a pH 7.4, se adicionó un mL. del mismo buffer, se homogenizó con un homogenizador potter modelo S 63 C, enseguida se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una centrifuga refrigerada Hernal Z 360 K. La reacción se inició incubando el sobrenadante con diferentes cantidades de p - Nitro anizol (consultar tabla 1) a temperatura ambiente durante 150 minutos; la reacción se detuvo adicionando un mL. de ácido tricloro acético al 30 %, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, para precipitar proteínas; se le adicionaron dos mL. de hidróxido de sodio 2 N al sobrenadante y finalmente se determinó el p - Nitro fenol producido espectrofotométricamente a 400 nm [32].

5.9. TRATAMIENTO ESTADISTICO

En las diferentes determinaciones efectuadas, se obtuvieron las medias, las desviaciones estándar y los errores estándar de cada grupo (cinco repeticiones para cada lote en cada concentración considerada), los resultados obtenidos de los diferentes grupos experimentales, fueron analizados por las pruebas de ANOVA y Duncan como diferencia de medias, tomando como valor significativo aquellos que presentaron $P < 0.01$ [89].

RESULTADOS

6.1. BIOTRANSFORMACION DEL p - NITRO ANIZOL EN *Limnodrilus hoffmeisteri*

En la tabla 1 se observa que la formación de p - Nitro fenol crece conforme aumenta la concentración de p - Nitro anizol en el sobrenadante de tubificido, que fue incubado con este sustrato; sin embargo, este incremento no es proporcional, ya que al graficar la actividad enzimática contra las diferentes concentraciones de p - Nitro anizol, se presenta un comportamiento asintótico a las concentraciones mayores (fig. E - 1), característico de reacciones enzimáticas; este comportamiento se corroboró al linealizar los valores por el método de Lineaweaver y Burk (fig. E - 2 y E - 3).

La biotransformación de PNA a PNF por el tubificido va de 8.75 a 20.23 nmoles, en los lotes control, presentando un incremento en la actividad enzimática de 57.38 hasta 132.57 nmoles de PNF/mg Proteína/g tejido/minuto, como se observa en la tabla 1, lo que representa un incremento superior al 50 % en la actividad de la O - desmetilasa.

TABLA 1.

EFFECTO DEL PLOMO SOBRE EL METABOLISMO
DEL P - NITRO ANIZOL EN *L. HOFFMEISTERI* (IN VITRO)

nmol de P N A	1/nmol de PNA (X 10 ⁻³)	TRATAMIENTOS CONC. DE Pb (ppm)	nmol DE PNF PRODUCIDO	ACTIVIDAD (nmol/mg p/ g T/min.)	1/ACTIVIDAD	Error std. (X 10 ⁻³)
382.02	2.61	Control	8.75	57.38	0.0174	± 2.60
		0.1	3.95	15.55	0.0642	± 0.92
		0.5	2.13	11.27	0.0887	± 0.70
764.05	1.30	Control	9.86	64.67	0.0154	± 1.74
		0.1	5.04	19.84	0.0503	± 1.60
		0.5	2.59	13.74	0.0727	± 1.06
1528.11	0.65	Control	11.26	73.85	0.0135	± 3.30
		0.1	6.15	24.22	0.0412	± 0.70
		0.5	3.84	20.33	0.0491	± 0.67
2293.17	0.43	Control	14.53	95.27	0.0104	± 2.78
		0.1	6.97	27.46	0.0364	± 1.40
		0.5	5.37	28.44	0.0351	± 0.58
3820.28	0.26	Control	20.23	132.57	0.0075	± 2.98
		0.1	9.80	38.57	0.0259	± 0.10
		0.5	6.95	36.80	0.0271	± 1.28

CADA VALOR ES LA REPLICAS DE CINCO EXPERIMENTOS.

± Es = ERROR ESTANDAR

PNF = PARA NITRO FENOL

PNA = PARA NITRO ANIZOL

BIOTRANSFORMACION DEL PNA EN EL LIMNODRILUS HOFFMEISTERI (LOTES CONTROL)

Actividad (nmoles de PNF/mg Prot./g tejido/min)

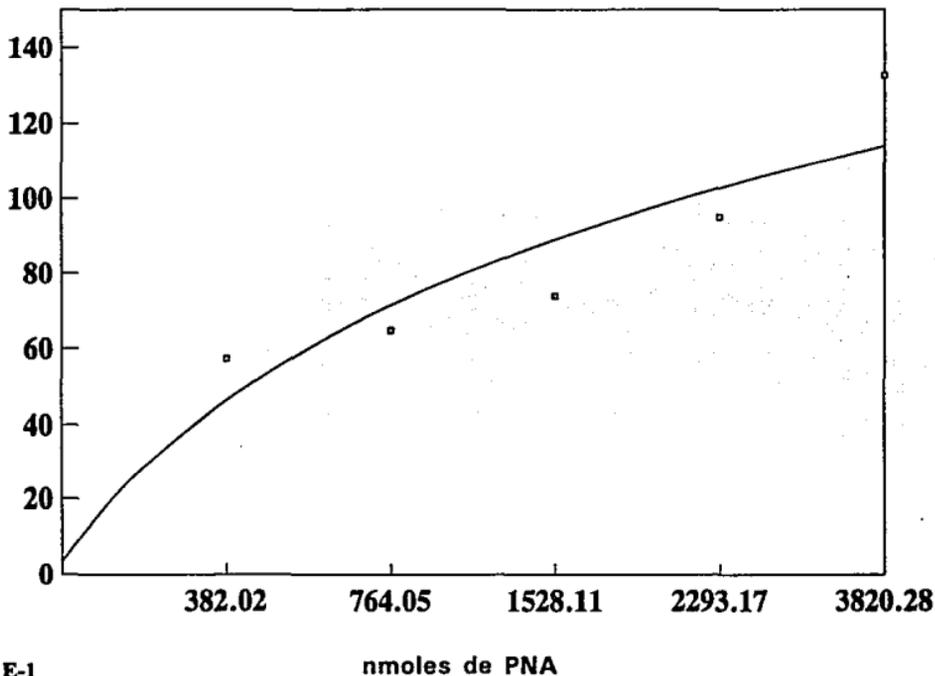


Figura: E-1

METABOLISMO DEL PNA EN LIMNODRILUS HOFFMEISTERI (LOTES CONTROL)

1/Actividad (1/nmoles de PNF/mg Prot./g tejido/min)

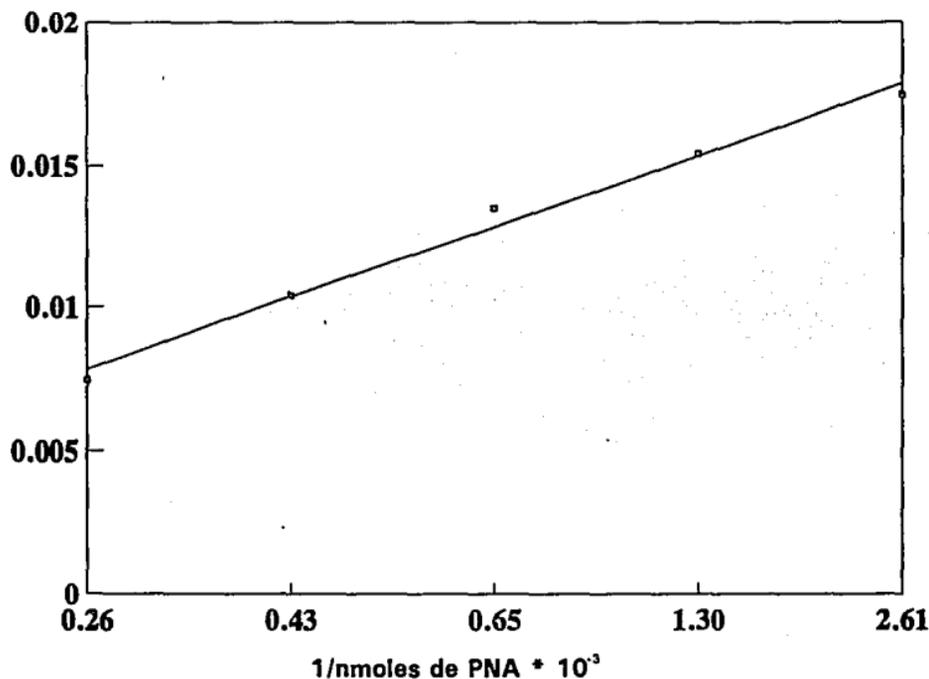
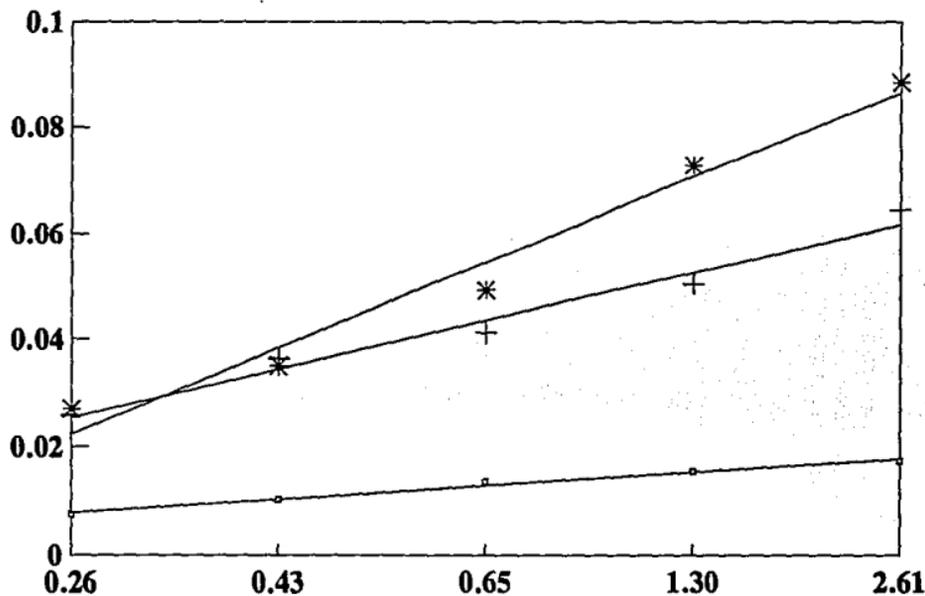


Figura: E-2

EFFECTO DEL PLOMO SOBRE EL METABOLISMO DEL PNA EN LIMNODRILUS HOFFMEISTERI

1/Actividad (1/nmoles de PNF/mg Prot./g tejido/min)



\square CONTROL + 0.1 ppm de Pb * 0.5 ppm de Pb
 $1/nmoles \text{ de PNA} \times 10^{-3}$

Figura: E-3

6.2. EFECTO DEL PLOMO SOBRE LA BIOTRANSFORMACION DEL p - NITRO ANIZOL

La actividad enzimática del tubificido, encargada de la biotransformación del p - Nitro anizol a p - Nitro fenol fue inhibida por el plomo en ambas concentraciones (0.1 y 0.5 ppm) (tabla 3 y fig. E - 6). Aun en los casos expuestos a 0.1 ppm de plomo (límite permisible en agua), se observó una inhibición de un 69.30 % en promedio, comparado con los lotes control ($P < 0.01$), registrándose una concentración máxima de 9.80 nmoles de PNF producido (tabla 1)

En el caso de los organismos expuestos a 0.5 ppm de plomo, la formación de PNF disminuyó significativamente en todas las concentraciones de PNA con respecto a los lotes control, ($P < 0.01$) habiendo una transformación máxima de 6.95 nmoles de PNF (tabla 1).

En términos generales, la actividad enzimática en los organismos intoxicados con 0.5 ppm de plomo presenta una inhibición considerablemente elevada, siendo esta de 74.79 % en promedio.

La velocidad máxima (V_{max}) de biotransformación del PNA descendió tanto en los organismos tratados con 0.1 como con 0.5 ppm de plomo, representando esto un 68.08 y 67.24 % respectivamente tomando como referencia al control, ($P < 0.01$) (fig. E - 5).

Así mismo, la afinidad de la O - desmetilasa disminuye a medida que aumenta la concentración de plomo siendo totalmente diferente en ambos tratamientos, presentando una diferencia de 128.82 % menor con respecto al control para los tratamientos con 0.1 ppm de plomo, no así en los expuestos a 0.5 ppm del metal, ya que la K_m aumentó importantemente hasta 928.75 nmoles de PNA, correspondiendo a un incremento del 233.02 %, careciendo por tanto de afinidad ($P < 0.01$) (tabla 2 y fig. E - 4).

TABLA 2.

EFFECTO DEL PLOMO SOBRE LA CINETICA DE BIOTRANSFORMACION

DEL P - NITRO ANIZOL

TRATAMIENTOS ppm de Pb.	Km (nmol PNA)	Vmax. (nmol/mg p/g t/m)
Control	400.06	110.66
0.1	515.36	35.32
0.5	928.75	36.25

EFFECTO DEL PLOMO SOBRE LA K_m DEL METABOLISMO DEL PNA EN LIMNODRILOS HOFFMEISTERI

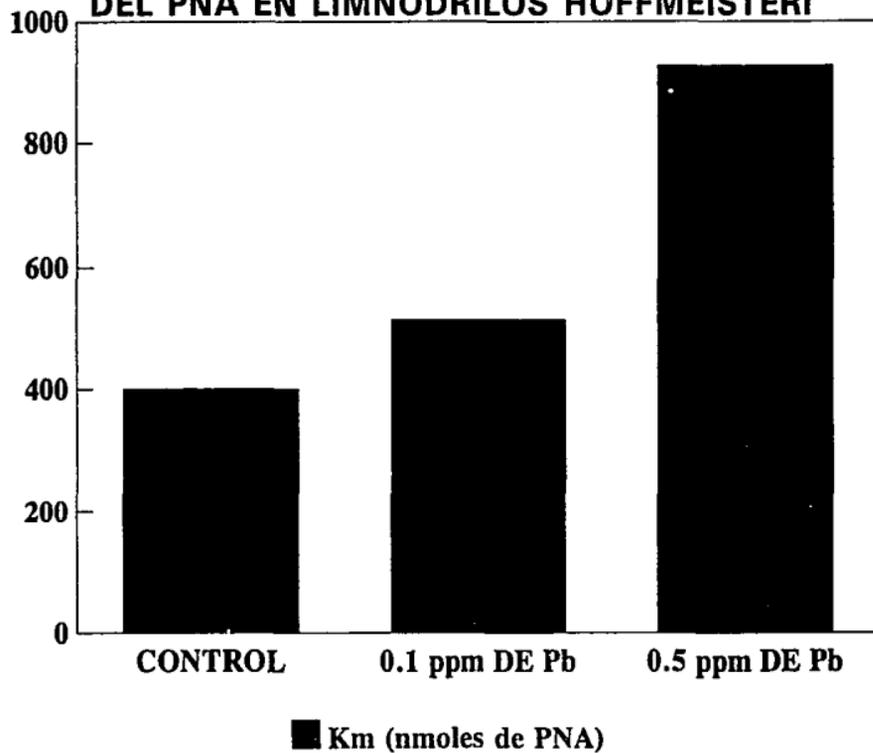


Figura: E-4

EFFECTO DEL PLOMO SOBRE LA Vmax DEL METABOLISMO DEL PNA EN LIMNODRILUS HOFFMEISTERI

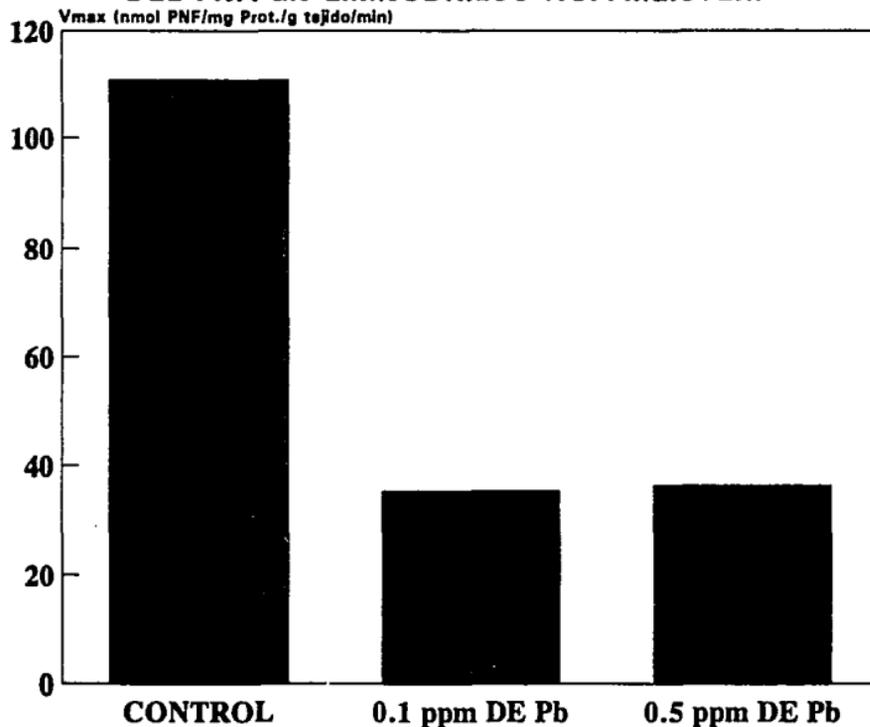


Figura: E-5

Vmax (nmol PNF/mg Prot./g tejido/min)

TABLA 3.

PORCENTAJE DE INHIBICION DE LA FUNCION MIXTA OXIDASA

nmol de PNA	0.1 ppm de Pb	0.5 ppm de Pb
382.0234	54.8511	88.3702
764.0566	37.6295	73.6822
1528.1133	13.0228	65.9036
2293.1700	52.0041	63.0164
3820.2839	75.0718	65.6190

EL PORCENTAJE DE INHIBICION, ESTA CALCULADO TOMANDO LA BIOTRANSFORMACION DE PNA A PNF DEL CONTROL COMO 100 %.

**% DE INHIBICION PRODUCIDA POR EL PLOMO SOBRE EL METABOLISMO
DEL PNA EN LIMNODRILUS HOFFMEISTERI**

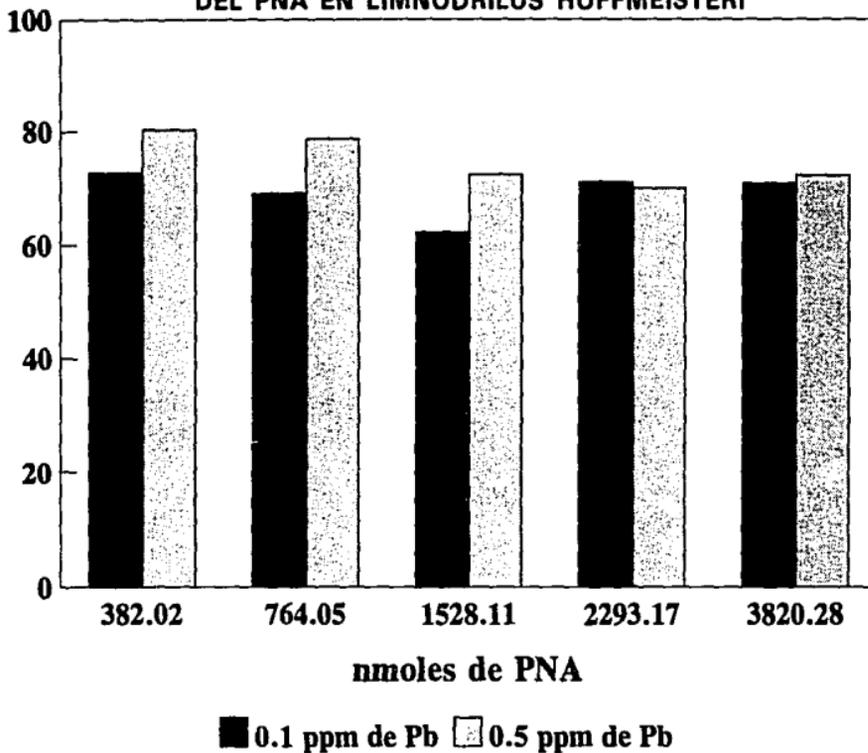


Figura: E-6

DISCUSSION

La biotransformación de los xenobióticos, comprende los cambios que estos sufren en su estructura química debidos a la acción de las enzimas del organismo [11], gracias a este mecanismo, se pueden generar compuestos más polares que los originales, lo que permitirá que la permanencia de esos compuestos extraños, en algunos casos sea más corta y en otros, aumente su vida media en el organismo. La duración e intensidad de muchos xenobióticos, depende de la actividad de la FMO, localizada en la fracción microsomal del homogenizado [5]; es necesario conocer la capacidad de este sistema para detoxificar o limpiar un cuerpo de agua, ya que así se podrá determinar la frecuencia de eliminación de sustancias nocivas en efluentes acuáticos.

En este estudio, se demostró que el *Limnodrilus hoffmeisteri*, lombriz acuática que bioacumula metales pesados, contiene la O - desmetilasa, ya que biotransforma el PNA (sustrato) en PNF. Esta O - desmetilación comprueba que este organismo contiene la FMO, ya que el PNA se ha utilizado en diferentes organismos como *E. coli*, para evidenciar la presencia de citocromos P₄₅₀ [32]; otro resultado que apoya la existencia de este sistema metabólico en *L. hoffmeisteri* es el aumento en la concentración de PNF en el medio de incubación a medida que se incrementa la concentración del sustrato como se observa en la fig. E - 1 y E - 2, correspondientes a la tabla 1.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Es importante mencionar que en la cinética de biotransformación llevada a cabo en esta investigación, a concentraciones muy altas de PNA, éste inhibe su propia conversión a PNF como se observa a 3820.28 nmoles, donde la O - desmetilasa unicamente biotransformó 0.52 %, a diferencia de la concentración de 382.02 nmoles habiendo una biotransformación de 2.29 % (tabla 1). Estos resultados indican que la FMO del tubi es saturable, como se ha demostrado con este mismo sustrato pero en diferentes organismos [32], los cuales tienen un comportamiento de cinética enzimática de acuerdo al propuesto por Michaelis - Menten la cual menciona que la combinación simple entre un sustrato que reacciona con una enzima produce posteriormente un complejo Enzima - Sustrato [10 y 39].

Un parámetro enzimático importante de la velocidad de reacción, es la llamada constante de Michaelis - Menten (K_M), cuyo valor es igual a la concentración del sustrato en el momento en que la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima [39]; por lo tanto, si el valor de la K_M fue de 400.06 nmoles de PNA, en el caso de los lotes control, entonces la velocidad de transformación del mismo a esa concentración, corresponde a 55.33 nmoles de PNF/mg Proteína/g tejido/minuto, demostrando así que el tubificido en estudio es capaz de biotransformar compuestos que presentan grupos metoxi, entre los que se encuentran hidrocarburos policíclicos, alcaloides y un sin número de compuestos que pueden llegar a diferentes mantos acuíferos. Se han reportado evidencias de que en sustratos como la acetofenitidina y la codeína se

muestra el mismo comportamiento, siendo estos biotransformados por el mismo sistema que el PNA [93].

Con estos resultados se muestra que el tubificido presenta el sistema de biotransformación de xenobióticos, explicando así la elevada tolerancia del gusano a grandes cantidades de contaminantes, ya que inclusive se considera como un buen indicador de contaminación acuática [8, 12 y 59]; es probable que uno de los mecanismos responsables de la resistencia a compuestos como plaguicidas, hidrocarburos, herbicidas, metales pesados y materia orgánica [80] sea, que el *Limnodrilus hoffmeisteri* biodegrada a los xenobióticos a sustancias hidrosolubles, facilitando así su eliminación.

Los organismos acuáticos que contienen FMO y son expuestos continuamente a la acción de contaminantes, pueden aumentar o prolongar el efecto tóxico que producen estos compuestos por la inhibición del complejo de monooxidasas; por lo que es importante caracterizar este tipo de inhibiciones y de esta manera determinar la permanencia de un xenobiótico en un cuerpo de agua, así como los antagonismos y agonismos que se pueden presentar al encontrarse un sin número de contaminantes en dicho sistema acuático [93].

Debido a la baja especificidad de sustratos del sistema microsómico P₄₅₀, muchos xenobióticos compiten entre sí por la oxidación; así cualquier sustrato es capaz de inhibir el metabolismo de otro. Se ha encontrado que para un xenobiótico

especifico, la K_M (determinada por la inhibición producida en el metabolismo), es diferente a la K_I^{10} (determinada por la inhibición producida en el metabolismo de otro xenobiótico), implicando que su acción inhibitoria se debe a la ocupación del sitio para el sustrato dado [10 y 91]; en la tabla 2, podemos observar que la K_M obtenida en los organismos expuestos a 0.1 y 0.5 ppm de plomo, fue de 515.36 y 928.75 nmoles de PNA respectivamente, valores diferentes a los encontrados en los testigos (400.06 nmoles de PNA). Ahora bien, si analizamos el valor de la V_{Mx} . se puede considerar que el plomo actúa también sobre otro sitio activo, lo que sugiere que el metal produce una inhibición incompetitiva; esta es un tipo de inhibición relativamente rara, donde la combinación de xenobióticos solo se da con el complejo enzima - sustrato (no con la enzima libre, como ocurre con la inhibición no competitiva) en un sitio diferente de la primera, con la cual, el sustrato es combinado [46]; (tabla 2 y figura E - 3) como hemos visto, el plomo produce un efecto de inhibición significativamente importante, lo cual, daña las transformaciones de los xenobióticos en general, y por consiguiente su permanencia en el tubificio.

Estudios de laboratorio realizados en diversas especies de animales como roedores, insectos (moscas), entre otros; sugieren que una intoxicación aguda con metales pesados como el

¹⁰ K_I = Constante de Inhibición.

plomo está asociada a una depresión significativa del citocromo P₄₅₀ contenido en los microsomas [4, 43, 52, 75 y 81] y demás enzimas involucradas en la biosíntesis del grupo hemo como son: el ácido δ - amino levulínico deshidratasa (ALA - D), la oxidasa del coproporfirinógeno y la ferroquelatasa [42 y 66], lo que puede disminuir la capacidad de biotransformación de xenobióticos en los organismos intoxicados [5].

A 382.02 nmoles de PNA, en los tratamientos con 0.5 ppm de plomo, el efecto inhibitorio sobre la O - desmetilasa del tubificido es muy elevado, lo cual puede deberse a que el sustrato libre es escaso, por lo que la enzima no tiene la capacidad de biotransformarlo. Existen evidencias de que algunos inhibidores como la imipramina disminuye su propio metabolismo debido a que decrece la concentración libre de este fármaco [39].

En todo estudio de inhibición de biotransformación de xenobióticos es importante determinar como influye la concentración del inhibidor en dicho efecto, ya que esto facilitará establecer el nivel de saturación del sistema, la resistencia del organismo a esos compuestos extraños y la bioacumulación, entre otros. En el presente trabajo, se observó, que a medida que asciende la concentración del plomo, aumenta a su vez la inhibición de la O - desmetilasa (tabla 3), Es importante mencionar que el límite permisible de este metal en agua es de 0.1 ppm, lo que indica que aún cuando los efluentes acuáticos presenten esta concentración, éstos pueden causar grave

daño, quizás no la muerte, pero si participar en la bioacumulación no sólo del plomo, sino de otros contaminantes que utilicen esta misma vía de detoxificación, lo que repercutirá en el crecimiento y producción de esta especie, que es componente de algunas cadenas tróficas.

En general, podemos sugerir que el plomo inhibe de manera importante el sistema de biotransformación del tubificido en ambas concentraciones, ya que se encontró un promedio de 60.30 y 74.79 % de inhibición para las concentraciones de 0.1 y 0.5 ppm respectivamente; estos valores, se consideran elevados, sobre todo el correspondiente a 0.5 ppm, ya que otros compuestos orgánicos como la menadiona, producen una inhibición máxima de 59.8 % sobre el metabolismo de la anilina [35].

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir lo siguiente:

- 1.- El *Limnodrilus hoffmeisteri* contiene el sistema Función Mixta Oxidasa (F.M.O.), a lo cual se le puede atribuir su gran tolerancia a concentraciones elevadas de todo tipo de contaminantes.
- 2.- El oligoqueto en estudio, tiene la capacidad de biotransformar el p - Nitro anizol a p - Nitro fenol lo que sugiere que este organismo contiene una O - desmetilasa que cataliza la reacción.
- 3.- Los datos obtenidos sugieren que una exposición a plomo inhibe significativamente el sistema de biotransformación de xenobióticos lo cual puede contribuir a aumentar y prologar las respuestas tóxicas producidas no sólo por este metal, sino por otros contaminantes, aunque existen algunos compuestos que activan sus efectos únicamente al ser biotransformados, por lo que su toxicidad se ve disminuida.
- 4.- El efecto inhibitorio del plomo sobre los componentes del Sistema Mixto de Oxidación es dependiente de la concentración del metal.

- 5.- El efecto inhibitorio más relevante fue a la concentración de 0.5 ppm de plomo.
- 6.- La inhibición que produce el plomo sobre la F. M. O. es una inhibición incompetitiva, ya que tanto la K_m como la V_{max} son diferentes.
- 7.- Es necesario realizar más estudios sobre estos organismos a corto, mediano y largo plazo, debido a que podrían ser utilizados como posibles elementos de control de la contaminación.
- 8.- A la concentración considerada como límite permisible de plomo en agua (0.1 ppm), se presenta una inhibición significativa sobre el sistema de biotransformación de xenobióticos.
- 9.- De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se sugiere que este límite deberá ser cambiado por uno menor, para lo que se deben realizar más estudios, y así determinar el límite correcto.

RESUMEN

El agua representa uno de nuestros más preciados recursos, pues además de ser indispensable para todos los seres vivos y de formar parte de la materia viva, es utilizada en casi todas las actividades humanas [91 y 92].

Debido al abuso de esta riqueza, utilizándola como destino de toda clase de desechos, su capacidad para propiciar la vida se encuentra en peligro [61 y 92].

Existen diversos mecanismos propuestos para explicar como un compuesto tóxico puede inhibir la acción de células e incluso llegar a destruirlas [95]. Dentro de las actividades que pueden presentar los compuestos tóxicos sobre los organismos incluyen: daño a nivel genético, alteración de membranas celulares, desplazar cationes (Na^+ y Ca^{2+}) de sitios de adsorción presentes en la célula, bloqueo de quimiorreceptores y acción sobre enzimas [64]. Si un compuesto tóxico es de difícil metabolismo y eliminación, este tenderá a acumularse de manera exponencial al paso entre niveles tróficos sucesivos [72].

Los metales pesados, entre los que destaca el plomo, tienen como característica la elevada toxicidad de sus sales solubles, las cuales pueden ser acumuladas por los organismos que las han absorbido; estos, a su vez, pueden entrar en la cadena alimenticia

que termina en el hombre, con sus trágicas secuelas como el saturnismo, enfermedad que engloba trastornos nerviosos, digestivos y renales entre otros [92].

Se han realizado algunos estudios con respecto al metabolismo de xenobióticos en organismos acuáticos, sin embargo, es necesario hacer más estudios al respecto, partiendo de la duración e intensidad de efectos tóxicos de muchos contaminantes ampliamente determinados, que son metabolizados en el hidrobionte por enzimas de FMO.

El *Limnodrilus hoffmeisteri* es componente de diferentes cadenas tróficas, por lo que en este trabajo se investigó su capacidad de metabolizar el plomo utilizando como sustrato el p - Nitro anizol.

Diez lotes del tubificido dispuestos al azar fueron expuestos a diferentes concentraciones de plomo por un periodo de 48 horas, posteriormente se cuantificó el p - Nitro fenol producido espectrofotométricamente, obteniéndose como resultado que el *L. hoffmeisteri*, presenta el sistema de detoxificación FMO; la biotransformación del PNA fue inhibida por el plomo no importando la concentración empleada, por lo que el límite permisible de plomo en agua deberá ser cambiado.

REFERENCIAS

- 1.- Aguilar, E. (1984). Correlación Estadística entre deshidratasa del Acido Delta Aminolevulinico y el Plomo Sanguineo en Poblaciones Humanas Expuestas al Plomo, Arch. Invest. Med., 15, 93.
- 2.- Alabaster, J. S. y Lloyd, (1982). Water quality criteria for freshwater fish, Segunda edición, Butterworth Scientific, London, 243 - 253.
- 3.- Altmann, L. et al. (1993). Impairment of long - term potentiation and learning following chronic lead exposure. Toxicology Letters, 66. 105 -112.
- 4.- Alvarez, A. P. et al. (1972). Lead and methyl mercury: Effects of acute exposure on cytochrome P₄₅₀ and the mixed function oxidase system in the liver. Journal of Experimental Medicine, 135: 1406 - 1409.
- 5.- Alvarez, A. P. (1975). Lead intoxication: Effects on Cytochrome P₄₅₀ - Mediated Hepatic Oxidation. Clin. Pharmacol. Ther, 19, 183 - 190.

- 6.- Amitai, Y. (1986). Residential Deleading: Effects on the Blood Lead Levels of Lead - Poisoned Children, Pediatrics, 88 (5): 893 - 897.
- 7.- Anderson, R. L. (1980). Chironomidae toxicity testes, Biological background and procedures, En: Bulkema, A. L. Jr. y Cairns, J. Jr. (eds.). Aquatic invertebrate bioassays, American Society for testing and materials. ASTM STP 715A, 70 - 80.
- 8.- Aston, R. J. (1973). Tubificids and water quality: A review. Environ. Pollut., 5: 1 - 10.1 - 10.
- 9.- Avram, G. M. et al. (1974). Principles of drug action: The basis Pharmacology John Wiley and Sons, Segunda edición, U. S. A. 242 - 292.
- 10.- Avram, G. M. et al. (1979). Farmacología. Limusa, México, 320 - 324.
- 11.- Banker, G. S. and Rhodes, C. T. (1990). Modern Pharmaceutics. Marcel Dekker, Inc., Segunda edición, New York, N. Y. 91 - 136.
- 12.- Barnes, R. D. (1977). Zoología de los Invertebrados, Interamericana, Tercera edición, México, D. F., 276 - 292.

- 13.- Benitez, B. (1980). La Patologia ambiental, contaminación termodinámica y salud. Ciencia y Desarrollo, 26 (93): 69 - 84.

- 14.- Bitton, G and Dutka, B. J. (1986). Introduction and Review of Microbial and Biochemical Toxicity Screening, Toxicity Testing Using Microorganisms. CRC Press. Boca Raton, Florida, (1): 1 - 8.

- 15.- Blaise, Ch. (1991). Microbiotesti in Aquatic Ecotoxicology: Characterictics, Utility and Prospects, Enviromental Toxicology and Water Quality: An International Journal, 6, 145 - 155.

- 16.- Brinkhurst, R. O. and Cook, D. G. (1980). Aquatic oligochaete Biology. Postscript, Plenum Publishing Corporation, 507 - 519.

- 17.- Bryan, G. W. (1979). Bioaccumulation of marine pollutants. Phil. Trans. R. Soc. Lond., 286: 483 - 505.

- 18.- Burgos, R. (986). Particulas Suspendidas, Información Científica y Tecnológica, 8, 115, 22 - 23.

- 19.- Burns, R. G. (1982). Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. Soft Biol. Biochem. 14: 423.

- 20.- Cairns, J. Jr., Heath, A. G. y Parker, B. C. (1975). The effects of temperature upon the toxicity of chemical to aquatic organisms, *Hydrbiol.*, 47, 1, 135 - 171.
- 21.- Cano, V. F. (1991). Alteraciones en el aparato respiratorio por algunos contaminantes ambientales. *Revista de la Facultad de Medicina, U.N.A.M.* 34: 1.
- 22.- Capuzzo, J. M. and Moore, M. N. (1988). Effects of toxic chemicals in the marine enviroment: predictions of impacts from laboratory studies, *Aquat. Toxicol.*, 11, 303 - 311.
- 23.- Carson, B. L., Ellis III, H. V. y McCann, J. L. (1991). *Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans*, Lewis Publishers Inc. tercera impresión, Michigan U. S. A., 7, 128 - 133.
- 24.- Corey, O. G. (1989). Serie Vigilancia, Plomo, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Metepec, México.
- 25.- Chapman, P. M. y Brinkhurst, R. O. (1984). Lethal and sublethal tolerance of aquatic ologochaetes with reference to their use as a biotic index of pollution, *Hydrobiological*, 115, 139 - 144.

- 26.- Chiba, M. (1984). The in Vitro Effects of Zinc and Manganese on Delta Aminolevulinic Acid Dehydratase Activity Inhibited by Lead or Tin. Toxicology and Applied Pharmacology. 73: 388 - 394.
- 27.- Delves, H. T. (1984). Temporal stability of blood concentrations in adults exposed only to environmental lead. Human. Toxicol., 3: 279 - 288.
- 28.- Doroshkevich, V. (1977). Ecological features of tubificidae raised in effluent. Ilim Publishing House, Frunze, 17 - 19.
- 29.- Durand, G. (1965). Enzymes and soil. Rev. Ecol. Biol. Soil. 2: 141.
- 30.- Duvigneaud, P. (1978). La Síntesis Ecológica. Alhambra, Primera edición, Madrid España, 33.
- 31.- Ebel, R. (1981). Hepatic microsomal aniline p - Hydroxylase: Substrate inhibition by aniline. Drug Metabolism and Disposition, 9 (6): 578 - 579.
- 32.- Edelson, J. R. and McMullen, J.P. (1977). O - demethylation of p - Nitroanisole by *Escherichia coli*, The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 5 (2): 185 - 190.

- 33.- Fabregat, V. M. (1992). Evaluación del Plomo en Alimentos Marinos Enlatados, Tesis U.N.A.M., México, D. F.
- 34.- Falahi - Ardakani, A. (1984). Contamination of environment with heavy metals emitted from automotives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8: 152 - 161.
- 35.- Floreani, M. and Carpenedo, F. (1990). Inhibition of rat liver monooxygenase activities by 2 - Methyl - 1,4 - naphthoquinone (menadione). *Toxicology and applied Pharmacology*, 105: 333 - 339.
- 36.- Fulton, M. (1987). Influence of Blood Lead on the Ability and Attainment of Children in Edinburg. *The Lancet*, Saturday 30 May, 1221 - 1225.
- 38.- Gillette, J. R. (1963). Factors that affect the stimulation of the microsomal drug enzymes induced by foreign compounds. *Advance Enzyme Regulation*, 1: 215 - 223.
- 37.- Gillette, J. R. (1963). Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanisms. *Prog. Drug Pres.*, 6: 11 - 73.
- 39.- Goldstein, A. et al. (1974). Principles of drug action. Segunda edición, John Wiley and Sons, New York.

- 40.- González, J. S. (1992). Cuantificación de Arsénico, Cadmio, Mercurio y Plomo en Pescados y Mariscos por Espectrofotometría de Absorción Atómica, Tesis U.N.A.M., México, D. F.
- 41.- Harlam, W. R. (1985). Blood Lead and Blood Pressure. *Jama*, 253 (4): 530 - 534.
- 42.- Johansson, S. M. et al. (1979). Effects of inorganic lead on delta aminolevulinic acid dehydratase activity and hematological variables in the rainbow trout *Salmo gairdnerri*. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, 8, 419 - 431.
- 43.- Karen, B. (1988). Derivados alquilicos del plomo: Efectos sobre la salud y el ambiente. Centro panamericano de ecología humana y salud. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Metepec, México.
- 44.- Kemmer, F. N. (1988). Manual del Agua, su Naturaleza, Tratamiento y Aplicaciones, Nalco Chemical Company, McGraw Hill, Tomo I, México, D. F., 1988, Cap. 5 pp 1 - 26 y Cap. 6, pp 1 - 15.
- 45.- Khangarot, B. S. (1991). Toxicity of Metals to a Freshwater Tubificid Worm, *Tubifex tubifex* (Muller). *Environmental Contamination and Toxicol.*, 46, 906 - 912.

- 46.- Korolkavas, A. (1970). Essentials of molecular Pharmacology. Wiley - Interscience, Sao Paulo, Brasil. 290 - 306.
- 47.- Korpela, H. (1986). Lead and cadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta and amniotic membranes. Am. J. Obstet. Gynecol., 155: 1086 - 1089.
- 48.- LaDu, B. N., Mendel, H. G. y Way, E. L. (1972). Fundamentals of drug disposition. The Williams and Wilkins Company, U.S.A. 566.
- 49.- Landrigan, Ph. (1987). Pediatric lead poisoning in 1987: The silent epidemic continues. Pediatrics, 79 (4): 583.
- 50.- Laws, E. A. (1981). Aquatic pollution, Jhon Wiley and Sons, New York, U. S. A., 1 - 2 y 160 - 182.
- 51.- Lazin, M.N. and Leamer, M.A. (1986). The Life - Cycle and Productivity of *Tubifex tubifex*, (*Oligochaeta tubificidae*) in the Moat - Feeder Stream, Cardiff, South Wales, Holartic Ecology, 9, 185 - 192.
- 52.- Lee, S. T. y Scott, J. G. (1989). Microsomal Cytochrome P₄₅₀ Monooxygenases in the house fly (*Musca domestica* L.): Biochemical changes associated with pyrethroid

- resistance and phenobarbital induction. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 35, 1 - 10.
- 53.- Levine, R. R. (1983). *Pharmacology. Drug actions and reactions*. Tercera edición, Lettle, Brown and Co., Boston.
- 54.- Lynch, M. J. (1969). *Métodos de Laboratorio*. Interamericana, segunda edición. México, D. F. 1447.
- 55.- MacIorowski, A. F., Little, L. W. y Sims, J. L. (1980). *Bioassays procedures and results*, *Jou. WPCF*, 53, 6, 1930 - 1956.
- 56.- Mahaffey, K. R. et al. (1981). *Effects on toxicity and tissue metal concentrations in the rat*. *J. Lab. Clin. Med.*, 98 (4): 463 - 479.
- 57.- Malcoms, S. Gordon, et. al. (1984). *Fisiología Animal*, C.E.C.S.A. Tercera impresión, México, D. F., 48.F., 48.
- 58.- Manahan, S. E. (1992). *Toxicological Chemistry*. Lewis Publishers Inc. Segunda edición, 252 - 260.
- 59.- Marian, P. and Pandian, T. (1984). *Culture and Harvesting Techniques for *Tubifex tubifex**, *Aquaculture*, 42, 303 - 315.

- 60.- Martínez, J. F. (1990). Contaminación acuática y Toxicología. Zoología informa. E. N. C. B., Lab. de Ecotoxicología, Secc. de Acuicultura, Depto. de Zoología, 19 - 20, 1 - 48.
- 61.- Martínez J. F. (1991). La Importancia de los Bioensayos en la Evaluación de la Toxicidad Acuática. Universidad Ciencia y Tecnología, I (4): 37 - 44.
- 62.- Mason, C.F. (1984). Biología de la Contaminación del Agua Dulce. Alhambra, España, 120 - 122.
- 63.- Metelev, V. V., Kanaev, A. I. y Dzasokhova, N. G. (1983). Water Toxicology, Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, 162 y 216.
- 64.- Michal, G. (1978). Determination for Michaelis constants and inhibitor constants, in Principles of enzymatic analysis. Verlag. Chemic., Weinhem. 29.
- 65.- Molina, F. J. Diccionario Químico Comercial, Industrial y Farmacéutico, Editorial de Libros Científicos, México, D.F., 359.
- 66.- Moore, M. R. et al. (1980). Lead and heme biosynthesis. Lead Toxicology, Urban and Schwarzenberg, Baltimore. 79 - 119.

- 67.- Muy, R. M. (1985). Cuantificación de Plomo en Cabellos por Espectrofotometría de Absorción Atómica en dos Muestras Poblacionales, Tesis U.N.A.M., México, D. F.
- 68.- O. P. S. (1979). Criterios de Salud Ambiental 3 Plomo, Publicación Científica No. 388.
- 69.- Osorio, A. R. (1986). Enfermedad intersticial pulmonar asociada con la inhalación no ocupacional de polvos inorgánicos ambientales. Rev. Invest. Clín., 38: 59 - 63.
- 70.- Overstreet, R. M. (1988). Aquatic pollution problems, Southeastern, U. S. Coasts: Histopathological indicators, Aquat. Toxicol., 11, 213 - 239.
- 71.- Patrick, R. (1973). Use of Algas Especially Diatoms in the Assessment of Water Quality in Biological Methods for the Assessment of Water Quality, ASTM Phyladelphia, STP - 528.
- 72.- Rand, G. M. et al. (1980). Introduction to environmental toxicology. Elsevier North Holand Inc. Now York, 390 - 403.
- 73.- Rothernberg, S. J. (1989). Resultados Preliminares del Estudio Prospectivo del Plomo en la Ciudad de México. Temas Selectos en Reproducción Humana. Instituto Nacional de Perinatología. México, D. F.

- 74.- Russell, L. H. (1923). A Modification of the Folin - Wu method for Marking Protein - Free Blood Filtrates. J. Biol. Chem., 56, 469 - 471.
- 75.- Sasame, H. A. et al. (1968). Studies on the destruction of liver microsomal cytochrome P₄₅₀ by carbon tetrachloride administration. Biochemical Pharmacology, 17: 1759 - 1768.
- 76.- Sastry, K. V. (1979). Effects of lead nitrate on the activities of a few enzymes in the kidney and ovary of heteroneutes fissill. Springer Verlag, New York, Inc., 54 - 59.
- 77.- Sayer, M. and Pucsko, R. (1991). Trace Element Concentrations of Ollchaetes and Relations to Sediment Characteristics in the the Reservoir at Altenworth/Austria, Hydrobiologia, 226, 39 - 49.
- 78.- Segel, I. H. (1975). Enzyme Kinetics. John Wiley and Sons. New York.
- 79.- Skujins, J. (1976). Extracellular enzymes in soil. Crit. Rev. Microbiol. 383.
- 80.- Saith, E. M. (1985). Tubificid worms: Important Organisms in Aquatic Ecosystems. The American Biology Teacher, 17, 7, 41 - 415.

- 81.- Smith, J. H. et al. (1986). Induction of renal and hepatic mixed function oxidases in the hamster and guinea pig. *Toxicology*, 38: 209 - 218.
- 82.- Sprague, J. B. (1969). Measurement of pollutant toxicity to fish, I., Bioassay methods for acute toxicity, *Water Res.* 3, 793 - 821.
- 83.- Stewart, J. and Schultz - Baldes, M. (1976). Long Term Lead Accumulation in Abalone (*Haliotis sp.*) Fed on Lead treated Brown Algae *Egreria laevigata*. *Mar. Biol.*, 36, 19 - 24.
- 84.- Stocker, S. (1981). *Química ambiental: Contaminación del aire y del agua*. Blume, primera edición. Barcelona, España. 259 - 267.
- 85.- Suárez, B. G. (1991). Análisis de la Calidad Atmosférica en la Ciudad de México, *Información Científica y Tecnológica*, 13, 173, 31 - 36.
- 86.- Tabche, L. H. et al. (1990). Comparative study of toxic lead effects on gill and haemoglobin of Tilapia fish. *Journal of Applied Toxicology*, 10 (3): 193 195.

- 87.- The Merck Index, (1989). Merck and Co. Inc., eleventh edition, Centennial edition, Rahway, N.J. U.S.A., 851, 1042 y 1041.
- 88.- Thurston, R. V., Russo, R. C. y Vinogradov, G. A. (1981).
Ammonia toxicity to fish. Effect of pH on the toxicity of the un - ionized ammonia species. Environ. Sci. Technol., 15, (7). 837 - 840.
- 89.- Tsokos, M. (1987). Estadística para Biología y Ciencias de la Salud. Interamericana, McGraw - Hill, México, 304 - 310.
- 90.- Vega, G. S. (1985). Evaluación Epidemiológica de Riesgos Causados por Agentes Químicos Ambientales, Organización Panamericana de la Salud, O.M.S., México.
- 91.- Vidrio, H. y Rojas, J.A. Principios de Farmacología General, S.E.P. - U.N.A.M., 39 - 52.
- 92.- Villanueva, S. F. y Botello, A. V. (1992). Metales pesados en la zona costera del golfo de México y caribe mexicano: Una revision. Contaminación Ambiental, 8 (1): 47 - 61.
- 93.- Vizcaino, H. F. (1986). La contaminación en México. Fondo de Cultura Económica. 77 - 103.

- 94.- Waite, T.D. (1984). Principles of Water Quality. Academic Press, Orlando, 37 - 40 y 289.
- 95.- Wiederholm, T., Wiederholm, A. M. y Mibrink, G. (1987). Bulk sediment bioassays with five species of fresh - water oligochaetes, Water, Air and Soil Pollution, 36, 131 - 154.
- 96.- Williamson, R. J. and Johnson, D. G. (1981). A bacterial bioassay for assessment of wastewater quality. Water Res. 15, 383.