



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

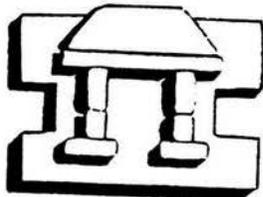
**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

BO 1309/97
Ej.1

**"ACUMULACION Y ELIMINACION DEL CADMIO
EN EL CARACOL DE JARDIN, *Helix aspersa* Muller,
1774".**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
CARLOS DE LA ROSA ROMERO

DIRECTORA DE TESIS: BIOL. MARIA EUGENIA HERES PULIDO



IZTACALA LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Con mucho cariño para mis padres, Ovidio Arnoldo de la Rosa Lazos y Catalina Romero Aguilar, y para mis hermanos Ovidio Arnoldo y José Luis, por ser una gran familia y esperando que siempre sigamos unidos.

Con todo mi amor, para Yuli, por llenar mi vida de cariño, felicidad y esperanza, y por su gran ayuda en la realización de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Lena Ruiz Azuara y a los integrantes del laboratorio de química inorgánica de la Facultad de química, por permitir el uso del horno (CEM-2000) y su apoyo técnico en la preparación de las muestras para su lectura en el espectrofotómetro.

A mi directora de tesis, Ma. Eugenia Heres Pulido, por su invaluable amistad y por su acertada orientación, tanto en la carrera como en la realización de esta tesis.

A los integrantes del Laboratorio de Genética Toxicológica de la ENEP Iztacala: Irma Elena Dueñas García, Ma. de Jesus Laura Castañeda Partida, Araceli Rosales Alarcón y Emma Jack, por su gran amistad que recordaré por siempre.

ÍNDICE

	Página
Índice	2
Resumen	3
Introducción	4
Antecedentes	8
Objetivos	10
Área de muestreo	11
Materiales y métodos.	12
Resultados	17
Análisis de resultados	27
Conclusiones	32
Apéndice	33
Referencias bibliográficas	36

RESUMEN

Se ha propuesto utilizar al caracol de jardín *Helix aspersa* para el monitoreo ambiental de metales, ya que pueden acumularlos en su hepatopáncreas. Sin embargo aún se desconoce mucho acerca de los procesos de acumulación y eliminación de estos elementos en poblaciones mexicanas. Por lo tanto, en este trabajo se propuso determinar si existe acumulación y eliminación de Cd en la glándula digestiva de organismos de esta especie, colectados en el municipio de Naucalpan, Edo. Mex. Se colectaron 110 caracoles y se distribuyeron en cuatro grupos: A1 y A2 para el experimento de acumulación y E1 y E2 para el experimento de eliminación. Al grupo A1 se le suministró alimento sin Cd y al grupo A2 alimento con Cd (12 ppm) durante un mes. A los grupos E1 y E2 se les proporcionó una dieta previa con Cd (12 ppm) durante 30 días. Al finalizar este tiempo, al grupo E1 se le siguió suministrando el metal, mientras que al grupo E2 se le proporcionó alimento sin Cd. Se extrajo el hepatopáncreas de los organismos del experimento de acumulación los días 0, 3, 10, 17, 24 y 31 y el hepatopáncreas del grupo del experimento de eliminación los días 2, 9, 16, 23 y 30 después de finalizar la dieta previa de 30 días con el metal. Se determinó la cantidad de alimento consumido diariamente y se colectaron las heces producidas durante siete días. Las muestras de hepatopáncreas y heces se digirieron en HNO_3 y se cuantificó el Cd por espectroforometría de absorción atómica. Se encontró un efecto de rechazo al alimento que contenía Cd. Se corroboró que esta especie es "macroconcentradora" de Cd. El porcentaje de asimilación de Cd en esta población fue de 55 %, lo que indica que *H. aspersa* es una vía importante de transporte de Cd hacia niveles tróficos superiores. Cuando el tiempo de exposición al metal fue prolongado se observó un mecanismo de eliminación eficiente que consiste en eliminar rápidamente el Cd en las heces en lugar de acumularlo. El tipo de eliminación, aunado al rechazo del alimento podrían dificultar el uso del caracol de jardín para monitoreo ambiental cuantitativo, pero debido a que acumula cantidades considerables de Cd en tiempos relativamente cortos podría ser útil para detectar sitios contaminados con este elemento aún cuando las cantidades en el ambiente fueran bajas.

INTRODUCCIÓN.

Debido al acelerado desarrollo de la industria y al crecimiento de la población se han incrementado los niveles de contaminación en todo el mundo. Uno de los tipos de contaminación es el aumento en la cantidad de "elementos traza", los cuales se definen en términos geológicos como aquellos que se hallan en una concentración de 1000 ppm o menos en la corteza terrestre. Dentro de estos elementos se encuentran los metales traza, los cuales se pueden clasificar en pesados (con densidades superiores a 5 g/cm^3) y ligeros (con densidades menores a 5 g/cm^3) (Duffus, 1983; Tron, 1993). La contaminación por metales pesados es uno de los temas que más preocupación causa ya que pueden producir daños muy graves a la salud, tanto en el ser humano como en el ambiente en general, de hecho, la mayoría de los organismos no se adaptan a ellos en corto tiempo, cuando éstos se encuentran en niveles excesivos (Hopkin, 1989).

Para evitar daños en el ambiente y en la salud de la población causados por la exposición prolongada a grandes cantidades de metales es necesario monitorearlos continuamente y una de las estrategias que se ha seguido es el biomonitoreo ambiental utilizando "bioacumuladores", es decir, organismos que tienen la capacidad de retener metales en sus tejidos (Beeby, 1995).

Las especies utilizadas con este fin deben cumplir ciertas características, que dependen de si se quiere evaluar el impacto biológico de algún metal sobre una comunidad o determinar la cantidad y distribución de dicho elemento dentro de alguna zona; las principales propiedades que deben presentar son: capacidad para acumular metales, ser abundantes, sésiles o con poco desplazamiento, fáciles de analizar en el laboratorio, y mostrar una constante relación entre la concentración del metal en los tejidos y los niveles en el ambiente (Beeby, 1995). Los moluscos son bioacumuladores que han sido ampliamente utilizados para monitoreo ambiental en zonas costeras de diferentes países (Rodríguez *et al*, 1992; De Gregori *et al*, 1992; Guerrero, 1993; Bordin *et al*, 1994, Cabrera *et al*, 1994 y De Gregori *et al*, 1994). Pero además, se ha planteado la posibilidad de utilizar al caracol de jardín *H. aspersa* para monitorear metales en ambientes terrestres. Estos organismos podrían ser una buena herramienta de monitoreo ambiental ya que presentan

poco desplazamiento, son fáciles de analizar y mantener en el laboratorio y son bioacumuladores (Coughtrey y Martin, 1976; Coughtrey y Martin, 1977; Howard, 1981; Beeby, 1985; Beeby y Richmond, 1987; Hopkin, 1989; Simkiss y Watkins, 1990; Watkins y Simkiss, 1990; Beeby, 1991; Simkiss y Watkins, 1991; Richmond y Beeby, 1992; Brooks *et al.* 1992).

H. aspersa es un molusco gasterópodo pulmonado que presenta una concha que mide entre 20 y 40 mm de altura y con un diámetro de 20 a 45 mm. En el cuerpo del caracol se pueden distinguir la cabeza, el pie, la masa visceral y el manto. Su aparato digestivo tiene forma de “U”, en la parte posterior de este se encuentra el esófago, seguido por un largo estómago que se continúa con el intestino que es curveado y está rodeado por la glándula digestiva o hepatopáncreas, formada por dos glóbulos de color oscuro (De Hita, 1987 ; Alexander, 1979).

El hepatopáncreas es un órgano muy importante para la digestión, además de ser el sitio principal en donde se acumulan los metales que entran al organismo (Coughtrey y Martin, 1976 ; Brooks *et al.* 1992; Laskowsky y Hopkin, 1996; Dallinger, *et al.* 1989; Ireland, 1988). Está formado por tres tipos celulares: las células fagocíticas que acumulan glucógeno y grasas; las células secretoras, que producen enzimas de digestión y las células de calcio que presentan gránulos intracelulares con grandes cantidades de calcio, magnesio y pirofosfatos (De Hita, 1987; Hopkin, 1989; Almendros y Porcel, 1992). En algunas ocasiones, en estos gránulos se encuentran concentraciones de metales tóxicos que podrían ser letales para otros organismos, por lo que se piensa que las células de calcio están ligadas a funciones de destoxificación (Howard *et al.*, 1981; Almendros y Porcel, 1992).

En estos moluscos se han encontrado proteínas de estrés que probablemente están ligadas a funciones de destoxificación de Cd llamadas metalotioneinas o “Cadmium-binding proteins”. Estas proteínas tienen un peso molecular de 22 Kb y se caracterizan por presentar afinidad por el Cd, alto contenido de cisteína y ausencia de aminoácidos

aromáticos. Solo se producen cuando los organismos están expuestos al metal (Dallinger *et al*, 1989; Hopkin, 1989 y Vallee y Ulmer, 1972).

Sin embargo aún no se conoce lo suficiente acerca de la bioacumulación de los metales en estos organismos como para asegurar que puedan ser utilizados para monitoreo ambiental.

La importancia de estudiar el comportamiento de los metales en estos organismos es que en México podrían usarse en un futuro para monitorear metales en zonas urbanas o rurales; también se podrían realizar investigaciones de ecotoxicología, estudiando el paso de los metales desde las plantas hacia los demás niveles tróficos ya que el caracol es un consumidor primario muy importante (Beeby, 1985), y además porque los caracoles son utilizados para consumo humano.

En este caso se estudió el comportamiento del cadmio en *H. aspersa* porque éste es un metal altamente tóxico para los seres vivos, y México es uno de los principales productores de Cd en Latinoamérica (Galvao, 1987). El Cd es un metal pesado que se encuentra en la corteza terrestre en una concentración de 0.1 - 0.25 ppm y en la atmósfera existe alrededor de 0.002 g de Cd/cm³ (Souza, 1996). Este metal no se encuentra en estado libre en la naturaleza y el sulfuro de Cd (*calamina*), único mineral de este elemento no es una fuente de extracción del metal. Casi todo el que se produce es obtenido como subproducto de la fundición de los minerales del zinc. El Cd se utiliza en la fabricación de baterías níquel-cadmio, como reactivo químico, en extinguidores, recubrimientos de reactores nucleares, cables eléctricos, celdas fotoeléctricas, colorantes de Cd, fusibles, joyería y soldadura (Galvao, 1987; Kim y Fergusson, 1994).

Al estudiar el comportamiento del Cd en *H. aspersa* se puede esperar que si a un grupo de caracoles se les suministra una fuente constante de cadmio, este elemento se acumulará principalmente en el hepatopáncreas (Coughtrey y Martin, 1976 y Brooks *et al*, 1992) en donde puede ser cuantificado. Por lo tanto, si la concentración de cadmio en éste órgano se mide por cierto periodo de tiempo, se podrá determinar la manera en que se bioacumula este metal. De la misma manera, si el cadmio se empieza a cuantificar después

de suspender una dieta con este metal, se podrá determinar si se presenta una eliminación de este elemento del hepatopáncreas, durante cierto tiempo.

ANTECEDENTES

Coughtrey y Martin (1976), estudiando el pie, el tracto reproductivo, la glándula de albúmina, la piel, el riñón, el hepatopáncreas y el músculo de *H. aspersa*, determinaron que el principal sitio de acumulación de plomo, zinc y cadmio es el hepatopáncreas.

Coughtrey y Martin (1977), encontraron diferencias significativas en la concentración de plomo, zinc, cadmio y cobre en organismos de *H. aspersa* de diferente tamaño y edad, por lo cual recomienda que si se quiere utilizar a esta especie para evaluar metales, es necesario trabajar con un mismo órgano y con individuos de talla, peso y edad similares.

Russell, *et al* (1981), estudiaron los efectos tóxicos del cadmio en individuos de *H. aspersa*, proporcionándoles diferentes concentraciones de cadmio durante 30 días. Encontraron que con 0-50 ppm de cadmio en el alimento, se observó un buen consumo del mismo en los organismos, pero en general conforme la concentración de Cd aumentó, el consumo de alimento disminuyó. A 50 ppm del metal se tuvo una mortalidad del 4%, mientras que con 25 ppm o menos se logró una sobrevivencia del 100%. A partir de 25 ppm se incrementa fuertemente la incidencia de dormancia (por lo tanto los organismos no se alimentan). También encontraron que por debajo de 10 ppm se acumuló sólo el 37.5% de cadmio mientras que a 25 ppm se retuvo el 59.0% del metal suministrado.

Dallinger y Wieser, (1984) estudiaron los patrones de acumulación y eliminación de Zn, Cu, Cd y Pb en *Helix pomatia*. Los organismos se alimentaron con lechuga adicionada con los metales por 32 días, posteriormente se les alimentó con lechuga sin metales durante 40-50 días. Encontraron que la glándula digestiva, y el intestino anterior acumulan cerca del 80 % de Cd. En los primeros días de ingestión del Cd la concentración de éste en las heces se incrementó drásticamente. Mencionan que en la glándula digestiva, el Cd no se eliminó aun después de suspender la dieta con el metal. La concentración inicial de Cd en el

hepatopáncreas fue de 80 $\mu\text{g/g}$ y se incrementó hasta 200 $\mu\text{g/g}$ aún después de ingerir alimento sin Cd.

Beeby y Richmond (1987), sugieren que este organismo puede ser utilizado como herramienta en el monitoreo ambiental de otro metal pesado, el plomo, ya que lo acumulan considerablemente y al alimentar a caracoles de zonas urbanas y rurales con este metal encontraron que presentan una adaptación a lugares muy contaminados.

Watkins y Simkiss, (1990), también proponen al caracol como una herramienta para el monitoreo de metales, pero sugieren que primero se deben estudiar los factores que intervienen en la acumulación y eliminación de estos elementos.

Rabitsch (1996), estudió el contenido de metales (Pb, Cd, Cu, y Zn) en varias especies de moluscos pulmonados en tres zonas diferentes en Austria. En el suelo encontró de 8.9 a 25 ppm de Cd. El hepatopáncreas registró la mayor cantidad de metales en todas las especies estudiadas con concentraciones de Cd de hasta 300 $\mu\text{g/g}$ (peso seco), y el órgano que le siguió con mayor concentración de metales fue el riñón, por lo cual infirió que ya que este órgano se utiliza como excretor, los organismos tienen otro mecanismo de detoxificación que consiste en eliminar los metales en vez de acumularlos. También determinó que los pulmonados terrestres pueden ser organismos monitores porque acumulan una buena cantidad de metales aunque existan pocos en el ambiente y recomienda que para este fin sea utilizado únicamente el hepatopáncreas y no todo el cuerpo del organismo.

Laskowski y Hopkin (1996), estudiaron diferentes concentraciones de metales (Zn, Cu, Pb y Cd) en *H. aspersa* con el fin de observar la transferencia de éstos hacia sus predadores. Encontraron que la eficiencia de acumulación fue de 68 - 72 % (mayor que la obtenida por Russell, 1981). Estos autores consideran a los caracoles como "macroconcentradores" de Cd, así mismo, encontraron que transfieren más Cd y Cu a las cadenas alimentarias que Zn y Pb. Por último determinaron que la concentración de Cd en la concha no excedió el 5% del encontrado en el resto del cuerpo.

OBJETIVOS

Objetivo principal:

Investigar los procesos de acumulación y eliminación del cadmio en una población del caracol de jardín, *Helix aspersa* Müller 1774.

Objetivos particulares:

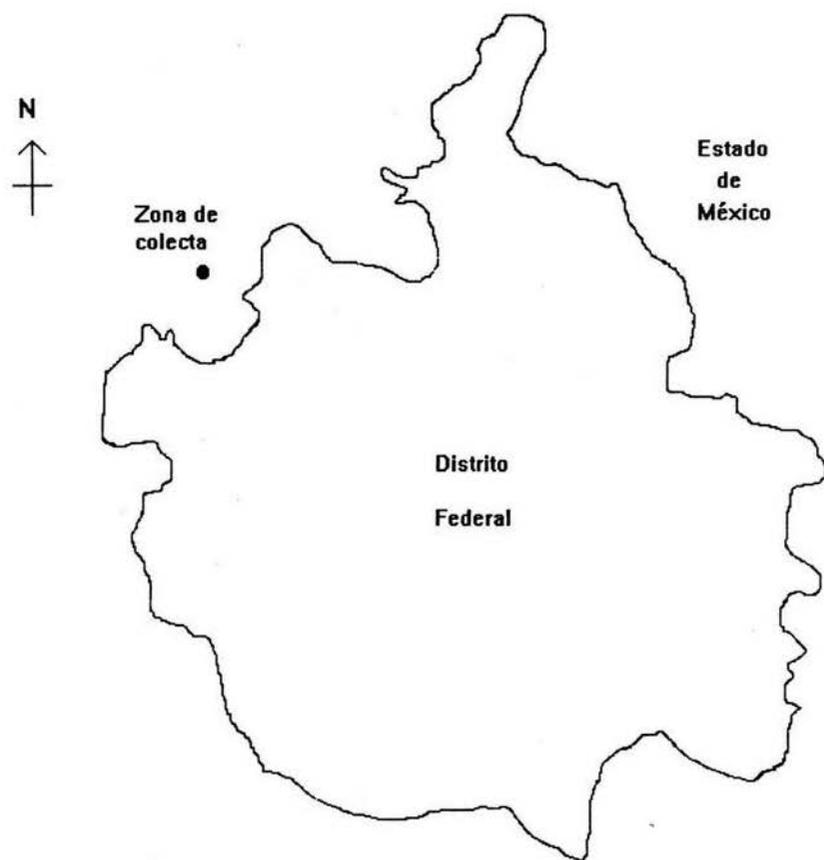
Medir el consumo de alimento del caracol mientras es sometido a una dieta con cadmio.

Demostrar la acumulación del cadmio en el hepatopáncreas del caracol de jardín, sometido a una dieta con CdCl_2 durante un mes.

Demostrar que existe eliminación del cadmio en el hepatopáncreas, después de suspender una dieta de 30 días con Cd.

Cuantificar la cantidad de cadmio excretado en las heces de estos moluscos, alimentados con dicho metal.

Figura - 1. La zona de colecta se ubicó en el parque de los remedios, municipio de Naucalpan de Juárez, Estado de México.



MATERIALES Y MÉTODOS

En el Parque de los Remedios ubicado en el municipio de Naucalpan, Edo. de México (Figura-1) se colectaron en el mes de noviembre de 1995, 110 caracoles adultos con un peso promedio de $4.62\text{g} \pm 1.3$, se colectaron de edad y talla similares con el fin de evitar los errores que implicaría comparar la cantidad de cadmio acumulado en organismos de diferente tamaño y edad (Coughtrey y Martin, 1977). El muestreo se realizó en un perímetro que no excedió los 500 m^2 , para asegurar que los organismos colectados pertenecieran a una misma población (Selander, 1975).

Los organismos se mantuvieron en cajas de acrílico durante por lo menos tres días sin proporcionarles alimento, con la finalidad de que eliminaran las heces y limpiaran su intestino.

Después de este lapso se seleccionaron aleatoriamente 10 caracoles y se sacrificaron congelándolos a -3°C para registrar la cantidad de Cd que contenían al iniciar el experimento.

Los 100 individuos restantes se colocaron de manera individual en frascos de vidrio de 166 cm^3 con tapadera, que contenía orificios para permitir el flujo de aire. A cada frasco se le asignó aleatoriamente un registro numérico el cual representó una unidad experimental de los diferentes grupos. Se mantuvieron en una cámara con un fotoperiodo de 14 horas luz a $2500 \pm 100\text{ lux}$ y 10 horas oscuridad, a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad promedio de 80%, ya que estas condiciones son las propicias para que los organismos se mantengan activos (Gomot, *et al.* 1982).

El alimento se preparó con agua desionizada (desionizador Bantan Holder; resina Barnstead), lechuga 19 % p/p (cultivada orgánicamente en Valle de Bravo, Edo. de México, para evitar en lo posible, la introducción de cadmio u otros químicos en el alimento), germen de trigo 5.5 % p/p y agar bacteriológico 3 % p/p (Bioxon, lote H5021 39J).

Se dividieron aleatoriamente en 2 grupos de 50 individuos, uno para el experimento de acumulación y el otro para el de eliminación. En ambos experimentos el alimento se cambió diariamente, registrando el peso del que no fue consumido, con el fin de saber la cantidad de alimento y metal que ingirió cada caracol por día.

El grupo utilizado para el experimento de acumulación se subdividió aleatoriamente en dos grupos de 25 organismos, uno de ellos fungió como control y el otro como tratamiento. Al grupo control (A1) se le proporcionó individualmente 1.4 g de alimento sin Cd durante 30 días, mientras que al grupo tratamiento (A2) se le dió la misma cantidad de alimento con 12 ppm de Cd durante el mismo período de tiempo. Esta concentración del metal se utilizó porque los organismos la ingieren y asimilan sin causarles daños letales (Rusell, 1981).

Para realizar el experimento de eliminación, a los 50 individuos restantes se les dió una dieta previa con 12 ppm de Cd durante 30 días, proporcionándoles 1.4 g de alimento diariamente. Después de este lapso se subdividieron aleatoriamente en dos grupos, al grupo E1 se le siguió suministrando el alimento con metal durante otros 30 días, mientras que al grupo E2 se le proporcionó alimento sin Cd por 30 días.

Diariamente se colectaron las heces de cada organismo, mismas que se almacenaron en bolsas de plástico a -3°C , de esta manera se determinó la cantidad de cadmio que se elimina por heces en el transcurso de una semana. En los organismos del experimento de eliminación, los parámetros anteriores se empezaron a medir después de los primeros 30 días de tratamiento.

Se seleccionaron aleatoriamente 5 individuos de cada grupo los días 3, 10, 17, 24 y 31 en el experimento de acumulación y los días 2, 9, 16, 23 y 30 después de finalizar la dieta previa de 30 días con el metal, en el experimento de eliminación, y se sacrificaron por congelación a -3°C .

Los caracoles sacrificados y las heces se almacenaron en bolsas de plástico en refrigeración hasta su posterior estudio de espectrofotometría de absorción atómica (EAA).

Para el estudio de EAA se descongelaron los individuos sacrificados y se les hizo una disección para extraer el hepatopáncreas.

Las heces y los hepatopáncreas se colocaron en pequeños trozos de papel filtro Whatman No. 541 (2 cm²) y se deshidrataron en horno (Paptlow, mod. WCE 550.5) a 80 °C y desecador hasta obtener su peso constante.

Las muestras se digirieron con 5 ml de HNO₃ concentrado (Baker, grado analítico, lote J36451) en horno de microondas (CEM. Mod. MS-2000). La digestión se llevó a cabo controlando la presión de la siguiente manera:

Tiempo (min)	5	5	5	5	5
Presión (PSI)	20	40	60	85	125

Se determinó la concentración de Cd en las muestras referidas con espectrofotómetro de absorción atómica (PYE-Unicam 192). El espectrofotómetro se calibró cada 12 muestras con los blancos (HNO₃) y curvas patrón preparadas con un estándar de Cd (Baker, lote J21612 1 mg Cd/ml). Para conocer el porcentaje de recuperación del metal se valoraron a lo largo de las mediciones, un total de 10 muestras de 0.2 g (peso húmedo) de material de referencia (Oyster 1566a, NIST) y además se aplicó el método de adición, determinando la concentración de Cd en 10 muestras preparadas con el estándar, de 1 y 2.5 µg/ml.

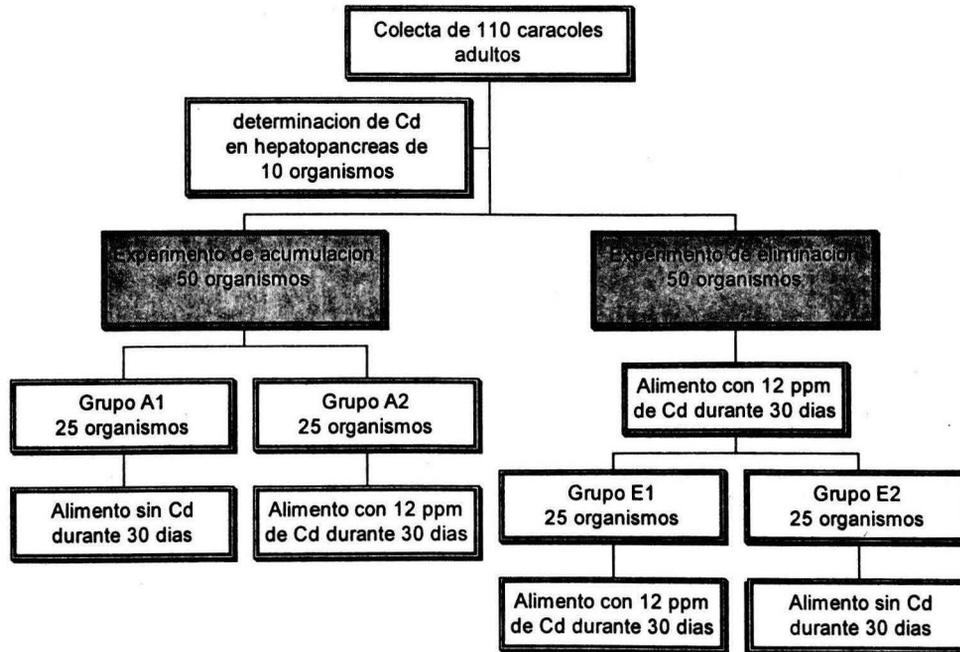
Se determinó la concentración de cadmio presente en 10 muestras de dos gramos (peso húmedo) del alimento con y sin cadmio, con la finalidad de verificar cuanto de ése metal se proporcionó a los organismos. También se determinó el cadmio en 10 muestras de 2 g de la lechuga, el agar y el germen de trigo utilizados para preparar el alimento, y en 10 muestras de 2 cm² del papel filtro utilizado en el experimento.

Se calculó el porcentaje de alimentación (% A) y de asimilación (% As) de los grupos A1 y A2.

$$(\% A) = \frac{\text{Alimento consumido}}{\text{Alimento suministrado}} \times 100 \quad (\text{Laskowski y Hopkin, 1996})$$

$$(\% As) = \frac{\text{Concentración de Cd en el hepatopáncreas}}{\text{Cantidad de Cd suministrado}} \times 100 \quad (\text{Beeby, 1995, Walker, 1990})$$

Los datos del alimento consumido, concentración de Cd en el hepatopáncreas y concentración de Cd en las heces de los cuatro grupos se analizaron estadísticamente aplicándoles regresión lineal simple (Programa: Statgraphics V.7.0) y las pendientes obtenidas se compararon por análisis de pendientes con "t" de Student (Zar, 1990).



RESULTADOS

En la figura 2 se muestra la concentración de Cd en el hepatopáncreas, que presentaron los organismos con la dieta que no contenía Cd (A1) y con la que sí contenía el metal (A2). Para el grupo A1 se observó una leve disminución en la concentración del metal en el hepatopáncreas, obteniéndose una pendiente (m) de -0.902 (Tabla I). Para el grupo A2 se encontró que el Cd se acumuló considerablemente en el hepatopáncreas ($m= 22.374$), y al realizar el análisis de pendientes entre estos dos grupos se determinó que son significativamente diferentes (apéndice 4).

En la figura 3 se esquematiza la concentración de Cd en las heces que presentaron los grupos A1 y A2. Los organismos del grupo A1 no eliminaron gran cantidad de Cd en las heces, pues la tasa de eliminación ($m= 0.06$) no aumentó durante el período de estudio, mientras que los individuos del grupo A2 excretaron una mayor cantidad de metal ($m= 1.806$) (Tabla I). Al comparar estas pendientes se determinó que son significativamente diferentes (apéndice 4).

La figura 4 representa el consumo de alimento de los grupos A1 y A2. Se encontró que los organismos del grupo A1 ingirieron en promedio 1.31g/día, y su tasa de alimentación fue constante ($m= -0.011$). En el grupo A2 la cantidad de alimento ingerido diariamente también fue constante ($m= -0.000126$) pero a diferencia del grupo A1 estos organismos consumían en promedio solo 0.223 g/día, es decir, seis veces menos alimento (Tablas I y III). Con el análisis de pendientes se determinó que que éstas fueron significativamente diferentes (apéndice 4).

En la figura 5 se muestra la concentración de Cd en el hepatopáncreas que presentó el grupo del experimento de eliminación que se alimentó con Cd por 60 días (E1) y al que se le suspendió la dieta previa de 30 días con el metal (E2). En el grupo E1, a partir del día 30 en que se inició la cuantificación del Cd en el hepatopáncreas y hasta el día 60, se observó una clara disminución de la cantidad de Cd en este órgano ($m= -12.951$). En el grupo E2,

también se observó un decremento en la cantidad de Cd en el hepatopáncreas ($m = -6.321$), cuando los organismos dejaron de ingerir el alimento con Cd (Tabla I). Al comparar estas pendientes se determinó que no eran significativamente diferentes (apéndice 4).

La figura 6 esquematiza la concentración de Cd en las heces en los grupos E1 y E2. En el grupo E1 la cantidad del metal eliminado en las heces aumentó considerablemente ($m = 16.556$) y en el E2 se presentó una disminución en la cantidad de Cd eliminado ($m = -2.857$) (Tabla I). El análisis de pendientes entre estos dos grupos demostró que fueron significativamente diferentes (apéndice 4).

En la figura 7 se representa la alimentación de los grupos E1 y E2. Los organismos del grupo E1 consumieron 0.064 g/día de alimento y su tasa de alimentación fue constante ($m = 0.0033$). El grupo E2, en promedio, se alimentó de 0.3 g/día y su tasa de alimentación también fue constante ($m = 0.017$) (Tablas I y III). Las pendientes de estos dos grupos son significativamente diferentes (apéndice 4).

El porcentaje de alimentación de los grupos A1 y A2 fue de 18 y 86 % respectivamente, y el porcentaje de asimilación fue de 55.1 y 54.7 % (Tabla II).

El porcentaje de recuperación obtenido con el material de referencia fue en promedio 98.6 %, y el del método de adición fue de 93.2 % y 96 % con soluciones de 1 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Apéndices 1 y 2).

Figura - 2. Resultados ajustados con regresión lineal, de la concentración de Cd en el hepatopáncreas, en los organismos del experimento de acumulación (grupo A1, alimentado sin Cd y grupo A2, alimentado con Cd).

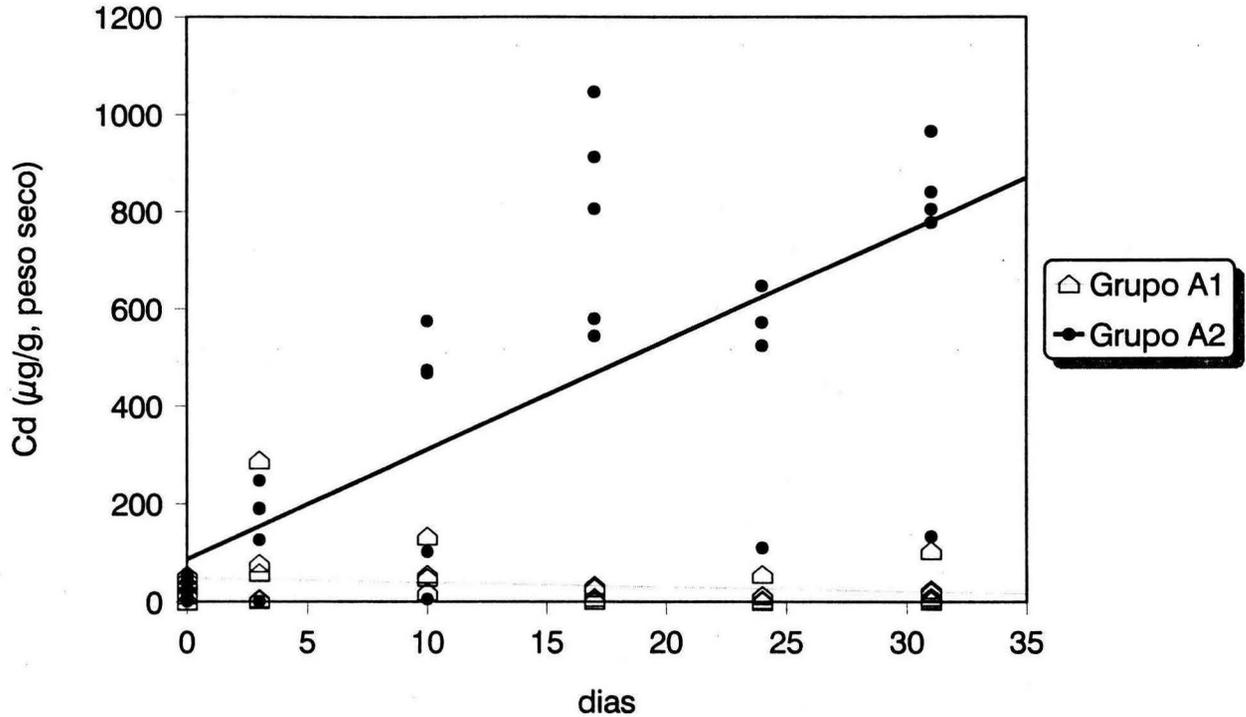


Figura - 3. Resultados ajustados con regresión lineal, de la concentración de Cd en las heces, en los organismos del experimento de acumulación (grupo A1, alimentados sin Cd y grupo A2, alimentados con Cd).

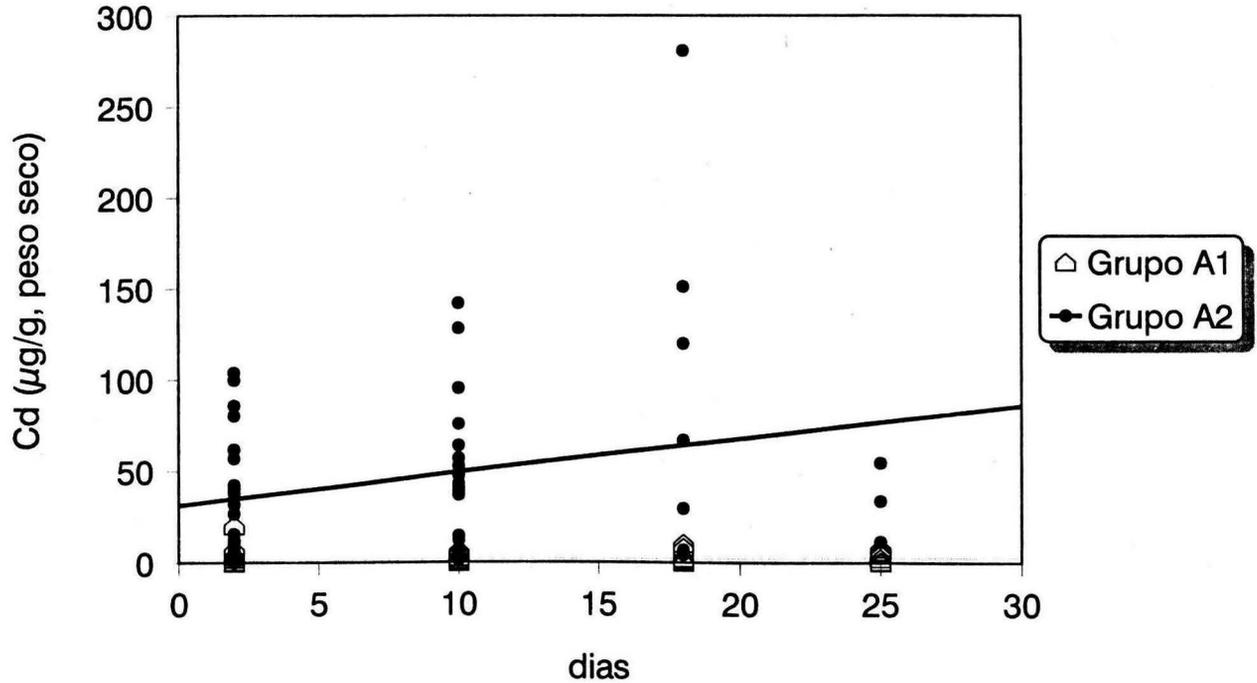


Figura - 4. Resultados ajustados con regresión lineal, de la alimentación, en los organismos del experimento de acumulación (grupo A1, alimentado sin Cd y grupo A2, alimentado con Cd).

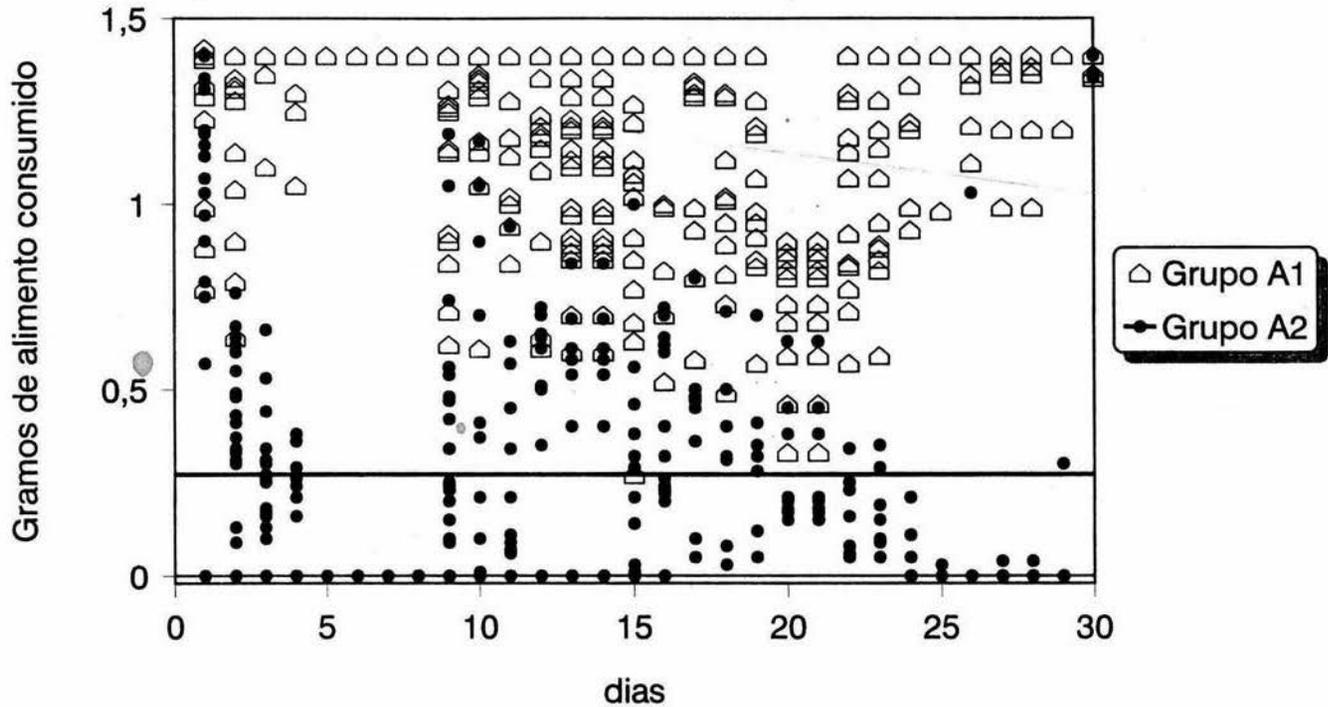
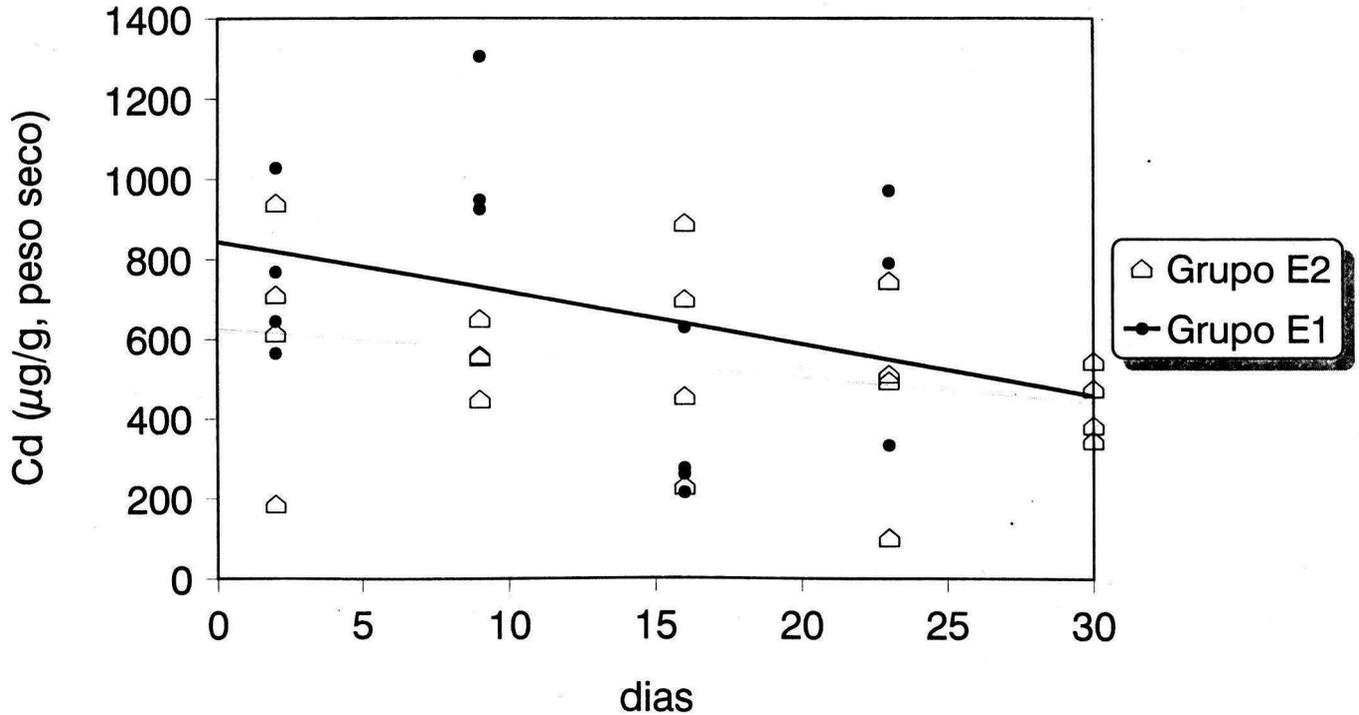
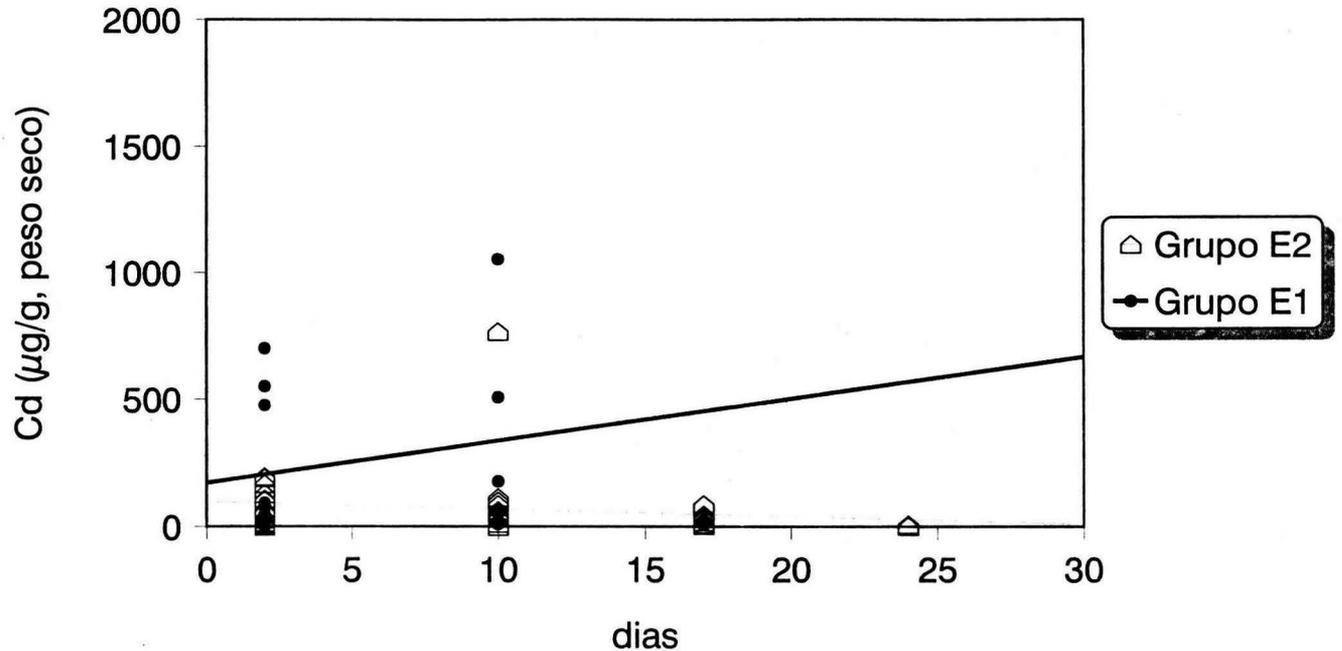


Figura - 5. Resultados ajustados con regresión lineal, de la concentración de Cd en el hepatopáncreas, en los organismos del experimento de eliminación (grupo E1, alimentado con Cd y grupo E2, alimentado sin Cd, después de la dieta previa de 30 días con el metal).



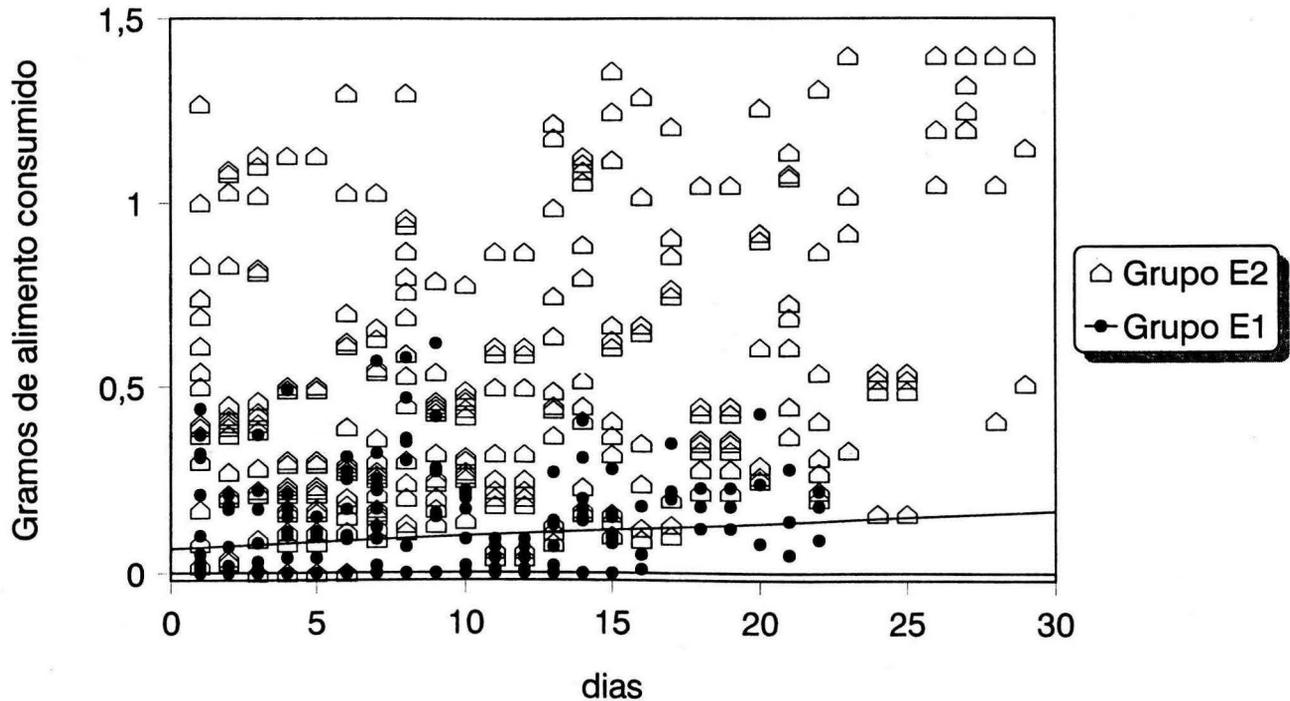
Nota: en estos grupos, el día cero es el momento en que concluyó la dieta previa de un mes con Cd.

Figura - 6. Resultados ajustados con regresión lineal, de la concentración de Cd en las heces, en los organismos del experimento de eliminación (grupo E1, alimentado con Cd y grupo E2, alimentado sin Cd, después de la dieta previa de 30 días con el metal).



Nota: en estos grupos, el día cero es el momento en que concluyó la dieta previa de un mes con Cd.

Figura - 7. Resultados ajustados con regresión lineal, de la alimentación, en los organismos del experimento de eliminación (grupo E1, alimentado con Cd y grupo E2, alimentado sin Cd, después de la dieta previa de 30 días con el metal).



Nota: en estos grupos, el día cero es el momento en que concluyó la dieta previa de un mes con Cd.

Tabla I. Ecuaciones lineales y significancias obtenidas de la regresión lineal ($y = mx + b$) aplicada a los valores obtenidos con los diferentes tratamientos.

E x p e r i m e n t o s				
	Acumulación		Eliminación	
Grupo	A1	A2	E1	E2
Cd en el alimento	0 ppm	12 ppm	12 ppm ++	0 ppm ++
Concentración de Cd en el hepatopáncreas	$y = -0.902x + 48.326$ NS	$y = 22.374x + 86.787$ ***	$y = -12.951x + 843.004$ NS	$y = -6.321x + 626.48$ NS
Concentración de Cd en las heces	$y = 0.06x + 1.095$ NS	$y = 1.806x + 31.128$ NS	$y = 16.556x + 170.899$ NS	$y = -2.875x + 97.2$ NS
Consumo de alimento	$y = -0.011x + 1.361$ ***	$y = -0.000126x + 0.273$ NS	$y = 0.0033x + 0.064$ *	$y = 0.017x + 0.3$ ***

Nota: * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; NS = No hay significancia. ++. Concentraciones de Cd suministradas en el alimento después de la dieta previa con Cd (12 ppm) durante un mes.

Tabla II. Porcentajes de alimentación y asimilación determinados en los grupos A1 (alimentados sin Cd por 30 días) y A2 (alimentados con Cd por 30 días)

Cd en el alimento (ppm)	Cd cuantificado en el alimento (ppm)	Porcentaje de alimentación (% A)	Porcentaje de asimilación en el hepatopáncreas (% As)
Grupo A1 (0 ppm)	0.062	18 %	55.1 %
Grupo A2 (12 ppm)	9.455	86 %	54.7 %

Tabla III. Alimento ingerido diariamente y tasa de alimentación del los cuatro tratamientos.

Grupo	Consumo de alimento (g/día)	Tasa de alimentación (m)
A1	1.31	- 0.011
A2	0.223	- 0.000126
E1	0.064	0.0033
E2	0.3	0.017

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La cantidad de alimento consumida en cada tratamiento fue significativamente diferente (apéndice - 4), pues los organismos se alimentaron menos cuando el alimento contenía el metal (Tabla III); esta diferencia se observó en el porcentaje de alimentación ya que los caracoles alimentados con Cd presentaron un 18 %, mientras que los organismos a los que no se les suministró el metal tuvieron un 86 % (Tabla II). Sin embargo, la tasa de alimentación en todos los tratamientos fue cercana a cero, es decir, que la cantidad de alimento consumido diariamente fue aproximadamente la misma durante todo el experimento. Esto indicaría que al alimentarse menos cuando el alimento contiene Cd, la absorción del metal al organismo también es menor, pero no dejaron de consumir la dieta, con lo que consiguieron seguir ingiriendo sustancias nutritivas (Tabla III). Lo anterior muestra un efecto de rechazo a la dieta causado posiblemente por la palatabilidad; este factor ya ha sido considerado por algunos autores como Laskowski y Hopkin (1996), Hopkin (1989) y Beeby (1987). Cuando las condiciones ambientales como humedad, temperatura, etc., no son óptimas, estos organismos pueden estar por periodos de 4 a 6 meses sin consumir alimento (se introducen en la concha, en la abertura de ésta forman una película mucosa que se seca llamada "epifragma" y bajan su tasa metabólica a niveles basales), por lo tanto, la estrategia de "evadir" el alimento contaminado puede ser una alternativa factible para evitar la toxicidad del Cd. Laskowski y Hopkin (1996) mencionan que inclusive esto podría explicar la extinción de poblaciones de estos moluscos en las zonas altamente contaminadas con metales, ya que al haber rechazo al alimento se produce la muerte por inanición de dichas poblaciones.

Al determinar que el Cd se acumuló significativamente en el hepatopáncreas durante los primeros 30 días de ingestión del metal (grupo A2), se corroboró que estos moluscos son capaces de acumular una gran cantidad de Cd en poco tiempo y como algunos autores los llaman, son organismos "macroconcentradores" (Coughtrey, 1976, Laskowski y Hopkin, 1996 y Rabitsch, 1996). El hecho de acumular el Cd en el hepatopáncreas es otra estrategia que utilizan para evitar la toxicidad del metal ya que lo almacenan de manera insoluble en los

gránulos de calcio y pirofosfatos que se encuentran en esta glándula (Almendros y Porcel, 1992 y Hopkin, 1989). Esta característica podría servir para utilizarlos como biomonitores (Beeby, 1995) ya que se tendría alta sensibilidad para detectar sitios poco y/o recientemente contaminados (Rabitch, 1996). Debido a la cantidad de metal que acumularon se determinó que estos organismos son una vía importante para el transporte de Cd hacia niveles tróficos superiores, tal como lo reportó Laskowski y Hopkin (1996) al encontrar que *H. aspersa* podría transferir Cd y Cu a las cadenas alimentarias.

Aún se desconoce mucho acerca del mecanismo de bioacumulación; se ha demostrado que cuando se inyectan metales en *H. aspersa*, éstos son removidos rápidamente de la sangre hacia el hepatopáncreas, y también se ha propuesto que las metalotioneinas cumplen funciones de detoxificación muy importantes (Hopkin, 1989). Se sabe que los metales se almacenan de manera insoluble en los gránulos de calcio y pirofosfatos que se encuentran en la glándula digestiva. El hecho de quedar insolubles en la glándula digestiva, permite que los organismos tengan concentraciones altas del metal sin causarles efectos letales (Almendros y Porcel, 1992 y Hopkin, 1989).

La eficiencia de asimilación del Cd por el hepatopáncreas (54.7 - 55.1% en los grupos A1 y A2 respectivamente) es semejante a la reportada por Russell (1981) quien al proporcionar a caracoles alimento con 25 ppm de Cd encontraron un 59 %, pero difiere de Laskowski y Hopkin (1996) quienes con diferentes concentraciones de Cd en el alimento encontraron porcentajes de asimilación de 68 a 72%, aunque ambos investigadores determinaron el metal en el cuerpo entero del caracol. Además, estos últimos obtuvieron porcentajes de alimentación (74%) semejantes a los de asimilación (68-72%), mientras que en este trabajo los porcentajes de asimilación (54.7 y 55.1%) fueron muy diferentes a los de alimentación (18 y 86%). Lo anterior indica que a pesar del rechazo a la dieta con Cd (el cual se refleja en los porcentajes de alimentación), la eficiencia de asimilación del metal por el hepatopáncreas fue el mismo en ambos grupos (A1 y A2); la estimación del porcentaje de Cd asimilado en el hepatopáncreas, permitirá conocer el riesgo que representa esta especie, desde el punto de vista de acumulación y transporte de metales, para los niveles tróficos superiores.

En los organismos que se alimentaron con el metal (A2) se observó que la cantidad de Cd en las heces fue aumentando, mientras que en el control (A1) la concentración de Cd en las heces se mantuvo constante. El incremento de Cd que se registra en dichas heces corresponde al Cd que no es asimilado por el intestino y al que está siendo eliminado del cuerpo de los caracoles gracias a sus mecanismos de eliminación (Beeby, 1995; Laskowski y Hopkin, 1996).

En el experimento de eliminación (E1) se encontró que cuando los caracoles ingieren alimento contaminado con Cd (12 ppm) por un largo período de tiempo, los mecanismos de eliminación son eficientes ya que hacen que la cantidad de Cd en el hepatopáncreas baje drásticamente ($m = -12.951$) y la tasa de eliminación, representada por la cantidad del metal en las heces se incremente ($m = 16.556$). Aunque como ya se había mencionado, una parte del Cd presente en las heces puede corresponder al metal que no fue asimilado en el intestino.

En el grupo al que después de la dieta de 30 días con el metal ya no se le administró más Cd (E2), la cantidad de éste en la glándula digestiva bajó ($m = -6.321$), pero no tan marcadamente como los organismos que consumieron Cd por 60 días ($m = -12.951$), aunque al comparar estas pendientes no se encontraron diferencias significativas (apéndice - 4). Esto quiere decir que en el grupo de organismos que estuvieron continuamente expuestos al Cd (E1) se descubrió otra estrategia para evitar la toxicidad al metal que consistió en eliminarlo rápidamente en las heces en vez de seguirlo acumulando.

Cuando Rabitsch (1996) encontró que en algunas especies de moluscos terrestres la cantidad de metales en el riñón, era similar a la del hepatopáncreas, infirió que cuando estos organismos estaban expuestos a altas concentraciones de ciertos metales se presentaba una alta eliminación en vez de solamente la acumulación. El autor sugiere que cuando la capacidad de acumulación del hepatopáncreas se agota y las proteínas de "stress" se saturan, es necesario "encender" otra estrategia de sobrevivencia, la cual corresponde a una alta tasa de eliminación. Como se observó en este experimento la estrategia fue efectivamente una

alta tasa de eliminación del Cd, en lugar de seguir acumulándolo, cuando la exposición fue continua.

Es posible que para que se “encienda” este mecanismo, la concentración de Cd en el hepatopáncreas deba llegar a cierto límite, que en este caso correspondió a consumir en el alimento 12 ppm de Cd durante más de 30 días y acumular en el hepatopáncreas aproximadamente 700 $\mu\text{g/g}$. Se ha mencionado que algunas poblaciones de *Helix aspersa* pueden adaptarse a sitios muy contaminados con plomo, teniendo mecanismos de eliminación más eficaces (Beeby y Richmond, 1987). Por lo cual, la tasa de eliminación en el hepatopáncreas ($m = -12.951$ en el grupo E1 y $m = -6.321$ en el grupo E2), el porcentaje de asimilación menor al reportado previamente y el rechazo al alimento, podría corresponder a una adaptación de esta población a lugares altamente contaminados ya que estos organismos fueron colectados cerca de una zona industrial de la ciudad de México.

Se ha determinado que en muchas especies de invertebrados, los mecanismos para regular metales esenciales son los mismos que para los metales tóxicos (Hopkin, 1989; Beeby, 1995), por lo cual, los procesos estudiados (acumulación y eliminación) podrían ser los mismos que usan los caracoles para regular iones esenciales como el calcio, cobre o zinc (hopkin, 1989).

Este tipo de regulación, aunado al rechazo del alimento cuando éste contiene Cd son características que nos podrían dificultar el uso de *H. aspersa* como herramienta de biomonitorio ambiental ya que los resultados obtenidos en el campo no serían de fácil interpretación. Sin embargo esto no quiere decir que no sea factible utilizarla para este fin, pues la mayoría de los organismos que se han estudiado (moluscos acuáticos, insectos, etc.) no cumplen con todas las características ideales para ser instrumentos de monitoreo biológico (Beeby, 1995), y por otro lado, como se comprobó, *H. aspersa* sí cumple con la propiedad de acumular en promedio hasta 705 $\mu\text{g/g}$ de Cd en periodos de tiempo cortos (Figura 2). Quizá no sea factible usarla para monitoreo cuantitativo pero sí se podría determinar si alguna zona presenta contaminación por Cd, aún en bajas cantidades.

Se sabe que para monitorear metales se pueden realizar determinaciones físicas y químicas del ambiente, sin embargo, es importante continuar este tipo de estudios para determinar en qué forma *H. aspersa* podría ser útil en el monitoreo biológico, ya que será de gran ayuda para evaluar el significado biológico de determinado metal para la propia especie o para otros miembros de la comunidad con los que habitan (Beeby, 1995, Morgan *et al*, 1986).

Russell *et al* (1981), reportó que cuando el alimento contenía 25 ppm de Cd, no se presentaba mortalidad. Sin embargo, aunque no se cuantificó, en este experimento si se observó mortalidad, principalmente en el grupo E1, que se alimentó 60 días con Cd (12 ppm). Este mismo autor encontró daños histológicos en la mayoría de los órganos en *H. aspersa*, utilizando diferentes concentraciones de Cd en el alimento, lo cual indica que las poblaciones de estos moluscos también pueden desaparecer debido a los daños tóxicos que produce el Cd.

CONCLUSIONES

Se encontró en los organismos un efecto de rechazo al alimento que contenía cadmio, causado posiblemente por la palatabilidad. Sin embargo, no dejan de alimentarse por completo, con lo que consiguen ingerir las sustancias nutritivas mínimas que necesitan.

Se corroboró que *H. aspersa* es una especie “macroconcentradora” de cadmio, ya que acumuló cantidades considerables del metal en solo 30 días.

Se determinó que en esta población, el porcentaje de alimentación es diferente al de asimilación, lo cual difiere con lo encontrado en otras poblaciones.

El porcentaje de asimilación encontrado (54.7-55.1) comprueba que *H. aspersa* es una vía importante de transporte de cadmio hacia niveles tróficos superiores.

Se observó un mecanismo de eliminación eficiente cuando los caracoles ingieren alimento contaminado con Cd (12 ppm) por más de 30 días, ya que provoca que el metal que se encuentra acumulado en el hepatopáncreas sea eliminado rápidamente en las heces.

El mecanismo de eliminación encontrado, aunado al rechazo del alimento cuando éste contiene Cd, podrían dificultar el uso de esta especie como herramienta de monitoreo ambiental, si se quiere inferir la cantidad del contaminante en el ambiente.

La propiedad de esta especie para acumular Cd podría utilizarse para detectar contaminación por cadmio, aún cuando éste se encuentre en bajas concentraciones.

Por lo anterior, el rechazo al alimento cuando éste contiene Cd, el porcentaje de asimilación más bajo que el de otras poblaciones y la alta eliminación del metal en las heces cuando existen exposiciones prolongadas al metal podría explicarse como resultado de una adaptación a lugares contaminados por metales.

APÉNDICE

Apéndice - 1. Porcentaje de recuperación del material de referencia (SRM), con una concentración de Cd de 4 µg/g. (Oyster 1566a, NIST)

Material de referencia procesado. Peso seco (g)	Concentración registrada en el SRM (µg/g)	Porcentaje de recuperación (%)
0.1755	4	100
0.175	4.1	102.5
0.1737	3.97	99.25
0.1735	3.84	96.0
0.1728	3.95	98.75
0.1759	4.26	106.5
0.1721	3.75	93.75
0.1739	3.90	97.5
0.1731	3.89	97.25
0.1722	3.81	95.25
		X= 98.67

Apéndice - 2. Porcentaje de recuperación del Cd por el método de adición

Cantidad de Cd en las soluciones ($\mu\text{g/ml}$)	Cantidad de Cd registrado ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de recuperación (%)
1	0.91	91
1	0.95	95
1	0.94	94
1	0.91	91
1	0.95	95
		X= 93.2
2.5	2.57	102.8
2.5	2.48	99.2
2.5	2.29	91.6
2.5	2.31	92.4
2.5	2.45	98
		X= 96.8

Apéndice-3. Cantidad de Cd en el alimento preparado y en cada uno de sus componentes

Tipos de alimento y sus componentes	Cd (ppm)
Alimento con Cd (12 ppm)	9.455
Alimento sin Cd	0.062
Lechuga	0.01
Gérmen de trigo	0.01
Agar	0.01

Apéndice-4. Comparación de las pendientes de los tratamientos, mediante análisis de pendientes con la "t" de Student (Zar, 1990).

	Cd en Hepatopáncreas	Cd en Heces	Alimentación
Experimento de acumulación. Grupo A1 vs A2.	P<0.001	P<0.001	P<0.001
Experimento de eliminación. Grupo E1 vs E2.	P>0.05	P<0.05	P<0.001

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Alexander, R.M. (1979). The invertebrates. Cambridge University Press. Great Britain. pp 562.

Almendros, A. y Porcel, D. (1992). A structural and microanalytical (E.D.X) study of calcium granules in the hepatopancreas of *Helix aspersa*. Comp. Biochem. Physiol. 103A(4):757-762.

Almendros, A y Porcel, D. (1992). Phosphatase activity in the hepatopancreas of *Helix aspersa*. Comp. Biochem Physiol 103A(3):455-460.

Beeby, A. (1985). The role of *Helix aspersa* as a mayor herbivore in the transfer of lead through a polluted ecosystem. Jour. of Appl.Ecology. 22:267-275.

Beeby, A. (1991). Toxic metal uptake and essential metal regulation in terrestrial invertebrates: A review. In: Metal ecotoxicology concepts and applications. (Newman M.C. and Mc. Intooch. A.W.). Lewis Publishers Inc. London, England. pp 89.

Beeby, A. y Richmond, L. (1987). Adaptation by an urban population of the snail *Helix aspersa* to a diet contaminated with lead. Environ. Pollut. 46:73-82.

Beeby, A. (1995). Applying Ecology. Chapman and Hall. London, England. pp 441.

Bordin, G., Mc. Curt, J. y Rodriguez, A. (1994). Trace metals in the marine bivalve *Macoma balthica* in the weesterschelde estuary, the netherlands. Part 2: Intracellular partitioning of copper, cadmium, zinc and iron, variations of the cytoplasmic metal concentrations in natural and *in vitro* contaminated clams. Sci. Total. Environ. 151:113-124.

Brooks, A.W., White, K.N. y Baley, S.E.R. (1992). Accumulation and excretion of aluminium and iron by the terrestrial snail *Helix aspersa*. Comp. Biochem. Physiol. 103C(3):577-583.

Cabrera, C., Ortega, E., Gallego, C., López, M.C., Lorenzo, M.L. y Asencio, C. (1994). Cadmium concentration in farmlands in southern Spain: possible sources of contamination. *Sci. Total. Environ.* 153:261-265.

Coughtrey, P.J. y Martin, M.H. (1976). The distribution of Pb, Zn, Cd and Cu within the pulmonate mollusc *Helix aspersa* Müller. *Oecologia.* 23:315-322.

Coughtrey, P.J. y Martin, M.H. (1977). The uptake of lead, zinc, cadmium, and copper by the pulmonate mollusc, *Helix aspersa* Müller, and its relevance to the monitoring of heavy metal contamination of environment. *Oecologia.* 27:65-74.

Dallinger, R., Berger, B., y Bauer, A. (1989). Purification of cadmium-binding proteins from related species of terrestrial helicidae (gastropoda mollusca): A comparative study. *Mol. Cel. Biochem.* 85:135-145.

Dallinger, R. y Wieser, W. (1984). Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd y Pb in diferent organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 79C:117-124.

De Gregori, I., Delgado, D., Pinochet, H., Gras, N., Thiek, M., Muñoz, L., Bruhn, C. y Navarrete, G. (1992). Toxic trace elements in Chilean seafoods: development of analytical quality control procedures. *Sci. Total. Environ.* 111:201-218.

De Gregori, I., Delgado, D., Pinochet, H., Gras, N., Muñoz, L., Brohn, C. y Navarrete, G. (1994). Cadmium, lead, copper and mercury levels in fresh and canned bivalve mussels *Tagelus dombeii*. (Navajuela) and *Semelle solida*. (Almeja) from the chilean coast. *Sci. Total. Environ.* 148:1-10.

De Hita, M.M.C. (1987). Observación y estudio del rendimiento de la helicultura en parcela. Tesis. Lic. México, D.F. UNAM. Facultad de Ciencias. pp 46.

Duffus, J.H. (1983). Toxicología ambiental. Editorial Omega. Barcelona, España. pp 173.

Galvao, L.A.C. y Corey, G. (1987). Cadmio. Serie vigilancia 4. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Metepec, México. pp 69.

Gennart, J.P., Buchet, J.P., Roels, H., Ghyselen, P., Ceulemans, E. y Lauwerys, R. (1992). Fertility of male workers exposed to cadmium, lead or manganese. Am. Jour. of Epidem. 135(11):1208-1219.

Gomot, L., Enée, J y Laurent, J. (1982). Influence de la photopériode sur la croissance pondérale de l'escargot *Helix aspersa* Müller en milieu contrôlé. Acad. Sc. Paris. 294:749-752.

Guerrero, C.Y.C. (1993). Evaluación de la concentración de metales pesados en la ostión de roca *Crassostrea iridescens*, agua y sedimento de la bahía de Manzanillo, Col. Tesis Lic. México, D.F. UNAM. Facultad de Ciencias. pp 62.

Hopkin, S.P. (1989). Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier Applied Science. Publ. L.T.D. Pollution monitoring series. Ed.K. Mellanby. London, England pp 366.

Howard, B., Mitchell, C.H., Ritchie, A., Simkiss, K. y Taylor, M. (1981). The compositions, of intracellular granules from the metal-accumulating cells of the common garden snail (*Helix aspersa*). Biochem. J. 194:507-511.

Ireland, M.P. (1988). A comparative study of the uptake and distribution of silver in slug *Airon ater* and a snail *Achatina fulica*. Comp. Biochem. Physiol. 90C(1):189-194.

Kim, N.D. y Fergusson, J.E. (1994). The concentrations, distribution and sources of cadmium, copper, lead and zinc in the atmosphere of an urban environment. Sci. Total. Environ. 144:179-189.

Laskowski, R. y Hopkin, S. (1996). Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): implications for predators. Environm. Poll. 91(5):289-297.

Morgan, A.J., Morris, N., James, N., Morgan, J.E. y Leyshon, K. (1986). Heavy metals in terrestrial macroinvertebrates: species differences within and between trophic levels. *Chemistry in Ecology*. 2:319-334.

Rabitsch, W.B. (1996). Metal accumulation in terrestrial pulmonates at a lead/zinc smelter site in Arnoldstein, Austria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56:734-741

Richmond, L. y Beeby, A. (1992). A comparative study of lead uptake by three population of the snail *Helix aspersa* Müller. *Polish Journal of Environ. Studies*. 1(1):9-13.

Rodríguez, A.A., Abril, N., Navas, J.I., Dorado, G., López, B.J. y Pueyo, C. (1992). Metal, mutagenicity, and biochemical studies on bivalve molluscs from spanish coasts. *Environ.. Mol. Mut.* 19:112-124.

Russell, L.K., De Haven, J.I. y Botts, R.P. (1981). Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26:634-640.

Selander, R.K. y Kautman, D.W. (1975). Genetic structure of populations of the brown snail (*Helix aspersa*). Micrographic variation. *Evolution*. 29(3):385-401.

Simkiss, K. y Watkins, B. (1991). Differences in zinc uptake between snails *Helix aspersa* Müller. from metal - and bacteria - polluted sites. *Funct. Ecol.* 5:787-794.

Simkiss, K. y Watkins, B. (1990). The influence of gut microorganisms on zinc uptake in *Helix aspersa*. *Environ. Poll.* 66:263-271.

Souza, V., Bucio, O., Sánchez, I., López, I., Antuna, B.S., Rondán, Z.A., Gutiérrez, M.C. y Fortoul, T.I. (1996). El cadmio. Mecanismos básicos de toxicidad. *Ciencia y Desarrollo*. Enero/febrero: 39-45.

Tron, M.L. (1993). Metales pesados en branquias, exoesqueleto, hepatopáncreas y porción anterior del cefalotórax de los camarones, *Panaeus vannamei* Boone y *Panaeus californiensis* Holmes. Tesis. Lic. Edo. Mex. México. UNAM. ENEP Iztacala. pp 58.

Vallee, B.L. y Ulmer, D.D. (1972). Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annual review of biochemistry*. 41:91-129.

Walker, C. H. (1990). Kinetics to predict bioaccumulation of pollutants. *Ecology*. 4:295-301.

Watkins, B. y Simkiss, K. (1990). Interactions between soil bacteria and the molluscan alimentary tract. *Jour. Mollus.Stud.* 56:267- 274.

Zar, J.H. (1990). *Bioestatistical Analysis*. Prentice-Hall. Inc. U.S.A. pp 356.