



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE FLUORANTENO SOBRE LOS BIOMARCADORES: ACETILCOLINESTERASA, EROD Y PROTEÍNAS EN *Stagnicola* sp

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
S I N A I I B A R R A M E J I A



DIRECTOR DE TESIS: DOCTORA LAURA MARTÍNEZ TABCHE
ADSCRIPCIÓN: INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO
ESCUELA NACIONAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

MÉXICO, D.F.

2005

0350230





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.

AGRADECIMIENTOS:

- Agradezco a mi directora de tesis Dr. Laura Martínez Tabche por sus conocimientos aportados a este trabajo y sus consejos.
- A mi asesora interna Ma. de Los Angeles Galván Villa Nueva que mas que una maestra es para mi como una madre y amiga agradezco por su apoyo a lo largo de este trabajo y su valiosa contribución.
- Al profesor Enrique Mendieta Marques por su valioso apoyo para la contribución de este trabajo.
- Al profesor M. en C. German Calva Vásquez por su amistad y su tiempo en el apoyo para la realización de este trabajo.
- A la bióloga Lucía Salazar Coria por su apoyo en el IMP y su valiosa contribución para la mejoría de este trabajo
- Al Dr Isaias H. Salgado Ugarte por su valiosa aportación en la parte del análisis estadístico.
- A la profesora Ma del Carmen por su apoyo y valiosa contribución para la realización de este trabajo.
- Al profesor Armando Cervantes por su en el manejo estadístico de los datos.
- A mis compañeros y amigos Iván Almansa, Víctor Duarte, y Ricardo Colima por su tiempo dedicado al apoyo de la realización de este trabajo.
- Al IMP por su equipo y a los compañeros que en el laboran por su apoyo.
- Un agradecimiento de manera especial al M. en C. German Calva Vásquez del Laboratorio de Contaminación Atmosférica de la FEZ por el espacio brindado y el apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS:

- Agradezco a mi directora de tesis Dr. Laura Martínez Tabche por sus conocimientos aportados a este trabajo y sus consejos.
- A mi asesora interna Ma. de Los Angeles Galván Villa Nueva que mas que una maestra es para mi como una madre y amiga agradezco por su apoyo a lo largo de este trabajo y su valiosa contribución.
- Al profesor Enrique Mendieta Marques por su valioso apoyo para la contribución de este trabajo.
- Al profesor M. en C. German Calva Vásquez por su amistad y su tiempo en el apoyo para la realización de este trabajo.
- A la bióloga Lucia Salazar Coria por su apoyo en el IMP y su valiosa contribución para la mejoría de este trabajo
- Al Dr Isaías H. Salgado Ugarte por su valiosa aportación en la parte del análisis estadístico.
- A la profesora Ma del Carmen por su apoyo y valiosa contribución para la realización de este trabajo.
- Al profesor Armando Cervantes por su en el manejo estadístico de los datos.
- A mis compañeros y amigos Iván Almansa, Víctor Duarte, y Ricardo Colima por su tiempo dedicado al apoyo de la realización de este trabajo.
- Al IMP por su equipo y a los compañeros que en el laboran por su apoyo.
- Un agradecimiento de manera especial al M. en C. German Calva Vásquez del Laboratorio de Contaminación Atmosférica de la FEZ por el espacio brindado y el apoyo incondicional para la realización de este trabajo

ÍNDICE

1	RESUMEN	7
2	INTRODUCCIÓN	8
3	ANTECEDENTES	9
4	MARCO TEÓRICO	11
4.1	Contaminación por Hidrocarburos	11
4.2	Características de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP'S)	12
4.2.1	Fluoranteno	13
4.2.1.1	Propiedades	13
4.2.1.2	Obtención y Características	13
4.2.1.3	Estructura Molecular del Fluoranteno (Muñoz, 2003)	14
4.2.1.4	Límites Permisibles	14
4.3	Biotransformación	15
4.4	Función del Citocromo	18
4.5	Oxidasas de Función Mixta	19
4.5.1	Transporte Electrónico	21
4.5.2	Biomarcadores de Daño	22
4.6	Etoxiresorofin-O-dietilasa (EROD)	23
4.7	Acetilcolinesterasa (AChasa)	24
4.8	Proteínas	27
4.9	MODELO EXPERIMENTAL	28
4.9.1	Moluscos	28
4.9.1.1	Características de la Concha	29
4.9.1.2	Características de los Euthyneura	30
4.9.1.3	Pulmonados	30
4.9.1.4	Nutrición	30
4.9.1.5	Alimentación	31
4.9.1.6	Generalidades de la Alimentación	31
4.9.1.7	Características del Cuerpo	31
4.9.1.8	Respiración	32
4.9.1.9	Reproducción	33
4.10	Familia Lymnaeidae	33
4.11	Ciclo Biológico de Gasterópodos	34
4.12	Clasificación Taxonómica	36
4.13	Características del Caracol	37
4.14	Ubicación de la Presa Ignacio Ramírez	38
4.14.1	Extención	39
4.14.2	Clima de Almoloya de Juárez	39
4.14.3	Características de la Presa	39
5	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	40
6	JUSTIFICACIÓN	41
7	HIPÓTESIS	42

8	OBJETIVO GENERAL	43
	8.1 Objetivos Particulares.....	43
9	MATERIAL Y MÉTODOS	44
	9.1 Obtención y Mantenimiento del Organismo de Prueba	44
	9.2 Toxicidad Subletal.....	45
	9.3 Determinación de Acetilcolinesterasa (AChasa) (Ellman et al, 1961).	46
	9.4 Determinación de EROD (Parrott <i>et al</i> , 1998).....	46
	9.5 Determinación de proteínas (Bradford, 1976).....	47
	9.6 Diagrama de Flujo.....	48
10	ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
11	RESULTADOS	49
12	DISCUSIÓN	63
	12.1 Acetilcolinesterasa.....	63
	12.2 EROD	66
	12.3 Proteínas.....	67
13	CONCLUSIONES	69
14	BIBLIOGRAFIA	70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Factores que influyen en la dinámica de un vertido de petróleo.....	12
Figura 2 Fluoranteno	14
Figura 3 Mitocondria	16
Figura 4 Ciclo de la Función Mixta Oxidasa	20
Figura 5 Ciclo del Citocromo	22
Figura 6 Reacción de EROD.....	24
Figura 7 La acción de Acetilcolinesterasa sobre acetilcolina	25
Figura 8 Función de acetilcolina en el sistema	26
Figura 9 Estructuras del caracol	28
Figura 10 Estructuras de la concha de caracol	29
Figura 11 Estructuras de caracol disecado	32
Figura 12 Saco con huevecillos de Stagnicola palustris.....	35
Figura 13 Imagen del caracol Stagnicola palustris	37
Figura 14 Mapa de la ubicación de Almoloya de Juárez	38
Figura 15 Ilustración del sistema de manutención del caracol Stagnicola sp.....	44
Figura 16 Resultado actividad de AChasa	50
Figura 17 Estadística de la actividad de AChasa	51
Figura 18 Contenido de Proteínas con respecto a AChasa control vs problema.....	52
Figura 19 Contenido de proteínas con respecto a AChasa.....	53
Figura 20 Resultado del contenido de proteínas en AChasa control contra problemas.....	54
Figura 21 Resultado contenido de la actividad de EROD	56
Figura 22 Estadística de la actividad de EROD.....	57
Figura 23 Contenido de Proteínas con respecto a EROD	58
Figura 24 Contenido de Proteínas respecto a EROD control contra testigo.....	59
Figura 25 Estadística del Contenido de proteínas con respecto a EROD.....	60
Figura 26 Contenido de proteínas.....	62

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Tabla de resultados de actividad de Acetilcolinesterasa	49
Cuadro 2 Resultados actividad de EROD	55
Cuadro 3 Contenido de Proteínas totales.....	61

1 RESUMEN

Los ecosistemas acuáticos se han usado como un depósito de desechos efluentes domésticos (industriales) que generan problemas de contaminación. Este impacto ambiental es ocasionado por diferentes compuestos entre ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos, lo cual representa un potencial riesgo ambiental.

Los principales impactos en la salud humana se basan en sus propiedades genotóxicas, (teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas). También pueden incluir efectos adversos en la reproducción, desarrollo e inmunidad. Los hidrocarburos aromaticos policiclicos son de mayor persistencia se acumulan en plantas, peces e invertebrados terrestres y acuáticos entre otros.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la toxicidad del fluoranteno en *Stagnicola sp* a nivel bioquímico. Se evaluó la toxicidad subletal con fluoranteno a 96 horas de exposición, para lo cual se cuantificaron los siguientes parámetros bioquímicos; concentración de actividad de Acetilcolinesterasa (AChasa) , actividad de etoxiresorufin-O-dietilasa (EROD) y proteínas.

Los resultados obtenidos muestran un notable efecto del fluoranteno sobre los parámetros bioquímicos evaluados. La respuesta a la actividad de EROD fue en aumento significativo para las concentraciones de 30 y 40 $\mu\text{g/L}$ mientras que para las concentraciones de 17 y 20 $\mu\text{g/L}$,se observo una disminución en la actividad esta con respecto a su control, en cuanto a la actividad de Acetilcolinesterasa se promovió un incremento en las concentraciones de 17, 20 y 30 $\mu\text{g/L}$ de Fluoranteno seguido de una baja para la máxima concentración de 40 $\mu\text{g/L}$ de fluoranteno, con respecto a concentración de proteínas en general presentan un aumento para las concentraciones de 17,20 y 40 $\mu\text{g/L}$ de F y una disminución en la concentración de 30 $\mu\text{g/L}$. Lo que se puede observar que el fluoranteno produce un efecto toxico a nivel bioquímico .

2 INTRODUCCIÓN

Diferentes estudios realizados por el Instituto Mexicano del Petróleo, han demostrado que el principal contaminante por su concentración y su permanencia, que se encuentra en el sedimento donde están las plantas petroquímicas es el fluoranteno. Este compuesto, cuyo potencial genotóxico es grande y por lo tanto de alto riesgo para la biota acuática así como para el consumidor de organismos marinos puede bioacumularse y biomagnificarse, lo cual da como resultado una respuesta tóxica. Debido a la problemática de este para el ambiente es necesario evaluar su toxicidad para establecer su riesgo y seguridad para los organismos vivos que están expuestos a él. El molusco *Stagnicola sp*, es un organismo bentónico que se ha empleado para determinar la toxicidad de compuestos del petróleo, ya que permite evaluar efectos subletales hasta letales, a nivel fisiológico, ultraestructural y bioquímico. Los daños a nivel enzimático pueden ser evaluados mediante dos biomarcadores de daño como es la actividad de la Etoxiresorufina-o-dietilasa (EROD) y de la (ACHasa). Cambios en estas dos enzimas (estimulación o inhibición), así como cambios a nivel proteico como es el caso de Hemocianina y Metaloproteínas permitirán determinar como concentraciones de fluoranteno provocan alteraciones sobre el proceso de detoxificación de xenobióticos y del sistema nervioso, los cuales participan en la homeostasis del organismo.

3 ANTECEDENTES

En la evaluación del estudio de salud de un cuerpo de agua así como el efecto tóxico producido por un xenobiótico es necesario establecer el organismo contaminado y el biomarcador de daño. Con respecto al hidrobionte existen variación de estudios que han utilizado a el caracol *Stagnicola sp*; sobre los efectos tóxicos y para determinar la viabilidad del Malatión presente en sedimentos naturales de la presa Ignacio Ramírez, mediante ensayos de la actividad de (AChasa) y concentración de proteínas (Martínez-Tabche *et al.*, 1997).

Con respecto a la AChasa, existen diferentes trabajos que utilizan este parámetro bioquímico para determinar el efecto de hidrocarburos del petróleo en células y órganos.

Martínez-Tabche *et al.*, (1997) determinaron respecto al indicador para hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), comparando AChasa, proteínas y Erod, los efectos tóxicos del el petróleo y sus mezclas sobre la actividad de ACHasa en *Moina macropa* in Vitro, estas investigaciones encontraron que este tipo de xenobióticos produce una disminución en la actividad de la enzima.

Cheng en 2001, analiza la distribución cuantitativa de mutagénicos potenciales en agua a nivel micro ensayos sobre EROD. En éstos se detectó la presencia de daños en el medio ambiente por sustancias como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, muchos de estos compuestos son lipofílicos y resistentes a la degradación bioquímica.

El siguiente trabajo está basado en los factores que afectan la actividad de EROD en el lenguado silvestre (*Pleuronectes americanus*) expuesto a efluentes de la pulpa del papel de una fabrica. En él se pudo determinar que los organismos acuáticos tienen una biotransformación donde producen una serie de enzimas, incluidas en la función mixta oxidasa (Khan and Payne, 2002).

Un trabajo muy importante es la aplicación de ensayos en Etoxiresofufina -o-dietilasa, para analizar el efecto de mezclas de Compuestos Aromáticos Halogenados en el Lago Ontario en Canadá. En él se demostró que éste es un biomarcador de xenobióticos, que involucran enzimas dependientes de citocromo P450, usado como monitor de exposición a sustancias tóxicas (Petruelis *et al.*, 2000).

En estudios realizados en la universidad de Missouri-Colombia, evaluaron el uso y limitaciones en la actividad de EROD como un catalítico medido de citocromo P450 por inducción, como un biomarcador en peces.

En análisis realizados cinéticamente del citoflour en EROD para los microsomas en un formato de placa de cultivo de tejido fino de peces fueron realizados en la universidad de China en Hong Kong encontrando una disminución en la actividad de la enzima.(Chung, 2001).

En el estudio de evaluación del Tiempo dependiente de la toxicidad de fluoranteno sobre invertebrados de agua dulce y el rol de la biotransformación sobre cuerpos letales de residuos. Se encontró un valor de CL50 para fluoranteno en *H azteca* de 60µg/L, de 40µg/L en *C tentans* y para *Diporea* una CL50 de 95.5µg/L

En otro estudio con el nombre de biocumulación y toxicidad de fluoranteno en el oligoqueto *Monopylephorus* y *rubroniveus* estuarinos. Donde se reporta la CL50 de fluoranteno en *M rubroniveus* de 0.7µg/L, en *Lumbriculus variegatos* 1.2µg/L, para *Palaemonetes sp* 22 µg/L y *Mendía beryllina* 30 µg/L.

En la investigación de la Fototoxicidad del fluoranteno para siete crustáceos bentónicos marinos se encontró en el anfípodo *C insidiosum* una CL 50 de fluoranteno de 96 µg/L y para *E estuarios* 91 µg/L de fluoranteno en donde se toma como un factor importante la exposición a la luz ultravioleta.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 Contaminación por Hidrocarburos

Esta puede llevarse por diversas circunstancias por transporte de los mismos puede conllevar a contaminación por accidentes, esto puede ocasionar dispersión de contaminantes en el medio terrestre así mismo por la construcción de infraestructura. En ello se produce una alteración del drenaje natural por la edificación de túneles, obras de drenaje, pavimentación, puentes, pasos a desnivel y obras complementarias. Las redes de ductos de distribución de petróleo están siempre sujetas a riesgos de accidentes de diversa índole que de producirse significa derrames, explosiones, incendios, desprendimientos de gases de los tanques de almacenamiento (evo transpiración) y vertimientos de residuos de hidrocarburos. Los establecimientos manejan volúmenes de hidrocarburos y derivados (gas de uso domestico, petróleo diáfano, diesel, gasolinas, grasas, aceites, solventes, resinas), en general estos lugares no cuenta con dispositivos adecuados de control de emisiones, derrames o vertimientos al suelo, así como aguas negras en los sistemas municipales, todo esto provoca riesgos de fugas y derrames (Jiménez, 2001).

En la figura 1 se observan las diferentes rutas y factores que puede seguir el petróleo en el medio ambiente así como distintos factores que influyen sobre el destino del mismo en donde este puede ser evaporado, disperso en el ecosistema, el cual con lleva a la disolución, sedimentación y depositación (en costera) o absorción por organismos que también estos, se sedimentan y provocan una acumulación de el elemento.

Petróleo

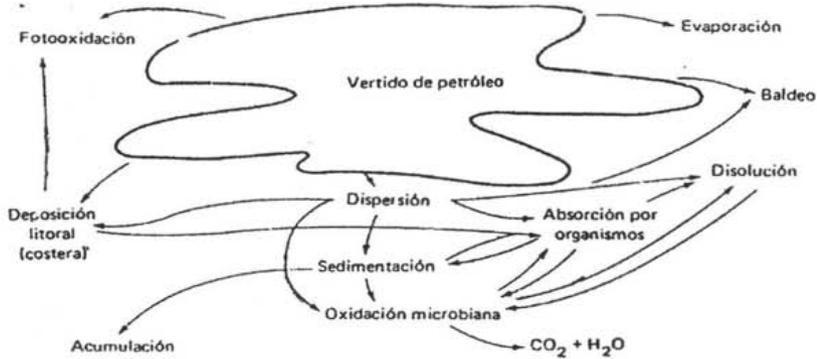


Figura. 1: Factores que influyen en la dinámica de un vertido de petróleo. (Stephenstoke and seager 1981)

En los organismos se da la conversión de compuestos xenobióticos o contaminantes de forma que puedan ser excretables, este proceso se da principalmente en el hígado. En microorganismos su utilización y transformación es por el contrario una forma de obtención de energía o fuente de carbono (Klaassen y Walkins, 2001).

4.2 Características de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP'S)

Estos son de alto peso molecular son relativamente inmóviles y, por ende, de baja volatilidad y solubilidad. De los dieciséis HAP's designados por la Agencia Americana de Protección Ambiental como contaminantes prioritarios, los siguientes son los principales naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno (Muñoz 2000); sin embargo se suele limitar su análisis a los seis más frecuentes: 3,4-benzofluorantenos, 11,12-benzofluorantenos, 3,4-benzopireno, 1,12-benzopireno, indeno-1,2,3, -pireno y fluoranteno. A causa de su elevado potencial cancerígeno este último es de interés debido a que se ha detectado en peces colectados en una zona petrolera (Jiménez, 2001).

Los HAP'S contienen un anillo bencénico el cual no está saturado pero es muy estable comportándose frecuentemente como un compuesto saturado (Gary y Handwerk, 1980).

Los aromáticos son más solubles en agua que los hidrocarburos saturados. Estos pueden matar organismos marinos por contacto directo con petróleo, o al estar expuestos en soluciones diluidas cuando los compuestos se disuelven en el agua. Los efectos a largo plazo y especialmente a bajas concentraciones de los componentes del petróleo sobre los sistemas vivos, no son tan aparentes como los de corto plazo. Éstos pueden ser mutagénicos, cancerígenos, a nivel estructural, bioquímico y fisiológico. (Stoker y Seager, 1981).

4.2.1 Fluoranteno

4.2.1.1 Propiedades

Fluoranteno es un hidrocarburo aromático tetracíclico $C_{16}H_{10}$, punto de fusión $107^{\circ}C$, punto de ebullición $250^{\circ}C$, insoluble en agua, soluble en éter y benceno.

4.2.1.2 Obtención y Características

Es un combustible que se obtiene a partir del alquitrán de hulla, es moderadamente tóxico, mutagénico, carcinogénico, teratogénico y neurotóxico (Gessner, 1975). Un contaminante que se bioacumula en compartimentos ambientales y es ligeramente propenso a biodegradarse y puede ser metabolizado por plantas y animales (James y Handwerk, 1980).

4.2.1.3 Estructura Molecular del Fluoranteno (Muñoz, 2003).

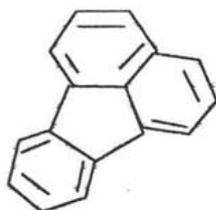


Figura 2: Estructura molecular del fluoranteno

4.2.1.4 Límites Permisibles

En Ontario USA según la guía de sedimentos en agua dulce, y el fluoranteno tiene una concentración de 0.750mg/Kg reportan como nivel de efectos mínimos y 1020 mg/Kg. repentinamente se reporta como niveles de efectos severos en los ecosistemas acuáticos (Department of environmental protection 1998).

Para Massachussets el plan de contingencia alarmante para aguas dulces y sus sedimentos se determina que la concentración del fluoranteno es de 423 $\mu\text{g/Kg}$ la cual se encuentra en el umbral que produce efectos (Criterios alarmantes usados en el medioambiente en el estado Massachussets). Según la EPA el límite permisible en cuerpos de agua de fluoranteno es 0.042mg/L a (EPA, 2004).

De este compuesto los valores en Netherlands son de 0.023 $\mu\text{g/g}$, los recomendados para sedimento son 1.2-2 $\mu\text{g/g}$ y el máximo límite es de 3.5 $\mu\text{g/g}$. En el Río Lawrence de Canadá que promueve, criterio sin efectos es de 0.01-0.02 $\mu\text{g/g}$, el valor mínimo es 0.6 $\mu\text{g/g}$, sin embargo 2 $\mu\text{g/g}$, se considera produce efectos tóxicos en los organismos, el límite para el dragado de sedimentos es de 3.5 $\mu\text{g/g}$.

En Estados Unidos de Norteamérica la estimación recomendada para límite general bajo es de 0.23 $\mu\text{g/g}$, el menor basado en la calidad del agua es de 1.6 $\mu\text{g/g}$ el valor intermedio en sedimentos de agua dulce es de 18.8 $\mu\text{g/g}$ el límite crítico en sistemas marinos es 7 $\mu\text{g/g}$. En Oregon la apreciación para una buena calidad de agua de consumo humano es menor a 1.883 $\mu\text{g/g}$.

En USA según la EPA el criterio en la calidad de sedimentos es abajo de 10.2 $\mu\text{g/g}$. La estimación alarmante en el estado de New York en cualquier ambiente es de 1020 $\mu\text{g/g}$ (USEPA, 2000). El real decreto 1138/90 de la Organización Mundial de la Salud, tiene un valor máximo permisible de fluoranteno de 0.0002mg/L.

4.3 Biotransformación

Muchas sustancias químicas extrañas que son introducidas en un organismo vivo, sufren transformaciones químicas, designándose en general como la transformación metabólica o biotransformación. Estos procesos de transformación son inducidos enzimáticamente y dan lugar a la alteración de la molécula inicial o a la formación de productos resultantes de su combinación con sustancias internas.

Cierto número de sistemas enzimáticos que inducen la transformación de compuestos endógenos en el organismo, son también activos para catalizar modificaciones de sustancias químicas extrañas que en su estructura son lo suficientemente similares al sustrato normal. Por ejemplo las enzimas colinesterasas y las esterasas inespecíficas, no sólo hidrolizan la acetilcolina (neurotransmisor que se encuentra normalmente), sino que también hidrolizan la procaína.

Las enzimas metabolizadoras de xenobióticos consisten en un grupo de ellas que están presentes en muchos tejidos pero que son particularmente abundantes en las células hepáticas. El retículo endoplasmático puede ser observado con el microscopio electrónico, apreciándose estructuras filamentosas de dos tipos: filamentos de superficie lisa y de superficie rugosa (Figura 3). La superficie lisa es la que contiene gran proporción de distintos metabolizadores de toxinas, mientras que la superficie rugosa está relacionada con las enzimas implicadas en la síntesis proteica. Cuando se rompen las células hepáticas por homogeneización, el retículo endoplasmático se fragmenta, y sus fracciones se pueden separar de dichas células. Los fragmentos del endotelio reticular liso se llaman, de ordinario microsomas (Loomis, 1982).



Figura 3: Estructura de la mitocondria. Las mitocondrias tienen 2 μ m de largo, los pliegues de la membrana interna, llamados crestas, aumentan la superficie y la capacidad bioquímica del transporte de electrones lo que genera en el exterior un gradiente ácido de protones. (Roskoski et al., 2000)

Los mecanismos de biotransformación de sustancias químicas extrañas se dividen en dos grandes tipos (1) reacciones no sintéticas que comprenden oxidación, reducción o hidrólisis, y (2) reacciones sintéticas que comprenden la formación de un producto que es biosintetizado a partir de la sustancia (o su metabolito) más un metabolito endógeno (Loomis, 1982).

El citocromo P450, enzimas principales del metabolismo de fase I va actuar dentro de la célula acompañado de las enzimas de fase II, encargadas de la conjugación de los metabolitos producidos por las primeras, entre las que se encuentran las glutatión-S-transferasas(GST)y las N-acetiltransferasas(NAT). Estas sustancias van a ser reconocidas por la célula como señales exógenas mediante diversos mecanismos de recepción y entrarán en ella por difusión pasiva o mediante transportadores activos. Una vez dentro actuarán las enzimas de fase I (principalmente la súper familia del citocromo P450). Los metabolitos que se generan y las propias moléculas no metabolizadas podrán actuar y ser eficaces, o resultar tóxicos para la célula. El que una droga, carcinógeno o agente terapéutico resulte inocuo para la célula impidiendo su efecto beneficioso o perjudicial, va a depender de la cantidad formada de sustratos intermedios, de la estabilidad química de éstos y de la presencia cercana de enzimas de fase II. Estas sustancias van a poder actuar como agonista o antagonistas para inducir o reprimir los genes que codifican para las enzimas de fase I y fase II. Esto les va a permitir regular su propio metabolismo.

Las familias 1,2 y3 del citocromo P450 son enzimas activas en el metabolismo de una gran variedad de xenobióticos, aunque alguno de ellos también metabolizan compuestos endógenos, como esteroides, hormonas y ácido arquidónico.

La familia CYP1del citocromo esta constituida por los genes CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 estos comparten la característica de ser activados por hidrocarburos aromáticos poli cíclicos (PAHs) , y por el tabaco.

Todos ellos son primordiales en la metabolización de PAHs a compuestos intermediarios que pueden unirse a ácido desoxiribonucleico (ADN), los cuales pueden provocar, en algunos casos mutaciones involucradas en procesos de transformación neoplásica.

El CYP1A1 constituye la mayor fracción del citocromo P450 extra hepático. Contribuye notablemente a la toxicidad de muchos carcinógenos, especialmente los PAHs (Gómez *et al.*, 2002).

4.4 Función del Citocromo

Uno de las principales enzimas implicadas en el metabolismo de la degradación de xenobióticos es el citocromo P450 (CYP1A1). Este constituye una súper familia enzimática involucrada en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos y exógenos como drogas, pesticidas e hidrocarburos, etc.

Este se identificó en 1958 como un pigmento celular reducido y unido a membrana con un pico de absorción inusual a los 450 nm, en 1964 se sugiere el nombre de citocromo P450 por Omura y Sato. Esta súper familia enzimática en el caso de organismos eucariotas ha sido detectada prácticamente en todas las membranas subcelulares examinadas, siendo la mitocondria y principalmente el retículo endoplasmico las fuentes más importantes.

La súperfamilia del citocromo P450 se caracteriza por ser hemo proteínas capaces de transportar electrones, poseen una parte proteica (apoproteína) y un grupo hemo (grupo protéico) donde se localiza un átomo de hierro.

El CYP1A1 funciona como una mono oxigenasa, cataliza reacciones en las que solamente se incorpora uno de los átomos del oxígeno y el otro se reduce a H_2O . Además, precisa de dos sustratos para actuar como reductores de los dos átomos de la molécula de O_2 , el principal acepta uno de los oxígenos y un cosustrato proporciona átomos de H para reducir el otro H_2O .

Gracias a su intervención se produce una hidroxilación del sustrato que tiene como consecuencia la formación de productos más solubles en agua y generalmente de derivados farmacológicos menos potentes que pueden ser excretados directamente. También puede ser mediador de la activación de pre carcinógenos. Importante el papel detoxificador que realiza gracias al cual se facilita la eliminación de muchas drogas y sustancias perjudiciales para el organismo.

La hidroxilación de un sustrato orgánico -RH (sustrato principal) a R-OH a expensas de un átomo de una molécula de oxígeno. El átomo es reducido a H₂O por los equivalentes de reducción proporcionados por el NADH o NADPH (cosustrato), habitualmente transferidos al P450 directamente o vía citocromo (Figura 5) (Gómez *et al*, 2002).

4.5 Oxidasas de Función Mixta.

La cadena de transporte electrónico se encuentra en el retículo endoplasmico o en la fracción microsomal del hígado y otros tejidos. Esta porción de viaje de electrones presenta varias diferencias importantes que la distinguen de su equivalente mitocondrial . Primero en el transporte utiliza NADPH como sustrato o fuente de equivalentes de reducción para la reacción inicial de esta secuencia que esta ligada a flavina, por ejemplo, la NADPH-citocromo P450 reductasa. Segundo el sistema microsomal contiene un citocromo que es exclusivo de este sistema membranoso y que no se encuentra en la mitocondria que se denominó citocromo P450, porque la forma reducida tiene una banda de absorción a 450 nm. Durante la reacción terminal de esta secuencia de transporte electrónico el Fe²⁺ del citocromo P450 reacciona con oxígeno molecular para formar el complejo citocromo P450Fe³⁺+2O⁻.

A continuación uno de los átomos de éste es introducido en el sustrato en una reacción de hidroxilación mientras que el otro se reduce a agua. El material microsómico contiene al sistema oxidasa de función mixta, unido a la membrana. Este consiste en permitir el transporte de electrones entre compuestos mediante la acción de diversas reductasas, más un grupo de hemo proteínas que poseen propiedades de oxidación. Este es capaz de atacar al oxígeno molecular (O₂) reduciéndose para formar agua, e incorporando el otro átomo de O a una sustancia química xenobiótica sustitutiva. El sistema microsómico requiere la presencia de fosfocotina-adenin-dinucleotido reducido (NADPH) y el oxígeno molecular. El NADPH reduce a un componente de H en los microsomas, el cual reacciona con el oxígeno molecular para formar un complejo intermedio activo que oxida al xenobiotico. Esto puede ser considerado como un proceso escalonado que implica inicialmente la oxidación de NADPH por la acción de una flavienzinma (citocromo o reductasa), y subsiguientemente en presencia

de una hemoproteína reducida llamada P-450, se forma el complejo de oxígeno activo a partir de oxígeno molecular(La figura 4 muestra el ciclo catalítico de la función mixta oxidasa).

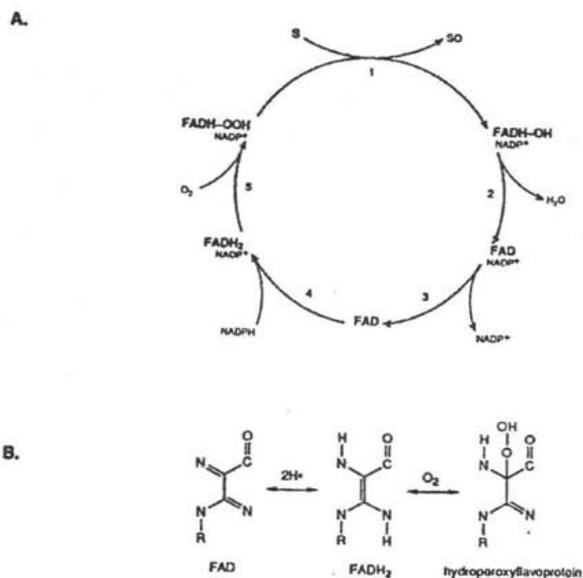


Figura 4: Ciclo catalítico de las enzimas *Función Mixta Oxidasa*. (Hodgson and Levi, 1994)

Esta cadena de transporte electrónico no es fosforilante puesto que no se sintetiza ATP durante la misma. El fin primario de este sistema es la hidroxilación de diversos fármacos, esteroides o esterolos, ácidos grasos, hidrocarburos policíclicos y algunos aminoácidos. La síntesis de componentes de la secuencia de transporte electrónico microsomal es inducida en el hígado a partir de la administración de ciertos xenobióticos u otros substratos de este sistema como fuente de dichos enzimas (Devlin, 1991). Estas enzimas microsómicas son capaces de catalizar diversas reacciones de biotransformación, entre ellas tenemos: hidroxilación, desalquilación, desaminación, oxidación de la cadena lateral alquilica, hidrólisis y reducción. De hecho, en general convierten compuestos liposolubles en menos

liposolubles, dando lugar de esta manera a sustancias más polares que pueden ser fácilmente excretadas por el riñón y por el tracto biliar.

4.5.1 Transporte Electrónico

Los componentes implicados en el transporte de electrones son:

- 1) Flavo proteínas (que contienen mononucleótido de flavina o FMN y di- nucleótido de adenina flavina o FAD
- 2) coenzima Q
- 3) proteínas de hierro -azufre, y
- 4) citocromos (Roskosk , 2000).

Los microsomas es decir el reticulo endoplasmatico liso del hígado y de otros tejidos, contienen sistemas de transporte electrónico capaces de utilizar el oxígeno molecular para oxidar moléculas orgánicas específicas insertando directamente uno de sus átomos o los dos en el producto. Sistemas capaces de insertar ambos elementos reciben el nombre de oxigenasas. Las enzimas que realizan la inserción en el sustrato de solo un átomo de O₂ de la molécula del mismo se denominan hidroxilasas u oxigenasas de función mixta (MFO) (Lenhinger, 1972) y esta involucrada en la oxidación de numerosos xenobioticos orgánicos contaminantes con nitrógeno, sulfato , fosfatos y diferentes átomos algunos con iones inorgánicos (Hodgson y Levi 1994) . El otro átomo de oxígeno se emplea para oxidar el NADPH o el NADH. Las hidrolasas del reticulo endoplasmatico actúan con las flavoproteínas y con los citocromos. Se hallan organizadas en cadenas cortas de transporte electrónico que no llevan a cabo la fosforilación. Esta que realiza las hidroxilaciones es la mejor comprendida, contiene citocromo P450, que forma un complejo con el CO reducido, así como una flavoproteína específica que contiene FAD (Lenhinger, 1972).

Los citocromos son la ultima clase de componentes que participan en el transporte de electrones (figura 5 muestra el ciclo del citocromo P450). Se llaman así por que son componentes celulares coloridos (cito "célula", cromo "color ") Los citocromos son proteínas

Hem es la ferro porfirina que se encuentra en la hemoglobina, en la mioglobina y en la hemocianina.

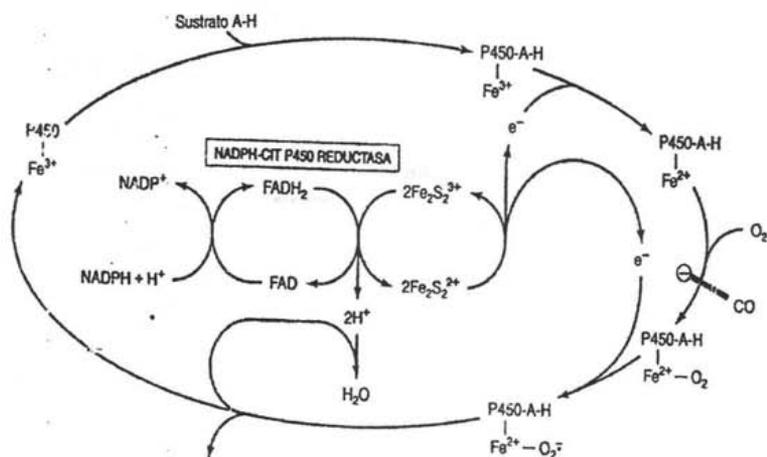


Figura 5: Ciclo del citocromo P450 hidroxilasa en los microsomas. Se muestra el sistema tipo de las hidroxilasas de esteroides en la corteza suprarrenal. La citocronmo P 450 hidroxilasa microsomicas hepática no requiere la sulfoproteína férrica. El monóxido de carbono inhibe la etapa señalada. (Santiago et al., 2002).

Este es un componente de la función mixta oxidasa, transporta electrones y que participa en las reacciones de oxidación. Las principales variedades de estos en la mitocondria son los tipos a, b y c. Las familias de ellos se subclasifican según el orden histórico de su descubrimiento (b1, b2, b3....) o la longitud de onda de absorción(nm) (Roskosk, 2000).

4.5.2 Biomarcadores de Daño

Son una respuesta biológica a uno o más químicos que inducen una medida de contacto y a veces, una tóxica. Incluyen en esta bioquímicas, anatómicas, fisiológicas y de conducta que indican una exposición adversa a compuestos antropogénicos o radiaciones.

Los biomarcadores relacionan las respuestas biológicas producidas en el organismo con exposición a xenobiotico y sirven como herramientas ecotóxicológicas en la evaluación del medio ambiente. Es usual utilizarlos para caracterizar la concentración de contaminantes antropogénicos, daño o efectos adversos en la salud ejemplo: Etoxiresorufin-odietilasa (EROD), Indicador de exposición a xenobioticos (Villegas, 2003).

4.6 Etoxiresorufin-O-dietilasa (EROD)

La inducción del citocromo P450 detectado a través de la actividad de 7-etoxiresorufin-odietilasa en hepatoma celular de rata, es usado cuantitativamente para localizar la presencia de daños en el medioambiental por compuestos hidrocarburos poli cíclicos aromáticos. Muchos de estos compuestos son lipofílicos y resisten la degradación bioquímica. Como resultado, estos químicos se acumulan en los tejidos biológicos alterando así la cadena alimenticia y el ecosistema Si la actividad de la enzima esta aumentando o disminuyendo comparado con un control esto implica que ha ocurrido una exposición a una sustancia tóxica. Cuanto más altas son las cantidades de enzima, el organismo se ha expuesto a concentraciones elevadas de la xenobiotico (Chung, 2001).

EROD es una enzima que pertenece al grupo de las oxigenasas de función mixta que oxidan, por adición de un átomo de oxígeno. Su mecanismo de acción requiere oxígeno y un agente reductor como el NADPH, con el transporte electrónico facilitado hacia el citocromo P-450.

Son enzimas inducibles que incrementan su actividad por agentes como el 2,3, 7,8-tetraclorodibenceno-p-dioxina. Entre las oxidasas más conocidas están la arilhidrocarbonohidroxilasa, la 7-etoxicumarina-O-dimetasa y la misma EROD (Villegas, 2003).

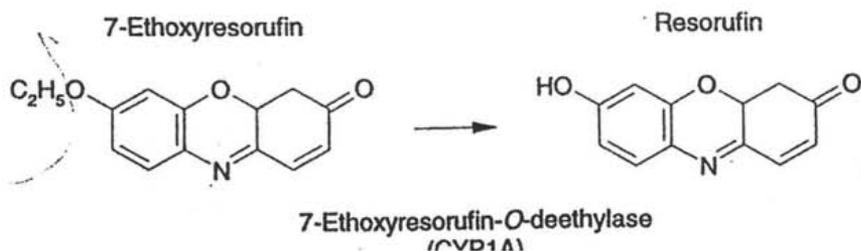


Figura 6: Acción de 7-Etoxiresorufin-o-deetilasa (Petrulis y Bunce, 2000)

EROD es una enzima que oxida 7-etoxiresorufina (7ER) a resorufin, catalizado por citocromo P450 (CYP1A1) (Rodríguez y Prough 1992). El grupo CH_2 es oxidado a CHOH , dando como resultando hemicetal disociándose espontáneamente para dar resorufina. La reacción es transportada donde hay una suficiente o alta concentración de la enzima CYP1A1 (Petrulis y Bunce 2000). EROD es usado como biomarcador para citocromo P450, es muy sensible y comúnmente usado para los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) La inducción de citocromo P450 y la actividad de EROD se pueden medir en el hígado o en cultivos de células del mismo expuestas a productos químicos o a sus mezclas complejas (Chung, 2001).

4.7 Acetilcolinesterasa (AChasa)

Es conocida como acetilcolina acetilhidrolasa (Boyer, 2000), una enzima presente en la superficie de las hendiduras subneurales del sarcolema de fibras musculares. Está solamente presente en la unión neuromuscular, puede estimular la fibra muscular en forma casi indefinida. La transmisión continua de impulsos por este neurotransmisor normalmente la evita la AChasa o colinesterasa. En un lapso de 1500 seg. esta biomolécula inactiva a la acetilcolina degradando ésta en sus componentes acetato y colina (figura:7). Esta acción permite que la membrana de la fibra muscular se repolarice inmediatamente de modo que pueda generarse otro impulso en fibra muscular (Tortora, 1991), y el potencial Post-sináptico decae gradualmente (Schmidt-Nielsen, 1983).

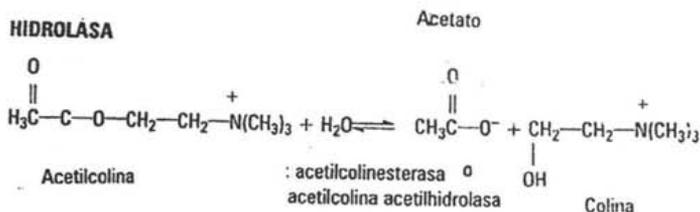


Figura 7: Acción de la Acetilcolinesterasa sobre la Acetilcolina (Metzler, 1981)

La unión de la acetilcolina a su receptor específico tiene como resultado la elevación transitoria de la conductancia de la membrana postsináptica para el Na⁺ y el K⁺. La cantidad de esta enzima liberada por la terminación nerviosa presináptica no varía de forma continua,, sino que lo hace por etapas, correspondiendo cada unas de ellas a la liberación de una vesícula sináptica. La cantidad de acetilcolina contenida en una de estas corresponde a un cuarto de la misma (Berne *et al.*, 1995).

La ACHasa esta situada en la hendidura sináptica (figura 8), donde está enlazada a una red de colágeno y glicosaminoglicanos derivado de la célula post-sináptico.

Una característica llamativa de esta enzima es su elevado número de recambio de 25,000 1/s, lo que significa que hidroliza una molécula de acetilcolina en 40 microsegundos.

El alto número de recambio de la enzima resulta esencial para la restauración rápida del estado polarizado de la membrana postsináptica.

El mecanismo catalítico de la acetilcolinesterasa se parece al de la quimotripsina. La acetilcolina reacciona con un residuo específico de serina del centro activo de la ACHasa para

formar un intermediario covalente acetil-enzima y se libera colina. El intermediario acetil-enzima reacciona entonces con agua para formar acetato y regenerar la enzima libre.

La cuantificación de la actividad de esta enzima es un parámetro sensible para la evaluación de la presencia de compuestos órgano fosforados en el agua. La inhibición de la actividad de la AChasa en peces ha sido utilizada como herramienta para el diagnóstico de contaminación ocasionada por estos compuestos (Galar, 1999). Los muchos mecanismos de acción de organofosforados e insecticidas carbamatos que suponen la inhibición de colinesterasas. Las enzimas AChasa y colinesterasas pueden ser distinguidas no sobre la distribución pero sí sobre un sustrato específico y su sensibilidad para la selectiva inhibición. Los carbamatos provocan el incremento de los niveles de la sinapsis nerviosa causando continuas estimulaciones de las fibras y eventualmente fracasando en la repolarización de los nervios, ocasionando una inhibición de la AChasa (Dembele *et al.*, 1999).

Compuestos organo fosforados (neurotóxicos) promueven la inhibición de la actividad de AChasa causando la acumulación de acetilcolina (ACh) y la nerviación sináptica. Este lleva a la destrucción del sistema nervioso central y eventualmente la muerte del animal (Rahman *et al.*, 2004).

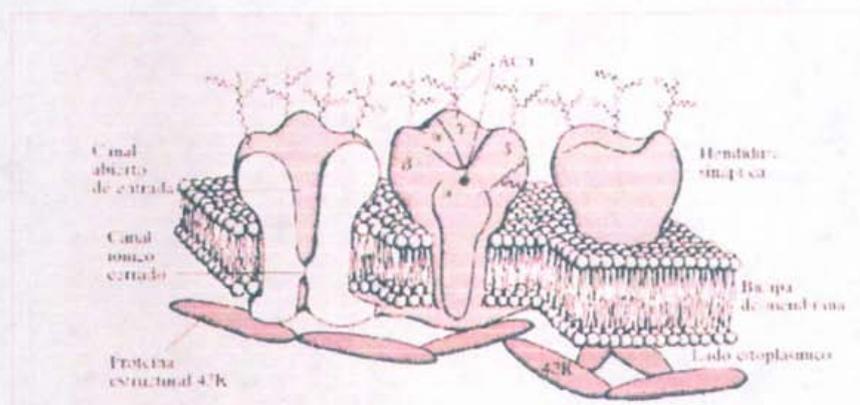


Figura 8: Modelo tridimensional del receptor nicotínico de acetilcolina. (Ganongn, 1996)

4.8 Proteínas

Las proteínas constituyen uno de los nutrientes de mayor trascendencia en los seres vivos. Desempeñan una amplia variedad de funciones que determinan en gran parte la actividad metabólica y morfológica de los seres vivos. Son los principales constituyentes nitrogenados de todos los organismos animales y vegetales.

Éstas desempeñan una amplia variedad de funciones, la más importante es la catalítica que se lleva a cabo a través de enzimas, todas ellas de naturaleza proteica y que participan en la mayor parte de las reacciones químicas celulares. La hidrólisis a la que son sometidos los nutrientes en el proceso de digestión, la absorción de moléculas simples hacia el citoplasma de la célula. Su participación en el transporte de numerosas sustancias como los lípidos que se encuentran en el torrente circulatorio en forma de lipoproteínas. En general estas biomoléculas proveen de aminoácidos para la formación de proteínas corporales con lo que se pueden resintetizar los tejidos que constantemente están en degradación. (Lehninger, 1990).

Los pesticidas actúan sobre enzimas esencialmente de metabolismo oxidativo ocurriendo hipoxia en el organismo que habitan los cuerpos de agua, los carbohidratos son la principal fuente de energía durante los periodos crónicos de stress. La hipoxia resulta de los pesticidas alterando el metabolismo de los hidrocarburos, en los caracoles bajando la producción de energía, las proteínas son la alternativa de fuente de energía durante el estrés (Tripath and Singh, 2003)

4.9 MODELO EXPERIMENTAL

4.9.1 Moluscos

Corresponden un grupo de organismos bien reconocido y ubicado en la escala animal por los zoólogos, el cual resalta entre los invertebrados por mostrar una gran radiación adaptativa y notable plasticidad.

El phylum Mollusca animales de cuerpo blando (figura 9) incluye los caracoles, babosas, almejas, mejillones, ostras, pulpos y calamares. Solo los miembros de una clase son segmentados. Casi todos tienen simetría bilateral y concha protectora y de sostén hechas principalmente de carbonato de calcio. Ciertas estructuras, como el pie, se encuentran en todos los moluscos, los caracoles usan este para deslizarse sobre la superficie.

Ellos se dividen en seis clases: Pelecypoda-almejas, ostras y otros bivalvos; Cephalopodos-calamares, pulpos y nautilus; Gastropoda-caracoles y babosas; Polyplacophora-quitones; Scaphododa-cormillos de mar; y Monoplacophora-los que poseen concha plana (Pérez, 1995).

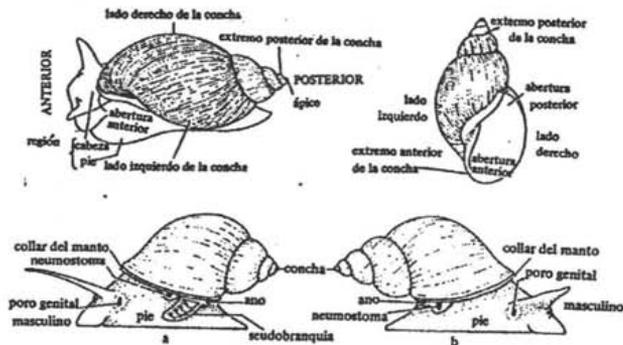


Figura 9: Estructuras del caracol (Marshall and Williams, 1985)

4.9.1.1 Características de la Concha

En general los gasterópodos, son animales sin opérculo con la abertura de la concha sellada cuando esta retraído, el y su caparazón son dextrogiros (enrollados hacia la derecha). El caracol con concha enrollada en espiral levantada. Su coraza no succiniforme, la abertura puede no ser grande u oval, y silo es la concha no es delgada ni frágil, el periostraco no presenta ornamentaciones espiraladas en forma de huellas. Concha del animal adulto grande, mas de 20mm en altura; columela usualmente bien desarrollada, torcida o en forma de pliegue (Burch y Cruz, 1987).

Todos los moluscos de agua dulce secretan un exoesqueleto o concha externa constituida por carbonato de calcio, sobre la cual se forma una fina cubierta de material orgánico denominada periostraco, que le confiere un color variable desde el café claro al oscuro, pudiendo ser también grisáceo y a veces negro. En la figura 10 se muestra la estructura longitudinal de tres tipos de conchas (Pérez, 1995).

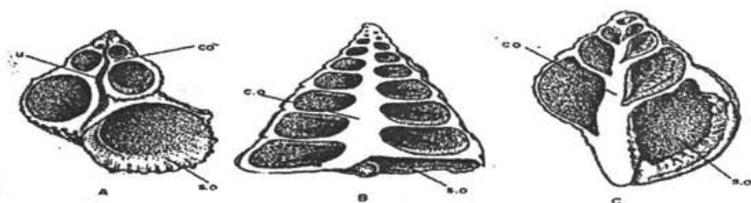


Figura 10: Tres conchas cortadas longitudinalmente mostrando la espiralización A. Turbo; B, Argobuccinum. Co, columela; s.o, abertura de la concha; u, ombligo. (Marshall y Williams, 1985).

4.9.1.2 Características de los *Euthyneura*

Son los más recientes estrictamente hablando, con nervios no cruzados, se basan en neoformaciones secundarias y dislocaciones: como características tienen, concentración del sistema nervioso en la cabeza; acortamiento de los conectivos, por lo cual dejan de cruzarse; la función respiratoria es adoptada por la pared de la cavidad paleal, con cambio a respiración aérea (pulmonados, *Pulmonata*) (Linder, 1989).

4.9.1.3 Pulmonados

Estos comprenden los caracoles terrestres costeros como otras tantas formas de agua dulce, y 14 000 especies descritas están bastante distribuidas por el mundo entero, tanto en las regiones tropicales como en las templadas. El grupo deriva su nombre de la conversión de la cavidad del manto en un pulmón. Los bordes de ella se han sellado al dorso del animal, excepto en cuanto a una pequeña abertura en el lado derecho, llamada neumostoma. El permanece abierto, por regla general, durante todo el tiempo, y se abre y cierra con el ciclo ventilatorio.

4.9.1.4 Nutrición

Este grupo incluye herbívoros, carnívoros, alimentadores de suspensión y de materias orgánicas descompuestas, y parásitos.

4.9.1.5 Alimentación.

Los hábitos alimenticios del grupo son variables. Muchas especies son herbívoras, y roen material vegetal con la rádula. Otras en cambio son predatoras activas y algunas son parásitas (Lincon y Gordon, 1989).

Los Herbívoros, tienen rádula con el número mayor de dientes de todos los gastropodos (hasta 150 dientes pequeños por hilera transversal) (Meglisch, 1981).

4.9.1.6 Generalidades de la Alimentación.

La radula es empleada casi siempre en la alimentación. La digestión es siempre, por lo menos parcialmente, extracelular. Con pocas excepciones, las enzimas para la digestión extracelular son producidas por las glándulas salivales, bolsas esofágicas, glandular digestiva, o por una combinación de estas estructuras. El estómago es la sede de la digestión extra celular, y la glándula digestiva de la absorción y la intracelular, si es que la misma tiene lugar. La movilización del alimento a lo largo del intestino se produce, por lo menos parcialmente, por medio de cilios. El alimento es movido más bien por conductos ciliados que por contracción muscular.

4.9.1.7 Características del Cuerpo

El cuerpo de los moluscos esta generalmente cubierto por un tegumento húmedo. El manto que secreta la concha, es un pliegue de la pared corporal. Los caracoles solo tienen un lóbulo y este forma una concha univalva. Entre el y la pared corporal se encuentra la cavidad del

mismo (figura 11). En el adulto hay un celoma reducido en forma de cavidad pericárdica y otra para los órganos reproductores.

La mayor parte de los gasterópodos y cefalópodos tiene mandíbulas. Todos los moluscos tiene un órgano raspador (radula) (por lo general se encuentra en la boca de la faringe). Consta de una hilera de dientes quitinosos que desgarran el alimento a medida que pasa por ellos.

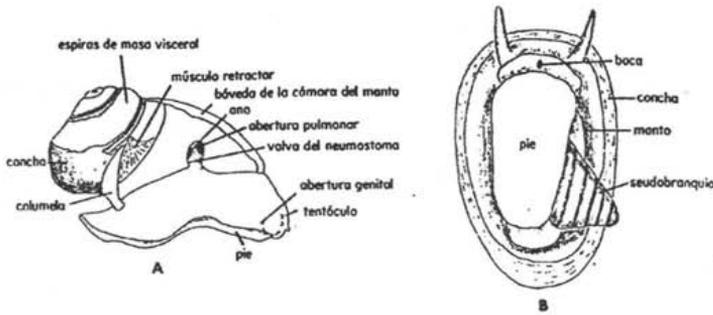


Figura. 11: El caracol disecado parcialmente para mostrar la abertura en forma de poro (neumostoma) hacia el pulmón o ola cavidad del manto B, El pulmonado dulceacuicola, una lapa con branquia secundaria; vista ventral (Barnes, 1997)

4.9.1.8 Respiración

Esta se efectúa principalmente en las branquias y el manto. La mayoría de los caracoles de aguas dulces y terrestres (gasterópodos pulmonados) captan el aire en la cavidad vascularizada; Otros respiran por la piel.

4.9.1.9 Reproducción

Los sexos generalmente están separados aunque ciertos grupos son hermafroditas. La mayoría de los moluscos producen gran cantidad de huevos. Después de la incubación, los moluscos sufren metamorfosis, que suele comprender un estado de larva trocofora que se transforma en una veliger, llamada así por una banda de cilios (o velo) localizada en la parte anterior de la boca. El velo es el órgano de locomoción y en parte es importante para la dispersión de las especies (Boozotlan, 1991).

4.10 Familia Lymnaeidae

Estos gasterópodos tienen una distribución mundial, pero cabe hacer notar que su mayor diversidad específica está localizada en el Norte de Estados Unidos y parte central de Canadá.

De manera característica las conchas muestran formas que pueden ser espiraladas o no, siendo las últimas con el aspecto de lapas, los de forma en espiral tienen sus conchas dextrógiras (Pérez, 1995).

Los tentáculos de Lymnaeidae son anchos, planos y triangulares en vez de ser largos delgados y filamentosos como sucede en los representantes de la familia Planorbidae, Physidae y Ancyliidae; no obstante y en contraste con las tres familias mencionadas todos los Lymnaeidae carecen de una pseudo branquia respiratoria (Burch y Cruz, 1987).

Los miembros de esta familia generalmente se distribuyen en la interfase agua-tierra, pero es de llamar la atención el hecho de que preferentemente vivan en las depresiones o hundimientos del suelo fangoso. Esto es ocasionado por las pisadas del ganado cuando éste se acerca a abrevar y/o ramonear en las orillas del embalse (Pérez, 1995).

4.11 Ciclo Biológico de Gasterópodos

En su ciclo biológico se muestran características de comportamientos y de desarrollo más o menos similares durante la mayor parte del mismo.

Las condiciones de temperatura ambiente en que se encuentran estos caracoles son 19 y 21°C, las tallas son variables pero nunca menores a 7 milímetros, ya que esta última fue determinada y reconocida como la correspondiente a la madures sexual.

La fecundación es interna y de tipo cruzada a consecuencia de su hermafroditismo, la duración del apareamiento, tarda aproximadamente entre cuarenta y ciento veinte minutos.

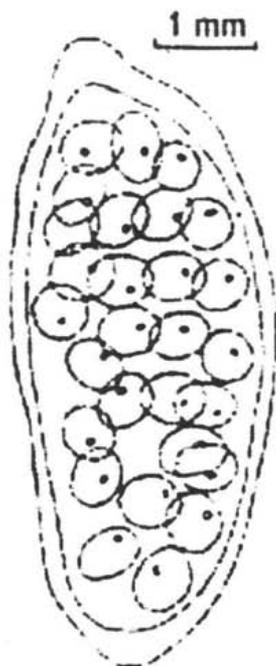
Posterior a la fecundación, producen sus desoves (Fig.14 huevecillos desovados), entre los nueve y doce días siguientes a la cópula, lo que depende de la temperatura ambiente, dicho factor determina la variación en el tiempo de eclosión el 96% de veces.

En el momento de la eclosión, tienen una talla no menor a 0.5 milímetros y aparentemente todos son iguales; no obstante en cuanto empiezan a desarrollarse los juveniles muestran un crecimiento desigual, de tal forma que algunos se tornan de mayor tamaño con respecto a otros en un mismo tiempo desde su salida del huevecillo, por lo que al término de 70 u 80 días, los individuos pueden mostrar tamaños de 7 a 12 milímetros sexualmente maduros.

Cuando los organismos alcanzan los 7 a 8 milímetros de tamaño, adquieren la talla correspondiente a la primera madurez sexual y consecuentemente sobreviene el apareamiento; resulta interesante mencionar que durante la cópula los organismos de menor tamaño funcionan como macho y los más grandes como hembras, justificando con ello el hermafroditismo que presentan, es decir que en algunos individuos primero se desarrollen gónadas masculina, mientras que en otras primero maduran las femeninas, por requerir de mayor espacio corporal para el almacenamiento de los huevos obviamente son más grandes.

Existen dos fases de crecimiento en ellos, la primera es de incremento de biomasa en forma rápida que se manifiesta durante los primeros 125 días, en los Physidae y Lymnadea y en 150 días aproximadamente para los Planorbidae; la relación de mortalidad aparece en las primeras dos semanas, posteriormente la mortalidad disminuye de los 120 hasta los 210 días, sin embargo existen períodos de alta mortandad durante el lapso de tiempo que dura el ciclo biológico (Pérez, 1995). El tiempo de vida es sumamente variable de uno a dos años para la mayoría de pulmonados de agua dulce (Barnes, 1997).

Figura 12: Saco con huevecillos de *Stagnicola palustris*



4.12 Clasificación Taxonómica

Eucariota

Metazoa

Reino: Animalia

Grupo: invertebrado

Phylum; Mollusca

Clase: Gasteropoda o Gastropoda

Subclase: Euthyneura (Nervios no cruzados)

Orden: Pulmonata o pulmonados

Suborden: Bassomatophora

Familia: Lymnaeidae

Genero: Stagnicola

Subgénero: Stagnicola

Especie: *palustris**

* Identificación en el laboratorio de invertebrados acuáticos ENCB-IPN

4.13 Características del Caracol

Stagnicola palustris (Müller, 1974)

Este es una especie nativa de la presa Ignacio Ramírez ubicada en Toluca Estado de México. Este embalse forma parte del sistema Lerma –Chapala el cual es un importante sistema hidrológico en México (Martínez, 2001). Es un molusco, gasterópodo, herbívoro con simetría bilateral, pulmonado, de la familia Lymnaeidae. (Barnes, 1977) el cual posee un pigmento respiratorio en la sangre que es una proteína llamada hemocianina, se caracteriza por poseer cobre en lugar de hierro (Cockrum, 1967).

El caracol *Stagnicola palustris* se identificó en el Instituto Politécnico Nacional en la Escuela Nacional en Ciencias Biológicas, estos organismos son de cáscara cónica con color marrón oscuro, la boca tiene una venda marrón rojiza dentro de la anchura Medida promedio 20 milímetros por 8.5 mm. , en la ilustración 12 se muestra su figura. Su alimentación basada en plantas, él vive en agua dulce y tranquila, en lugares fangosos o bancos. En Europa se encuentra en África del noroeste y Asia (Lincoln y Gordon, 1989).

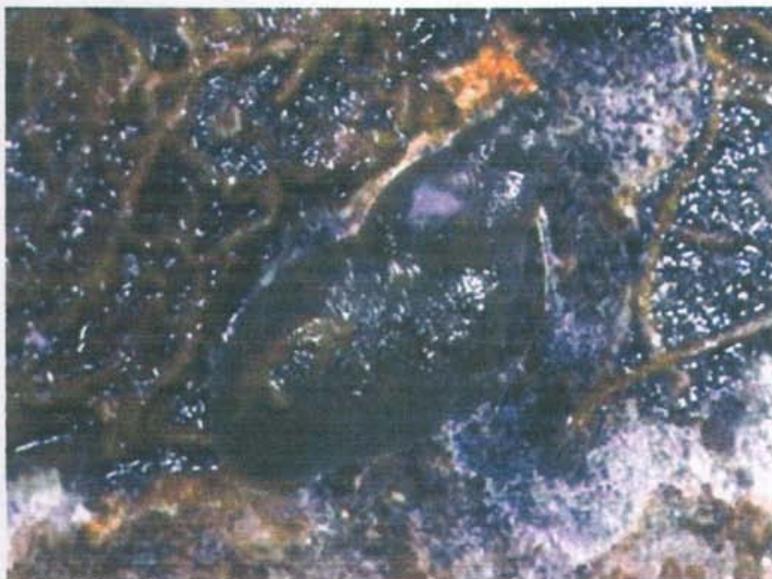


Figura. 13: Caracol *Stagnicola palustris*

4.14 Ubicación de la Presa Ignacio Ramírez

El municipio de Almoloya de Juárez se localiza en la región I Toluca, pertenece al XIV distrito judicial con sede en la capital del estado, al que corresponden los municipios de Toluca, Metepec, Temoaya, Villa Victoria y Zinacantepec. Almoloya de Juárez colinda con seis municipios: al norte con San Felipe del Progreso e Ixtlahuaca, al sur con Zinacantepec, al este con Toluca y Temoaya y al oeste con Villa Victoria y Amanalco de Becerra. Se localiza entre las coordenadas $90^{\circ} 14' 20''$ y $19^{\circ} 33' 01''$ de latitud norte y $99^{\circ} 42' 07''$ y $99^{\circ} 56' 13''$ de longitud oeste (figura 14). La presa se ubica sobre el río de la Gavia a 25 Km aproximadamente al noroeste de la ciudad de Toluca, 3 Km. aguas arriba de la influencia con el río Lerma, en el municipio de Almoloya de Juárez, Estado de México. Ella descansa en el ejido Salitre de Mañones, San Agustín Citlali y San Antonio.



Figura 14: Mapa de Ubicación de Almoloya de Juárez (Muñoz, 2003).

4.14.1 Extensión

El municipio de Almoloya de Juárez está ubicado en la parte nor-occidental del Estado de México, perteneciente a la región I Toluca, extensión que representa el 17.0% del total de la región; cuenta con una superficie de 483.8 kilómetros cuadrados; y en la entidad ocupa el 2.2% del territorio estatal, y se encuentra a una altitud en la cabecera municipal de 2,600 metros sobre el nivel del mar.

Se localiza entre las siguientes coordenadas geográficas:

La altitud promedio del territorio municipal es de 2,600 metros sobre el nivel del mar.

4.14.2 Clima de Almoloya de Juárez

El clima es templado subhúmedo, frío con lluvias en verano y parte del otoño, la temperatura media anual de 10° a 14° C y una precipitación total anual de 1000 a 1200 mm.

4.14.3 Características de la Presa

Con el propósito de aprovechar las aguas del río "La Gavia" para riego, se construyó en 1965 la Presa Ignacio Ramírez, la cual tiene una capacidad total de 2,548.40 millones de m³, sin embargo el almacenamiento máximo es de 20.5 millones de m³.

En la presa Ignacio Ramírez el pH promedio es de 6.5, con un contenido de materia orgánica de 4.9% (Lincoln y Gordon, 1989).

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los cuerpos acuáticos se pueden producir derrames de petróleo, en donde son liberados los hidrocarburos policíclicos aromáticos, cuya degradación a través de microorganismos es a menudo lenta, lo que conduce a su acumulación en los sedimentos, suelos, plantas acuáticas y terrestres, así mismo en peces e invertebrados. Considerando que el fluoranteno es uno de los seis hidrocarburos más frecuentes en dichos derrames y esto causa un problema en la biota acuática por esta razón es importante analizar y conocer el efecto de este compuesto a nivel de las enzimas ACHasa, EROD y la concentración de proteínas sobre un organismo acuático como el caracol *Stagnicola sp*, ya que estos bioindicadores de daño mantienen la homeostasis del organismo.

6 JUSTIFICACIÓN

La contaminación de cuerpos de agua por petróleo puede producirse por transporte del mismo y por actividades antropogénicas, lo que confiere a que se bioconcentren y biocumulen, los compuestos alcanzando concentraciones dañinas.

Considerando que los hidrocarburos producen toxicidad en la biota, es necesario evaluar los efectos tóxicos ocasionados por estos en particular del fluoranteno, ya que es uno de los elementos que es detectado con mayor frecuencia, ya que permitirá evaluar el riesgo que se tiene de este compuesto presente en el cuerpo de agua.

7 HIPÓTESIS

Si el fluoranteno es un hidrocarburo, neurotóxico, mutagénico, carcinogénico y teratogénico, entonces al ser derramado en un cuerpo de agua producirá daños sobre la biota, provocando a nivel bioquímico una alteración en biomarcadores de daño tales como la actividad enzimática de EROD, Acetilcolinesterasa y el contenido de proteínas en *Stagnicola sp.*

8 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la toxicidad del fluoranteno en *Stagnicola sp* a nivel bioquímico.

8.1 Objetivos Particulares

- Determinar la actividad basal de Acetilcolinesterasa y EROD en *Stagnicola sp*.
- Cuantificación en proteínas a nivel basal.
- Determinar la actividad de Acetilcolinesterasa y EROD en *Stagnicola sp* , resultante de la exposición a concentraciones subletales de fluoranteno.
- Cuantificación en Proteínas resultantes de la exposición a concentraciones subletales de fluoranteno.

9 MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 Obtención y Mantenimiento del Organismo de Prueba

Se colectaron los organismos en la presa Ignacio Ramírez, en época de estiaje (Enero-Febrero), incluyendo individuos de talla 0.5 a 1 cm. Estos se capturaron con una red para peces de acuario, se transportaron en una pecera con H₂O de la presa. En el laboratorio se pusieron a detoxificación en agua dura (2.4 g de Mg SO₄, 3.48g de NaHCO₃, 16 g de KCl y 2.4 g de CaSO₄.2H₂O todo ello disuelto por litro de agua bidestilada), el primer día con agua de la presa el segundo día agua de la presa 50% y agua dura 50%. Se les alimentó con lechuga cada tercer día con oxigenación constante al igual que recirculación constante. El acondicionamiento se dio en el transcurso de una semana. Las características fisicoquímicas del agua de cultivo fueron: pH 7- 8, salinidad de 0.5-0.4 ppm, y temperatura de 18-25°C(Figura 15). Para las pruebas se utilizaron los organismos adultos capturados en la época de estiaje (enero-febrero).



Figura 15: Sistema de mantenimiento del caracol *Stagnicola sp*

9.2 Toxicidad Subletal

Se realizo un prueba de la toxicidad subletal colocando 10 caracoles en cada lote con cinco repeticiones de los extractos, Se colocaron 10 organismos testigo los cuales solo estuvieron en agua dura, 10 caracoles en control con cinco lotes solo con los solventes hexano/acetona 1:1, para cada concentración y 10 animales en la solución problema con cinco concentraciones de 17 a 40 $\mu\text{g/L}$ de fluoranteno disuelto en hexano/acetona 1:1 con cinco lotes cada concentración. Después de 24, 48, 72 y 96 hr. se determino el número de organismos muertos. Las concentraciones utilizadas fueron tomadas de una solución fluoranteno-haexano/acetona 1:1. Las concentraciones para intoxicar fueron tomadas de una solución de 10 mg de fluoranteno en 1 litro de hexano /acetona de ellas se intoxicaron con un volumen de 85 μl , 100 μl , 150 μl y 200 μl , para después determinar AChasa, EROD y proteínas.

1) 85 μl (que corresponde al promedio de los valores máximos y mínimos detectados en agua 17 $\mu\text{g/L}$).

2) 100 μl (que corresponde al valor máximo detectado en agua 20 $\mu\text{g/L}$)

(Díaz, 2001).

3) 150 μl (que corresponde al promedio entre el limite permisible y el valor intermedio de máximos y mínimos detectados en agua 0.0015mg/L, el cual fue modificado a criterio de 30 $\mu\text{g/L}$)

4) 200 μl (que corresponde al límite permisible de fluoranteno para agua, que es de 40 $\mu\text{g/L}$)
(Díaz, 2001).

Después de 96 hr., se retiraron los hidrobiontes y se homogeneizaron para determinar la actividad de AChasa y EROD con su correspondiente concentración de proteínas. Trabajando una concentración por día con un biomarcador.

Se procedió a optimizar el método de proteínas, acetilcolinasterasa, y EROD. Se utilizo la cantidad de biomasa mas adecuada 1g, del *Stagnicola sp.* Se ajustaron los reactivos con respecto a la biomasa así como los tiempos.

9.3 Determinación de Acetilcolinesterasa (AChasa) (Ellman et al, 1961).

Se pesó 1 g de organismo sin concha, agregando 1:4 de amortiguador de fosfatos (Buffer 100mM pH 7.4), se maceró en frío, posteriormente se centrifugó a 9000rpm por 15min, se obtuvo el sobrenadante y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones.

Se tomó 0.1 mL de sobrenadante, y se agregó 0.6 mL de yoduro de acetilcolina (1M) y 0.6mL de 5-5 ditiono bis (2-ácido nitro benzoico)(3,3'-6)DTNB (1M), se incubó a 37°C por 20 min, se adicionó 0.5 mL de salicilato de eserina (0.1M) y al final se leyó la absorbancia en el Espectrofotómetro Perkin-Elmer LS-3B a 412nm.

Se realizó una curva estándar de colina, con 0.1, 0.2, 0.4, 0.5 y 0.6 mL de solución de colina 1mM, se llevaron a 0.6mL con H₂O desionizada y se adicionó 0.6 mL de DTNB. Se incubó a 37°C por 20 min., después de este periodo se agregó 0.5 mL de salicilato de eserina(0.1M). Posteriormente se interpoló la absorbancia en la curva estándar y se realizaron cálculos para expresar el resultado en nmol de AChasa hidrolizada /mg de proteína/20min.

9.4 Determinación de EROD (Parrott *et al*, 1998)

Se pesó 1g de tejido se agregó 10 mL de solución "A" Buffer, homogeneizando en frío en el aparato Glas-Col, se centrifugó a 9 000 rpm 20 min a 4°C. A 100 μ l del sobrenadante se le agregó 0.25 mL de 7-etoxiresorufin (0.00001M) disuelta en dimetilsulfoxido, 0.7 mL de NADPH (adenin difosfato hidratado 0.001M), 1.25 mL de HEPES (N(2-Hydroxyethyl) piperazine-N-(2- ethanesulfonic acid 0.1M), 0.25 mL de sulfato de magnesio(0.01M), 0.1 mL de solución de albúmina (0.1g/10mL agua) .

Se incubó 15min a 25°C, adicionando 3.2 mL de metanol frío, se centrifugó a 4000 rpm 15 min.

Se transfirieron a la celda el sobrenadante leyendo la fluorescencia a 530/588nm de absorbancia, excitación/emisión. Se realizó la curva estándar de resorufin (PM 235.2 g/mol)

Se pesó 35.28 mg de resorufin y se llevó a 10 mL con tris-HCL (50 mM PH 7.5). De esta solución se añadió 2,4, 6, 8 y 10 μ l, llevándolos a 10 μ l con agua desionizada, adicionando 0.7 mL de NADPH (0.001M), 1.25 mL de HEPES (0.1M), 0.25 mL de sulfato de magnesio (0.01M), 0.1 mL de solución de albúmina (0.1g/10 mL agua).

Se adiciono 3.2 mL de metanol frío (para parar la reacción), incubando 15 min. a 25°C , se medio la fluorescencia en un espectrómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS-3B a 520/585 nm . Ajustando a cero con blanco sin resorufina.

Se realizaron los cálculos par expresar el resultado en nanomoles de EROD/ mg de proteína/ 15min. de incubación.

9.5 Determinación de proteínas (Bradford, 1976)

Se peso 1g de tejido húmedo machacando en frío, se agrego 4 mL de Buffer PO_4^- (100mM) pH 7.4, centrifugando a 9000rpm por 15min, se tomo 25 μl de sobrenadante, llevándolo a 100 μl con agua desionizada, se agrego 2.5 mL de reactivo de Bradford (100mg de azul de Commasie (azul G250) ,100ml de ácido fosforico, 50ml de etanol al 95%, esto se llevo a 1L con agua deshionizada).

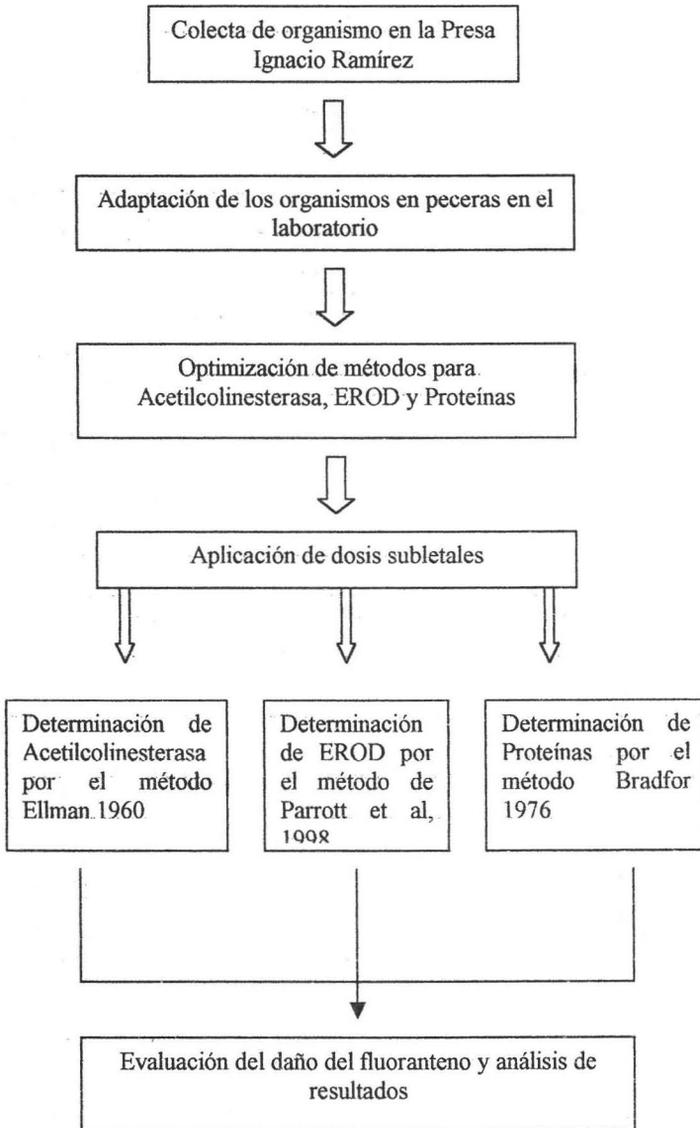
Se agito y se dejo reposar 5 min.

Se leyó la absorbancia a 595 nm en el Espectrofotómetro Perkin-Elmer LS-3B

y se interpolo con la curva patrón de albúmina sérica, se analizaron los cálculos para expresar los resultados en unidades de miligramos de proteína por gramo de tejido.

Se preparo una curva patrón por duplicado con 20 μl de albúmina +80 μl de agua y 2.5 mL de reactivo de Bradford, 40 μl de albúmina +60 μl de agua y 2.5 mL de Bradford, 60 μl de albúmina +40 μl de agua +2.5 mL de Bradford, 80 μl de albúmina +20 μl de agua +2.5 mL de Bradford y 100 μl de albúmina +2.5 mL de Bradford.

9.6 Diagrama de Flujo



10 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados de la evaluación de toxicidad en Proteínas, EROD así como en AChasa fueron sometidos a un modelo de análisis de varianza, con el fin de detectar diferencias significativas y posteriormente se efectuó la prueba de Barlett's, Levine y en algunos casos T de Students.

11 RESULTADOS

Para la evaluación de la actividad de AChasa para *Stagnicola palustris* tratada y control así como testigo (Cuadro 1, figura 16) se observó un incremento del 32% para la concentración de 0.0008mg de f con respecto a el control, mientras que para la concentración de 0.001mg de f se obtuvo un incremento del 58%, al igual que para la concentración de 0.0015 mostró un aumento de 13% en la actividad enzimática, la concentración de 0.002mg de f se halló un decremento del 15% en la actividad de AChasa con respecto a su control.

Cuadro 1 Resultados de la actividad de AChasa con su desviación a 96 hrs. de intoxicación con fluoranteno.

Concentraciones	Promedio	
	AChasa nmol/mg/min	desvest
testigo	2,7082E-07	1,0188E-07
Control 17	3,4102E-07	1,6699E-07
17 µg/L de f	4,5012E-07	9,2922E-08
control 20	2,5492E-07	7,2321E-08
20 µg/L de f	4,0234E-07	1,6735E-07
control 30	4,9525E-07	9,0039E-08
30 µg/L de f	5,6122E-07	1,8747E-07
Control 40	5,5271E-07	6,0674E-08
40 µg/L de f	4,7372E-07	4,5589E-08

El efecto del fluoranteno en AChasa como puede observarse en la figura 16 y tabla en las concentraciones de 17, 20, 30 $\mu\text{g/L}$ de f se incremento la actividad de la enzima. Sin embargo el efecto inhibición ocurrió en la concentración de 40 $\mu\text{g/L}$ de f siendo esta la más alta concentración.

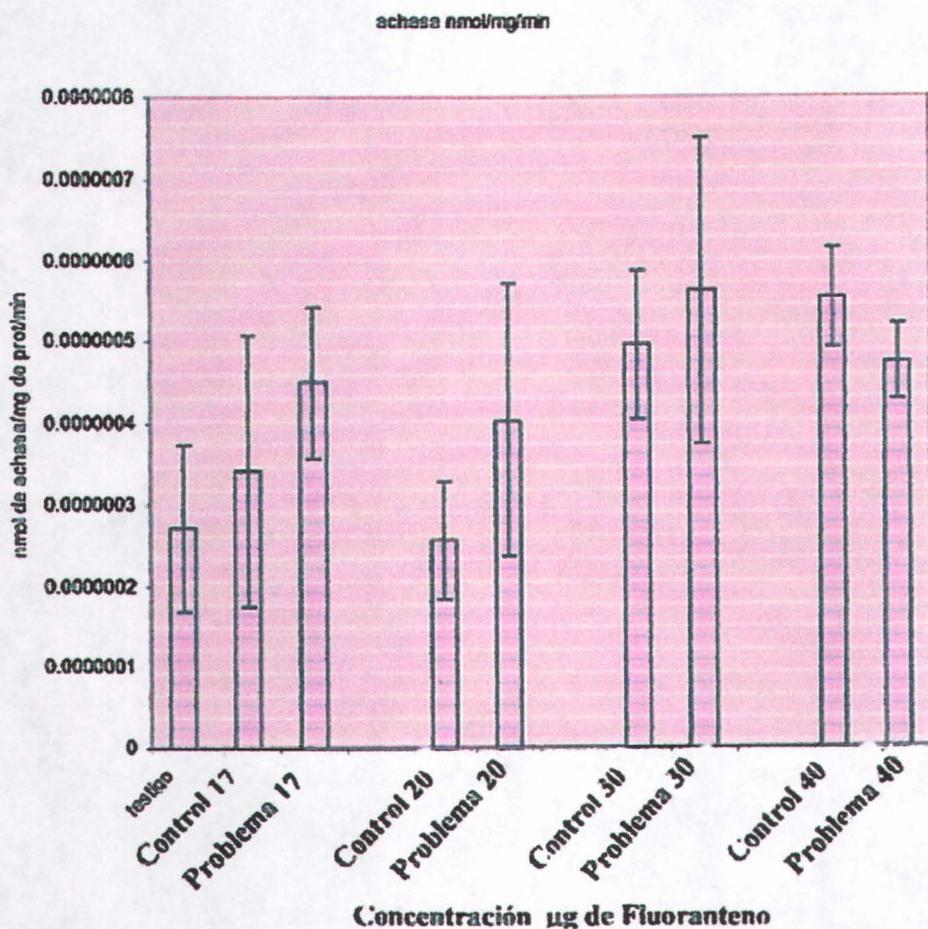


Figura 16 Resultados de la actividad de AChasa en el caracol *Stagnicola palustris* en distintos tratamientos a 96 hrs de exposición

En la siguiente figura 17 se observa como la concentración de 17 $\mu\text{g/L}$ de f tiene un aumento en la actividad enzimática de AChasa con respecto a su testigo, la concentración de 20 $\mu\text{g/L}$ de f aumenta con respecto a su control al igual que la concentración 30 realiza un aumento en la actividad de la enzima con respecto a su control. La concentración de 40 $\mu\text{g/L}$ de f tiene una inhibición en la actividad de la enzima con respecto a su control.

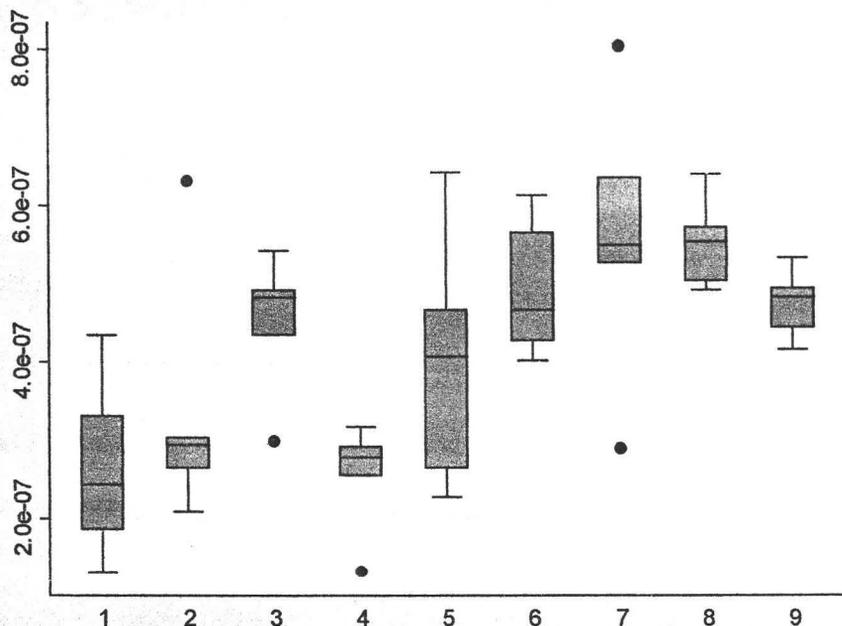


Figura 17 resultados de la actividad de AChasa según el modelo estadístico. Con diferentes concentraciones, como resultado de 96hrs. de exposición a fluoranteno en el caracol *Stagnicola palustris*. Donde el 1 es el testigo, 2 es igual al control 17, el 3 es el problema 17 $\mu\text{g/L}$ de f, el 4 es el control 20 el 5 es el problema 20 $\mu\text{g/L}$ de f, el 6 es el control 30, el 7 es el problema 30 $\mu\text{g/L}$ de f, el 8 es el control 40, el 8 es el problema 40 $\mu\text{g/L}$ de f.

En la Figura 18 se muestra la comparación del control contra el testigo y muestra que los solventes tiene un efecto de elevar la concentración proteica.

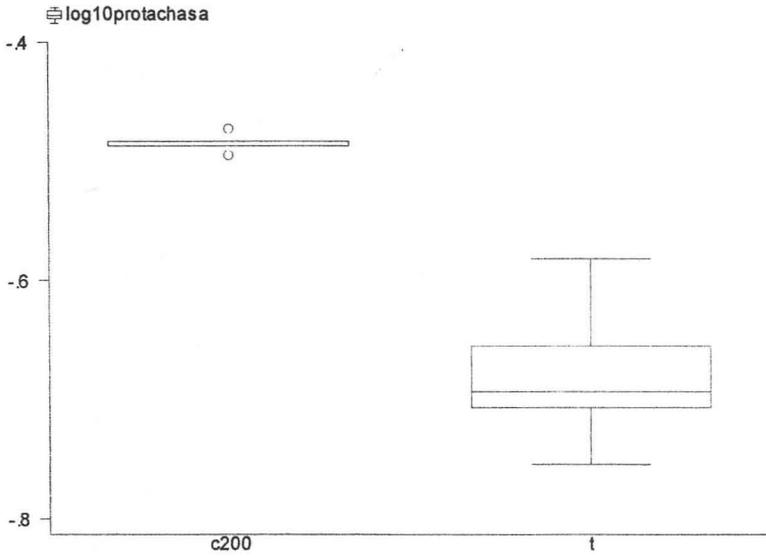


Figura 18 Resultados en actividad de AChasa, control contra testigo realizados en el programa estadístico. Con exposición a fluoranteno en *Stagnicola palustris* durante 96hrs.

La figura 19 muestra la concentración de proteínas en la determinación de AChasa esta varia. La concentración 30 $\mu\text{g/L}$ de F y 40 $\mu\text{g/L}$ de F tiene una disminución casi nula en la concentración con respecto al control, mientras 17 y 20 $\mu\text{g/L}$ tiene una disminución muy severa en la concentración proteica, con respecto al control. El análisis estadístico determino que no hay diferencia estadísticamente significativa entre tratamiento (igualdad de varianzas)

proteinas en la medicion de AChasa

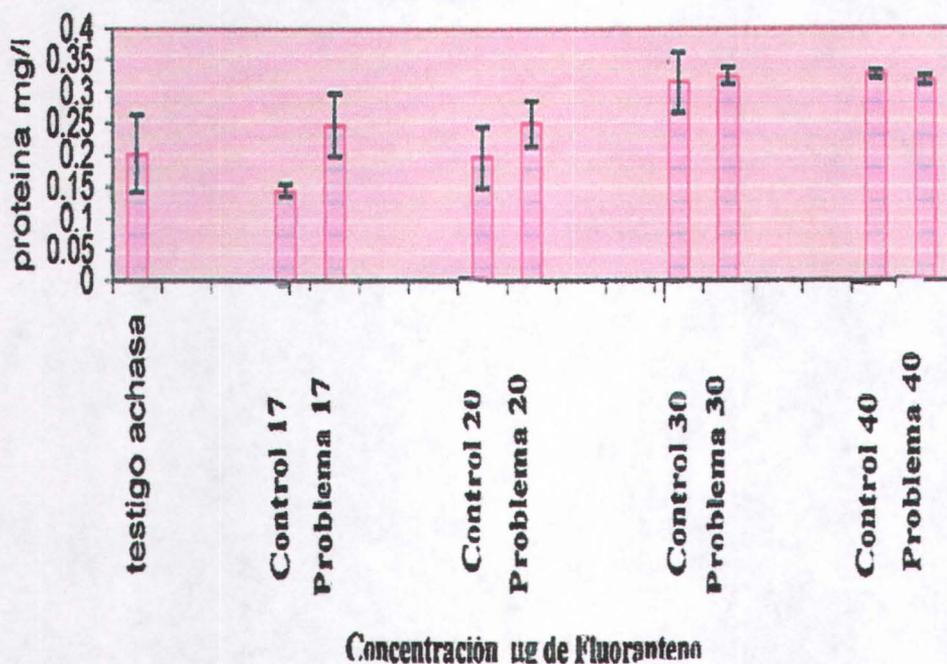


Figura 19 Resultado del contenido de proteínas con respecto a la actividad de AChasa en los diferentes tratamientos con exposición a fluoranteno durante 96hrs en el caracol *Stagnicola palustris*

La figura 20 muestra como la concentración en proteínas en la evaluación de AChasa , donde 4) 30 $\mu\text{g/L}$ de F y 3) 40 $\mu\text{g/L}$ de F tienen una mínima disminución de proteínas con respecto al control sin embargo para 2) 17 $\mu\text{g/L}$ de F Y 3) 20 $\mu\text{g/L}$ de F hay una disminución apreciable.

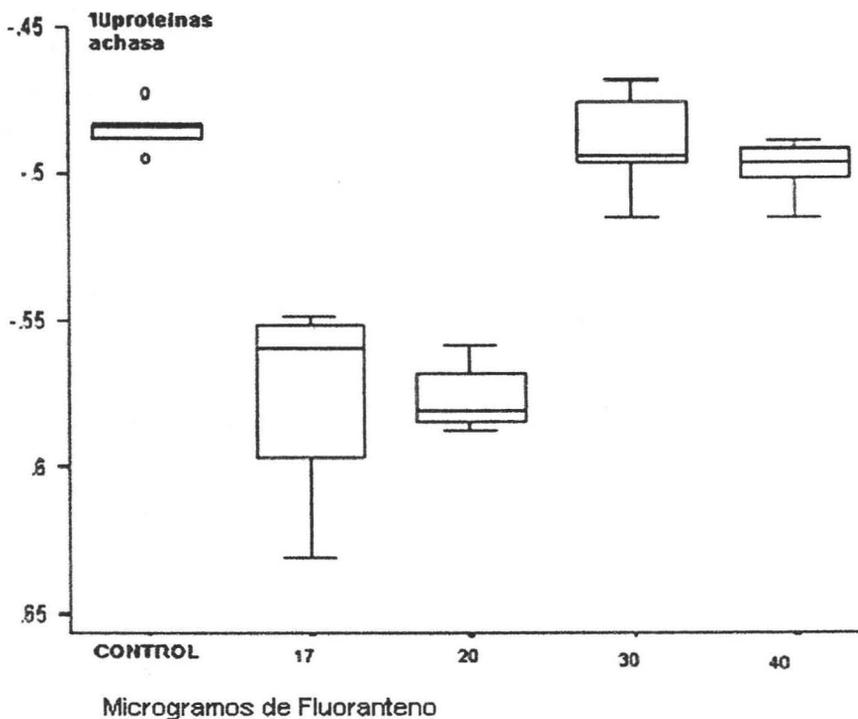


Figura 20 resultados estadísticos de proteína como resultado de la actividad en AChasa con diferentes concentraciones de fluoranteno durante 96hrs en el caracol Stagnicola palustris.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad de EROD en *Stagnicola palustris* tratado y control mostraron (cuadro 2 y figura 21) decrementos del 13% en la concentración de 17 µg/L de f con respecto al control, mientras que para el problema 20 µg/L de f se encontró un decremento del 31%, para la concentración de 30 µg/L de f se halló un aumento del 23% en la actividad de la enzima, para la concentración 40 µg/L de f se mostró un aumento muy elevado del 98% con respecto al control en la actividad enzimática.

Cuadro 2 Resultados de la actividad de EROD con su desviación a 96 hrs. de intoxicación con fluoranteno.

Concentración	EROD nmol/mg/min	desvest
Testigo EROD	0,00047626	3,7083E-05
Control 17	0,00138639	1,7486E-05
17 µg/L de f	0,00120567	4,1087E-05
Control 20	0,00129107	4,0833E-05
20 µg/L de f	0,00088747	2,7481E-05
Control 30	0,00050493	2,5454E-05
30 µg/L de f	0,00062372	1,7105E-05
control 40	9,0021E-05	3,5963E-06
40 µg/L de f	0,00017838	1,2019E-05

En la figura 21 se puede apreciar que para las concentraciones de 17 $\mu\text{g/L}$ de f y 20 $\mu\text{g/L}$ de f hay un efecto de inhibición de la enzima mientras que para las concentraciones de 30 y 40 $\mu\text{g/L}$ de f, hay un aumento en la actividad enzimática.

erod

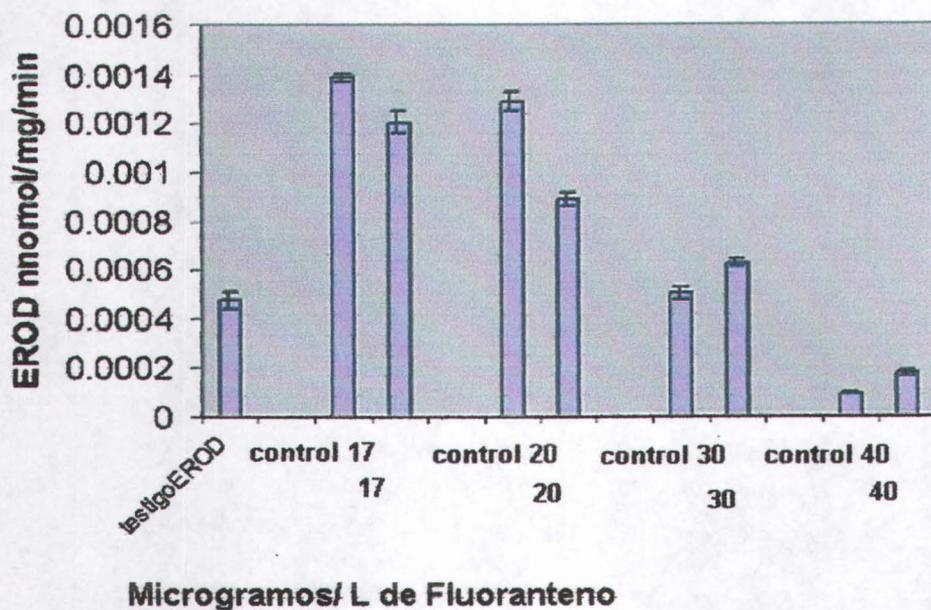


Figura 21 resultados para la actividad de EROD en diferentes concentraciones de fluoranteno durante 96 hrs. de exposición, en el caracol *Stagnicola palustris*.

En la figura 22 según el programa estadístico se observa que el control tuvo un efecto de inhibición para las concentraciones de 17 y 20 $\mu\text{g/L}$ de f, mientras que para las concentraciones de 30 y 40 $\mu\text{g/L}$ de f se observó un efecto de aumento en la actividad de la enzima (EROD) con respecto a su control de cada una.

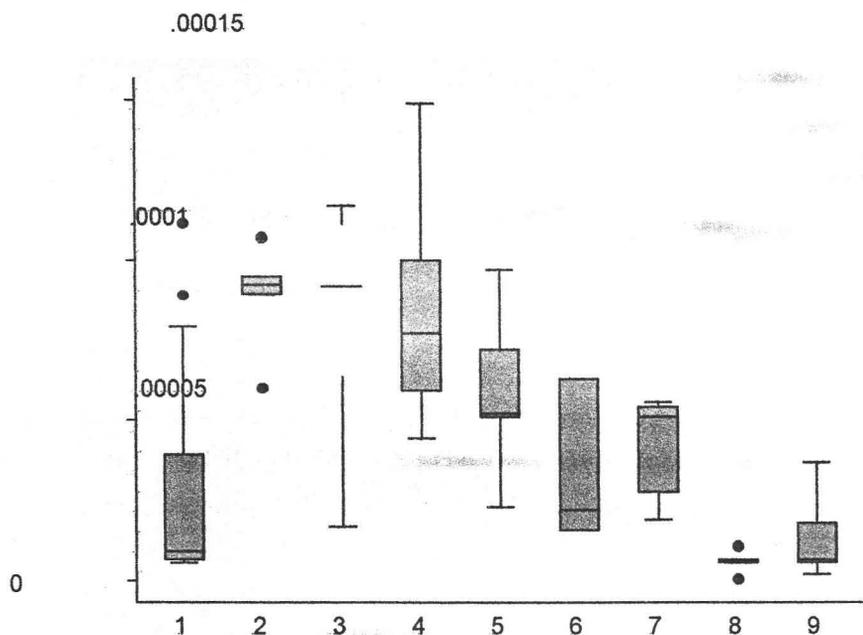


Figura 22 resultados estadísticos de la actividad de ERO en diferentes concentraciones de fluoranteno durante 96hrs en el caracol *Stagnicola palustris*. Donde el valor 1 es el testigo el 2 es el control 17, el 3 es el problema 17 mg/L de f, el 4 es el control 20, el 5 es el problema 20mg/L de f, el 6 es el control 30, el 7 es el problema 30 mg/L de f, el 8 es el control 40, el 9 es el problema 40mg/L de f.

En la Figura 23 se observa la concentración en proteínas en el tratamiento de 20µg/L de F esta aumenta un 100% con respecto a el control , teniendo para 17µg/L de F un aumento minimo ,mientras que para 30 no hubo cambio apreciable y para 40µg/L de F una disminución.

Proteínas en medicion de EROD

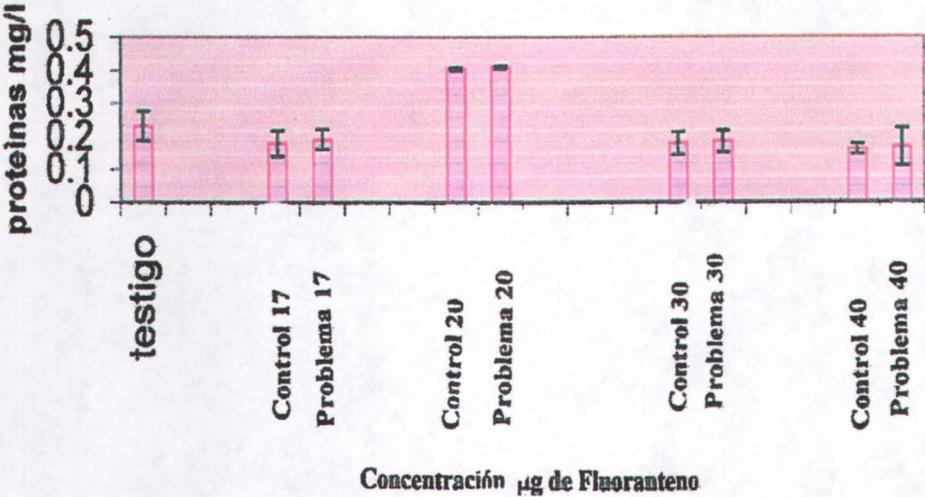


Figura 23 Resultados del contenido de proteínas con respecto a la actividad de EROD en los diferentes tratamientos con exposición a fluoranteno durante 96 hrs en el caracol *Stagnicola palustris*.

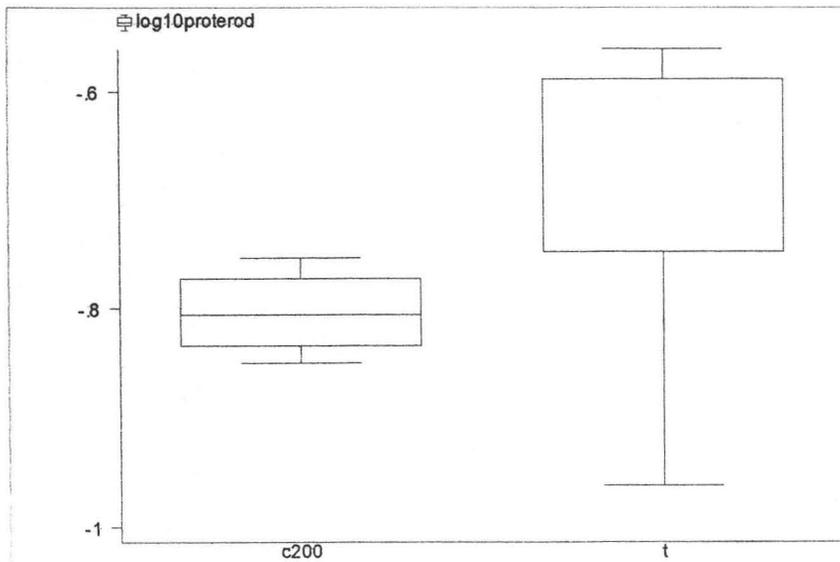


Figura 24 Resultados estadísticos de la actividad de proteína en control y testigo con respecto a la actividad de EROD en diferentes concentraciones con fluoranteno durante 96hrs en el caracol *Stagnicola palustris*.

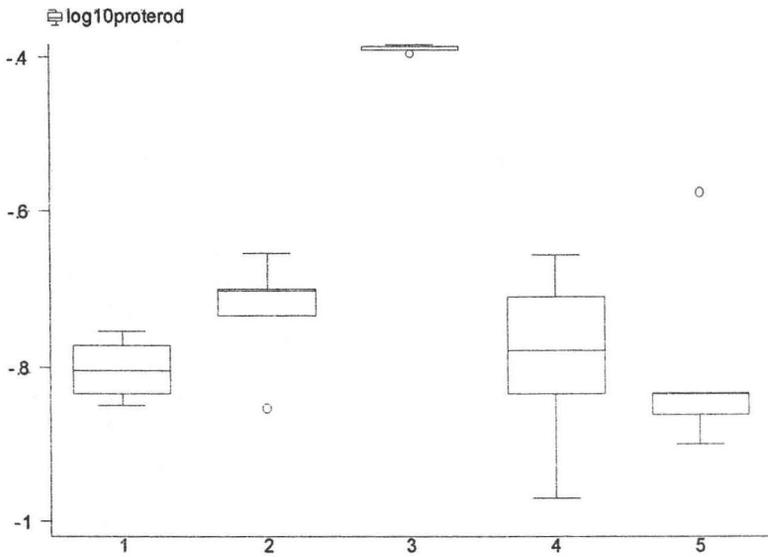
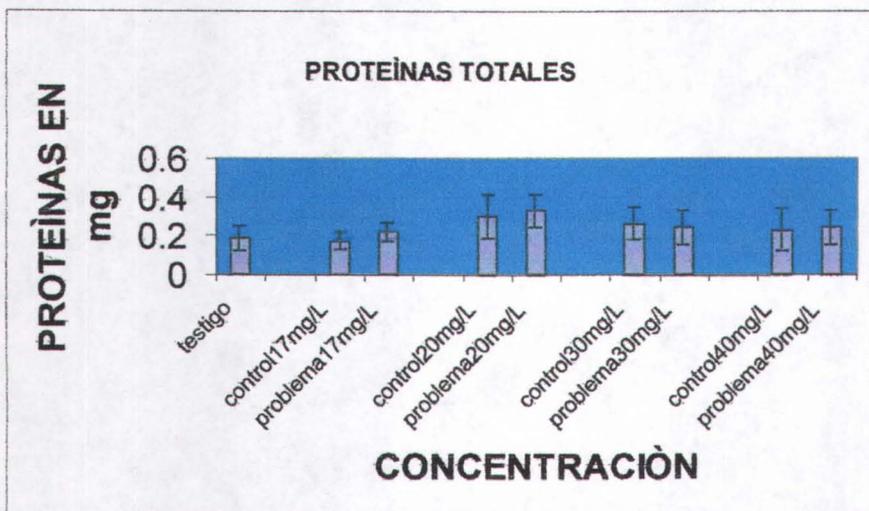


Figura 25 resultados estadísticos en la cantidad de proteínas con respecto a la actividad de EROD en diferentes concentraciones con fluoranteno durante 96hrs en el caracol *Stagnicola palustris*. Donde la caja 1 es el control mayor de H/A y la 2 es igual a 17, la 3 es igual a 20, la 4 es igual a 30, la 5 es igual a g 40 mg/L. de f.

La cuantificación de proteínas totales para *Stagnicola palustris* tratado, control, así como testigo.(Cuadro 3 , figura 26) se observó un incremento para la concentración de 17 µg/L de f del 71% , mientras que para la concentración del 20 µg/L se obtuvo un aumento del 275 en la concentración, para la concentración de 30 µg/L se halló un aumento del 3% y finalmente para la concentración de 40 µg/L de f se mostró un decremento en la concentración de 4 % .

Cuadro 3 Resultados de la cantidad de Proteínas Totales en mg para el caracol *Stagnicola palustris* a 96 hrs de exposición a Fluoranteno.

Concentración	Proteínas mg	
	promedio	desvest
testigo	0,18586315	0,06322011
Control 17µg/L	0,17265361	0,04431419
Problema 17µg/L	0,21785006	0,04923473
Control 20µg/L	0,30022619	0,11407214
problema20µg/L	0,32942754	0,0875394
control30µg/L	0,26230398	0,08241998
problema30µg/L	0,24542381	0,0890937
control40µg/L	0,23002507	0,10988087
problema40µg/L	0,2408651	0,08908226



Grafica 26 de la cuantificación de proteínas totales en *Stagnicola* sp a 96hr de exposición a fluoranteno

En la grafica 26 se muestra un aumento para las concentraciones de 17 y 20 $\mu\text{g/l}$ de Fluoranteno, se observa una baja en la concentración de 30 $\mu\text{g/L}$ de F.

12 DISCUSIÓN

El ambiente acuático es alterado por la incorporación de químicos, como resultado de una alta tecnología y desarrollo industrial. Los cuerpos de agua hoy están cargados con cerca de 60.000 diferentes químicos. Los análisis químicos no siempre revelan el impacto de la contaminación química en el mismo (Arinc *et al.*, 1994).

En la determinación de toxicidad letal de malation reportados por Galar (1999) en caracol *Stagnicola sp.* a 72 hrs. Reportaron un valor de CL50 en agua 0.0893 ppm. En el presente estudio se encontró un valor en el caracol *Stagnicola palustris* de 39.528×10^{-5} mg de fluoranteno. Estos resultados sugieren que este contaminante es mucho mas toxico que los insecticidas orgfano fosforicos y por lo tanto tiene una alta tasa de acumulación en la cadena alimenticia y en los ecosistemas.

12.1 Acetilcolinesterasa

La determinación de la actividad de ACHasa usada en estudios de biomonitoreo ambiental como biomarcadores y bioquímica, indican efectos del medio principalmente por los xenobioticos y esto constituye una herramienta para evaluar la exposición de contaminantes. (Voel, 1992).

En el trabajo de Bayen, (1986) evalúan la contaminación de algunos sitios en el litoral Tunisian, con organismos en diferentes condiciones ambientales para la determinación de su condición fisiológica en la ACHasa, para la evaluación del medio ambiente. La variación espacial de la actividad de la enzima en el control se encontró valores de 8 nmol/min/mg proteína sin embargo en el lago Faroua se encontró un valor de 3 nmol/min/mg proteína. En Jemil el valor encontrado fue de 2.5 nmol/min/mg proteína; en el canal de Tunis de 6 nmol/min/mg proteína; en el lacustre North Lac se encontró 7 nmol/min/mg proteína.

Los resultados comparativos de la actividad de la enzima en tejidos, demuestran contaminación por exposición a hidrocarburos durante el periodo de la investigación. Los valores encontrados en el cuerpo de agua Faroua son indicadores de contaminación en la glándula digestiva por alimentos contaminados por hidrocarburos.

En otro estudio demostró que ACHasa fue inhibida por el agua de la laguna Bizerte al compararla con otros sitios. Trabajos previos reportados de este lugar demostraron que este cuerpo de agua fue altamente contaminado por pesticidas e insecticidas de los deslaves en agricultura ya que la actividad de la enzima era mayor (Dellali, 2001).

Inhibición *in vitro* de ACHasa por compuestos Organo fosforados (OP) en varios tejidos ha sido demostrada en diferentes estudios. Estos pesticidas usados extensivamente en la agricultura, éstos tienen un efecto de inhibición en la actividad de ACHasa (Arman, 2004). En sitios de contaminación marina, se han detectado un gran número de compuestos que afectan al ecosistema por inhibición de su actividad por pesticidas y por metales pesados en medio marino. (Narbone 2001).

Coppage and Matthews (1974) reportan que los pesticidas organofosforados y carbamatos inhiben la actividad de ACHasa y causan muerte a los organismos.

Dembele y colaboradores, en 1999 reportaron que la actividad de ACHasa en vivo en diferentes tiempos de exposición sobre cerebros de carpa, tiene una inhibición por insecticidas como son el carbono furano y Chlorofenovinfos.

Los compuestos de eserina se reportan como un inhibidor de la actividad de ACHasa en presencia de BW284C51 (Sine *et al.*, 1992; Sylver, 1974; Vigny *et al.*, 1978).

Hoffman *et al.*, (1990), Asís *et al.*, (1993), Martínez-Tabche *et al.*, (1993) and Kufcsak *et al.*, (1994) reportan que elementos como boro, cadmio y cobre incrementan la Acetilcolinesterasa en diferentes organismos expuestos a estos metales.

Scaps *et al.*, (1997) reportaron inhibición de esta enzima en pez *Nereis diversicolor*

Los efectos de eserina y BW284C51 en la actividad de ChE de *M. galloprovincialis* haemolymph. La eserina inhibió completamente la actividad enzimática cuando fue probada una concentración baja (0.006mM) significa que inhibió la actividad enzimática (García *et al.*, 2000).

Bajas concentraciones (intervalo 10^{-5} M) de la carbamata eserina inducen la inhibición de ChE (Eto 1974). Este hecho permitió distinguir ChE de esterasas no específicas, que no son inhibidas por este compuesto. En estudios con biomarcadores, este conocimiento es muy importante cuando los tejidos podrían contener cantidades significantes de esterasas no específicas, lo que contribuye a la actividad medida y tal vez más o menos sensitiva que ChE para anti-colinesterasas químicas (García *et al.*, 2000).

En el presente trabajo con respecto a la actividad de Acetilcolinesterasa en *Stagnicola palustris*, se obtuvo un aumento en la actividad para las concentraciones de 10, 20 y 30 $\mu\text{g/L}$ de Fluoranteno. Estudios realizados por Bayen (1986) coinciden con los resultados de este trabajo. Posteriormente una disminución en la concentración 40 $\mu\text{g/L}$ de fluoranteno, todos ellos con respecto al control. En la mayoría de los trabajos reportados se presenta una tendencia de inhibición de la actividad de AChasa, un trabajo que reporta el incremento es Martínez-Tabche (1993) y Kufcsak *et al.*, 1992; este incremento se da por elementos como boro, cadmio y cobre.

12.2 EROD

La inducción de citocromo p450 A y de estas actividades monooxigenasa, es decir actividad de arilhidrocarbon hidroxilasa (AHH) y 7-ethoxyresorufin o-ditilasa (EROD), en pez por estos químicos son probablemente los más frecuentemente usados como medidores bioquímicos en biomonitoreo de medioambiente contaminado. (Arinc *et al.*, 1999).

Algunos estudios recientes han empleado EROD como un biomarcador potencial por exposición xenobiótica en pez. (Arinc *et al.*, 1999).

Después de exponer células o tejidos de mamíferos en cultivos con ciertos químicos, la actividad enzimática de la AHH el sistema incrementó y diferentes formas de citocromo-p450 fueron sintetizadas. Este proceso de inducción tal vez produce un importante mecanismo de detoxificación de los químicos por una parte, o en algunos otros casos provee un sendero hacia la formación de intermediarios carcinogénicos.

Cuando un individuo esta expuesto HAP'S se produce un incremento en la síntesis de todos los componentes del sistema incluyendo CP450 y proteína.

Datos con respecto al efecto del pH en EROD en *G. pulex* indican que su actividad es máxima en el intervalo de pH 7.0 - 7.8, decreciendo hacia valores altos. Otros resultados similares, han reportado que la actividad de EROD en intestino, hígado y pulmón de rata, fue máxima en un intervalo de pH 7.8 y declina con valores altos de pH.

Las actividades industriales urbanas impactan altamente la calidad del agua. Esto ha sido gran generador de contaminantes orgánicos.

Dikari, (1992) demostró que la inducción de EROD en hígado de pescado ha sido inhibida por la aplicación simultánea de carbón tetracoloruro.

En contraste para EROD su inducción a sido detectada en muchos estudios (Arinc y Sen 1999, 2000), se observo una ligera inhibición de la enzima. En algunos casos, un consumo alto de contaminantes inhibe la acción de EROD. (Kutlu and Susuz, 2003).

En el presente trabajo la actividad de EROD tuvo una inhibición con respecto su control las concentraciones 17 $\mu\text{g/L}$ y 20 $\mu\text{g/L}$ mientras que para las siguientes concentraciones 30 $\mu\text{g/L}$ y 40 $\mu\text{g/L}$ de F en el cual la actividad enzimática observo un aumentó, correspondiendo este con los trabajos r5eportados con anterioridad donde se reporta un aumento en la actividad de EROD, concluyendo que tiene un efecto en la actividad enzimática y este efecto tóxico depende de la concentración.

En los resultados obtenidos en el trabajo presente en el la forma estadística según la prueba de Levene (igualdad de varianzas) la p es mayor a 0.05 la H_0 no se rechaza $H_0 = \delta_1 = \delta_2 = \delta_3 = \delta \dots$, esto es que no hay diferencias significativas en las diferentes concentraciones.

12.3 Proteínas

Las proteínas son cadenas de moléculas formadas por otras moléculas más pequeñas llamadas aminoácidos. Cada uno representa un eslabón en la cadena. Ellas tienen una gran diversidad a nivel molecular, forman células, tejidos, órganos y organismo individuales. También son fuente de energía en los organismos durante periodos críticos de stress (Smallwood y Green, 1974).

Los resultados del estudio de efectos tóxicos de dimetil y carbaril dos pesticidas sobre el Metabolismo de proteínas en el caracol de agua dulce *Lymnaea acuminata*, estos pesticidas tienen alteraciones en los niveles totales de proteína los niveles son muy reducidos en hepatopancreas después de la exposición a 24 hrs. Y 96 hrs (Tripathi and Singh, 2003)

Los resultados obtenidos en el estudio de toxicidad subletal realizados por Galar (1999) se demostró que la proteína en caracoles *Stagnicola sp.* expuestos a malation 0.05ppm, se

observo a lo largo de todo el estudio que este parámetro muestra un incremento paulatino con respecto al tiempo alcanzándose la concentración máxima a las 72 hrs., siendo el incremento de 79.37% con respecto al control, ellos concluyen que el malation tiene un efecto de inducción en la concentración de proteínas (Galar, 1999).

Begum y Vijayaraghavan (1996), quienes encontraron que el dimetoato, un órgano fosforado, produce disminución en la concentración de proteínas de *Clarias batrachus*.

En el presente trabajo en el organismo *Stagnicola palustris* se encontró que hay un aumento en la concentración proteica en las concentraciones de 17, 20 y 30 µg/L de F para la actividad de AChasa siendo la máxima en la concentración de 17 µg/L de Fluoranteno sucediendo la inhibición en la concentración mas alta de 40 µg/L de F , ellas con respecto al control, concluyendo que a mas altas concentraciones se llega a un punto de disminución en la concentración de proteínas esta a poyado por Begun y Vijayaraghama (1996).

En este se encontró que para la actividad de EROD las 5 concentraciones tuvieron un aumento en la cantidad de proteínas puede apoyarse con los estudios realizados por Galar (1999).

En el trabajo reportado para el caracol *Lymnaea acuminata* los niveles de proteínas son reducidos en hepatopancreas por pesticidas, con esto se puede concluir que el fluoranteno tiene un efecto de reducir las concentraciones de proteínas en *Stagnicola palustris* anterior a lo que se encontró.

13 CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye lo siguiente:

- ❖ La actividad de Acetilcolinesterasa estimada en *Stagnicola palustris* expuestos con fluoranteno en distintas concentraciones muestran un notable incremento de 40 µg/L de F se presenta una baja en la actividad enzimática, por lo cual se puede concluir que este xenobiotico tiene una toxicidad que esta influida por la concentración del hidrocarburo, sobre el caracol ocasionando alteración en este biomarcador .
- ❖ La actividad de etoxiresorufin-o- dietilasa evaluada en *Stagnicola palustris* intoxicados con fluoranteno a diferentes concentraciones presenta una disminución en la actividad para las concentraciones de 15 y 20 µg/L de F , y un aumento en la actividad para las concentraciones de 30 µg/L de F y 40 µg/L de F.
- ❖ La concentración de proteínas en el gasterópodo *Stagnicola palustris* con respecto a AChasa la cuantificación de proteínas para 17, 20 y 30 µg/L de F existe un aumento en la cantidad de las mismas, mientras que en concentraciones mayores a 40 µg/L de F se presento una disminución en la concentración, provocando daños a nivel bioquímicos.
- ❖ La concentración de proteínas en caracoles *Stagnicola palustris* intoxicados con fluoranteno se ve alterada con un incremento en la concentración de las mismas, donde estas fueron cuantificadas para la determinación de EROD .
- ❖ Existe un aumento en la cantidad de enzima que es sintetizada, ocasionado fundamentalmente por el propio sustrato sobre el que esta actúa al aumentar requerimientos de esta se modifican los mecanismos reguladores de la síntesis proteica, se incrementa en forma especifica.
- ❖ Podemos concluir que el fluoranteno tiene un efecto tóxico sobre el organismo y que la toxicidad del depende de la concentración

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

14 BIBLIOGRAFIA

1. Arinc E., Sen A. (1999). Hepatic cytochrome P4501A and 7-ethoxyresorufin o-deethylase induction in mullet and common sole as an indicator of toxic organic pollution in Izmir Bay , Turkey, Mar Environ Res 48; 147-160.
2. Arman M.F., Mahboob M., Grover P. (2004). In vitro Acetylcholinesterase Inhibition By Novel OP Compounds in Variuos Tissues of the Fish *Channa punctatus* Environ. Contam. Toxicol. New York . Vol. 72. Pág. 38-44.
3. Asís F., Amin M. And Shakoori A.C. (1993). Toxic effect of cadmium chloride in the haematology of fish *Tilapia mossambica*. Proceedings of the Pakistan ongress of zoology. Lahore. Pakistan Zool. Soc Pakistán. Vol. 13 Pág. 141-154.
4. Barnes A. R. (1977). Zoología de Invertebrados. ED. Interamericana. México. Pág. 338-355.
5. Bayen B.L. (1986). Mesasuring the effect of pollution at the cellular and organism level. In Kullenberg. G.(ed) The Role of the Oceans as a waste Disposal Option. Reidel Publishing Company. Pág. 617-634.
6. Begum G. And Vijayaraghavan S. (1996). Alterations in protein metabolism of muscle tissue in the fish *Clarias batrachus* (Linn) by commercial grade dimethoate. Bull. Environ. Contm. Toxicol. Vol. 57 Pág. 223-228.
7. Berne R.M.D., Robert M., Matthew N., Levy M.D. (1995). Fisiología. ED Moloy Doyma Libros. España. Pág. 40-41, 492-49
8. Bradford, M. M. (1976). A rapid an sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding Anal. Biochemist vol. 72. Pág. 248-254.
9. Boolzotlan A.R. (1991). Zoología. Ediciones Ciencia y Técnica S.A. México. Pág. 231-242.
10. Boyer R. (2000). Concepts en Bioquímica. Internacional Tomson Editores. UNAM ENEP Iztacala. Pág.146-161.
11. Burch B.J., Cruz R. A. (1987). Clave para la identificación de gastropodos de agua dulce en México. Instituto de Biología UNAM. México. Pág.10-41.
12. Cockrum E L., William J., Mclauley. (1967). Zoología. ED Interamericana. México. Pág. 312.

13. Coppage D.L., Matthews E. (1974). Short term effects of organophosphate pesticides on cholinesterase of estuarine fishes and pink shrimp. *Bull Environ Contam Toxicol* Vol. 11 Pág. 483-488.
14. Chung K. H. (2001). Quantitative Assessment of Mutagenic Potential of Water via EROD-Microbioassessment. *Environmental Contamination and Toxicology*. vol 68. Pág. 24-7, 787-793.
15. Dellali M. (2001). Utilisation of the glutathione S-transferase dans the Biosurveillance of the lagoon of Bizerte. *Colloque PRICAT/RIGEDMER* Vol. 72.
16. Dembele . K., Haubruge E., Gaspar Ch. (1999). Recovery of Acetylcholinesterase Activity in the Common Carp *Cyprinus carpio* L. After Inhibition by Organophosphate and Carbamate Compounds. *Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 62 Pág. 731-742.
17. Devlin T.M. (1991). *Bioquímica Libro de texto con aplicaciones clínicas*. ED Reverte S.A. España. Pág. 316-325.
18. Díaz N., Alfaro J., Garza H. (2001). Método analítico para detectar hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua potable. *Ciencia UANL*. Vol. IV. No.4 Pág.420-425
19. Dikari A., Jimenez B. (1992). Effects of hepatotoxicants on the induction of microsomal monooxygenase activities in sunfish liver by beta naphthoflavone and benzo(a) pyrene. *Ecotoxicol Environ Safety* 23:89-102
20. Ellman G. L. K., Courtney D., Valentino A JR. y Featherstone M. R. (1961). *Biochemical Pharmacology*. Department de Pharmacology. University of California Medical Center. San Francisco, California. Vol. 7. Pág. 88-95.
21. EPA (Environmental Protection Agency. Organización Mundial de la salud), Directiva 83/98/CEE, Real Decreto 113890 www.epa.gov/global/
22. EPA (Department of environmental protection), Environmental Protection Agency. (1998). *Guidelines for the protection and management of aquatic sediment quality in Ontario*. ISBN 0-7729-9248-7. Ontario Ministry of the Environment, Ottawa, Ontario PAG. 23.
23. EPA (Environmental Protection Agency) U.S. (2004). Interim sediment criteria values for nonpolar hydrophobic organic contaminants. Office of Water Regulations and Standards, Criteria and Standards Division. SCD no. 17 www.epa.gov/global/
24. Etienne B. G., Manchacas H. (1975). *El Petróleo y la Petroquímica*. ED Edicol S.A. México. Pág. 86-105.

25. Eto M. (1974) Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry. CRC Press, Cleveland, Ohio
26. Forlin L., Haux C., Karlson-Norrgren L., Runn P., Larson A. (1986). Biotransformation enzyme activities and histopathology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, treated with cadmium. *Aquat Toxicol* 8:51-64.
27. Galar T. M. (1999). Efecto tóxico del malation en sedimentos de la presa Ignacio Ramírez sobre el caracol *Stagnicola sp.*. Tesis de Maestría en Toxicología. Escuela Nacional en Ciencias Biológicas, I.N.P. Pág. 1-59.
28. Ganong W. M.D. (1996). Fisiología Médica ED Manual moderna S.A. de C.V. México DF. Pág. 95-127.
29. García ML., Castro B., Ribeiro R., Guilhermino L. (2000). Characterization of cholinesterase from guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its in vitro inhibition by environmental contaminants. *Biomarkers* 5:274- 285
30. Gary H.J., Handwerk G.E. (1980). Refino del petróleo tecnología. Editorial Reverte España. Pág.20-27.
31. Gessner G. H. (1975). Diccionario de Química y de Productos Químicos. ED. Omega. Barcelona España. Pág. 250.
32. Gómez. G. F., Santiago C., Bandres F. (2002). Polimorfismos de citocromo P450; Papel como marcador biológico. *Medicina del trabajo Madrid España Vol. 11y3. mayo-junio* Pág. 130-140.
33. Guyton A. C M.D., Hall J. E. (2000). Tratado de Fisiología Médica. Ed Mc Graw Hill, México. Pág. 95-99, 837-838.
34. Grzimek's B. (1970). Animal life encyclopedia Mollusks and Echinoderm. Ed Van Nostrand Reinhold company New York. Vol. 3 Pág 19-24.
35. Hodgson M.D. E. and Levi E. P. MD. (1994). Introduction to Biochemical Toxicology. 2a Edition. Editorial Appleton and Lange. Norwalk Connecticut USA. Pág. 88-99.
36. Hoffman D.J., Camardese M.B., Lecaptain L.J. and Pedleton G.W. (1990). Effects of boron on growth and physiology in mallard ducklings. *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 9 Pág. 335-346.
37. Horton R. H., Moran L. A. R. S., Ochos J., Rawn D. K., Gray and Scringeur Prentice-Hall S. (1993). Bioquímica. ED Hispanoamericana S.A. México. Pág. 6.11-6.1.5

38. James H. G., Handwerk G. E. (1980). Refino del Petróleo Tecnología y Economía. ED Reverte S.A. España. Pág. 20-27.
39. Jiménez C. E. (2002). La Contaminación Ambiental en México Causas, Efectos y Tecnología apropiada. ED Limusa Noriega Editores. México. Pág. 641-663.
40. Kennedy SW., Jones S.P., Bastien L.J. (1995). Efficient análisis of cytochrome P450A catalytic activity, porphyrins, and total proteins in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence plate reader . Anal Biochem Vol. 226. Pág. 362-370.
41. Khan R. A. and Payne J.F. (2002). factors Influencing EROD Activity en Feral Winter Flounder (*Pleuronectes americanus*) Exposed to Effluent from a Pulp and Paper Mill in Newfoundland. Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 68 number 25-6, Pág. 794-800.
42. Klaassen D.C., Walkins B.J. (2001). Manual de Toxicología. Editores Mc Gaw-Hill Interamericana. Madrid España., Pág. 113-147.
43. Kulcsak O., Seglets T., Lang G., Halasy R., Benedeczky Y. and Nemcsok J. (1994). Investigation of effects of pesticides on molecular forms of AchE in alimentary canals of carp. Pestic. Biochem. Physiol.. Vol. 49 Pág.155-163.
44. Kunuckles M. E., Inyang F. and Ramesh A. (2004). Acute and subchronic oral toxicity of fluoranthene in F-344 rats., Ecotoxicology and Environmental Safwety vol. 59 Pág. 102-108
45. Kutlu M., Sumer S. (1998). Effects of Lead on the activity of aminolevulinic acid dahidratase in *Gammarus Pulex*. Bull environ contal toxicol 60:816-821.
46. Law Alianza Mundial del Derecho Ambiental 2003, Reglamento Modificado para el sector Hidrocarburos 26117. elawus@ela
47. Lehninger A.L. (1972). Bioquímica las bases Moleculares de la estructura y función celular. ED Omega. Barcelona España. Pág. 396-413.
48. Lehninger L.A. (1990). Bioquímica las bases moleculares de la estructura y función celular. ED. Omega. Barcelona España. Pág. 60-227.
49. Li W., Wu W.Z., Xu.Y., Schramm K.W., Kettrup A. (2001).Measurin TCDD Equivalents in Environmental Samples .with the Mrico-EROD Assay: Comparison with HRGC/HRMS Data. Environ. Contam Toxicol. New York. Vol. 72 Pág. 787-795..

50. Lincon J. R. , Gordon J. S. (1989). Invertebrados Guía de captura y Conservación. Interamericana Mc Graws-Hill. Madrid España. .Pág. 69-107.
51. Linder G. (1989). Moluscos y Caracoles de los mares del mundo. ED Omega S.A.. Barcelona España. Pág. 24-27.
52. Loomis A.T. (1982). Fundamentos de Toxicología. ED. Acriba. Zaragoza España Pág.72-157.
53. Loomis A.T. (1982). Fundamentos de toxicología. ED Acriba Zaragoza España. Pág. 224-237.
54. Lu. F. K. C. (1993). Toxicología básica riesgos por exposición a sustancias toxicas. Editorial Harla . México. Pág. 49-112.
55. Manual de Contaminación Ambiental. (1994). Fundación MAPFRE - ITSEMAP Ambiental. México. Pág. 73-78.
56. Marshall A.J., Williams WD. (1985). Zoología de Invertebrados Vol 4 Ed Reverte España.
57. Martinez T L., Galar M., Olvera H. E., Chehue R. A, López L. E., Gómez-Oliván L. and Terron S. O. (2001). Toxic Effecto and Bioavailability of Malathion Spike in Natural Sediments from the Ignacio Ramirez Dam on the Snail *Stagnicola sp.* Ecotoxicology and Enviromental. Vol. 52, Pág. 232-237.
58. Martinez-Tabche L., Ramirez M. B., German F. C., Galar C. I., Madrigal O. M., Ulloa G. V., Orozco F. M. (1997). Toxic Effect of Sodium Dodecylbenzenesulfonate, Lead, Petroleum, and Their Mixtures on the Activity of Acetilcholinesterase If *Moina Macrocopa* in Vitro. Enviromental Toxicology Water Qual. Vol.12, 12 .Pág. 211-215.
59. Meglisch A.P. (1981). Zoología de Invertebrados. Blume Ediciones. Madrid España. Pág.234-317.
60. Metzler E. D. (1981). Bioquímica Las reacciones químicas en las células vivas. ED Omega S.A. Barcelona España. Pág.382-310.
61. Mohamed B., Rym B.D., Amor E.A., Hamadi B. (2003). Genotoxicity, Catalase, and Acetylcholinesterase in the Assessment of the Pollution Status of Some Sites on the Tunisian Littoral. 2003. Environ. Contm. Toxicol. New York Vol 68, Pag 854-860.
62. Morris P.A. (1975). Afield guide to shells. 3a Edición. Houghton Mifflin Company. Boston. USA. Pág. 5-25.

63. Muñoz E. J. (2000). Determinación de Hidrocarburos poli cíclicos aromáticos en procesos de combustión e incineración. Tesis para maestría. UAM Azcapotzalco Pág. 1-6.
64. Narbonne J.F., Ferrari I., Spano M.A., Centeno A.J. (2001). Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. *Environ Mol Mut.* Vol 30. Pág. 293-297.
65. Parrot, J. L., Chang-Kit R., Rokosh D. A. (1999). EROD Introduction in fish a tool to measure environmental exposure, en: Rao. Impact assessment of hazardous aquatic contaminants. Lewis Publishers U.S.A
66. Pérez R. R. (1995). Estudio de los moluscos bentónicos y epifíticos de la presa de Atlangatepec, Tlaxcala. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco división de ciencias biológicas, México. Pág. totales 66.
67. Petrusis R. J., Chen Guosheng., Benn Sally LaMarre J., Bunce J., Nigel. (2000). Application of the Ethoxyresorufin-o-Deethylase (EROD) Assay to Mixtures of Halogenate Aromatic Compounds. *Environmental Toxicology.* Vol.16. Pág. 177-184.
68. Rodríguez. A.D., Prough R.A. (1992). *Methods Enzymology.* Ed Academic Press. New York Pág 422-431.
69. Roskosk R. Jr M.D PH. D. (2000). *Bioquímica.* Editorial MacGraw -Hill Interamericana. México. Pág.127-141.
70. Santiago C., Bandres F., Gómez F-Gallegos. (2002). Polimorfismo del citocromo P450: Papel como marcador biológico LAB de biopatología dto. de Toxicología y Legislación Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid España *Medicina del trabajo* Vol. 11 mayo-junio 2002 Pág. 130-140.
71. Scaps P., Demuyne S., Descamps M. and Dhainaut A. (1997). Effects of Organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities of the polychaete *Nereis diversicolor*. *Arch. Environ. Toxicol.* Vol. 33. Pág. 203-208.
72. Schmidt K-Nielsen. (1983). *Fisiología Animal Adaptación y medio ambiente.* ED Omega Barcelona. Pág. 448-449.
73. Sine J.P., Toutant J.P., Weigel P., Colas B. (1992). Amphiphilic forms of butyrylcholinesterase in mucosa cells of rat intestine. *Biochemistry* Vol.31 Pág. 10893-10900.

74. Smaallwood W. L., Green E. R. (1974). *Biología*, Editorial Porrúa México, Pág. 117-119.
75. Stoker S H,y Seager L. S. (1981). *Química Ambiental Contaminación del Aire y del Agua*. ED Blume. Barcelona España. Pág. 25-41, 238-253.
76. Sylver A. (1974). The biology of cholinesterase. In: AT Neuberger, E.L. (ed) *Frontiers of biology* Amsterdam.
77. Tripathi P.K., Singh A. (2003). Toxic Effects of Dimethoate and Carbaryl Pesticides on protein Metabolism of the freshwater Snail *Lymnaea acuminata* Environ. Contam. Toxicol New York. Vo. 70 Pág. 146-152.
78. Tortora J. G. (1991). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Editorial Limusa. España Pág. 324-333.
79. United States Enviromental Protection Agency (USEPA), *Drinking Watrer Standards and Health Advisories*. (2000). National Primary Drinking Water Regulations and National Secondary Drinkinf Water Regulations www.wpa.gov/OST
80. Vigny M., Gisiger G., Massoulie J. (1978). "Nonspecific" cholinesterase and acetylcholinesterase in rat tissues; molecular forms, structural and catalytic properties, and significance of the two enzyme systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2588-2592.
81. Villegas H.M. I. (2003). Tesis Maestría en Ciencias Químico Biológicas, Evaluación del agua de la presa Fernando Hiriart en tila pía *Oreochromis niloticus*. Directora Laura Martínez Tabche IPN ENCB México Pág. 20-24.
82. Voel D. Y., Voel J. (1992). *Bioquímica*. Editorial Omega. Barcelona España, Pág.402-403.
83. Whyte JJ., Jung R.E., Schmitt .C.J. , Tillitt D.E. (2000). Etoxyresorufina-O-dietilasa (EROD) actividad en peces como un biomarcador de exposición química. *Toxicol Vol.30* (4), Pág.347-570.
84. World Health Organization (WHO) , *Guidelines for drinking water quality*, 2nd ed. Vol. 2 *Health criteria an othrer supporting information*. (1996). ww.who.int/water_sanitation_health.