



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

RETENCIÓN DE TOXINAS Y DAÑOS EN TEJIDOS DE  
CAMARÓN PATIBLANCO *Litopenaeus vannamei*  
PRODUCIDOS POR LA EXPOSICIÓN A  
*Gymnodinium catenatum* (PSP) Y *Karenia brevis* (NSP)

## TESIS

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Ecología)

Presenta

**Jesús Pérez Linares**

La Paz, Baja California Sur, junio 2008.

## Comité Tutorial

La presente Tesis Doctoral se realizó bajo la supervisión de los siguientes investigadores:

Dr. José Luis Ochoa<sup>†</sup>  
Laboratorio de Biotoxinas Marinas  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (Unidad La Paz)  
**Director**

Dra. Ana Gago Martínez  
Laboratorio de Química Analítica e Alimentaria  
Universidad de Vigo, España  
**Co-Directora**

Dr. Lourival Domingos Possani Postay  
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos  
Instituto de Biotecnología, UNAM (*Campus Cuernavaca*)  
**Tutor**

Dr. Marco Linné Unzueta Bustamante  
Dirección General de Investigación en Acuicultura  
Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA)  
**Tutor**

Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez  
Laboratorio de Neurofarmacología Marina  
Instituto de Neurobiología, UNAM (*Campus Juriquilla*)  
**Tutor**

### Comité Revisor

**Dra. Ana Gago Martínez**

Laboratorio de Química Analítica e Alimentaria. Universidade de Vigo, España

**Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle**

Laboratorio de Patogénesis Microbiana. CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dr. Lourival Domingos Possani Postay**

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. IBT-UNAM (*Campus Cuernavaca*)

**Dr. Marco Linné Unzueta Bustamante**

Dirección General de Investigación en Acuicultura. INAPESCA.

**Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez**

Laboratorio de Neurofarmacología Marina. INB-UNAM (*Campus Juriquilla*)

### Jurado en Examen de Grado

**Dra. Ana Gago Martínez**

Laboratorio de Química Analítica e Alimentaria. Universidade de Vigo, España

**Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle**

Laboratorio de Patogénesis Microbiana. CIBNOR (Unidad La Paz)

**Dr. Lourival Domingos Possani Postay**

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. IBT-UNAM (*Campus Cuernavaca*)

**Dr. Marco Linné Unzueta Bustamante**

Dirección General de Investigación en Acuicultura. INAPESCA.

**Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez**

Laboratorio de Neurofarmacología Marina. INB-UNAM (*Campus Juriquilla*)

**Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes (Suplente)**

Dirección del Programa de Posgrado. CIBNOR (Unidad La Paz).

**Acta de Liberación de Tesis**

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 26 del mes de Mayo de 2008, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**Retención de toxinas y daños en tejidos de camarón patiblanco  
*Litopenaeus vannamei* producidos por la exposición a  
*Gymnodinium catenatum* (PSP) y *Karenia brevis* (NSP)**

Presentada por el alumno:  
**M. en C. Jesús Pérez Linares**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN ECOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

La Comisión Revisora

q. e. p. d.

DR. JOSÉ LUIS OCHOA OCHOA  
DIRECTOR DE TESIS

DR. ANA CARO MARTINEZ  
CO-DIRECTOR

DR. LORIVAL DOMINGOS POSSANI POSTAY  
CO-TUTOR

DR. MARCO LINNÉ UNZUETA BUSTAMANTE  
CO-TUTOR

DR. MANUEL BENIGNO AGUILAR RAMÍREZ  
CO-TUTOR

DR. FELIPE DE JESÚS ASCENCIO VALLE  
CO-TUTOR

DR. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## Resumen

La camaronicultura en México ha experimentado problemas relacionados con proliferaciones de microalgas tóxicas. Las toxinas paralizantes y las neurotoxinas son dos de las ficotoxinas más importantes en nuestro país por el impacto que representan al ambiente, economía y salud pública. El efecto de estas toxinas en los camarones es aún desconocido, por lo que la posibilidad de considerarlos como vectores potenciales para los humanos nos llevó a la evaluación de toxinas en sus tejidos. En este estudio, el camarón patiblanco (*L. vannamei*) fue expuesto a diferentes densidades celulares de *G. catenatum* y *K. brevis* para conocer sus efectos tóxicos. Los ensayos agudos probaron la supervivencia de los camarones a densidades celulares bajas de los dinoflagelados ( $10^3$  cél/L), pero se observaron mortalidades y comportamiento anormal con densidades celulares más altas ( $>10^4$  cél/L). El ensayo crónico mostró diferencias significativas en la supervivencia, porcentaje de alimentación y crecimiento en peso de los organismos expuestos a los dinoflagelados. Se detectaron toxinas paralizantes y neurotoxinas en tejidos comestibles de camarón, encontrando que la glándula gástrica y el hepatopáncreas retuvieron las toxinas por más tiempo, incluso después del período de depuración. Además se observaron daños severos en los tejidos del corazón, glándula gástrica y protocerebro.

Palabras clave: PSP, NSP, *Gymnodinium catenatum*, *Karenia brevis*, *Litopenaeus vannamei*.



**Vo.Bo. Dra. Ana Gago Martínez**  
**Co-Directora**



### Abstract

Several outbreaks of toxic microalgae have been the cause for important economic losses in the Mexican aquaculture industry. PSP and NSP are the most important phycotoxins due the environment, economy and public health impact that they represent. The mechanism of these toxins in shrimp still remains unknown. The possibility of considering shrimps as potential vectors of toxins to humans, lead us to the evaluation of the presence of these toxins in shrimp edible tissues. In this study, white leg shrimp (*L. vannamei*) were exposed to different cell densities of *G. catenatum* and *K. brevis* through to estimate the toxicological effects. Acute assays proved the survival of shrimp at low densities of dinoflagellates ( $10^3$  cell/L) while mortality and abnormal behavior were observed with higher densities ( $>10^4$  cell/L). Chronic assays showed a significant difference in survival, percentage of feed and weight gain of organisms exposed to dinoflagellates. PSP and NSP toxins were detected in edible tissues. Gastric glands and muscles retain toxins for a longer period of time than other tissues, even after a depuration period. Histology damages have been observed in heart, gastric gland, and brain.

Key words: PSP, NSP, *Gymnodinium catenatum*, *Karenia brevis*, *Litopenaeus vannamei*.



---

**Vo.Bo. Ana Gago Martinez, PhD**  
**Co-Director**

**Dedicatoria**

***In Memoriam***

**Dr. José Luis Ochoa [1951-2007]**

*A mi Tutor, Maestro, Guía y Amigo.*

*Por legarme su ejemplo de lucha, perseverancia y pasión por el trabajo.*

## Agradecimientos

Este trabajo fue desarrollado y concluido gracias a la ayuda, consejos y soporte de muchas personas. A todas ellas, todo mi agradecimiento y reconocimiento:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó para realizar mis estudios de Posgrado (No. de registro 158418).

Agradezco de manera muy especial a mis Directores de Tesis: el Dr. José Luis Ochoa<sup>†</sup> y la Dra. Ana Gago, quienes siempre me apoyaron y me proporcionaron el mejor ejemplo de integridad, profesionalismo, honestidad y nobleza. Porque son grandes investigadores sin dejar de ser excelentes personas...

Dr. José Luis Ochoa<sup>†</sup>, gracias por su gran ejemplo de tenacidad, fortaleza y pasión por la investigación y por la vida.

Dra. Ana Gago Martínez, gracias por brindarme siempre ánimos, confianza y un modelo excelente a seguir en el ámbito profesional y personal.

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dr. Lourival D. Possani, Dr. Marco Linné Unzueta y Dr. Manuel B. Aguilar, porque a pesar de la distancia siempre estuvieron cerca de mi trabajo y atentos al desarrollo de mi tesis. Sus comentarios, sugerencias y experiencia han enriquecido de manera sustancial mi desarrollo profesional.

Al Dr. Felipe Ascencio por sus recomendaciones, su amistad y su apoyo en los momentos difíciles.

A la Dra. Thelma Castellanos, Directora del Programa de Posgrado del CIBNOR y a todo su equipo de trabajo: Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Leticia González, Lic. Beatriz Gálvez, Lic. Guadalupe Sánchez, Lic. Claudia Olachea, Ing. Horacio Sandoval e Ing. José Manuel Melero. Por todo el apoyo que me brindaron durante mis estudios de posgrado.

Al equipo de redes e informática: Ing. Héctor Campos, Lic. Pedro Tsuchiya, Ing. Roberto Carlos Morales, Lic. Isabel Castro. Por su excelente trabajo en la coordinación y desarrollo de videoconferencias con mi Comité Tutorial y su apoyo en informática.

A los responsables de los siguientes laboratorios en el CIBNOR quienes me apoyaron y compartieron conmigo su tiempo y experiencia:

Manuel Moreno [Biotoxinas Marinas], Hever Latisnére [Biotecnología de Organismos Marinos], Arturo Sierra y Delia Rojas [Genética Molecular], José Luis Ramírez [Laboratorio Húmedo de Genética Acuícola], Carmen Rodríguez [Histología e Histoquímica], Minerva Cerro y Marte Virgen [Cepario], Sandra de La Paz y Gilberto Colado [Nutrición Experimental], Amaury Cordero [Bioterio] y Armando Monge [Ecofisiología de Organismos Acuáticos].



Al Dr. José Manuel Leão, por su paciencia, amistad y consejos durante mi estancia en la Universidad de Vigo.

A mis amigos Diana y Pepo (Galicia, España), porque me recordaron que todavía existe gente noble, hospitalaria y desinteresada en el mundo... porque me abrieron las puertas de sus casas y de sus corazones en momentos difíciles de mi vida y me devolvieron la fe en la humanidad... Moitas grazas!

Ás familias Seijo-Vila e Vázquez-Pérez (Mos e Vigo, Pontevedra, España) pola súa hospitalidad, alegría e o gran corazón que teñen. Grazas por acollerme, non deixar que me sentise só nin un momento e permitirme formar parte da gran familia galega.

Al equipo de trabajo de la Dra. Ana Gago en el Laboratorio de Química Analítica y Alimentaria de la Universidad de Vigo: Diana, Laura, Manel, Nati, Cori, Juan, Isa, Sandra, Celia, Lusimi y Pablo. Por su ayuda, consejos, convivencia y enseñanzas.

Al Dr. Paul McNabb (Cawthron Institute, New Zealand) porque a pesar de estar tan lejos (down under), siempre ha estado cuando solicito su ayuda y consejos. Por la confianza que ha depositado en mi, por compartir sus resultados (aún antes de publicarse) y su experiencia en el análisis de ficotoxinas.

Al Dr. Rob Arathoon por sus consejos invaluables, sugerencias y críticas constructivas en mi desarrollo académico. Por su amistad y porque siempre ha tenido palabras de aliento y ánimo en momentos difíciles. Thank you!

Al Dr. Jim Hungerford [FDA, USA] por su interés en mi trabajo, por invertir su tiempo en leerlo y por las sugerencias acertadas para perfeccionarlo.

Al Dr. Robert Dickey [FDA, USA] por sus recomendaciones en el análisis de toxinas y por la amable donación de los estándares de brevetoxina [PbTx-2 y 3].

Al Dr. Tracy Villareal [MSI, UTEX] por la importante donación de las cepas de *K. brevis*, con las cuales se pudo realizar parte de este trabajo.

A mis amigos de toda la vida: Alberto Burgos, Cristina Araiza, Maricela Sánchez, Alicia Olalde, Juan Gaona, Mercedes Guerrero, Angélica DeToma, Miguel Altamirano, Violeta Gleaves, Erika Torres, Víctor Flores, Giovanni Talamantes y Bárbara Carranza. Sin ellos no hubiera terminado este trabajo. Gracias mil por su apoyo, confianza, cariño, consejos y todas las cosas positivas que han traído a mi vida.

Al grupo de trabajo del Dr. Ochoa: Gorette Solís, Laura González, Jairo Fuentes, Leyberth Fernández y Axel Falcón. Por compartir y ayudarme a sobrellevar la pena de haber perdido a nuestro guía y amigo; con energía, optimismo, solidaridad y profesionalismo hemos salido adelante.

Gracias también a Miguel Córdoba Matson y Juan D. Gaona por su gran amistad y por el tiempo que invirtieron en la revisión de mis manuscritos en inglés, por sus consejos y sugerencias para mejorarlos.

Agradezco también el apoyo que siempre me ha brindado mi familia en Puebla. Mis padres, Héctor Pérez Vidaurri y Dolores Linares; mis hermanos Alejandra, Héctor y Silvia; y mis sobrinas Vero, Gaby, Adri y Sandy... he tomado mi camino lejos de casa, pero siempre cerca de ellos.

Finalmente quiero agradecer a los siguientes investigadores del CIBNOR cuya influencia ha sido muy importante en mi formación académica: Dra. Norma Hernández, Dr. Felipe Ascencio, Dr. Alejandro López, Dr. Salvador Lluch, Dra. Tania Zenteno, Dra. Irma Olguín, Dr. Ricardo Estrella y Dr. Fernando García.

Y de manera muy especial a Arturo P. Sierra Beltrán, quien me introdujo en el interesante tema de las biotoxinas marinas junto con el Dr. Ochoa.

## Contenido

Comité Tutorial.....	i
Comité Revisor.....	ii
Jurado en Examen de Grado.....	ii
Acta de Revisión de Tesis.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Dedicatoria.....	vi
Agradecimientos.....	vii
Contenido.....	ix
Lista de Tablas.....	xv
Lista de Figuras.....	xvi
<b>Capítulo I. Generalidades.....</b>	<b>1</b>
1.1 Introducción.....	2
1.2 Antecedentes.....	5
1.3 Justificación.....	8
1.4 Hipótesis del trabajo.....	10
1.5 Objetivo general.....	11
1.5.1 Objetivos específicos.....	11
1.6 Material y métodos.....	12
1.6.1 Organismos.....	12
1.6.1.1 <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	13
1.6.1.2 <i>Karenia brevis</i> .....	13

1.6.1.3 Cultivo y cosecha de los dinoflagelados.....	16
1.6.1.4 <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	18
1.6.2 Extracción y análisis de toxinas paralizantes (PSP).....	20
1.6.3 Extracción y análisis de neurotoxinas (NSP).....	23
1.6.4 Tratamiento de desechos.....	25
1.6.5 Técnicas histológicas.....	26
1.6.6 Análisis estadísticos.....	27
<b>Capítulo II. Perfil de toxinas de GCCV-6 y KBTX-3.....</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo general.....	29
2.1.1 Objetivos específicos.....	29
2.2. Material y métodos.....	29
2.2.1 Procesamiento de muestras y análisis de ficotoxinas.....	29
2.3 Resultados y discusión.....	30
2.3.1 Perfil de toxinas.....	30
2.4 Conclusiones.....	35
<b>Capítulo III. Bioensayo agudo por ingestión.....</b>	<b>37</b>
3.1 Objetivo general.....	38
2.1.1 Objetivos específicos.....	38
3.2. Material y métodos.....	38
3.2.1 Diseño del bioensayo.....	38
3.2.2 Bioensayo de ingestión.....	39
3.2.3 Procesamiento de muestras.....	41
3.2.4 Análisis de ficotoxinas.....	41

3.2.5 Análisis histológicos.....	42
3.3 Resultados y discusión.....	43
3.3.1 Dosis letales y subletales.....	43
3.3.2 Ingestión de células.....	44
3.3.3 Comportamiento.....	46
3.3.4 Análisis de ficotoxinas.....	48
3.3.5 Daños en tejidos.....	51
3.3.5.1 Hepatopáncreas.....	51
3.3.5.2 Corazón.....	53
3.3.5.3 Ganglio supraesofagal.....	55
3.3.5.4 Músculo.....	56
3.4 Conclusiones.....	57
<b>Capítulo IV. Bioensayo crónico por ingestión.....</b>	<b>59</b>
4.1 Objetivo general.....	60
4.1.1 Objetivos específicos.....	60
4.2 Material y métodos.....	60
4.2.1 Diseño del bioensayo.....	60
4.2.2 Procesamiento de muestras.....	63
4.2.3 Análisis de ficotoxinas.....	63
4.2.4 Análisis histológicos.....	63
4.3 Resultados y discusión.....	64
4.3.1 Supervivencia, porcentaje de alimentación, ganancia en peso y comportamiento.....	64

4.3.2	Análisis de ficotoxinas en tejidos de camarón.....	68
4.3.4	Daños en tejidos.....	76
4.3.4.1	Hepatopáncreas.....	77
4.3.4.2	Corazón.....	78
4.3.4.3	Ganglio supraesofagal.....	79
4.3.3.4	Músculo.....	80
4.4	Conclusiones.....	83
	<b>Capítulo V. Ensayo agudo por inyección.....</b>	<b>85</b>
5.1	Objetivo general.....	86
5.1.1	Objetivos específicos.....	86
5.2	Material y métodos.....	86
5.2.1	Análisis de toxinas paralizantes.....	86
5.2.1.1	Cromatografía de alta eficacia y detección con fluorescencia (HPLC-FLD).....	86
5.2.1.2	Bioensayo en ratón.....	87
5.2.2	Diseño del bioensayo.....	88
5.2.3	Técnicas histológicas.....	90
5.3	Resultados y discusión.....	90
5.3.1	Perfil tóxico del extracto.....	90
5.3.2	Tiempo de muerte y comportamiento.....	91
5.3.4	Daños en tejidos.....	92
5.4	Conclusiones.....	95
	Discusión general.....	96

Conclusiones finales.....	100
Recomendaciones.....	101
Referencias.....	102
Anexos.....	121
Anexo I. Preparación del medio f/2+Se.....	122
Anexo II. Preparación del medio GSe.....	123
Anexo III. Preparación de solución Davidson.....	125
Anexo IV. Preparación de solución Karnovsky.....	126
Anexo V. Técnica histológica para cortes en parafina.....	127
Anexo VI. Técnica histológica para cortes en resina.....	128
Anexo VII. Tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E).....	129
Anexo VIII. Tinción Policrómica.....	130
Anexo IX. Participación en congresos nacionales e internacionales.....	131
Anexo X. Artículos.....	132



## Lista de Tablas

Tabla	Título	Página
<b>Tabla I</b>	Niveles máximos permitidos de ficotoxinas según la Norma Oficial Mexicana.	9
<b>Tabla II</b>	Posición taxonómica de <i>Gymnodinium catenatum</i> y <i>Karenia brevis</i> .	14
<b>Tabla III</b>	Posición taxonómica de <i>Litopenaeus vannamei</i>	18
<b>Tabla IV</b>	Programa de análisis para la detección de toxinas paralizantes mediante oxidación pre-columna, y HPLC-FLD (Lawrence <i>et al.</i> , 2004)	22
<b>Tabla V</b>	Condiciones generales para el análisis de brevetoxinas [PbTx] mediante LC-MS (McNabb <i>et al.</i> , 2007).	24
<b>Tabla VI</b>	Tiempos de muerte promedio del ensayo agudo de <i>L. vannamei</i> expuesto a diferentes densidades celulares de <i>G. catenatum</i> y <i>K. brevis</i> .	44
<b>Tabla VII</b>	Toxinas paralizantes detectadas en tejidos de <i>L. vannamei</i> durante el ensayo agudo por ingestión.	50
<b>Tabla VIII</b>	Supervivencia, porcentaje de alimentación y ganancia en peso promedio de camarones expuestos crónicamente a $10^3$ cél/L de GCCV-6 y KBTX-3	65
<b>Tabla IX</b>	Toxinas paralizantes detectadas en tejidos de <i>L. vannamei</i> durante el ensayo crónico por ingestión	69
<b>Tabla X</b>	Resumen del ensayo agudo por inyección de toxinas paralizantes de GCCV-6 en juveniles y adultos de <i>L. vannamei</i> .	92

## Lista de Figuras

Figura	Título	Página
<b>Figura 1</b>	Estructura química de la saxitoxina (STX) y análogos, y de la brevetoxina (PbTX) y análogos.	4
<b>Figura 2</b>	Cepa GCCV-6 de <i>Gymnodinium catenatum</i> proveniente de la CODIMA-CIBNOR y cepa KBTX-3 de <i>Karenia brevis</i> proveniente de la UTEX	15
<b>Figura 3</b>	<i>Gymnodinium catenatum</i> y <i>Karenia brevis</i>	15
<b>Figura 4</b>	Distribución mundial de <i>Gymnodinium catenatum</i> y <i>Karenia brevis</i> .	15
<b>Figura 5</b>	Cosecha de <i>Gymnodinium catenatum</i> (cepa GCCV-6) y <i>Karenia brevis</i> (cepa KBTX-3).	17
<b>Figura 6</b>	Camarón patiblanco <i>Litopenaeus vannamei</i> (Boone, 1931). (Foto tomada del sitio: <a href="http://www.aquakulturtechnik.de">http://www.aquakulturtechnik.de</a> )	19
<b>Figura 7</b>	Proceso de extracción de toxinas paralizantes	21
<b>Figura 8</b>	Detección de toxinas paralizantes mediante el método de Lawrence y colaboradores (2004)	23
<b>Figura 9</b>	Detección de neurotoxinas mediante el método de McNabb y colaboradores (2007)	25
<b>Figura 10</b>	Tratamiento de material, equipo, desechos biológicos y sobrenadantes de cosechas con NaOCl [25%] y NaOH [0.2 N]	26
<b>Figura 11</b>	Cromatograma obtenido en el análisis de muestras de <i>Gymnodinium catenatum</i> (cepa GCCV-6) donde se corrobora la presencia de compuestos con fluorescencia natural	31
<b>Figura 12</b>	Cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras de <i>Gymnodinium catenatum</i> (cepa GCCV-6) con su perfil de toxinas	32
<b>Figura 13</b>	Cromatogramas obtenidos en el análisis modo de SIM de muestras de <i>Karenia brevis</i> (cepa KBTX-3) con su perfil de toxinas	33
<b>Figura 14</b>	Espectro obtenido en el análisis modo SCAN de muestras concentradas 10x de <i>Karenia brevis</i> (cepa KBTX-3) con su perfil cromatográfico de toxinas	34
<b>Figura 15</b>	Extractos de los medio f/2+Se y GSe [controles] analizados con HPLC-FLD y LC-MS respectivamente, para corroborar la ausencia de ficotoxinas	35
<b>Figura 16</b>	Diagrama de flujo del diseño experimental del bioensayo agudo por exposición de <i>Litopenaeus vannamei</i> a diferentes densidades celulares de <i>G. catenatum</i> (cepa GCCV-6) y <i>K. brevis</i> (cepa KBTX-3)	40
<b>Figura 17</b>	Porcentajes promedio de células de dinoflagelados en acuarios del ensayo agudo donde se infiere su ingestión por <i>L. vannamei</i>	47

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 18</b>	Cromatogramas del análisis de toxinas paralizantes en hepatopáncreas de camarón durante el ensayo agudo por ingestión	49
<b>Figura 19</b>	Cortes transversales de la glándula gástrica de <i>L. vannamei</i> expuesto a diferentes densidades celulares de GCCV-6	52
<b>Figura 20</b>	Cortes transversales del corazón de <i>L. vannamei</i> expuesto a diferentes densidades celulares de GCCV-6	54
<b>Figura 21</b>	El programa Image-Pro Plus <sup>®</sup> (v. 5.1) cuantifica las diferencias observadas en algunos tejidos de <i>L. vannamei</i> expuesto a densidades de $10^4$ y $10^6$ cél/L de dinoflagelados tóxicos comparados con los demás tratamientos.	54
<b>Figura 22</b>	Cortes transversales del ganglio supraesofagal de <i>L. vannamei</i> expuesto a diferentes densidades celulares de GCCV-6. <b>a)</b> $10^3$ cél/L; <b>b)</b> $10^4$ cél/L; <b>c)</b> $10^6$ cél/L; <b>d)</b> control negativo (medio f/2+Se). Tinción H-E [20x]	55
<b>Figura 23</b>	Cortes transversales del ganglio supraesofagal de <i>L. vannamei</i> expuesto a diferentes densidades celulares de KBTX-3. <b>a)</b> $10^4$ cél/L; <b>b)</b> $10^6$ cél/L; <b>c)</b> control negativo (medio GSe). Tinción policrómica [20x]	56
<b>Figura 24</b>	Diagrama de flujo del diseño experimental del bioensayo crónico por exposición de <i>Litopenaeus vannamei</i> a una densidad celular de $10^3$ cél/L de <i>G. catenatum</i> (cepa GCCV-6) y <i>K. brevis</i> (cepa KBTX-3)	57
<b>Figura 25</b>	Ganancia en peso promedio de <i>L. vannamei</i> después de 45 días de suministrar células de GCCV-6 y KBTX-3 ( $10^3$ cél/L)	66
<b>Figura 26</b>	Cromatogramas del análisis de toxinas paralizantes en hepatopáncreas de camarón durante el ensayo crónico por ingestión	70
<b>Figura 27</b>	Cromatogramas y espectros obtenidos en el análisis de neurotoxinas en hepatopáncreas de camarón durante el ensayo crónico por ingestión.	71
<b>Figura 28</b>	Cromatograma del análisis de toxinas paralizantes en hepatopáncreas de camarón durante el ensayo crónico por ingestión (día 60)	72
<b>Figura 29</b>	Cromatograma y espectro obtenidos en el análisis de neurotoxinas en hepatopáncreas de camarón durante el ensayo crónico por ingestión (día 60)	72
<b>Figura 30</b>	Cromatograma del análisis de toxinas paralizantes en músculo de camarón durante el ensayo crónico por ingestión (día 45)	74
<b>Figura 31</b>	Cromatograma y espectro obtenidos en el análisis de neurotoxinas en músculo de camarón durante el ensayo crónico por ingestión (día 45)	75
<b>Figura 32</b>	Cortes transversales de la glándula gástrica de <i>L. vannamei</i> expuesto crónicamente a $10^3$ cél/L de GCCV-6 durante 45 días	78

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 33</b>	Cortes transversales de corazón de <i>L. vannamei</i> expuesto crónicamente a $10^3$ cél/L de GCCV-6 durante 45 días	79
<b>Figura 34</b>	Cortes transversales de ganglio supraesofagal de <i>L. vannamei</i> expuesto crónicamente a $10^3$ cél/L de GCCV-6 durante 45 días	81
<b>Figura 35</b>	Cortes transversales de ganglio supraesofagal de <i>L. vannamei</i> expuesto crónicamente a $10^3$ cél/L de KBTX-3 durante 45 días	81
<b>Figura 36</b>	Cortes longitudinales de músculo abdominal de <i>L. vannamei</i> expuesto crónicamente a $10^3$ cél/L de KBTX-3 durante 45 días	82
<b>Figura 37</b>	Bioensayo en ratón para obtener la toxicidad del extracto de toxinas paralizantes de la cepa GCCV-6	88
<b>Figura 38</b>	Ensayo agudo por inyección intramuscular de toxinas paralizantes en juveniles de <i>L. vannamei</i> .	89
<b>Figura 39</b>	Ensayo agudo por inyección intramuscular de toxinas paralizantes en adultos de <i>L. vannamei</i> .	89
<b>Figura 40</b>	Corte transversal de corazón de camarones inyectados con extractos de GCCV-6	93
<b>Figura 41</b>	Corte transversal de ganglio supraesofagal de camarones inyectados con extractos de GCCV-6	94

## **Capítulo I**

### **Generalidades**

## 1.1 Introducción

Las Proliferaciones de Algas Nocivas (PAN), HAB (de sus siglas en inglés Harmful Algal Blooms) o comúnmente denominadas “Mareas rojas” (Ochoa *et al.*, 2003) han llamado la atención de la comunidad científica a escala mundial debido a su impacto en la salud pública, en los ecosistemas e incluso en el sector económico, debido a que afectan regiones turísticas, actividades pesqueras, la acuicultura y la salud pública (Shumway, 1990; Hallegraeff, 1993; Burkholder, 1998; Landsberg y Shumway, 1998; Ochoa, 2003). Los reportes de estos fenómenos se han incrementado en las últimas décadas y la comunidad científica coincide que se debe a la sinergia entre varios factores, de los cuales se destacan el cambio climático global del planeta, el impacto antropogénico a los ecosistemas y las vías de comunicación, especialmente el transporte de especies mediante la creación de canales y por medio del lastre de las embarcaciones (Hallegraeff, 1993; Burkholder, 1998; Ochoa, 2003).

Existen muchas especies de microalgas capaces de producir proliferaciones masivas tóxicas, pero todas pertenecen a tres grupos principales: cianobacterias, dinoflagelados y diatomeas (Cortés-Altamirano y Hernández-Becerril, 1995; Hallegraeff *et al.*, 1995). Las toxinas de microalgas o ficotoxinas son sustancias que tienen grupos funcionales específicos situados en la molécula de tal forma que le confieren una toxicidad fisiológica muy fuerte sobre el organismo que la ingiere (Scoging, 1998; FAO, 2004).

En general la estructura química de las ficotoxinas es muy diversa y compleja, teniendo en común su naturaleza no proteica (Muñoz-Cabrera, 1998a), y precisamente por esta heterogeneidad, los daños que producen en los organismos son muy variados; por eso la

manera más común de clasificarlas es mediante los efectos que tienen en el ser humano: toxinas parálíticas (PSP, Paralytic Shellfish Poison), diarreicas (DSP, Diarrhetic Shellfish Poison), amnésicas (ASP, Amnesic Shellfish Poison) y neurotoxinas (NSP, Neurotoxin Shellfish Poison) (Premazzi y Volterra, 1993; Muñoz-Cabrera, 1998b).

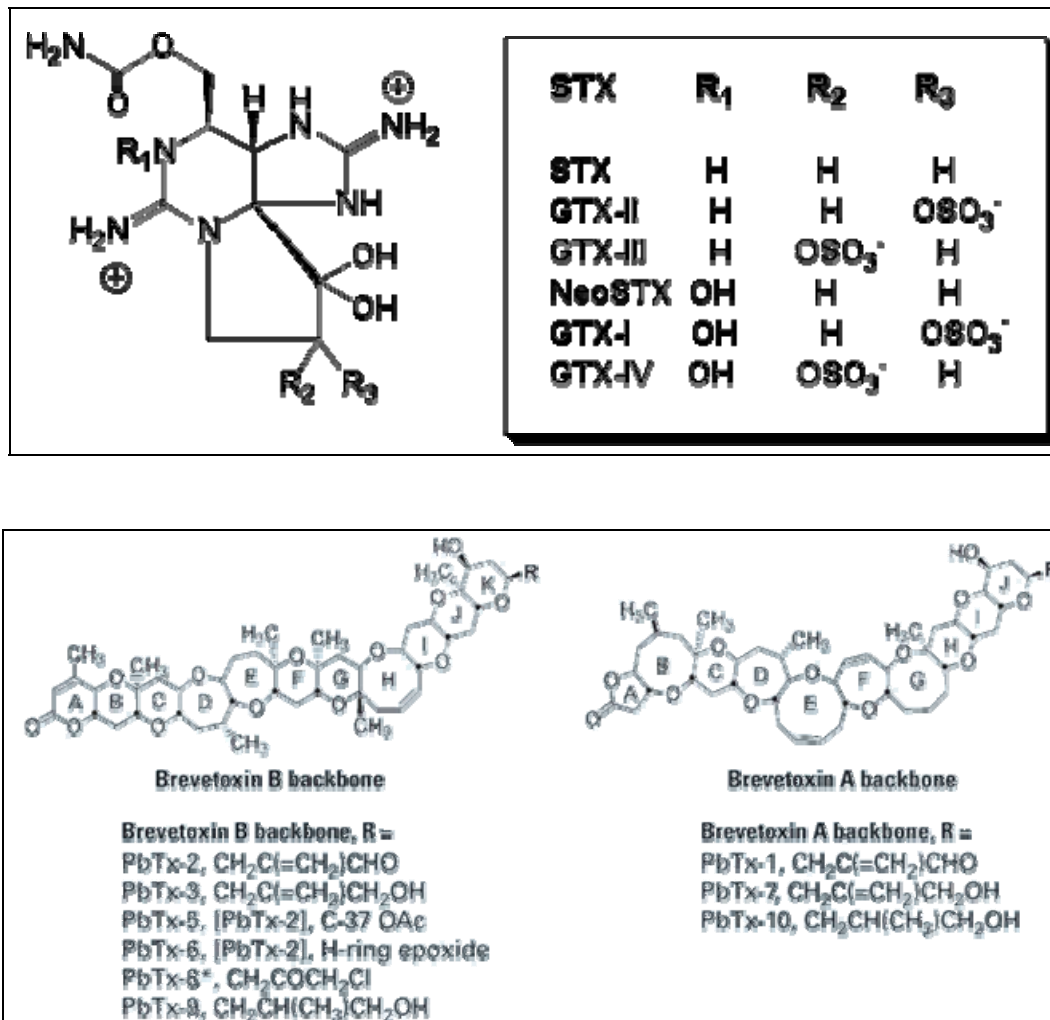
En este trabajo solo se contemplan las toxinas paralizantes (PSP) del grupo de la saxitoxina (Figura 1a) y a las neurotoxinas (NSP) del grupo de la brevetoxina (Figura 1b). Ambas toxinas actúan a nivel de los canales de sodio ( $\text{Na}^+$ ) (McFarren *et al.*, 1958; Hall *et al.*, 1990; Trainer *et al.*, 1990) y son de las más importantes en el litoral mexicano (NOM-EM-005-SSA1-2001).

La saxitoxina y sus análogos bloquean los canales de  $\text{Na}^+$  neuronales y musculares principalmente, uniéndose a un sitio en la superficie extracelular de estos canales, interrumpiendo la difusión pasiva de los iones (la cual ocurre normalmente cuando el canal está en estado de conducción), evitando el potencial de acción que es esencial para la conducción del impulso nervioso y de la contracción de los músculos (Schantz, 1986; Shimizu *et al.*, 1989; Cembella *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1990).

Por otro lado la brevetoxina y sus derivados se unen específicamente al sitio 5 de los canales de  $\text{Na}^+$  actuando como despolarizadores y dejando la activación de los canales en un potencial normal de relajación y una depresión del potencial de acción, provocando un bloqueo para la excitación de la célula (McFarren *et al.*, 1958; Catterall y Risk, 1981; Cembella *et al.*, 1995; Trainer *et al.*, 1990). A pesar de que ambas toxinas actúan en los canales de  $\text{Na}^+$ , se ha reportado que las PbTX no interfieren con el enlace de las STX que se unen a los sitios 1-3 del canal de sodio (Catterall y Risk, 1981; Poli *et al.*, 1999),



aunque se ha observado un paralelismo entre el comportamiento de desplazamiento de las PbTX con la STX (Poli *et al.*, 1999).



**Figura 1.** Estructura química de la saxitoxina (STX) y análogos (a) y de la brevetoxina (PbTX) y análogos (b). Figura (a) tomada de Patockaa y Stredab (2002) y Figura (b) Tomado de Baden *et al.* (2005).

La acción de estas ficotoxinas no se restringe a los tejidos del sistema nervioso, del corazón o del músculo, como generalmente se asocia. También se han reportado afecciones en células endocrinas y aquellas implicadas en la respuesta inmune (Bossart *et al.* en FAO, 2004). En consecuencia, una exposición crónica a estas toxinas puede afectar

otros tejidos y no solamente los considerados tradicionalmente como “excitables” (Strichartz y Castle, 1990; Bossart *et al.* en FAO, 2004), por lo que se debe poner especial atención a los efectos causados por estas ficotoxinas durante exposiciones crónicas (Carmichael y Falconer, 1993; Landsberg, 1996; Bury *et al.*, 1998; FAO, 2004).

## 1.2 Antecedentes

Existen documentos antiguos que mencionan que grupos indígenas americanos tenían restricción en el consumo de moluscos especialmente a principios de cada año para evitar intoxicaciones, lo cual se presume está relacionado con las “mareas rojas” (Ochoa *et al.*, 1998). Sin embargo, los reportes de proliferaciones de microalgas dañinas en México se han hecho de manera más formal y sistemática desde hace poco más de una década. Cortés-Altamirano y Núñez-Pastén (1992) publicaron un documento donde se describen doce años de registros y monitoreo de proliferaciones de algas nocivas en la Bahía de Mazatlán, identificando especies y describiendo el impacto causado en cada caso.

Durante los años comprendidos entre 1992 y 1995 se reportaron eventos relacionados con crecimientos masivos de microalgas en la costa noroeste del Pacífico mexicano. Estos fenómenos afectaron moluscos, peces, reptiles, aves, mamíferos marinos e incluso en algunos se observaron enfermedades y muerte en humanos. Entre los grupos de microorganismos implicados en estos eventos se identificaron algunos dinoflagelados y cianobacterias, y se pudieron determinar hepatotoxinas, toxinas paralíticas y diarreicas (Ochoa *et al.*, 1997). Desafortunadamente no en todos los eventos se pudieron identificar las especies ni las toxinas involucradas. Sin embargo, en 1998 se utilizaron técnicas

analíticas más precisas para la identificación de especies de microalgas y para la determinación de las toxinas involucradas en la muerte de almejas ocurrida en Bahía Concepción, B.C.S. en el año de 1992. Se reportaron dos especies de dinoflagelados (*Prorocentrum* sp y *Alexandrium* sp) y se detectaron saxitoxina y derivados de gonyautoxina (Ochoa *et al.*, 1998).

En 1998 Sierra-Beltrán y colaboradores realizaron un análisis de los eventos tóxicos relacionados con proliferaciones masivas de microalgas en México, describiendo especies tóxicas como *Gymnodinium breve*, *G. catenatum*, *Alexandrium catenella*, *A. tamiyavanichi*, y *Pseudonitzschia australis*, además de corroborar la presencia de toxinas parálíticas, neurotóxicas, amnésicas, diarreicas, tetrodotoxinas y ciguatoxinas.

En 1999 Ramírez-Camarena y colaboradores reportaron la mortandad de peces en las costas del Golfo de México causada por la intoxicación con PbTx proveniente de una proliferación de *Karenia brevis* (= *Gymnodinium breve*). Los reportes de daños por brevetoxinas en México se han limitado a efectos letales en peces e intoxicaciones en humanos (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998; FAO, 2004) pero en las costas de Texas y Florida se han reportado también muerte e intoxicación de invertebrados, mamíferos marinos y aves (Pierce y Henry, 1996; Villareal *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2005; Flewelling *et al.*, 2005).

Recientemente se han realizado estudios de la acumulación de toxinas parálíticas en moluscos silvestres en Golfo de California en diferentes meses del año y durante eventos de mareas rojas del género *Gymnodinium catenatum*. Se pudo constatar que varias especies de moluscos son capaces de acumular peligrosas cantidades de toxinas producidas por el dinoflagelado no solo en eventos de marea roja si no que

probablemente también contribuya la acumulación por ingestión crónica debido a que *G. catenatum* se encuentra todo el año en la zona y es parte de la dieta de los moluscos (Band-Schmidt *et al.*, 2005; Garate-Lizárraga *et al.*, 2004a; Garate-Lizárraga *et al.*, 2004b). Así mismo estos estudios han contribuido a conocer el perfil de toxinas de *G. catenatum* durante proliferaciones naturales y bajo condiciones de laboratorio, su tasa de crecimiento y otras características biológicas importantes (Band-Schmidt *et al.*, 2005).

Un común denominador en reportes recientes de eventos vinculados con proliferaciones de microalgas nocivas es el establecimiento de planes o redes de monitoreo como principio para manejar y prevenir contingencias relacionadas con estos fenómenos, debido a los daños severos que pueden producir las ficotoxinas al ecosistema, a la salud pública y a la economía (acuicultura, pesca y turismo, principalmente). Por lo anterior en la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-005-SSA1-2001 se considera que *“las mareas rojas pueden tener una variedad de efectos adversos a la salud, especialmente cuando el fitoplancton tóxico es filtrado del agua como alimento por los moluscos bivalvos, acumulando toxinas en sus tejidos a niveles que pueden ser letales para los humanos que los consumen”*. Además se mencionan los niveles máximos permisibles para algunas toxinas en especies de moluscos bivalvos como el ostión, la almeja, el mejillón y las vieiras (Tabla I). Sin embargo, no se hace mención de las consecuencias de dosis subletales o exposiciones crónicas de ficotoxinas en la población o en organismos cultivados, tampoco se incluyen otros organismos que pueden actuar como vectores potenciales de ficotoxinas: peces, crustáceos, moluscos gasterópodos y cefalópodos. Aunado a lo anterior, los límites máximos permisibles de ficotoxinas de la NOM-EM descritos en la Tabla publicada presentan un error en el límite máximo para el

Ácido Domoico (ASP), no considera todas las ficotoxinas que se pueden encontrar en México y las unidades que establece no son homogéneas (ver correcciones en Tabla I).

En la Tabla I se presentan, con caracteres normales, los límites máximos permitidos para algunas toxinas según la NOM-EM. Los datos en **negritas** fueron incorporados en este trabajo para homogenizar las unidades, basándose en los trabajos publicados por Sommer y Meyer (1937), WHO (1989), Hokama (1993), AOAC (1997), FDA (2001), FAO (2004) y Alonso-Rodríguez *et al.* (2004b).

Finalmente, el impacto de la exposición crónica a ficotoxinas en la población de México es prácticamente desconocido (De la Garza, 1983; Ochoa, 2003; Pérez-Linares *et al.*, 2008). La ingesta de ficotoxinas al consumir alimentos contaminados con dosis subletales, puede producir síntomas que se confunden fácilmente con infecciones gastrointestinales, descartando la importancia de una posible intoxicación crónica (Fleming *et al.*, 1995; Muñoz-Cabrera, 1998b). Investigaciones previas han demostrado que varias de estas toxinas producen daños a diversos tejidos (Roberts *et al.*, 1979; Saker y Eaglesham, 1999; Pérez-Linares *et al.*, 2003; Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2008; Pérez-Linares *et al.*, 2008), que pueden causar inmunosupresión (Strichartz y Castle, 1990; Pierce y Henry, 1996; FAO, 2004) y/o son promotoras de tumores cuando se consumen de manera crónica en dosis subletales (Khan *et al.*, 1996; Bury *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 1998; Landsberg, 1996; Landsberg y Shumway, 1998).

### **1.3. Justificación**

En México existen pocos trabajos relacionados con el estudio de especies de microalgas tóxicas y ficotoxinas en cultivos de camarón, así como sus efectos en la producción

(Cortés-Altamirano *et al.*, 1997; López-Cortés, 1999; Ochoa, 2003; Pérez-Linares *et al.*, 2003; Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004a y 2004b; Ochoa *et al.*, 2004; FAO, 2004; Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2008; Pérez-Linares *et al.*, 2008). Debido a la relevancia internacional de leyes sobre inocuidad alimentaria, es necesario saber si los camarones cultivados son capaces de retener toxinas parálíticas y neurotoxinas actuando como vectores para la población consumidora.

**Tabla I.** Niveles máximos permitidos de diferentes ficotoxinas según la Norma Oficial Mexicana.

Toxina o plancton	Límite máximo ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de carne)	Limite máximo (ppm)	Límite máximo (UR/100 g)
Ácido Domoico (ASP)	<b>2000</b>	200 ( <b>20</b> )	<b>N.A.</b>
Brevetoxina (NSP)	<b>80</b>	<b>0.8</b>	20
Saxitoxina (PSP)	80	<b>0.8</b>	<b>400</b>
<b>Acido Okadaico (DSP)</b>	<b>20</b>	<b>0.2</b>	<b>5</b>
Fitoplancton en agua de mar	<b>N.A.</b>	5,000 ( <b><math>&gt;10^4</math></b> )	<b>N.A.</b>

Los datos en **negrita** no se incluyen en la Tabla original de la NOM pero se incorporaron en este trabajo para homogenizar las unidades.

UR= Unidades Ratón; N.A.= No es aplicable

El cultivo de camarón es una actividad importante en varios países debido a que se han podido domesticar especies de interés comercial, manipulándolas para obtener beneficios en temporadas en las que anteriormente no se podía (Anderetta y Alfonso, 1997) y con características organolépticas mejoradas que el mercado solicita (Flores-Campaña, 1990; Mazón *et al.*, 1996; Anderetta y Alfonso, 1997). Además esta actividad permite que las poblaciones naturales no sean sobre-explotadas (Guilland y Rothschild, 1984).

En el noroeste de México se ha desarrollado la acuicultura con camarón de manera exitosa desde hace más de 15 años por sus características geográficas (Mazón *et al.*, 1996). Sin embargo, esta industria se ha visto afectada por diversos factores naturales y

antropogénicos o una sinergia entre ellos, como el impacto de enfermedades, desproporción nutricional, aclimatación a nuevos sistemas de cultivo, perfeccionamiento de técnicas de cultivo, etc. (Flores-Campaña, 1990). Las proliferaciones de microalgas nocivas es otro de los factores naturales que ha impactado económicamente a la acuicultura (Lightner, 1983; Shumway, 1990; Scoging, 1998) ya que los organismos expuestos a microalgas tóxicas pueden presentar anomalías reproductivas, susceptibilidad a enfermedades, desórdenes alimenticios y hasta la muerte (Lightner, 1983; Cortés-Altamirano *et al.*, 1997; Karunasagar *et al.*, 1997; Pérez-Linares *et al.*, 2003; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004a; Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2008; Pérez-Linares *et al.*, 2008).

También se ha observado que las ficotoxinas que no son letales para los crustáceos son capaces de acumularse en sus tejidos, intoxicando posteriormente a los consumidores en la red trófica (Foxall, *et al.* 1979; Roberts *et al.*, 1979; Hwang *et al.*, 1990; Saker y Eaglesham, 1999; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004b). En ambos casos estos eventos llegan a impactar a la acuicultura, reportándose pérdidas parciales o totales de la producción (en uno o varios estadios del cultivo) o bien impidiendo su exportación o venta nacional debido al peligro potencial en la salud pública (Falconer, 1993; Hallegraeff, 1993; Landsberg y Shumway, 1998; Codd *et al.*, 1999; FAO, 2004).

#### **1.4. Hipótesis de trabajo**

- i) La exposición aguda y crónica de *Litopenaeus vannamei* a cultivos de *Gymnodinium catenatum* y *Karenia brevis* produce daños a diferentes tejidos del camarón (hepatopáncreas, corazón, sistema nervioso y músculo).



- ii) Las toxinas de *G. catenatum* (PSP) y *K. brevis* (NSP) pueden acumularse en algunos tejidos (hepatopáncreas, corazón, sistema nervioso y músculo) de *L. vannamei* bajo exposiciones crónicas.
- iii) Las toxinas de *G. catenatum* (PSP) y *K. brevis* (NSP) que se acumulan en algunos tejidos (hepatopáncreas, corazón, sistema nervioso, músculo) de *L. vannamei* pueden depurarse después de un periodo posterior sin exposición a los cultivos de los dinoflagelados.

### **1.5. Objetivo general**

Determinar si existe una acumulación y posterior depuración de toxinas de *Gymnodinium catenatum* (PSP) y *Karenia brevis* (NSP) en varios tejidos (hepatopáncreas, corazón, sistema nervioso, músculo) del camarón patiblanco *Litopenaeus vannamei*, bajo exposiciones agudas y crónicas a los cultivos de los dinoflagelados. Describir los daños causados en tejidos de camarón por la exposición a los cultivos de ambos dinoflagelados.

#### **1.5.1 Objetivos específicos**

1. Determinar el perfil de toxinas PSP y toxinas NSP producida por *G. catenatum* (Cepa GCCV-6, CODIMAR-CIBNOR) y *K. brevis* (Cepa KBTX-3, MSI, UTEX), respectivamente, bajo condiciones de cultivo.
2. Diseñar bioensayos de exposición aguda en el camarón patiblanco *L. vannamei*, con los cultivos de GCCV-6 y KBTX-3 para conocer las densidades letales para los organismos y determinar dosis subletales.

3. Diseñar un bioensayo de exposición crónica en el camarón con cultivos de las cepas GCCV-6 y KBTX-3, para conocer los daños que provocan las toxinas en tejidos diana (hepatopáncreas, corazón, sistema nervioso, músculo), el impacto en la supervivencia y en el crecimiento de los organismos.
4. Detectar e identificar las toxinas que se acumulan en los tejidos del camarón (hepatopáncreas, corazón, sistema nervioso, músculo) y su posible depuración mediante análisis con Cromatografía Líquida de Alta Eficacia y Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas.
5. Evidenciar y describir los daños en los tejidos del camarón por el resultado de la exposición a los cultivos de los dinoflagelados.

## **1.6. Material y métodos**

### **1.6.1 Organismos**

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron 2 especies diferentes de dinoflagelados tóxicos (*Gymnodinium catenatum* y *Karenia brevis*) para conocer su impacto en camarones de cultivo. Para este último se tomó como modelo el camarón patiblanco *Litopenaeus vannamei*.

A continuación se hará una breve descripción de cada uno de los organismos involucrados, su biología general, su distribución mundial y características relevantes.

### **1.6.1.1 *Gymnodinium catenatum***

Para obtener las toxinas paralizantes (PSP) se cultivó la cepa GCCV-6 de *Gymnodinium catenatum* proveniente de la CODIMAR-CIBNOR (Figura 2a) que fue aislada de Bahía Concepción, B.C.S., México (Band-Schmidt *et al.*, 2005).

*Gymnodinium catenatum* es un dinoflagelado desnudo con células de 34-65 µm de largo y 27-43 µm de ancho (Figura 3a), capaz de formar cadenas (Figura 3b). Su contenido celular está formado por cloroplastos amarillo-verdosos, gránulos de lípidos y un núcleo central grande (Blackburn *et al.*, 1989). La Figura 4 muestra su amplia distribución mundial, principalmente en zonas cálidas y templadas (Hewitt *et al.*, 2002). En México se localiza desde el Golfo de California hasta las costas del estado de Oaxaca (Cortés-Altamirano *et al.* 1995).

Esta especie es capaz de producir toxinas paralizantes, entre las más comúnmente detectadas se encuentran las toxinas tipo C (C1-4), la Neosaxitoxina (NEO), Gonyautoxinas (GTX1-4) y toxinas decarbamoil (dcSTX, dcGTX) (Band-Schmidt *et al.* 2005). Sin embargo, también es capaz de producir la saxitoxina (STX) que es una de las ficotoxinas más peligrosas por su toxicidad (80 µg/100 g de carne de molusco), hidrosolubilidad y termoestabilidad (AOAC, 1997; FAO, 2004). En la Tabla II se resume la posición taxonómica de *Gymnodinium catenatum*.

### **1.6.1.2 *Karenia brevis***

Para obtener las neurotoxinas se cultivó la cepa KBTX-3 de *Karenia brevis* (Figura 2b), la cual fue aislada del Golfo de México por el Dr. Tracy Villareal del Instituto de

Ciencias Marinas de la Universidad de Texas en Austin (MSI-UTEX) (Magaña *et al.*, 2003).

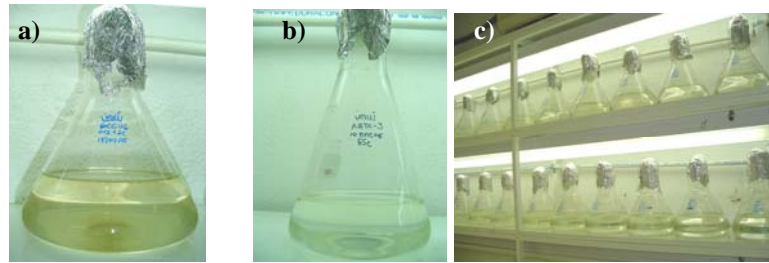
*Karenia brevis* (= *Gymnodinium breve*) es un dinoflagelado desnudo con células muy frágiles de 20-40 µm de largo y 15-70 µm de ancho (Figura 3c). Su distribución comprende el Golfo de México, parte de la costa este de los EUA, la costa sur de Australia y Nueva Zelanda (Figura 4).

Este dinoflagelado puede producir hasta nueve toxinas denominadas brevetoxinas o PbTx y designadas como PbTx-1, PbTx-2, *etc.* Este perfil puede cambiar dependiendo de las condiciones del medio, metabolismo y fase de crecimiento (Villareal *et al.*, 2001; Ishida *et al.*, 2004; Baden *et al.*, 2005) y se pueden liberar al medio o acumularse por medio de la red trófica (Plakas *et al.*, 2002; Ishida *et al.*, 2004). Otra vía de intoxicación es mediante aerosoles que se forman por la dinámica de corrientes, viento y oleaje, esparciéndose las brevetoxinas en el aire y dañando mucosas y vías respiratorias de reptiles, aves, mamíferos marinos e incluso del humano (Magaña *et al.*, 2003; Baden *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2005). A pesar de que se han reportado más de 10 análogos, algunos de ellos son artificios derivados de los métodos de extracción (PbTx-8, PbTx-11 y 12) o por el metabolismo de los moluscos (Plakas *et al.*, 2002; Ishida *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). En la Tabla II se resume la posición taxonómica de *Karenia brevis*.

**Tabla II.** Posición taxonómica de *Gymnodinium catenatum* y *Karenia brevis*.

Reino	Plantae	Plantae
División	Pyrrophyceae	Pyrrophyceae
Clase	Dinophyceae	Dinophyceae
Orden	Gymnodiniales	Gymnodiniales
Familia	Gymnodiniaceae	Gymnodiniaceae
Género	<i>Gymnodinium</i>	<i>Karenia</i> (= <i>Gymnodinium</i> )
Especie	<i>Gymnodinium catenatum</i>	<i>Karenia brevis</i> (= <i>Gymnodinium breve</i> )

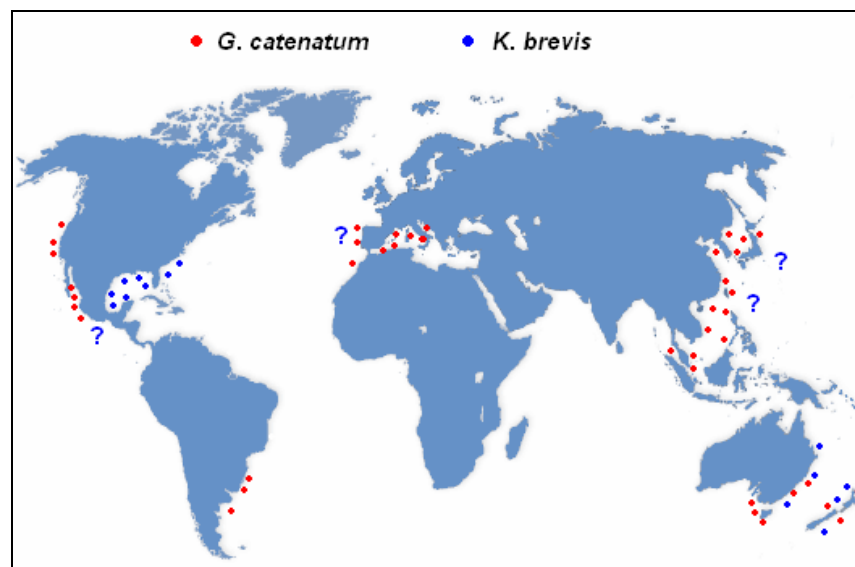
Tomado de Integrated Taxonomic Information System (<http://www.itis.gov>).



**Figura 2.** Cepa GCCV-6 de *Gymnodinium catenatum* proveniente de la CODIMA-CIBNOR (a) y cepa KBTX-3 de *Karenia brevis* proveniente de la UTEX (b). Ambas cepas se cultivaron en el Cepario del CIBNOR (c). Fotos: J. Pérez-Linares.



**Figura 3.** *Gymnodinium catenatum* (a y b) y *Karenia brevis* (c). Fotos: a) Korea Ocean Research & Development Institute; b) J.A. Fuentes-Pascacio; c) Marine Biotoxins Program, Center for Coastal Environmental Health and Biomolecular Research.



**Figura 4.** Distribución mundial de *Gymnodinium catenatum* y *Karenia brevis*. En México *G. catenatum* se distribuye desde el Golfo de California hasta las costas del estado de Oaxaca y *K. brevis* en el Golfo de México (Cortés-Altamirano *et al.* 1995; Cheng *et al.*, 2005). ?= Identificación de la especie sin reportes de mareas rojas. Mapa: J. Pérez-Linares.

### 1.6.1.3 Cultivo y cosecha de los dinoflagelados

Para cultivar las microalgas se utilizaron los medios f/2+Se (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975) y GSe (Provasoli *et al.*, 1957) (Anexos I y II). El agua de mar (33 UPS\*) se filtró con membranas de 0.5  $\mu\text{m}$ , se esterilizó en autoclave (121°C, 15 lb, 20 min.) y se dejó enfriar antes de preparar los medios de cultivo. Todas las cepas se mantuvieron en el Cepario del CIBNOR en cámaras adaptadas con lámparas de luz blanca (irradiación de 150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ), ciclos de luz y oscuridad 12:12 h y una temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  (Fig. 2c). Para conocer la densidad celular de los cultivos se utilizó el método de dilución de acuerdo a Throndsen (1995). El cultivo de células se homogenizó y se tomó una alícuota de 1 mL. A la muestra se le agregó una gota de solución de Lugol ( $\text{I}_2$ , 5% y KI 10%) y el conteo celular se realizó en cámaras de Sedwick-Rafter con ayuda de un microscopio compuesto.

Los cultivos se mantuvieron y escalaron para poder obtener las células vivas y realizar los bioensayos con los camarones. Algunos lotes se cosecharon para realizar extracciones y conocer su perfil tóxico. Lo anterior se llevó a cabo una vez que alcanzaban la fase logarítmica de crecimiento. En el caso de la cepa GCCV-6 se realizó la cosecha a los 17 días de su inoculación (Band-Schmidt *et al.*, 2005) y para la cepa de KBTX-3 a los 15 días (Magaña *et al.*, 2003; Magaña y Villareal., 2006).

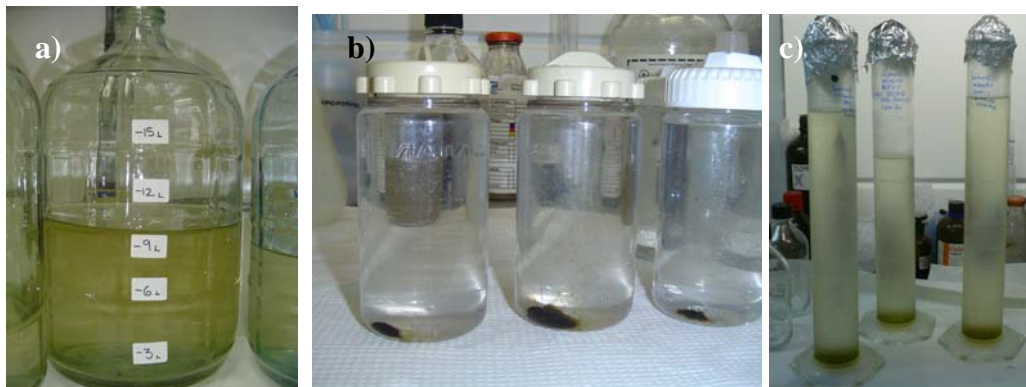
Para cosechar a *G. catenatum* se unieron varios lotes y se homogenizaron (Fig. 5a), se midió el volumen total, se tomaron alícuotas (por triplicado) para el conteo celular y se centrifugaron a 6,200 x g, 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y la biomasa sedimentada (Fig. 5b) se utilizó para extracción de toxinas paralizantes (PSP).

---

\* UPS: Unidades Prácticas de Salinidad (UNESCO, 1979).

*K. brevis* es una especie muy frágil y se puede romper con facilidad al centrifugar y verter las toxinas al medio. Por lo anterior se optó por cosechar las células mediante aletargamiento. Una vez que se homogenizaron los lotes elegidos y se tomaron las alícuotas para el conteo celular, los cultivos se colocaron en matraces de 2 L y se dejaron a 4°C durante 48 h. Una vez que las células se aletargaron y sedimentaron (Fig. 5c), se desechó la mayor cantidad posible de medio de cultivo, separándolo del paquete celular utilizando una pipeta Pasteur. Debido al exceso de medio de cultivo y sales, adicionalmente se centrifugó la biomasa obtenida a 6,200 x g, 15 minutos a 4°C. Se desechó nuevamente el sobrenadante y las células obtenidas se utilizaron para la extracción de neurotoxinas (NSP).

Todo el material, equipo y desechos de las cosechas se trataron antes de verterse al drenaje de manera segura (ver Apartado 1.6.4 Tratamiento de desechos).



**Figura 5.** Cosecha de *Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-6) y *Karenia brevis* (cepa KBTX-3). Los cultivos se reúnen y homogenizan (a). GCCV-6 se centrifuga (b) y KBTX-3 se aletarga a 4°C por 48 h (c) para obtener la biomasa sedimentada y desechar el sobrenadante. Fotos (a) y (b) J. Pérez-Linares; (c) L.J. Fernández-Herrera.

#### 1.6.1.4 *Litopenaeus vannamei*

Boone en 1931 describió por primera vez al camarón patiblanco y lo clasificó como *Penaeus vannamei*. Sin embargo, la especie fue reubicada en un nuevo género (*Litopenaeus*) debido a que encontraron sinonimias e inconsistencias en su clasificación (Pérez Farfante y Kensley, 1997).

*L. vannamei* es un crustáceo decápodo (Tabla III) que se distribuye principalmente en sistemas estuarinos de zonas tropicales y subtropicales (Guilland y Rothschild, 1984; Hendrickx, 1996), desde el norte del Golfo de California, hasta Perú y las Islas Galápagos (Pérez Farfante y Kensley, 1997; Rodríguez de la Cruz, 1987). Es una especie bentónica característica de fondos blandos, arcilloso-arenosos y se caracterizan por tener un color blanco transparente (Dore y Claus, 1987; Hendrickx, 1996; Pérez Farfante y Kensley, 1997) (Fig. 5).

**Tabla III.** Posición taxonómica de *Litopenaeus vannamei*.

Reino	Animalia
Filum	Arthropoda
Subfilum	Crustacea
Clase	Malacostraca
Orden	Decapoda
Familia	Penaeidae
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especia	<i>Litopenaeus vannamei</i>

Tomado de Integrated Taxonomic Information System (<http://www.itis.gov>).

El ciclo de vida de *L. vannamei* se divide en 3 estadios planctónicos larvales (nauplio, zoea y mysis) que en total se desarrollan en los primeros 12-15 días después de la eclosión. Cuando alcanza el estadio postlarval (~15 días) adquiere hábitos bentónicos y migra a zonas costeras. La etapa juvenil la desarrolla en lagunas costeras y zonas



estuarinas, ricas en nutrientes, vegetación y detritus. En el estadio pre-adulto (~10 cm. de longitud) migran nuevamente a mar abierto, donde llegan al estadio adulto y se reproducen (Orbe y Arias, 1987).



**Figura 6.** Camarón patiblanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). (Foto tomada del sitio: <http://www.aquakulturtechnik.de>).

*Litopenaeus vannamei* es considerado una de las tres especies de camarones peneidos más importantes de la pesquería a nivel mundial (Guillard y Rothschild, 1984; FAO, 2006). En los últimos 20 años el consumo de camarones cultivados se ha incrementado 4 veces (FAO, 2006) y *L. vannamei* es la segunda especie más importante en la camaronicultura después de *Penaeus monodon* (Anderetta y Alfonso, 1997; FAO, 2006). En México el camarón patiblanco se ha cultivado con éxito desde hace más de 15 años, principalmente en estados del noroeste: Sonora, Sinaloa, Baja California Sur y Nayarit (Flores-Campaña, 1990; Mazón *et al.*, 1996). Nuestro país ha ocupado por varios años el segundo lugar de producción en todo el continente Americano después de Ecuador (Anderetta y Alfonso, 1997; FAO, 2006). Para 2006 se reportó una producción total de

camarones cultivados de 98,945 t, un 62% de la producción total de camarones comercializados en México (CONAPESCA, 2007).

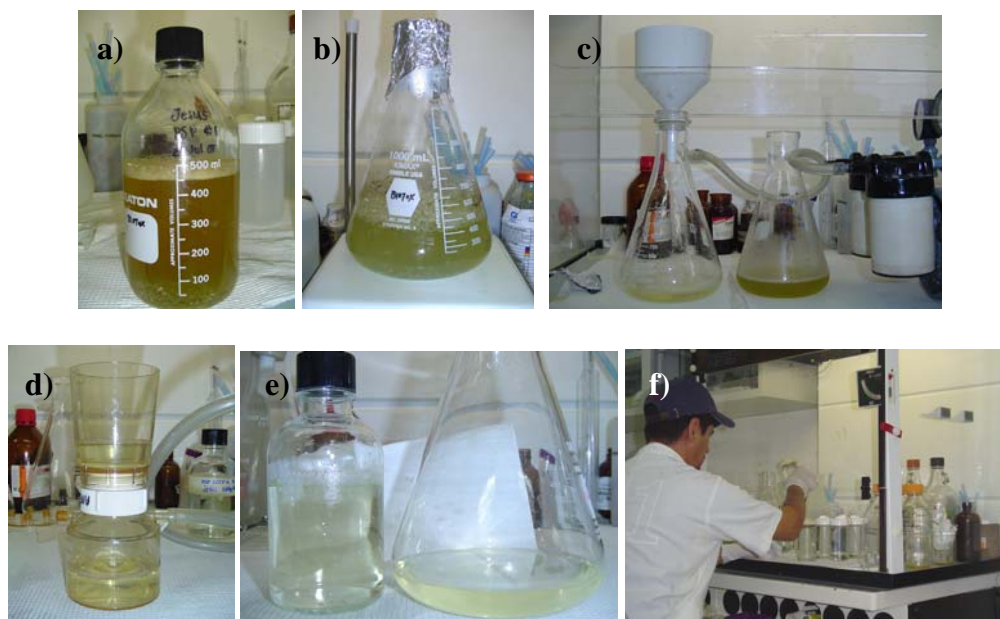
### **1.6.2 Extracción y análisis de toxinas paralizantes (PSP)**

Para obtener los extractos de toxinas paralizantes se siguió el protocolo de Lawrence y colaboradores (1995 y 2004). La biomasa de cada cosecha (ver Apartado *1.6.1.3 Cultivo y cosecha de los dinoflagelados*) se resuspendió en 5 mL de HCl [0.1 N] y se formó un “pool” con todas las muestras (Fig. 7a). Una vez que se resuspendió el material celular se agregaron perlas de vidrio (0.5mm Ø) y se agitó vigorosamente para completar la ruptura celular.

Posteriormente se calentó la mezcla hasta alcanzar el punto de ebullición durante 5 minutos (Fig. 7b) y una vez que se enfrió la muestra se filtró 2 veces, primero con un filtro Whatman<sup>®</sup> No. 1 (Fig. 7c) y después con una membrana de 0.45 µm (Fig. 7d).

El extracto de toxinas paralizantes (Fig. 7e) se almacenó en recipientes protegidos de la luz y en refrigeración a 4°C para análisis posteriores (*e.g.* bioensayo en ratón, HPLC-FLD). Todo el proceso se realizó bajo una campana de extracción para evitar contaminación y/o intoxicación (Fig. 7f).

Para conocer el perfil de toxinas en las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia con detección por fluorescencia (HPLC-FLD) siguiendo el protocolo propuesto por Lawrence y colaboradores (2004). El método de Lawrence se basa principalmente en la oxidación pre-columna de las muestras y su análisis en HPLC-FLD.



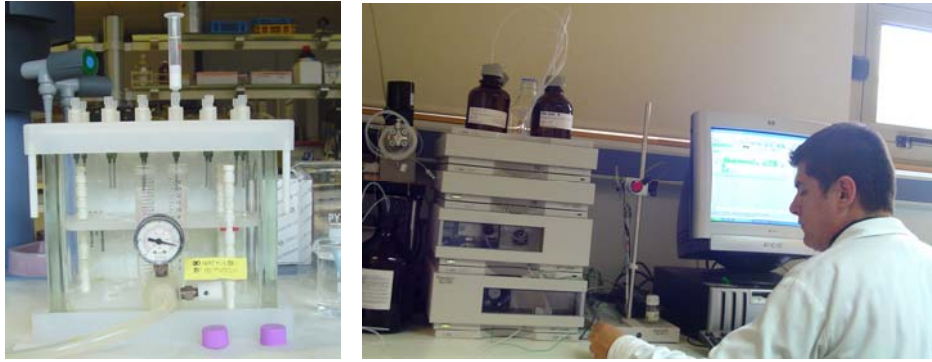
**Figura 7.** Proceso de extracción de toxinas paralizantes. El material biológico se resuspende en HCl [0.1 N] **(a)** para posteriormente calentarlo hasta ebullición por 5 minutos **(b)**. El extracto se filtra dos veces **(c y d)** hasta que se obtenga una solución clara **(e)**. Todo el proceso debe realizarse bajo condiciones de seguridad **(f)**. Fotos: J. Pérez-Linares.

Los componentes tóxicos derivados de la saxitoxina fueron detectados por las purinas altamente fluorescentes que se derivan de la oxidación. El tratamiento con peróxido de hidrógeno produce una oxidación alcalina en las moléculas de saxitoxina que deriva en el ácido guanidino-propiónico que se cicla rápidamente para dar origen a un compuesto altamente fluorescente (Leão-Martins *et al.*, 1998; Gago-Martínez *et al.*, 2001a). No todos los análogos de saxitoxina son susceptibles de oxidarse con  $H_2O_2$ , por ejemplo los compuestos N-hidroxilados (GTX1, 4, Neo, B2, C3,4) no producen compuestos fluorescentes con  $H_2O_2$  bajo condiciones básicas, a excepción de la GTX1. Pero en estos casos Lawrence y colaboradores utilizan el ácido periódico [ $HIO_4$ ] en medio alcalino (Leão-Martins, 1998; Gago-Martínez *et al.*, 2001a). Las muestras se limpiaron mediante una extracción en fase sólida (SPE-C18, Bakerbond, JT Baker<sup>®</sup>) utilizando una cámara de vacío (Supelco<sup>®</sup> Visiprep<sup>™</sup>) (Fig. 8a) para evitar los compuestos con fluorescencia

natural. Posteriormente la muestra se oxidó con peryodato y se analizó en un equipo HPLC-FLD con bomba cuaternaria (Agilent 1200 Series<sup>®</sup>) y equipado con el programa ChemStation<sup>®</sup> para análisis e integración de datos (Fig. 8b). Para el caso de toxinas H-hidroxiladas se realizó una segunda fase de limpieza o “cleanup” con cartuchos de intercambio iónico (SPE-COOH, Bakerbond, JT Baker<sup>®</sup>) para separar en 3 fracciones los diferentes grupos de toxinas paralizantes: fracción 1 toxinas tipo C, fracción 2 toxinas tipo GTX y fracción 3 saxitoxina (STX) y neosaxitoxina (NEO). Las fracciones se oxidaron nuevamente con peryodato y se volvieron a analizar. En caso de ausencia de toxinas N-hidroxiladas, las muestras solo se oxidaron con peróxido de hidrógeno y se analizaron en el cromatógrafo. Los estándares de toxinas paralizantes (C1-4, STX, NEO, dcSTX, GTX1-4 y B1-2, National Research Council, Halifax, Canadá) fueron proporcionados por el Laboratorio de Química Analítica y Alimentaria de la Universidad de Vigo. Las características generales del análisis son las siguientes: detector de fluorescencia con  $\lambda$  de excitación 340nm y 395 nm de emisión; columna C18, 5  $\mu$ m, 4.6x250 mm. (Phenomenex Luna<sup>®</sup>); elución en gradiente con un flujo 2 mL/min.; fase móvil A: [0.1 M] formiato de amonio y fase móvil B: [0.1 M] formiato de amonio en 4% acetonitrilo, ambas a pH 6.0. El programa de análisis se muestra en la Tabla IV.

**Tabla IV.** Programa de análisis para la detección de toxinas paralizantes mediante oxidación pre-columna, y HPLC-FLD (Lawrence *et al.*, 2004).

Minutos	Fase A	Fase B
0-5	100-95%	0-5%
5-9	95-30%	5-70%
9-11	30-100%	70-0%
11-14	100%	0%



**Figura 8.** Detección de toxinas paralizantes mediante el método de Lawrence y colaboradores (2004). Las muestras se limpian (“cleanup”) con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) (a) para oxidarlas y detectar los productos fluorescentes mediante HPLC-FLD (b). Fotos: J. Pérez-Linares.

### 1.6.3 Extracción y análisis de neurotoxinas (NSP)

Para obtener los extractos de neurotoxinas (NSP) se siguió el protocolo propuesto por McNabb y colaboradores (2007). La biomasa de cada cosecha (ver Apartado 1.6.1.3 *Cultivo y cosecha de los dinoflagelados*) se homogenizaron y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción. Se pesaron 2.0 g (o su equivalente) del homogenizado en un tubo de centrifuga. Se adicionaron 9 mL de metanol [80%] y se mezclaron en un “vortex” por 30 segundos. Se calentó la muestra en una placa a  $60^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos y de inmediato se dejó enfriar en un baño de hielo por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a  $3,000 \times g$ , 10 minutos a  $5^{\circ}\text{C}$  y se transfirió el sobrenadante a un tubo de centrifuga limpio. El sedimento obtenido en la centrifugación se re-extrajo como se mencionó anteriormente. Se combinaron ambos sobrenadantes y se diluyeron en 20 mL de agua. Se transfirió una alícuota de 8 mL a un tubo limpio y se adicionaron 10 mL de hexano [89-90%, calidad HPLC). Se agitó vigorosamente y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones que se describieron. Se transfirieron 5 mL de la capa metanólica a un tubo limpio y se adicionaron 15 mL de agua, mezclando suavemente. Se preconditionó la columna de

extracción en fase sólida (SPE, 8B-S100-UBJ, Phenomenex<sup>®</sup>) con 3 mL de metanol absoluto y 3 mL de metanol [25%] para cargar la muestra en la columna dejándola eluir a un flujo  $\leq 0.2$  mL/min. Finalmente se lavó el tubo de centrifuga que contenía la muestra con 4.5 mL de metanol [25%] y el lavado se vierte también en la columna de SPE para deja drenar completamente (Fig. 9a). Se eluyeron los residuos con 4.5 mL de metanol en un tubo de ensayo y el eluato se diluyó con 5 mL de metanol [80%], se mezcló y se transfirió una alícuota a un vial de cromatografía para su análisis.

Para la determinación del perfil de brevetoxinas se utilizó cromatografía líquida con una bomba binaria (Agilent 1200<sup>®</sup>) acoplada a un espectrómetro de masas (Agilent 3500<sup>®</sup>) de un solo cuadrupolo. Las condiciones generales de los análisis se presentan en la Tabla V. Los estándares de brevetoxina [Calbiochem<sup>®</sup> PbTx-2 y PbTx-3] fueron donados por el Dr. Robert Dickey (University of North Carolina at Wilmington).

**Tabla V.** Condiciones generales para el análisis de brevetoxinas [PbTx] mediante LC-MS (McNabb *et al.*, 2007).

Columna	Phenomenex <sup>®</sup> Luna 3 $\mu$ m C18(2), 50x2mm
Volumen de inyección	10 $\mu$ L
Flujo	$\leq 0.2$ mL/min.
Tiempo de análisis	25 min.
Modo de ionización	ES +
Flujo	Gradiente
Fase móvil A	50% MeOH + 33mM amonio/500 mM Formiato
Fase móvil B	90% MeOH + 33mM amonio/500 mM Formiato

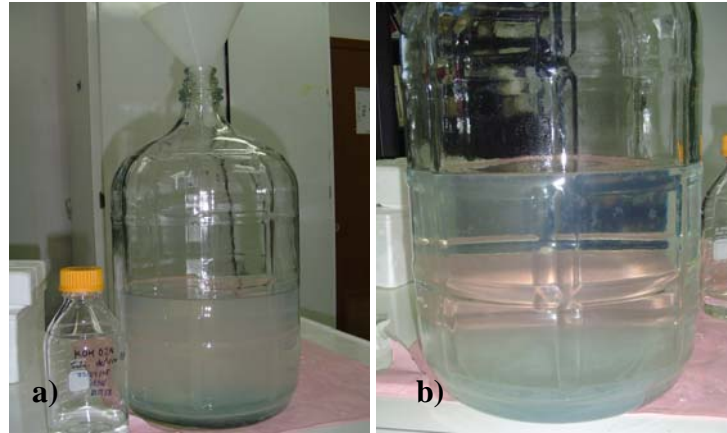


**Figura 9.** Detección de neurotoxinas mediante el método de McNabb y colaboradores (2007). Las muestras se limpian (“cleanup”) con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) **(a)** para posteriormente detectar las toxinas LC-MS **(b)**. Fotos: J. Pérez-Linares.

#### 1.6.4 Tratamiento de material y desechos

Para evitar resultados sesgados por contaminación, todos los materiales y equipo utilizados se tratan con HCl al 10% y posteriormente con agua desionizada. Las superficies de trabajo siempre se limpiaron antes de utilizarse con etanol al 70% para remover polvo, microorganismos y/o residuos extraños. Después de haber trabajado con material tóxico, tanto las superficies de trabajo, como el material y equipo se trataron con NaOH [0.2 N] por 10 minutos y posteriormente con agua desionizada para enjuagar/limpiar (Poli *et al.*, 1999).

Para evitar verter productos potencialmente tóxicos al ambiente, el material biológico de desecho y los sobrenadantes de las cosechas se trataron también. Primero con NaOCl [25%] por 15 minutos para destruir células vivas remanentes y después con NaOH [0.2 N] por 15 minutos para destruir posibles toxinas presentes (Wannemacher, 1989; Poli *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2002; Biegalski y Villareal, 2005; Cheng *et al.*, 2005).



**Figura 10.** Tratamiento de material, equipo, desechos biológicos y sobrenadantes de cosechas con NaOCl [25%] y NaOH [0.2 N]. Todo el material a tratar se almacena en un recipiente (a) y se trata por 30 minutos para destruir células vivas y toxinas (b). Fotos: J. Pérez-Linares.

### 1.6.5 Técnicas histológicas

Los tejidos de interés para análisis se procesaron utilizando técnicas de histología clásica, siguiendo los protocolos de Karnovsky (1965), Estrada *et al.*, 1982; Bell y Lightner (1988) y Lightner (1996). Los organismos se fijaron inmediatamente después de sacrificarse con solución de Davidson para inclusión en parafina o en solución de Karnovsky para inclusión en resina (ver Anexos III y IV para su preparación). Se les inyectaron de 300-1000  $\mu$ L del fijador en el dorso y ambos flancos del cefalotórax y posteriormente se sumergieron en el fijador por 48 h. Posteriormente las muestras se deshidrataron y se incluyeron en parafina o resina, según el caso (ver Anexos V y VI para los pasos de deshidratación). Finalmente se prepararon laminillas de los tejidos realizando cortes de 0.5-5  $\mu$ m con un microtomo (Leica<sup>®</sup> RM, modelo 2025) y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H-E) o tinción policrómica (Bell y Lightner, 1988; Tolvía *et al.*, 1994; Lightner, 1996) (ver Anexos VII y VIII para los pasos de tinción).



Las laminillas con cortes de tejidos de camarón se observaron mediante un microscopio óptico (Olympus® modelo BX41) equipado con una cámara digital (Media-Cybernetics® modelo Cool Snap-Pro Color) y el programa Image-Pro Plus® ver. 5.1 para examinar los tejidos, hacer micrografías digitales y realizar análisis estadísticos.

#### **1.6.6 Análisis estadísticos**

Para comparar los datos obtenidos de los ensayos se realizaron análisis de homocedasticidad (bondad de ajuste) usando la prueba de Kolmogorov-Smirnof y para conocer la homogeneidad se aplicó la prueba  $\chi^2$ . Una vez cubiertas estas premisas se utilizó la prueba *t*-Student. En todos los casos se usó una significancia estadística de ( $p < 0.05$ ).

Además de lo anterior, en algunos casos se realizaron análisis de variancia de una y dos vías (ANOVA) para comparar grupos de datos totales.

## **Capítulo II**

### **Perfil de toxinas de GCCV-6 y KBTX-3**

## **2.1 Objetivo general**

Determinar el perfil de toxinas paralizantes en la cepa GCCV-6 de *Gymnodinium catenatum* y de neurotoxinas en la cepa KBTX-3 de *Karenia brevis*.

### **2.1.1 Objetivos específicos**

1. Utilizar el método de Lawrence y colaboradores (2004) para conocer las toxinas paralizantes que produce GCCV-6.
2. Utilizar el método de McNabb y colaboradores (2007) para conocer las neurotoxinas que produce KBTX-3.

## **2.2. Material y métodos**

### **2.2.1 Procesamiento de muestras y análisis de ficotoxinas**

Los cultivos de dinoflagelados tóxicos se cosecharon bajo las condiciones que se mencionaron en el capítulo anterior (ver apartado 1.6.1.3 *Cultivo y cosecha de los dinoflagelados*). Para el análisis de toxinas paralizantes en la cepa GCCV-6 se utilizó el método de Lawrence y colaboradores (2004). Brevemente, la biomasa obtenida de las cosechas se limpió con un cartucho de separación en fase sólida (SPE-C18 y SPE-COOH, Bakerbond, JT Baker<sup>®</sup>), se oxidaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [10%] y HIO<sub>4</sub> [0.03M] para su análisis en HPLC-FLD (ver apartado 1.6.2 *Extracción y análisis de toxinas paralizantes*). Para el análisis de neurotoxinas (PbTx) en la cepa KBTX-3 se utilizó el método de McNabb y colaboradores (2007). Brevemente, la biomasa obtenida de las cosechas se limpió con cartuchos de reparación en fase sólida (SPE 8B-S100-UBJ, Phenomenex<sup>®</sup>) y se

extrajeron las toxinas con metanol [80%] y hexano [95%] para su análisis en LC-MS (ver apartado 1.6.3 *Extracción y análisis de neurotoxinas*)

## 2.3 Resultados y discusión

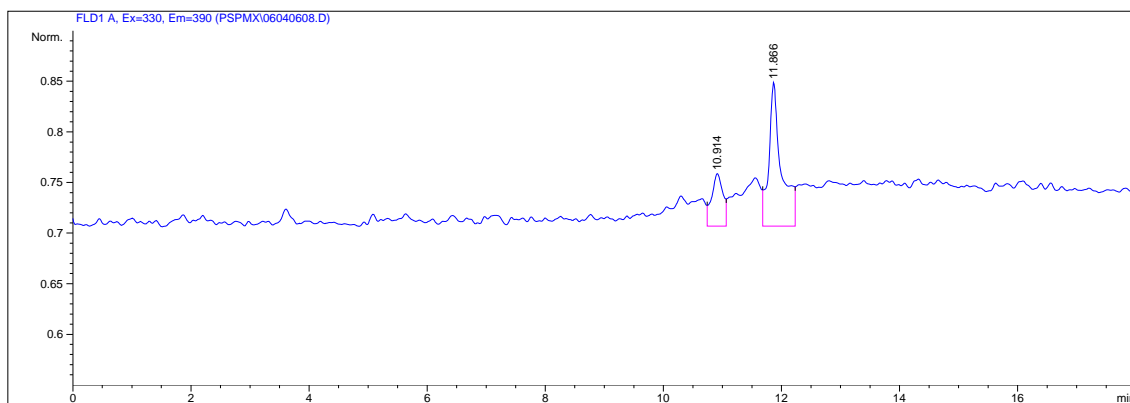
### 2.3.1 Perfil de toxinas

Utilizando el método de Lawrence y colaboradores (2004) se pudo corroborar que es viable para la identificación de toxinas paralizantes no solo en tejidos de moluscos, sino también de camarón y probablemente de otros crustáceos. El único inconveniente, quizás es la cantidad de sales en los tejidos de camarón que pueden reducir el tiempo de vida de la columna cromatográfica y alterar la línea base de las fases móviles en los análisis. Sin embargo para el segundo punto los patrones jugaron un papel muy importante ya que con ellos se pudieron contrastar los perfiles tóxicos que se obtuvieron en tejidos de camarón.

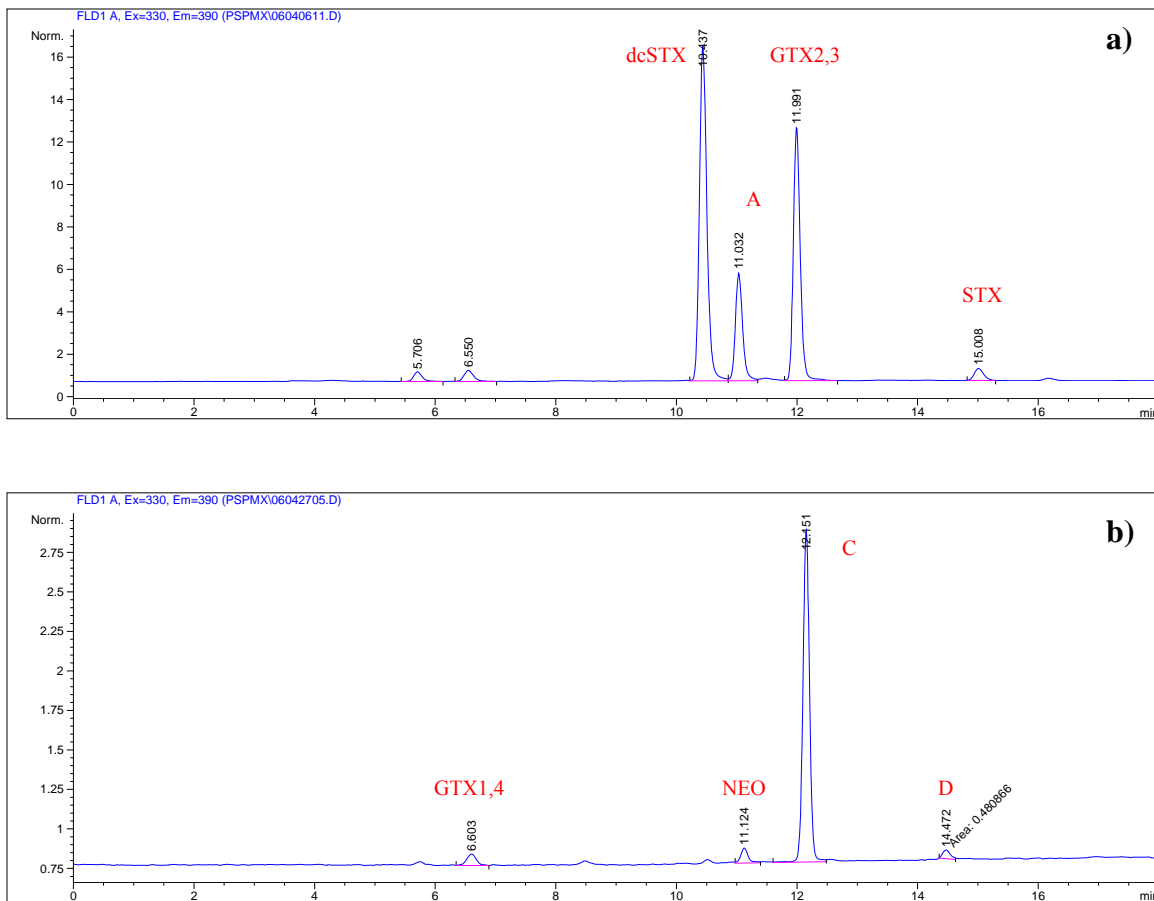
Las muestras de GCCV-6 presentaron compuestos con fluorescencia natural (Fig. 11), evidenciándose al inyectar las muestras sin derivatizar y antes de la limpieza con SPE. Por lo anterior, el paso del primer “cleanup” (SPE C18) fue definitivo para evitar la sobrestimación de los resultados (Gago-Martínez *et al.*, 2001b; Lawrence *et al.*, 2004). El segundo “cleanup” (SPE-COOH) es necesario solamente cuando se encuentran toxinas N-hidroxiladas en las muestras analizadas. Por otro lado se pudo corroborar la ausencia de toxinas paralizantes en las muestras control (cromatograma no incluido).

Se observó que el perfil de toxinas de la cepa GCCV-6 de *Gymnodinium catenatum* está conformado por saxitoxina y cuatro análogos de ella: dcSTX, GTX2,3, NEO y GTX1,4 (Fig. 12a y 12b). Estos resultados son parcialmente consistentes con los reportados previamente por Band-Schmidt *et al.* (2005 y 2006) y Gárate-Lizárraga *et al.* (2004b y

2005) ya que reportaron un perfil tóxico dominado por toxinas decarbamoil (dcSTX y dcGTX) en otras cepas de *G. catenatum* de la misma región que GCCV-6, igual que los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, estos autores también mencionan la presencia de toxinas sulfocarbamoil (B1, B2 y C2) que no se detectaron en GCCV-6 pero no reportan la presencia de STX ni de GTX1-4 para cepas de esta región (incluyendo GCCV-6) que si detectamos nosotros. Lo anterior puede deberse a que se analizaron cepas diferentes de *G. catenatum* y/o extractos de moluscos que pueden cambiar el perfil de toxinas (Hall *et al.*, 1990; Oikawa *et al.*, 2004a; Oikawa *et al.*, 2004b; FAO, 2004). También las diferencias en las condiciones utilizadas para el tratamiento de las muestras (extracción y “cleanup”) y para los análisis en HPLC-FLD pueden explicar estos contrastes. El método que se utilizaron en estos casos pudo causar la pérdida y/o enmascaramiento de la STX (Oshima, 1995; Hummert *et al.*, 1997). El método de Lawrence permitió identificar la saxitoxina dentro del perfil tóxico de GCCV-6.



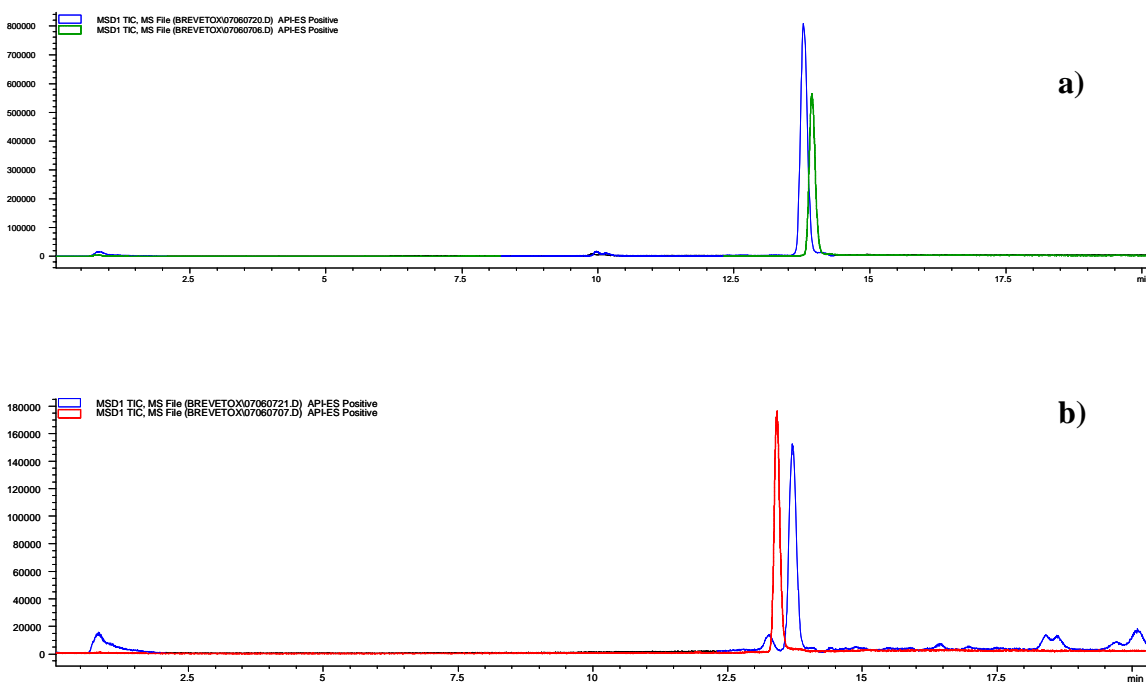
**Figura 11.** Cromatograma obtenido en el análisis de muestras de *Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-6) donde se corrobora la presencia de compuestos con fluorescencia natural. La muestra se inyectó sin derivatizar y previamente al paso de “cleanup”.



**Figura 12.** Cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras de *Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-6) con su perfil de toxinas. Se corrobora la presencia de toxinas paralizantes dcSTX, NEO, STX, GTX2,3 y GTX1,4. **a)** Oxidación:  $\text{H}_2\text{O}_2$  [10%]. **A**= producto de oxidación secundaria de dcSTX; **b)** Oxidación:  $\text{HIO}_4$  [0.03 M]. **C**= producto de oxidación secundaria de GTX1,4; **D**= producto de oxidación secundaria de NEO.

En el perfil de toxinas de la cepa KBTX-3 se detectaron como dominantes la brevetoxina 2 y 3 [PbTx-2 y PbTx-3], corroborándose con los estándares (Fig. 13). Estos resultados son consistentes con los análisis realizados previamente con cepas de la misma región (Villareal *et al.*, 2001; Magaña *et al.*, 2003; Magaña y Villareal., 2006; Cheng *et al.*, 2005) donde las brevetoxinas 2 y 3 son las predominantes en el perfil tóxico de *K. brevis*. Además, la muestra se concentró 10x y se realizó un análisis en modo “SCAN” para detectar otros iones relacionados con brevetoxinas ya que sólo se contaban con estándares de PbTx-2 y PbTx-3 y *K. brevis* es capaz de producir hasta 9 diferentes análogos de

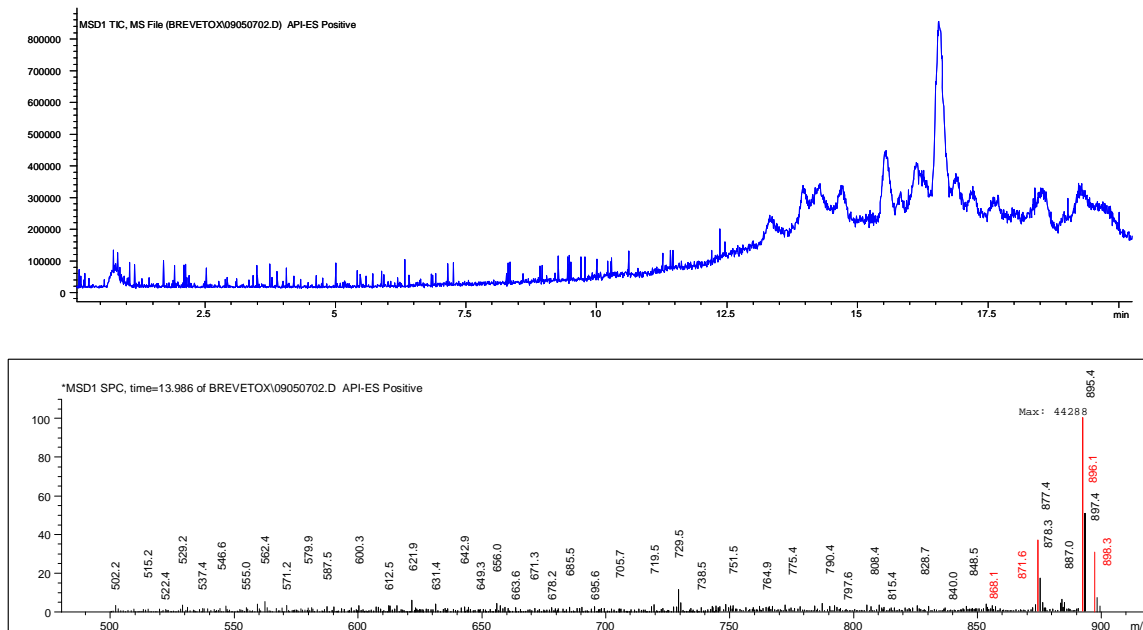
brevetoxina (Poli *et al.*, 1999; Baden *et al.*, 2005). Se pudo observar que la muestra presenta también iones con 868 y 872 m/z correspondientes a las brevetoxinas 1 y 10, respectivamente [PbTx-1 y PbTx-10]. Debido a que no se contaba con estándares de PbTx-1 y 10, se realizaron extracciones de los iones derivados por las pérdidas de agua y aductos formados por PbTx-2 y PbTx-3 con  $\text{NH}_4$  y MeOH (fases móviles), corroborando la presencia de ambas toxinas en la muestra de KBTX-3 (Fig. 14).



**Figura 13.** Cromatogramas obtenidos en el análisis modo SIM de muestras de *Karenia brevis* (cepa KBTX-3) con su perfil de toxinas. Se corrobora la presencia de neurotoxinas PbTx-2 y PbTx-3. En ambos cromatogramas: línea azul= extracto de KBTX-3; (a) línea verde= estándar PbTx-2 [SIM: 896 m/z]; (b) línea roja= estándar PbTx-3 [SIM: 898 m/z].

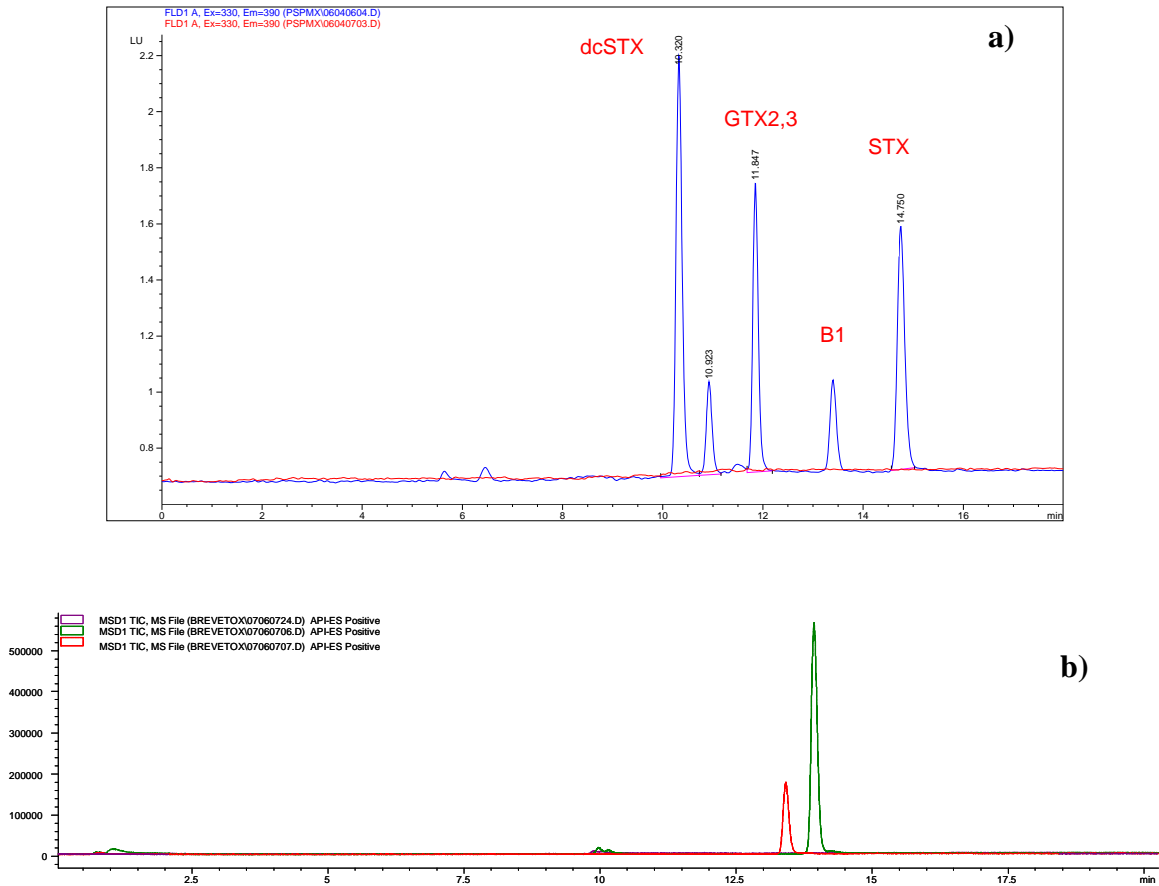
Finalmente se hicieron análisis de los medios donde se cultivaron los dinoflagelados y que se utilizaron como control en los ensayos, para corroborar la ausencia de ficotoxinas y/o derivados de ellas que puedan sesgar los resultados. La Figura 15a muestra uno de los cromatogramas realizados en el medio f/2+Se utilizando HPLC-FLD (Lawrence *et al.*,

2004). La Figura 15b muestra el espectro analizado del medio GSe mediante LC-MS (McNabb *et al.*, 2007).



**Figura 14.** Espectro obtenido en el análisis modo SCAN de muestras concentradas 10x de *Karenia brevis* (cepa KBTX-3) con su perfil cromatográfico de toxinas. Se corrobora también la presencia de PbTx-1 y PbTx-10. [SCAN: 500-900 m/z). Arriba: línea azul= extracto de KBTX-3; Abajo: líneas rojas= iones correspondientes a PbTx-2 [896 m/z], PbTx-3 [898 m/z], PbTx-1 [868 m/z] y PbTx-10 [872 m/z].





**Figura 15.** Extractos de los medio f/2+Se y GSe [controles] analizados con HPLC-FLD y LC-MS respectivamente, para corroborar la ausencia de ficotoxinas. **a)** La línea azul es la mezcla de estándares de toxinas paralizantes (Mix II: dcSTX, GTX2,3, B1 y STX) y la línea roja es el extracto de medio f/2+Se; **b)** Los picos observados pertenecen a los estándares de brevetoxina 2 y 3 (línea verde PbTx-2 y línea roja PbTx-3) y la línea púrpura es el extracto de medio GSe.

## 2.4 Conclusiones

1. Se pudieron caracterizar los perfiles de toxinas de ambas cepas (GCCV-6 y KBTX-3) mediante técnicas analíticas validadas internacionalmente (Lawrence *et al.*, 2004; McNabb *et al.*, 2007). Ambas cepas producen toxinas peligrosas que pueden poner en riesgo la salud pública y el ambiente.
2. La cepa GCCV-6 presenta un perfil dominado por la dcSTX y GTX2,3. Sin embargo, también se detectaron GTX-1,4, NEO y STX, estas dos últimas de las toxinas paralizantes más potentes (Schantz, 1986; Shimizu *et al.*, 1989; FAO, 2004).

3. La cepa KBTX-3 presenta un perfil dominado por la PbTx-2 y PbTx-3, aunque también se pudo corroborar la presencia de PbTx-1 y PbTx-10 por medio de los espectros de masa de sus iones. La PbTx-2 y PbTx-3 son los dos análogos mas importantes, conspicuos y peligrosos en *Karenia brevis* (Poli *et al.*, 1999; Villareal *et al.*, 2001; Baden *et al.*, 2005; Magaña y Villareal, 2006).
4. Los análisis que se realizaron a los medios de cultivo (f/2+Se y GSe) fueron negativos para neurotoxinas y toxinas paralizantes.

### **Capítulo III**

#### **Bioensayo agudo por ingestión**

### 3.1 Objetivo general

Conocer el efecto de la exposición aguda a células de dinoflagelados tóxicos (*G. catenatum* y *K. brevis*) en el camarón patiblanco (*L. vannamei*).

#### 3.1.1 Objetivos específicos

1. Corroborar la ingestión de células de dinoflagelados tóxicos (*G. catenatum* y *K. brevis*) por los camarones (*L. vannamei*).
2. Conocer las dosis letales y subletales para los camarones expuestos a distintas densidades celulares de los dinoflagelados tóxicos.
3. Detectar la posible retención de ficotoxinas (PSP y NSP) en tejidos diana de los camarones expuestos a los dinoflagelados tóxicos.
4. Evidenciar posibles daños en los tejidos de los camarones debido a la exposición con los dinoflagelados tóxicos.

### 3.2. Material y métodos

#### 3.2.1 Diseño del bioensayo

Se utilizaron postlarvas (PL<sub>40</sub>) de *Litopenaeus vannamei* con un peso promedio de 1.2±0.1 g. Se organizaron en acuarios de plástico (2 L) utilizando solo <sup>3</sup>/<sub>4</sub> de su capacidad y una densidad de ~4 PL/L. Los organismos se mantuvieron en ayuno hasta la realización del ensayo. Los acuarios contaban con un sistema de aireación mediante bombas (Máxima<sup>®</sup>, 2500 cc/L) y difusores, y los organismos se mantuvieron a una temperatura de 25 ± 2°C (clima artificial automatizado), en agua de mar filtrada a 35 UPS y con una dieta a base de alimento comercial (800 µm, PIASA<sup>®</sup> 50% proteína).

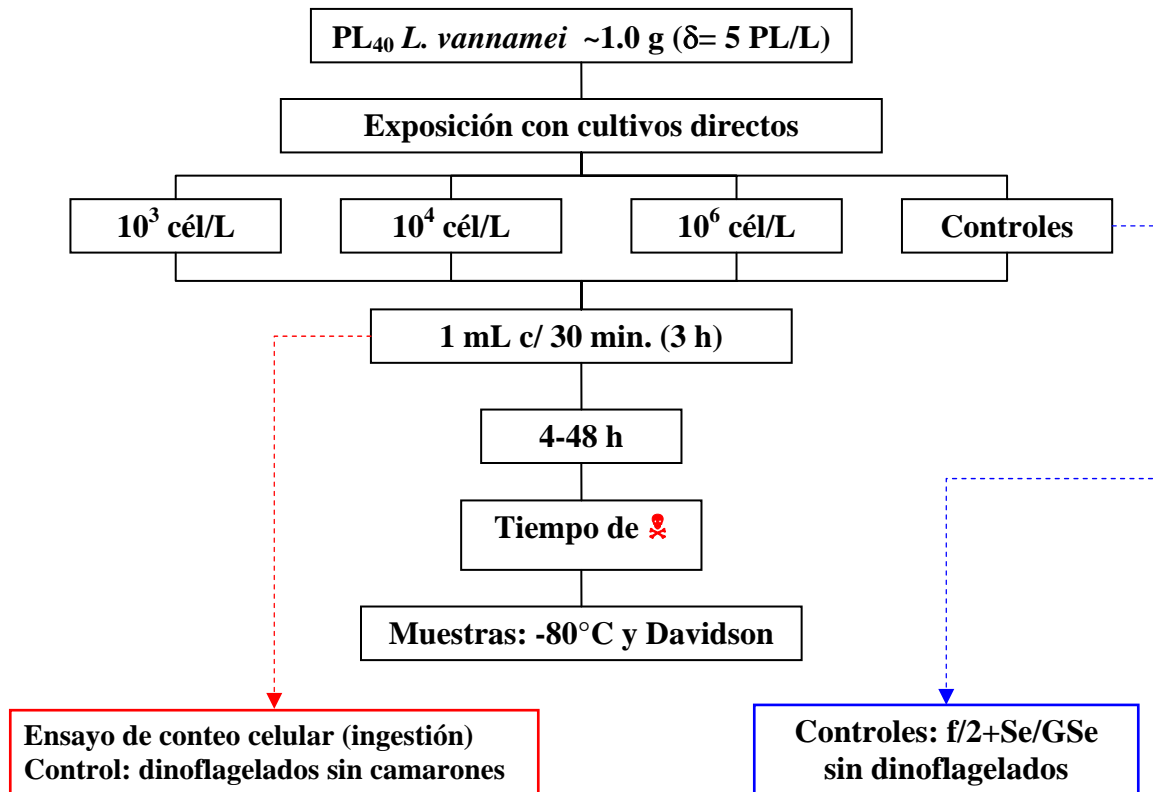
Al iniciar el experimento se alimentaron los camarones y se les proporcionaron de inmediato los cultivos de los dinoflagelados (GCCV-6 y KBTX-3) a diferentes densidades celulares para tener una exposición directa. Como se considera una marea roja al crecimiento excesivo de microalgas en densidades que van desde  $10^4$  hasta  $10^6$  cél/L (Roberts *et al.*, 1979; Hwang *et al.*, 1990; Alonso Rodríguez *et al.*, 2004a; Alonso Rodríguez *et al.*, 2004b) y debido a que el objetivo del ensayo es determinar dosis subletales, se utilizaron las siguientes densidades celulares:  $10^3$  cél/L,  $10^4$  cél/L y  $10^6$  cél/L. Además se manejaron lotes control, proporcionándoles a los camarones el mismo volumen adicionado a los grupos con la densidad mas alta ( $10^6$  cél/L) pero solo de medios de cultivo sin dinoflagelados (f/2+Se en el caso de GCCV-6 y medio GSe en el caso de KBTX-3). Con los controles se intentó descartar que sus componentes de los medios pudieran interferir en los resultados. Cada Grupo se hizo por triplicado y con una sola dosis de dinoflagelados.

Se hicieron observaciones de supervivencia, comportamiento y daños aparentes por 48 horas. Al término del ensayo los organismos se procesaron para sus análisis histológicos y químicos. La Figura 16 muestra el diagrama de flujo del ensayo.

### **3.2.2 Bioensayo de ingestión**

Para poder inferir que los camarones ingerían las células de ambos dinoflagelados, durante el ensayo agudo se realizaron conteos celulares periódicos. Se tomó 1 mL de agua de cada uno de los acuarios con las densidades celulares más altas ( $10^6$  cél/L) cada 30 minutos durante 3 horas. Además se mantuvo un grupo control (por triplicado) para cada experimento (con GCCV-6 y con KBTX-3) bajo las mismas condiciones que los

anteriores ( $10^6$  cél/L) pero sin camarones (supervivencia de células sin depredador), tomando también alícuotas para el conteo celular.



**Figura 16.** Diagrama de flujo del diseño experimental del bioensayo agudo por exposición de *Litopenaeus vannamei* a diferentes densidades celulares de *G. catenatum* (cepa GCCV-6) y *K. brevis* (cepa KBTX-3).

A las alícuotas de cada muestreo de células se les agregó una gota de solución de Lugol ( $I_2$ , 5% y KI 10%) y posteriormente se hicieron diluciones 1:10 para realizar los conteos en una cámara de Sedwick-Rafter. Con este ensayo se intentó comprobar la hipótesis de que el daño registrado en los organismos por la exposición a los cultivos es por contacto y/o ingestión del dinoflagelado.

### **3.2.3 Procesamiento de muestras**

Las muestras obtenidas de los camarones sacrificados en este ensayo se procesaron de dos formas distintas, dependiendo de los análisis posteriores a los que se sometieron.

De cada lote (con sus triplicados) se tomaron 5 organismos y se fijaron inmediatamente para su procesamiento histológico (ver Anexos III-VI). Por otro lado, 10 organismos de cada lote fueron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento para los análisis químicos. Para esto último, los ejemplares se disecaron para extraer el corazón, la glándula gástrica (hepatopáncreas), parte del tejido nervioso (glándula supraesofagal) y se tomó el músculo del primer segmento abdominal. Finalmente se hicieron grupos organizados por tejido/órgano y lote del experimento. Cabe mencionar que en algunos casos no fue posible extraer el tejido debido al tamaño de los organismos.

Los tejidos se maceraron con un homogenizador Potter-Elvehjem de 10 mL. Para los volúmenes pequeños de algunos órganos y tejidos de camarón, se utilizó un “politrón” (Kinematica<sup>®</sup> modelo PT1300D) para optimizar el rendimiento. Una vez que se obtuvieron las biomasas homogenizadas de los tejidos, se procedió a la extracción de las toxinas y su análisis (ver apartados *1.6.2 Extracción y análisis de toxinas paralizantes* y *1.6.3 Extracción y análisis de neurotoxinas*)

### **3.2.4 Análisis de ficotoxinas**

Todos los tejidos/órganos que se obtuvieron de los experimentos, así como alícuotas de los cultivos de los dinoflagelados utilizados fueron procesados para el análisis y detección de ficotoxinas.

Para la detección de toxinas paralizantes se siguió el protocolo propuesto por Lawrence y colaboradores (2004) mediante una extracción ácida (HCl 0.1N), oxidación pre-columna, separación con HPLC y detección por fluorescencia (ver apartado *1.6.2 Extracción y análisis de toxinas paralizantes*).

Para la detección de neurotoxinas se utilizó el protocolo de McNabb y colaboradores (2007) realizando extracciones con metanol [80%], separación con cromatografía líquida y detección mediante un espectrómetro de masas (ver apartado *1.6.3 Extracción y análisis de neurotoxinas*)

### **3.2.5 Análisis Histológicos**

Las muestras de tejidos fijadas se procesaron para su análisis histológico (ver apartados III-VI). Una vez obtenidas las laminillas, se realizaron observaciones en un microscopio óptico y se obtuvieron micrografías representativas de cada tejido/órgano a diferentes aumentos (4x, 10x, 20x, 40x y 100x).

Se realizaron comparaciones de los tejidos de camarones expuestos a los dinoflagelados con los controles y se contrastaron con tejidos normales utilizando el manual de histología publicado por Bell y Lightner en 1988 (ver apartado *1.6.5 Técnicas histológicas*). Mediante el uso del programa Image-Pro Plus<sup>®</sup> se obtuvieron datos cuantitativos de las diferencias en algunos tejidos a los cuales se les realizaron pruebas estadísticas (ver apartado *1.6.6 Análisis estadísticos*).



### 3.3 Resultados y discusión

#### 3.3.1 Dosis letales y subletales

Se observó que la supervivencia registrada las primeras 5 h fue del 100% en todos los lotes, pero a las 5 h con 20 minutos los organismos expuestos a GCCV-6 con la densidad celular más alta ( $10^6$  cél/L) comenzaron a presentar síntomas de intoxicación paralizante perdiendo movimiento en sus apéndices y postrándose en el fondo del acuario para finalmente morir. A las 6 h en promedio el 100% de los organismos de ese grupo (incluyendo sus triplicados) habían muerto. Más adelante, a las 17 horas en promedio todos los organismos del lote expuesto a GCCV-6 ( $10^4$  cél/L) también habían muerto (Tabla VI). Los camarones expuestos a esas mismas densidades celulares ( $10^4$  y  $10^6$  cél/L) pero de la cepa KBTX-3 tuvieron una supervivencia mayor, registrándose el tiempo de muerte promedio a las 32 y 27 h, respectivamente. Esta diferencia en el tiempo de muerte entre ambos experimentos quizás se puede explicar por la naturaleza misma de ambas toxinas, ya que las toxinas de GCCV-6 (STX y análogos) son hidrosolubles (Schantz, 1986; Shimizu *et al.*, 1989) y por lo tanto pueden asimilarse rápidamente (Hwang *et al.*, 1990; Oikawa *et al.*, 2002 y 2004a) mientras que las toxinas de KBTX-3 (PbTx y análogos) son liposolubles (Poli *et al.*, 1999; Baden *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2005), por lo cual su asimilación es más lenta (Roberts *et al.*, 1979; Pierce y Henry, 1996; Poli *et al.*, 1999).

En ambos casos los organismos expuestos a las densidades celulares más bajas ( $10^3$  cél/L) así como los controles, tuvieron una supervivencia de >48 h, por lo que esta densidad celular fue considerada como **dosis subletal** para futuros experimentos. Estos resultados son consistentes con los que anteriormente reportó Alonso-Rodríguez y

colaboradores (2004a y 2004b) con densidades similares ( $10^3$ - $10^6$  cél/L) pero en estadios larvarios del camarón.

Todos los individuos muertos se observaron en el estereoscopio y no se evidenciaron daños externos. Los organismos que sobrevivieron >48 h se sacrificaron posteriormente y se analizaron sin encontrar daños externos y su comportamiento a lo largo del experimento no presentó cambios.

Cabe mencionar que además en los acuarios con organismos expuestos a los dinoflagelados (incluyendo aquellos a  $10^3$  cél/L) se encontró alimento sobrante y pocas heces, mientras que en los acuarios control ocurrió lo contrario, se colectó poco alimento y la cantidad de heces fue mayor. Lo anterior sugiere diferencias en la conducta alimenticia de los organismos expuestos a dinoflagelados tóxicos, ya sea por la parálisis o aletargamiento que les producen las toxinas, o bien por los daños que les pueden producir en sus órganos gástricos tal como lo han reportado anteriormente algunos investigadores (Foxall *et al.*, 1979; Roberts *et al.*, 1979 Hwang *et al.*, 1990). La Tabla VI resume los resultados obtenidos en los ensayos agudos en camarón por ingestión de células de dinoflagelados tóxicos.

**Tabla VI.** Tiempos de muerte promedio del ensayo agudo de *L. vannamei* expuesto a diferentes densidades celulares de *G. catenatum* y *K. brevis*.

<b>Dosis</b>	<b>GCCV-6</b>	<b>KBTX-3</b>
$10^3$ cél/L	>48 h	> 48 h
$10^4$ cél/L	17 h	32 h
$10^6$ cél/L	6 h	27 h
Controles	>48 h	> 48 h

### 3.3.2 Ingestión de células

Mediante estos ensayos se pudo estimar la ingestión de células de los dinoflagelados tóxicos por los camarones. Los conteos celulares de los acuarios con las densidades

mayores ( $10^6$  cél/L de GCCV-6 y KBTX-3), así como el de los controles (dinoflagelados sin depredador; ver apartado 2.2.2 Bioensayo de ingestión) se calcularon como porcentajes obteniendo promedios de cada uno. El porcentaje de mortalidad natural observada en los acuarios sin depredador (*i.e.* diferencia del porcentaje de células cuantificado) se restó a la diferencia de células cuantificadas (*i.e.* células faltantes) en los acuarios con camarones y el resultado se consideró como las células que los organismos ingirieron (Fig. 17). Es importante aclarar que en cada muestreo se consideró como el 100% el conteo de células previo. Con estos datos se pudo observar que durante los primeros 90 minutos en ambos experimentos se encontraron 80 y 50% de células resuspendidas en los acuarios sin depredador (*G. catenatum*, y *K. brevis*, respectivamente), es decir, hubo una mortalidad de entre el 20 y 50%. Sin embargo, en los acuarios con camarones se encontraron porcentajes menores (30 y 28 %; Fig. 17). El porcentaje faltante en estos acuarios se puede explicar por la ingestión de células por los camarones.

Después de transcurridos 120 minutos la densidad celular baja en ambos controles sin depredador, lo que sugiere una mortandad por cambio de las condiciones del medio (de frascos de cultivo a acuarios). Por consiguiente, la ingestión de células por los camarones también desciende a partir de las 2 h de los experimentos al haber menor cantidad de células suspendidas. Sin embargo, se corroboró que en los primeros 90 minutos los organismos ingieren más del 45% de las células de ambos dinoflagelados y este dato fue utilizado más adelante en el ensayo crónico por ingestión (ver Capítulo III).

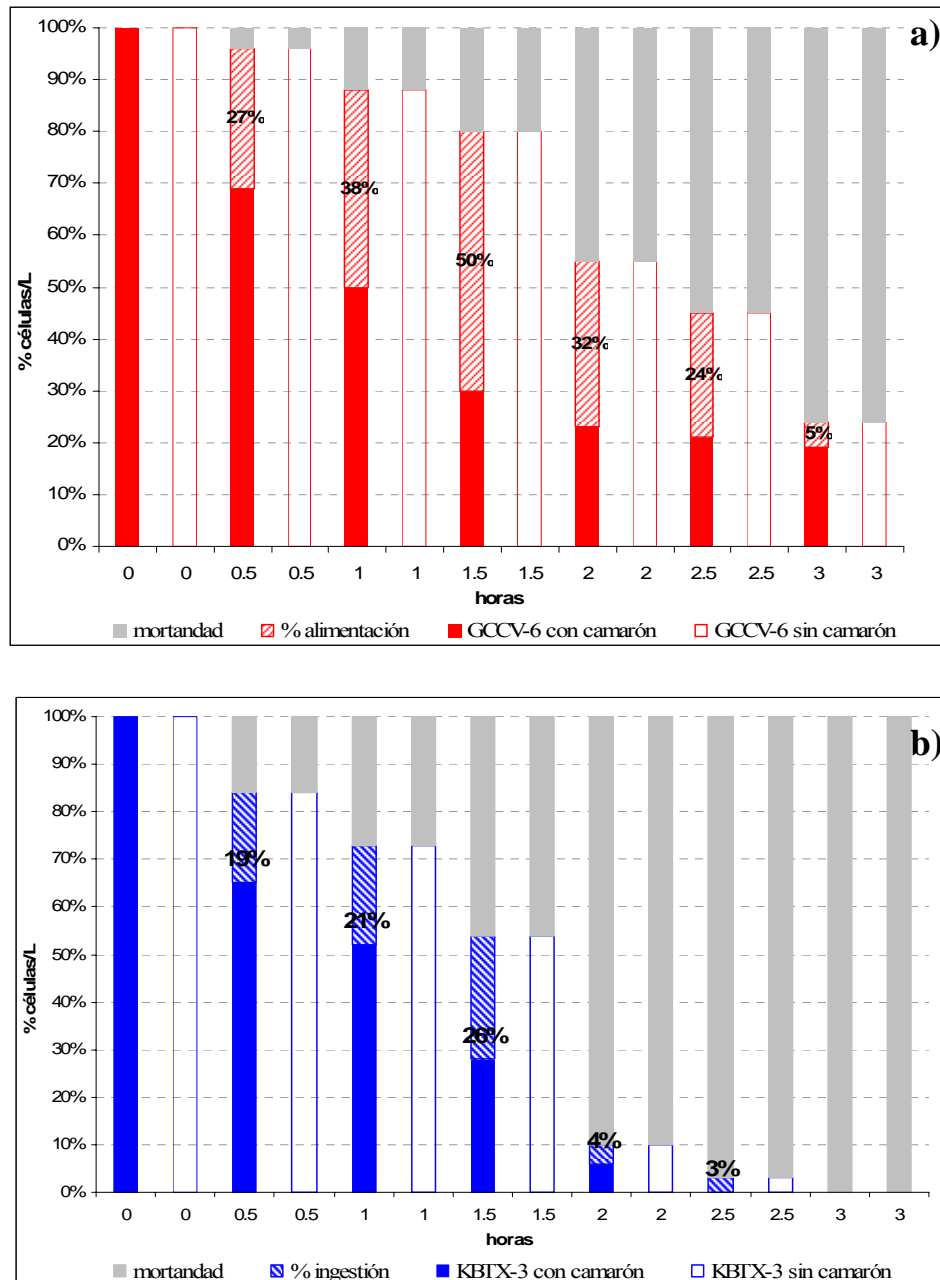
La dieta de los camarones en el estadio de vida postlarval ya no depende en su totalidad de microalgas. Sin embargo, por su condición de omnívoro las consumen durante toda su

vida y forma parte importante de su dieta para la obtención de pigmentos y ácidos grasos (Villalón, 1991; Anderetta y Alfonso, 1997; Jory, 2001; Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004b). Con este experimento se pudo inferir que los organismos no solo tuvieron contacto externo con el cultivo de los dinoflagelados, si no que además ingirieron las células y tuvieron contacto interno.

### **3.3.3 Comportamiento**

El comportamiento de los organismos control así como los organismos con las densidades celulares más bajas ( $10^3$  cél/L de GCCV-6 y KBTX-3) se alimentaron de manera normal inmediatamente después de proporcionarles el granulado comercial, mientras que los individuos que estuvieron expuestos a densidades de  $10^4$  y  $10^6$  cél/L presentaron un comportamiento anormal, con nado desequilibrado, letargo y convulsiones. El primer síntoma que se observó fue la parálisis parcial de los pereiópodos (patas caminadoras) en ambos experimentos. Además se pudo evidenciar que no todos los organismos se estaban alimentando.

Los camarones presentaron espasmos, desorientación e incluso arritmia del corazón y en las estructuras branquiales. Cabe mencionar que se hicieron filmaciones de esta conducta (las cuales no se pueden incluir en este trabajo). Estos resultados coinciden con lo que reportaron Foxall y colaboradores (1979) en ensayos realizados en cangrejos (*Cancer irroratus*) y toxinas paralizantes de *Gonyaulax tamarensis*. Observaron que los organismos presentaban aletargamiento, pérdida de movimiento y del reflejo de las tenazas. No presentaron respuesta al estímulo táctil de antenas y pedúnculo ocular, cesó la ventilación de sus branquias y disminuyó el movimiento del corazón.



**Figura 17.** Porcentajes promedio de células de dinoflagelados en acuarios del ensayo agudo donde se infiere su ingestión por *L. vannamei*. **a)** GCCV-6 y **b)** KBTX-3. Barras sólidas: acuarios con camarones; barras blancas: acuarios sin camarones (controles); barras grises: mortandad natural de células y barras con líneas transversales: % de células ingeridas (restada la mortalidad natural).

Por otro lado, Hwang y colaboradores (1990) describieron que los crustáceos y peces que examinaron presentaron nado vigoroso los primeros minutos y después pérdida de

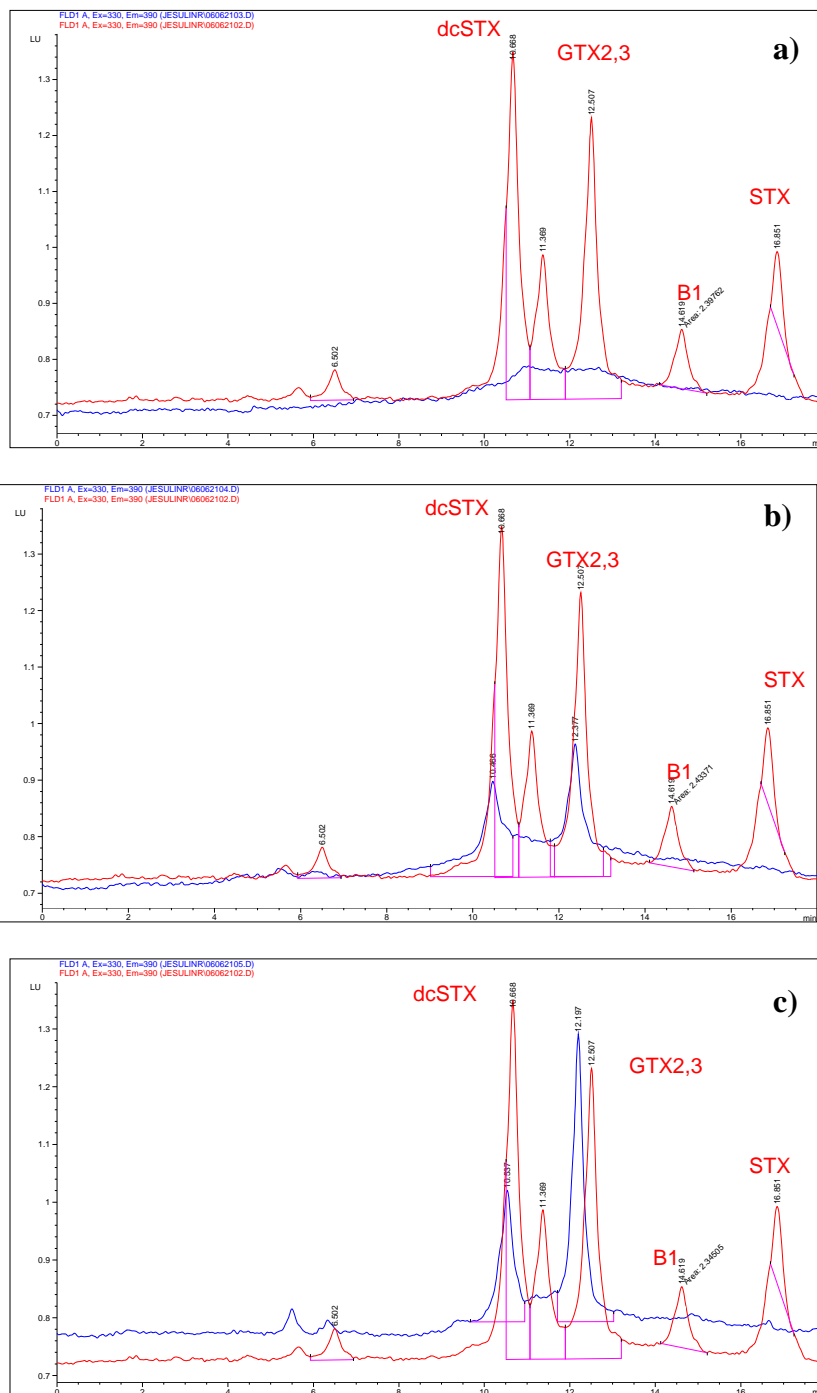
equilibrio, parálisis, convulsiones con nado anormal, después de haber suministrado de manera oral, intraperitoneal e intramuscular, distintas dosis de saxitoxina y tetrodotoxina. Ambos grupos de investigadores concluyeron que las toxinas paralizantes en ocasiones no son letales para los crustáceos, pero es muy probable que puedan acumularlas en tejidos (hepatopáncreas y músculo) y actuar como vectores en la cadena trófica magnificando el riesgo para la salud pública.

### **3.3.4 Análisis de ficotoxinas**

En las muestras del ensayo agudo con *G. catenatum* se detectaron 4 diferentes toxinas paralizantes (dcSTX, NEO, GTX2,3 y GTX1,4) en los tres tejidos analizados (hepatopáncreas, músculo y protocerebro) de los organismos expuestos a las densidades altas ( $10^4$  cél/mL y  $10^6$  cél/mL). En la Figura 18 se presentan tres cromatogramas del análisis de hepatopáncreas de camarón expuesto a diferentes densidades de GCCV-6.

El hepatopáncreas de los camarones retuvo 4 toxinas paralizantes en las exposiciones  $>10^4$  cél/L, mientras que en el músculo y parte del sistema nervioso (ganglio supraesofagal) se detectaron menos toxinas en densidades de  $10^4$  cél/L pero con densidades mas altas ( $10^6$  cél/L) los órganos pudieron acumular más toxinas (Tabla VIII). Estos resultados nos proporcionan indicios de que durante una “marea roja” de *G. catenatum*, con una densidad celular de  $10^4$  cél/L, los crustáceos expuestos son capaces de acumular toxinas paralizantes en estos tejidos (Foxall *et al.*, 1979; Oikawa *et al.*, 2002; Oikawa *et al.*, 2004a; Oikawa *et al.*, 2004b) y si la densidad es  $>10^4$  cél/L la cantidad de toxinas en los tejidos se incrementa.

En la Tabla VIII se resumen los datos obtenidos para la detección de toxinas paralizantes en tejidos de camarón en el ensayo agudo.



**Figura 18.** Cromatogramas del análisis de toxinas paralizantes en hepatopáncreas de camarón durante el ensayo agudo por ingestión. **a)**  $10^3$  cél/mL; **b)**  $10^4$  cél/mL; **c)**  $10^6$  cél/mL. Se corrobora la presencia de toxinas paralizantes dcSTX y GTX2, 3 (flechas) en los organismos expuestos a las densidades mas altas. **Línea azul:** hepatopáncreas de camarón **Línea roja** mezcla de patrones (Mix II: dcSTX, GTX2,3, B1 y SXT). Oxidación:  $H_2O_2$  [10%].

**Tabla VII.** Toxinas paralizantes detectadas en tejidos de *L. vannamei* durante el ensayo agudo por ingestión.

Tejido	10 <sup>3</sup> cél/L	10 <sup>4</sup> cél/L	10 <sup>6</sup> cél/L	Control
Hepatopáncreas	N.D	dcSTX, GTX2,3 NEO, GTX1,4	dcSTX, GTX2,3, NEO, GTX1,4	N.D.
Músculo	N.D	GTX2,3 PO-GTX1,4	dcSTX, GTX2,3, NEO, GTX1,4	N.D.
Protocerebro	N.D.	PO-GTX1,4	dcSTX, GTX2,3 PO-GTX1,4	N.D.

**PO-GTX1,4**= producto de oxidación secundaria de GTX1,4. **ND**= No se detectaron toxinas paralizantes.

En el ensayo agudo con KBTX-3 no se detectaron toxinas en los tejidos analizados. En estudios realizados previamente se ha reportado que las brevetoxinas necesitan más tiempo para poder acumularse en los tejidos de los organismos por su naturaleza liposoluble (Walter *et al.*, 2004; Baden *et al.*, 2005; Flewelling *et al.*, 2005) y este experimento se realizó en 48 h. Sin embargo, la exposición aguda a *K. brevis* resultan más dañina si está relacionada a los aerosoles que se forman, sobre todo para los mamíferos y aves (Pierce y Henry, 1996; Poli *et al.*, 1999; Biegalski y Villareal, 2005). Se ha reportado que durante una marea roja de *K. brevis*, la brevetoxina puede acumularse paulatinamente en pastos marinos, tejidos de organismos filtradores y otros invertebrados (incluyendo a los crustáceos), causando la intoxicación y muerte de peces, mamíferos y animales que los consumen incluyendo al humano. No obstante esto se ha reportado con mareas rojas con duración de varios meses y con densidades celulares >10<sup>6</sup> cél/L (Pierce y Henry, 1996; Walter *et al.*, 2004; Flewelling *et al.*, 2005).

Este fenómeno de acumulación de ficotoxinas en crustáceos ya se ha reportado previamente, donde los investigadores coinciden en que los tejidos con mayor capacidad de retener las toxinas paralíticas son el hepatopáncreas y el músculo (Foxall *et al.*, 1979; Hwang *et al.*, 1990; Llewellyn, 1997; Oikawa *et al.*, 2002). Es importante hacer hincapié en que muchos crustáceos no mueren al consumir densidades grandes de dinoflagelados



productores de toxinas paralizantes o neurotoxinas, pero tienen la capacidad de acumularla en sus tejidos así que se convierten en vectores potenciales, pudiendo biomagnificarla a través de la cadena trófica y causar intoxicaciones secundarias (Foxall *et al.*, 1979; Roberts *et al.*, 1979; Hwang *et al.*, 1990; Oikawa *et al.*, 2002).

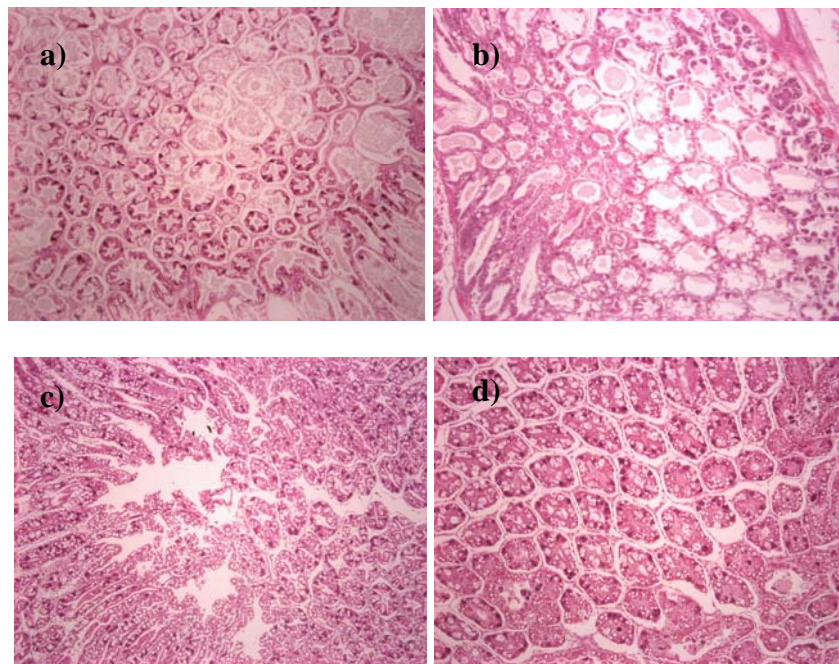
### **3.3.5 Daños en tejidos**

#### **3.3.5.1 Hepatopáncreas**

Se observó que la glándula digestiva en casi todas las laminillas (incluyendo los controles) presentaba evidencia de autólisis en la parte interna del órgano. Lo anterior se debe a que la solución Davidson penetra lentamente y no fija las células antes de que se lleve a cabo la actividad enzimática (Bell y Lightner, 1988) y aunque se hicieron las inyecciones en el dorso y los flancos del cefalotórax como se recomienda para maximizar la fijación (Bell y Lightner, 1988; Alday y Flegel, 1999) la degradación de parte de los tejidos se presentó.

En la Figura 19 se muestran regiones periféricas y centrales de la glándula digestiva de algunos organismos. Los cortes transversales evidencian algunas diferencias entre la organización celular del control con respecto a los expuestos a los dinoflagelados. Principalmente se puede destacar la disgregación de los tejidos del hepatopáncreas de camarones expuestos a la densidad más alta (Fig. 19c). Este daño probablemente se debe a problemas digestivos y se descarta que la disgregación celular sea por la técnica (corte, calentamiento o fijación) debido a que las células y túbulos que rodean ésta desorganización celular se encuentran conservados. En algunas regiones de los cortes se aprecian células autolisadas y se evidencian por la destrucción completa del túbulo y del

tejido conectivo que lo rodea (Fig. 19a y b). La micrografía del hepatopáncreas del camarón control (Fig. 18d) presenta una organización normal de los túbulos pudiéndose apreciar principalmente células B (o secretoras) en la periferia de los túbulos con su superficie luminal convexa y células R (o de reserva) características por su numerosas vacuolas (Bell y Lightner, 1988). Estos daños en la glándula gástrica de los camarones causados por la ingestión de los dinoflagelados tóxicos es importante ya que es un órgano imprescindible para la digestión de los organismos. Estos resultados fortalecen las hipótesis de reportes previos donde se han reportado debilidad, susceptibilidad a enfermedades, pérdida de peso e incluso muerte de camarones cultivados en diferentes estadios de vida cuando han estado expuestos a proliferaciones de *G. catenatum* (Cortés-Altamirano *et al.*, 1997; Karunasagar *et al.*, 1997; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004a).



**Figura 19.** Cortes transversales de la glándula gástrica de *L. vannamei* expuesto a diferentes densidades celulares de GCCV-6. **a)**  $10^3$  cél/L; **b)**  $10^4$  cél/L; **c)**  $10^6$  cél/L; **d)** control negativo (medio f/2+Se). Tinción H-E [10x].

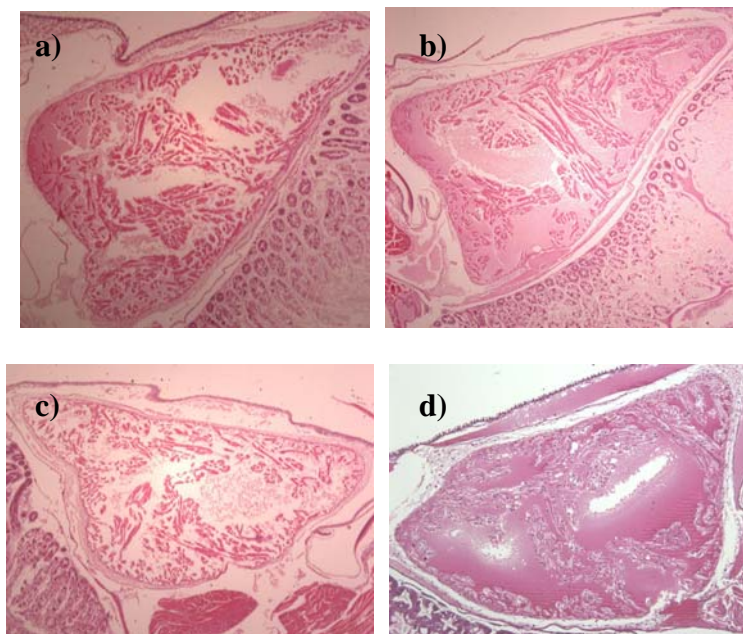
### 3.3.5.2 Corazón

Con respecto al corazón, la diferencia más importante que se observó entre los controles y los organismos expuestos fue la densidad de fibras formadas por células del miocardio. Se observó mayor densidad de fibras en el corazón de los organismos control (Fig. 20d), así como el de los expuestos a la densidad celular de dinoflagelado más baja. Aparentemente los organismos expuestos a las densidades de  $10^4$  y  $10^6$  cél/L experimentaron necrosis fibrilar. Se ha reportado que en tejidos cardiacos, después de un infarto el corazón puede presentar necrosis celular y como consecuencia pérdida de densidad fibrilar (Lesson *et al.*, 1990).

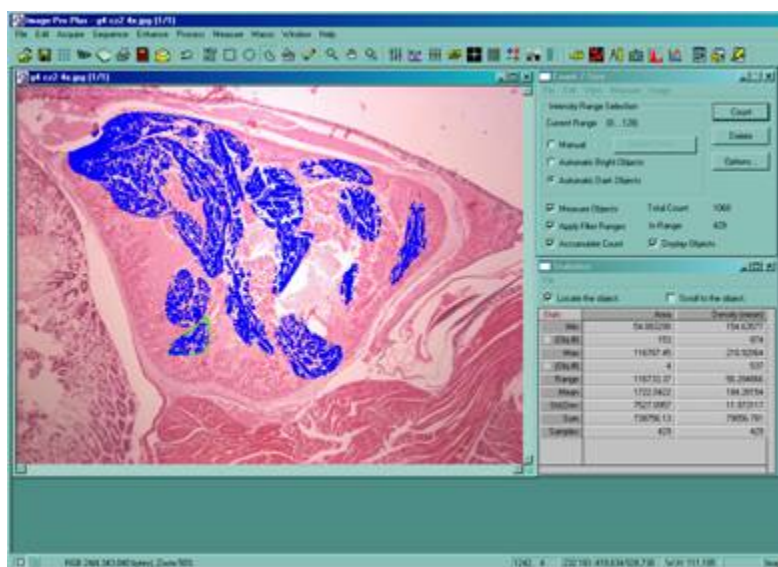
En todas las micrografías se observan las bandas que forman el miocardio, las fibras que separan las subcámaras del corazón y la hemolinfa dentro de éstas. Sin embargo, se puede apreciar que en la micrografía del camarón expuesto a  $10^6$  cél/L (Fig. 20c), parte del *muscularis frontalis* (miocardio central que divide las subcámaras) prácticamente ha desaparecido, apreciándose sólo fibras aisladas y segmentos dañados. Estudios previos han demostrado que la exposición de toxinas paralizantes en los organismos puede producir necrosis en las miofibrillas y pérdida de densidad fibrilar por el estrés causado, derivando en arritmia cardiaca e incluso muerte por paro cardiaco (Guo *et al.*, 1987; Andrinolo *et al.*, 1999).

Para corroborar estas diferencias de manera cuantitativa se utilizó el programa Image-Pro Plus<sup>®</sup> v.5.1 (ver apartados 1.6.5 *Técnicas histológicas* y 1.6.6 *Análisis estadísticos*) el cual cuantifica las zonas de interés y obtiene el área total y la densidad media de éstas (Fig. 21). Realizando un ANOVA de una sola vía se observó que existía diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la densidad media de los corazones de organismos expuestos a

las densidades de  $10^4$  y  $10^6$  cél/L de dinoflagelados. Sin embargo, no se presentó diferencia alguna ( $p < 0.05$ ) en el área total de los tejidos de corazón de organismos de los distintos tratamientos aplicando el mismo análisis.



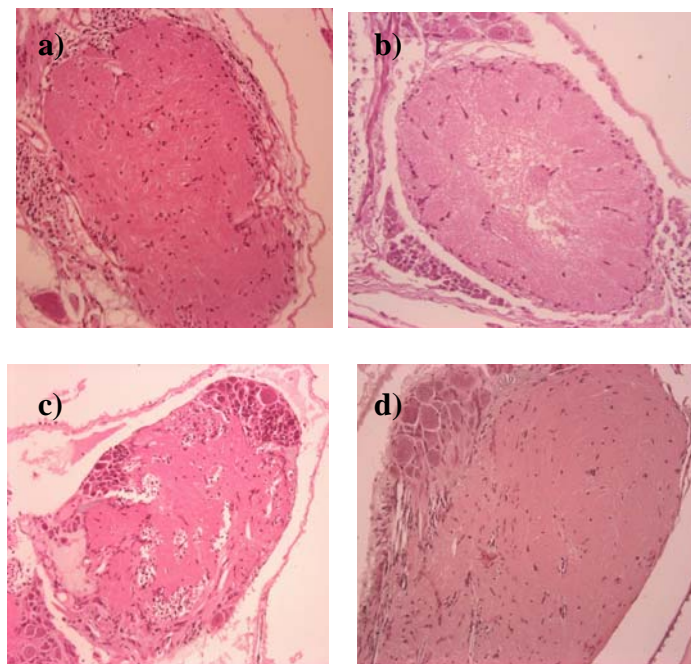
**Figura 20.** Cortes transversales del corazón de *L. vannamei* expuesto a diferentes densidades celulares de GCCV-6. **a)**  $10^3$  cél/L; **b)**  $10^4$  cél/L; **c)**  $10^6$  cél/L; **d)** control negativo (medio f/2+Se). Tinción H-E [4x].



**Figura 21.** El programa Image-Pro Plus® (v. 5.1) cuantifica las diferencias observadas en algunos tejidos de *L. vannamei* expuesto a densidades de  $10^4$  y  $10^6$  cél/L de dinoflagelados tóxicos comparados con los demás tratamientos.

### 3.3.5.3 Ganglio supraesofagal

En el protocerebro o ganglio supraesofagal de los organismos expuestos a las dosis celulares más altas se observó una desorganización celular en la zona medular o neuropilema ganglionar (Fig. 22b y c; Fig. 23a y b) donde se observan las células gliales deterioradas. Comparando los cortes histológicos de los organismos control y de los expuestos a la densidades más bajas de los dinoflagelados tóxicos, se puede ver un arreglo integral celular, con el neuropilema sin daños, la corteza del protocerebro con células gliales sanas y rodeados de la glía cortical y del neurilema fibroso (Fig. 22a y d; Fig. 23c).

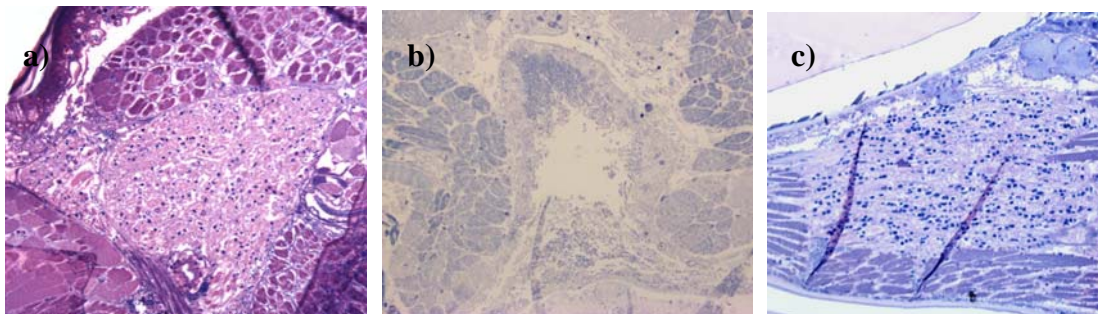


**Figura 22.** Cortes transversales del ganglio supraesofagal de *L. vannamei* expuesto a diferentes densidades celulares de GCCV-6. **a)**  $10^3$  cél/L; **b)**  $10^4$  cél/L; **c)**  $10^6$  cél/L; **d)** control negativo (medio f/2+Se). Tinción H-E [20x].

Estas diferencias en la zona del neuropilema pueden explicar el comportamiento que describieron los organismos al estar expuestos a los dinoflagelados tóxicos debido a que esta región del ganglio es la encargada de procesar la respuesta a los estímulos y donde se



llevan a cabo las sinapsis. Al presentar daños, los organismos son incapaces de realizar funciones motoras básicas (Lesson *et al.*, 1990; Villa, 1997; Trainer y Baden, 1999; Oliveira-Soares *et al.*, 2004).

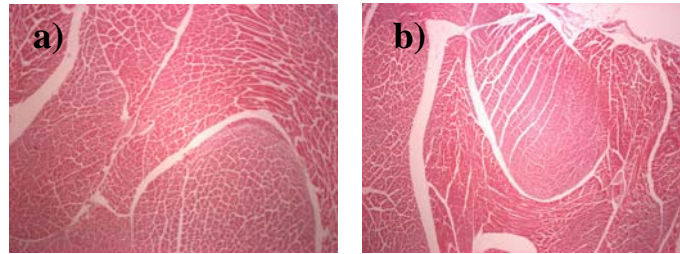


**Figura 23.** Cortes transversales del ganglio supraesofágico de *L. vannamei* expuesto a diferentes densidades celulares de KBTX-3. **a)**  $10^4$  cél/L; **b)**  $10^6$  cél/L; **c)** control negativo (medio GSe). Tinción policrómica [20x].

#### 3.3.5.4 Músculo

En los tejidos musculares analizados no se han observado daños ni diferencias entre los organismos expuestos al dinoflagelado y los controles. En la Figura 24 se muestran cortes transversales de los paquetes musculares abdominales de camarón. Se pueden apreciar las miofibras que conforman paquetes musculares arreglados en grupos transversales y longitudinales en la parte anterior del abdomen. Debido a que la técnica utilizada (inclusión en parafina, ver Anexo V. *Técnica histológica para cortes en parafina*) solo permite cortes de 4-5  $\mu\text{m}$ , fue imposible analizar las fibras musculares con más detalle. A pesar de que se encontraron daños en el músculo cardíaco, en el abdominal no fue posible corroborarlo. Se ha reportado que el tejido cardíaco está constituido por paquetes de fibras más delgadas que las del músculo abdominal (Estrada *et al.*, 1982; Bell y Lightner, 1988; Lesson *et al.*, 1990), por lo que son más frágiles o susceptibles a cambios abruptos

en su capacidad elástica (*i.e.* parálisis) (Guo *et al.*, 1987). Sin embargo, los resultados en este tejido no son concluyentes y es necesario utilizar otras técnicas histológicas o modificar las utilizadas para poder realizar análisis más exhaustivos del tejido muscular de camarones después de haber estado expuestos a toxinas paralizantes y neurotoxinas.



**Figura 24.** Cortes transversales del músculo abdominal de *L. vannamei* expuesto a diferentes densidades celulares de GCCV-6. **a)**  $10^6$  cél/L; **d)** control negativo (medio f/2+Se). Tinción H-E [4x].

## 2.4 Conclusiones

Se puede concluir en este capítulo lo siguiente:

1. Las dosis letales para *L. vannamei* ( $PL_{40}$ ) expuesto a células de GCCV-6 y KBTX-3 son de  $10^4$  cél/L, presentando un tiempo de muerte promedio de 6-32 h (para GCCV-6 y KBTX-3 respectivamente).
2. Los organismos sobrevivieron a densidades celulares de  $10^3$  cél/L por >48 h en ambos experimentos, por lo que se consideró la dosis subletal para *L. vannamei* ( $PL_{40}$ ).
3. Se corroboró que *L. vannamei* ingiere más del 50% de las células de GCCV-6 y KBTX-3 en las primeras 90 minutos, por lo que los efectos registrados no sólo fueron por exposición externa sino que de hecho también hubo exposición interna.

4. Los organismos expuestos a los dinoflagelados tóxicos (GCCV-6 y KBTX-3) experimentaron aletargamiento, parálisis de pereiópodos, desequilibrio, nado anormal, convulsiones y espasmos abdominales.

5. Los camarones pueden acumular en sus tejidos toxinas paralizantes en pocos días pero las neurotoxinas necesitan más tiempo para poder detectarse. Se detectaron 4 diferentes toxinas paralizantes (dcSTX, GTX2,3, NEO y GTX1,4) en los tejidos analizados pero no se observaron neurotoxinas.

6. Hay tejidos más susceptibles de acumular y retener las toxinas paralizantes. El hepatopáncreas retuvo todas las 4 toxinas en las densidades celulares más altas ( $10^4$  y  $10^6$  cél/L) pero el músculo y el ganglio supraesofagal acumularon más toxinas a medida que se aumentó la densidad celular.

7. La exposición a GCCV-6 y KBTX-3 en camarones puede causar daños en sus tejidos. Se observaron diferencias en el hepatopáncreas, corazón y ganglio supraesofagal, pero no hubo daños aparentes en el músculo abdominal.

8. Algunos tejidos son más susceptibles ya que se encontraron diferencias significativas en la densidad promedio de fibras cardiacas y daños evidentes en el neuropilema del protocerebro. En ambos casos puede explicar el comportamiento y muerte experimentados por los organismos.



## **Capítulo IV**

### **Bioensayo crónico por ingestión**

## **4.1 Objetivo general**

Conocer el efecto de la exposición crónica a células de dinoflagelados tóxicos (*G. catenatum* y *K. brevis*) en el camarón patiblanco (*L. vannamei*).

### **4.1.1 Objetivos específicos**

1. Analizar el resultado en la supervivencia, porcentaje de alimentación y ganancia en peso de *L. vannamei* expuesto crónicamente a células de dinoflagelados tóxicos (*G. catenatum* y *K. brevis*)

2. Detectar la posible retención de ficotoxinas (PSP y NSP) en tejidos diana de los camarones expuestos de manera crónica a los dinoflagelados tóxicos.

4. Evidenciar posibles daños en los tejidos de los camarones debido a la exposición crónica a los dinoflagelados tóxicos.

## **4.2 Material y métodos**

### **4.2.1 Diseño del bioensayo**

Se utilizaron postlarvas (PL<sub>30</sub>) de *L. vannamei* con un peso promedio de  $0.5 \pm 0.08$  g. Los organismos se pesaron y se dividieron en cuatro lotes con tres acuarios de plástico cada uno, a manera de triplicado. Los acuarios tenían 60 L de capacidad pero solo se utilizaron 2/3 partes de su capacidad (40 L) para evitar que los camarones pudieran saltar fuera de ellos. En cada recipiente se colocaron 150 organismos en promedio ( $\delta = \sim 4$  PL/L) y se mantuvieron bajo condiciones del laboratorio ( $35 \pm 2.0$  UPS,  $26 \pm 1.0^\circ\text{C}$ , ciclo luz-oscuridad 12/12, aireación constante) durante 10 días previos al experimento para su aclimatación.

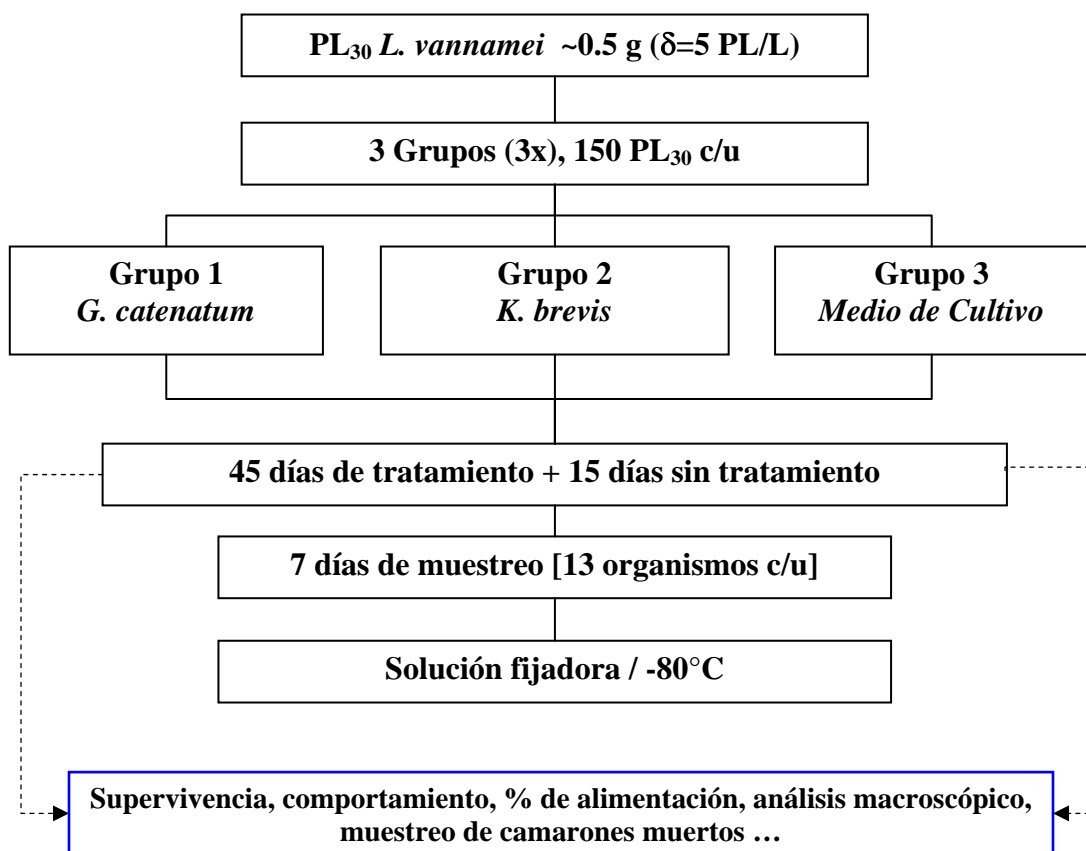
Al uno de los lotes se le suministró diariamente una dosis de  $10^3$  cél/L (dosis subletal; ver apartado 3.3.1 *Dosis letales y subletales*) del cultivo GCCV-6 durante 45 días, haciendo su recambio de agua diario para que la densidad de la dosis fuera siempre la misma. Al siguiente lote se le agregó la misma densidad celular pero de KBTX-3 por el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones. Ambos lotes contaban con sus controles a los cuales se les suministró un volumen equivalente al de cada tratamiento pero de medio f/2+Se y GSe (respectivamente). Transcurrido el período de experimentación se suspendieron los tratamientos en los cuatro lotes y se mantuvieron durante 15 días más para verificar si los organismos podían depurar las ficotoxinas.

Todos los organismos fueron alimentados diariamente con una mezcla de granulado comercial balanceado (PIASA<sup>®</sup>, 50% proteína). Dependiendo de la edad de los organismos se les alimentó con granulado de 300, 500 y 800 $\mu$  siguiendo las tablas recomendadas para el manejo integral del alimento de camarón, las cuales se basan en el porcentaje del peso corporal promedio estimado para el número de animales en el estanque (Jory, 2001; Villalón, 1991). Todos los acuarios contenían agua de mar filtrada (filtros de diatomita, cartuchos de 50  $\mu$ m y luz U.V.) y se limpiaban diariamente por el método de sifoneo para desechar los restos de comida, heces y dinoflagelados remanentes. Se hicieron observaciones en los cambios de comportamiento y conteos de supervivencia a lo largo del experimento.

Se colectó periódicamente el alimento sobrante de los estanques con una malla de 300  $\mu$ m, se dejó secar y se pesó para obtener una estimación del porcentaje de alimentación relacionado con su crecimiento. Los desechos provenientes de los acuarios con dinoflagelados se colectaban en recipientes de 200 L para tratarlos con NaOCl [25%] en

oscuridad durante 24 h para asegurarse que no hubiera células vivas (Jeong *et al.*, 2002) y NaOH [0.2N] para destruir las toxinas (Poli *et al.*, 1999), antes de verterlos al drenaje (ver apartado 1.6.4 *Tratamiento de desechos*).

Se conservaron alícuotas de los cultivos y del medio f/2+Se utilizados para su posterior análisis y corroborar la presencia/ausencia de toxinas (respectivamente; ver *capítulo II. Perfil de toxinas de GCCV-6 y KBTX-3*). Se sacrificaron 13 organismos de cada lote los días 0, 5, 10, 15, 30, 45 y 60 para los análisis histológicos, macroscópicos y químicos. La Figura 24 muestra el diagrama de flujo del ensayo crónico.



**Figura 24.** Diagrama de flujo del diseño experimental del bioensayo crónico por exposición de *Litopenaeus vannamei* a una densidad celular de  $10^3$  cél/L de *G. catenatum* (cepa GCCV-6) y *K. brevis* (cepa KBTX-3).

#### **4.2.2 Procesamiento de muestras**

Cada vez que se sacrificaban los animales se pesaban completos en una balanza granataria (OHAUS-Scout II<sup>®</sup>, 0.01-200 g) y se analizaron de manera macroscópica para observar posibles anomalías. Tres individuos de cada lote se fijaron para los análisis histológicos y los 10 organismos restantes se conservaron a -80°C para posteriores análisis químicos.

Los organismos congelados fueron procesados de igual forma que se describe en el apartado 3.2.3 Procesamiento de muestras. En este caso se agruparon las muestras de acuerdo al lote, tejido/órgano y día de muestreo.

#### **4.2.3 Análisis de ficotoxinas**

Todos los tejidos/órganos que se obtuvieron del experimento crónico fueron tratados para la extracción y detección de toxinas paralizantes y neurotoxinas de igual forma que se describe en el apartado 3.3.4 (análisis de ficotoxinas) del capítulo anterior.

#### **4.2.4 Análisis histológicos**

Todos los organismos sacrificados y fijados en el experimento crónico fueron procesados para su análisis histológico como se menciona en el apartado 3.2.5 (Análisis histológicos) del capítulo anterior.

### 4.3 Resultados y discusión

#### 4.3.1 Supervivencia, porcentaje de alimentación, ganancia en peso y comportamiento

Al finalizar los experimentos se registró un porcentaje de supervivencia promedio de los organismos control del 88%, mientras que la de los organismos expuestos a GCCV-6 y KBTX-3 fue de 58% y 77%, respectivamente (Tabla VIII). Los lotes control presentaron una supervivencia mayor (11-30%) que los organismos expuestos. En la camaronicultura se considera exitoso un cultivo cuando se obtiene una supervivencia de >70% de los organismos en este estadio de vida, ya que indica una buena calidad de la postlarva y manejo (De la Cruz, 1992; Lawrence *et al.*, 1998). Basado en lo anterior, los organismos expuestos a KBTX-3 no tuvieron influencia negativa en su supervivencia. Se realizaron análisis estadísticos (homocedasticidad, homogeneidad y *t*-Student, ver apartado 1.6.6 *Análisis estadísticos*) y se encontró que los organismos expuestos a GCCV-6 presentan diferencia significativa en la supervivencia promedio ( $p < 0.05$ ) con respecto a los controles, pero en la supervivencia de los camarones expuestos a KBTX-3 no hubo diferencia (Tabla VIII). Esta diferencia entre ambos tratamientos probablemente se debe a la naturaleza de las toxinas que produce, ya que se ha reportado que las toxinas paralizantes, al ser hidrosolubles, pueden asimilarse de manera más rápida (Schantz, 1986; Guo *et al.*, 1987; Hall *et al.*, 1990; Andrinolo *et al.*, 1999) que las neurotoxinas que son liposolubles (Baden *et al.*, 2005; Poli *et al.*, 1999). Sin embargo, es importante resaltar que aunque muchos organismos no mueren al entrar en contacto con *K. brevis*, son capaces de acumular sus neurotoxinas y fungir como vectores a otros niveles de la

red trófica (Roberts *et al.*, 1979; Pierce y Henry, 1996; Trainer y Baden, 1999; Walker *et al.*, 2004).

**Tabla VIII.** Supervivencia, porcentaje de alimentación y ganancia en peso promedio de camarones expuestos crónicamente a  $10^3$  cél/L de GCCV-6 y KBTX-3.

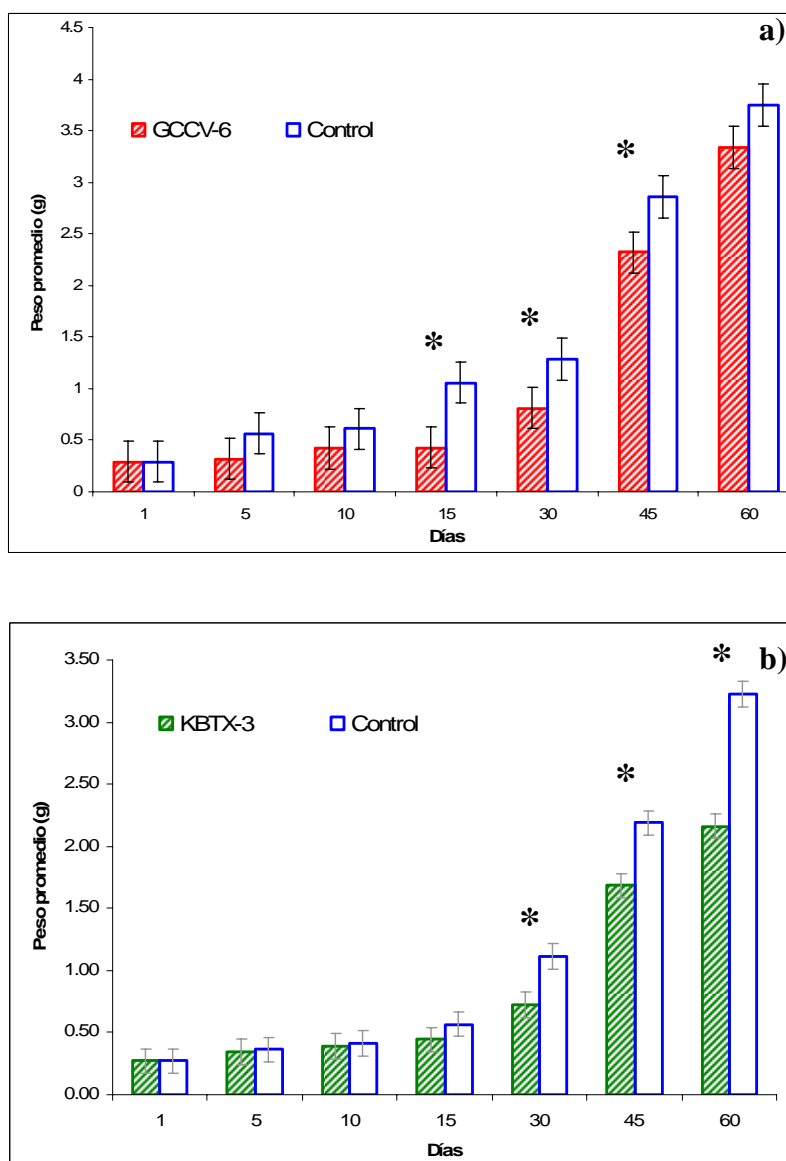
Tratamiento	Supervivencia	% de Alimentación	Peso promedio (g)			
			Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
GCCV-6	<b>58%</b>	<b>54%</b>	<b>0.4</b>	<b>0.8</b>	<b>2.3</b>	3.3
KBTX-3	77%	<b>69%</b>	0.6	<b>0.7</b>	<b>1.7</b>	<b>2.1</b>
Control	88%	77%	0.8	1.2	3.0	3.5

Datos en **negrita**: diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre controles y tratamientos.

Con respecto a la ganancia en peso promedio se observó que los organismos control tuvieron de un 6-40% más de crecimiento que los expuestos a los cultivos de GCCV-6 y KBTX-3, respectivamente (Fig. 25). Mediante un Análisis de Varianza de dos vías (2Way-ANOVA) se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre ambos grupos tratados con respecto a sus controles. Además se realizaron pruebas de *t*-Student para comparar cada uno de los días que se mantuvo el experimento y se encontró que había diferencia significativa ( $p < 0.05$ , Figura 25a; Tabla VIII) los días 15, 30 y 45 del experimento con GCCV-6 y en los días 30, 45 y 60 del experimento con KBTX-3 ( $p < 0.05$ , Figura 25b; Tabla VIII).

Los camarones presentaron efectos negativos en su peso de manera más rápida cuando están expuestos a toxinas paralizantes (hidrosolubles) pero después del período de depuración (suspensión del tratamiento) los organismos comienzan a recuperarse, ya que no se encontró diferencia significativa en el peso promedio de los individuos del día 60 con respecto al control (Tabla VIII). Por otro lado, los camarones expuestos a neurotoxinas (liposolubles) tardan más en presentar efectos negativos en su peso, pero

después del período de depuración, no logran recuperarse, ya que se encontró diferencia significativa en el peso promedio de los individuos del día 60 con respecto al control (Tabla VIII).



**Figura 25.** Ganancia en peso promedio de *L. vannamei* después de 45 días de suministrar células de GCCV-6 y KBTX-3 ( $10^3$  cél/L). **a)** Se encontró diferencia significativa (\*  $p < 0.05$ ) los días 15, 30 y 45 en la ganancia en peso promedio de los individuos expuestos a GCCV-6 (barras con líneas) con respecto a los controles (barras blancas); **b)** Se encontró diferencia significativa (\*  $p < 0.05$ ) los días 30, 45 y 60 en la ganancia en peso promedio de los individuos expuestos a KBTX-3 (barras con líneas) con respecto a los controles (barras blancas).



Durante los experimentos se pudo observar que los acuarios control presentaban diariamente una mayor cantidad de heces y poco remanente del granulado de la dieta, indicativo del aprovechamiento del alimento, del proceso digestivo y de la posterior ganancia en peso promedio. En presencia de los dinoflagelados tóxicos la cantidad de heces y alimento remanente no fue constante, ya que en ocasiones se cuantificó hasta un 80% de consumo y en otras solo un 20%. Al final del experimento el porcentaje promedio de alimentación en el lote control (restando el alimento sobrante a la cantidad proporcionada), fue de un 77% de aprovechamiento mientras que en los lotes expuestos a GCCV-6 y KBTX-3 fue de sólo un 54% y 69%, respectivamente. Esto solo es una aproximación debido a que parte del alimento se disgrega y puede pasar por la malla de 300  $\mu\text{m}$ , subestimando la cantidad remanente de alimento; pero por otro lado algunas hebras de heces son difíciles de separar, contribuyendo al peso final del alimento sobrante calculado teniendo quizás una sobreestimación. En ambos tratamientos se encontró diferencia significativa en el porcentaje de alimentación promedio con respecto al control (Tabla VIII). Las toxinas paralizantes y las neurotoxinas pueden causar desórdenes alimenticios, reproductivos y susceptibilidad a enfermedades en camarones de diferentes estadios de vida (Roberts *et al.*, 1979; Hwang *et al.*, 1990; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004b). La parálisis y letargo que experimentaron modificó su conducta alimenticia y probablemente los daños en tejidos importantes como el hepatopáncreas y protocerebro contribuyeron a que los organismos no pudieran alimentarse normalmente, perdieran peso y murieran (Tabla VIII).

A lo largo de los experimentos, los camarones control estuvieron más activos y sensibles a cambios de luz y movimiento del agua en el estanque, ya que con la manipulación

diaria de los acuarios reaccionaban de inmediato. Por otro lado, los camarones expuestos a los dinoflagelados se encontraban aletargados, en ocasiones inmóviles y sus reacciones hacia la luz o movimiento del agua fueron lentas. Cabe mencionar que algunos organismos presentaron movimientos súbitos y convulsiones repentinas. Las toxinas paralizantes y las neurotoxinas en bajas concentraciones provocan somnolencia, aletargamiento, adormecimiento de músculos y poca coordinación motriz (Hall *et al.*, 1990; Carmichael y Falconer, 1993; Poli *et al.*, 1999; Trainer y Baden, 1999) además de que ya se han reportado comportamientos anormales en crustáceos expuestos a este tipo de toxinas, presentando pérdida de equilibrio, parálisis, convulsiones y nado anormal (Foxall *et al.*, 1979; Roberts *et al.*, 1979; Hwang *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 2004)

No se observaron daños o lesiones externas visibles en los organismos muestreados a lo largo de los experimentos ni en los que se sacrificaron al final. Finalmente, no en todos los casos se pudieron recuperar organismos muertos durante los experimento, ya que esta especie se caracteriza por el canibalismo en condiciones de cultivo (Orbe y Arias, 1987; Anderetta y Alfonso, 1997; Villalón, 1991). Sin embargo en aquellos casos que se colectaron suficientes ejemplares se procesaron solo para análisis químicos.

#### **4.3.2 Análisis de ficotoxinas en tejidos de camarón**

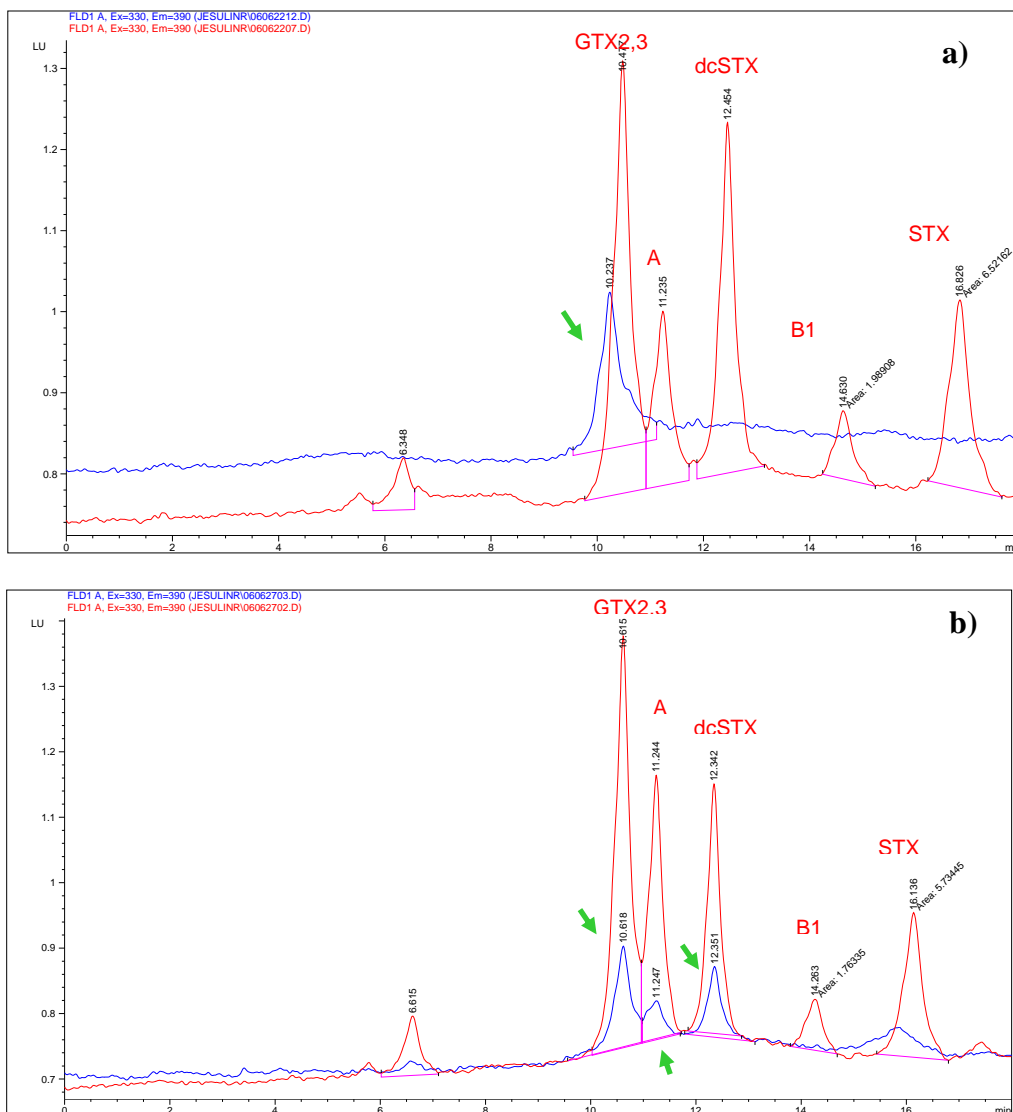
En ambos experimentos se observó que el hepatopáncreas presenta una mayor tendencia a retener las ficotoxinas. En el caso de las toxinas paralizantes se detectaron en casi todos los días de muestreo: 5, 15, 30 y 45 (Fig. 26; Tabla IX) y para las neurotoxinas sólo se detectó PbTx-2 en los últimos días del tratamiento (días 30 y 45; Fig. 27).

A los 15 días de depuración, después de que se les dejó de suministrar las células de los dinoflagelados (día 60) se observó la presencia de toxinas paralizantes (Fig. 28; Tabla IX) y neurotoxinas (Fig. 29). Lo que indica que la exposición periódica de los camarones a células de *G. catenatum* y *K. brevis* en densidades subletales puede provocar la acumulación en su glándula gástrica, pero además éste órgano retiene por más tiempo las toxinas y su capacidad de depurarlas es más lenta.

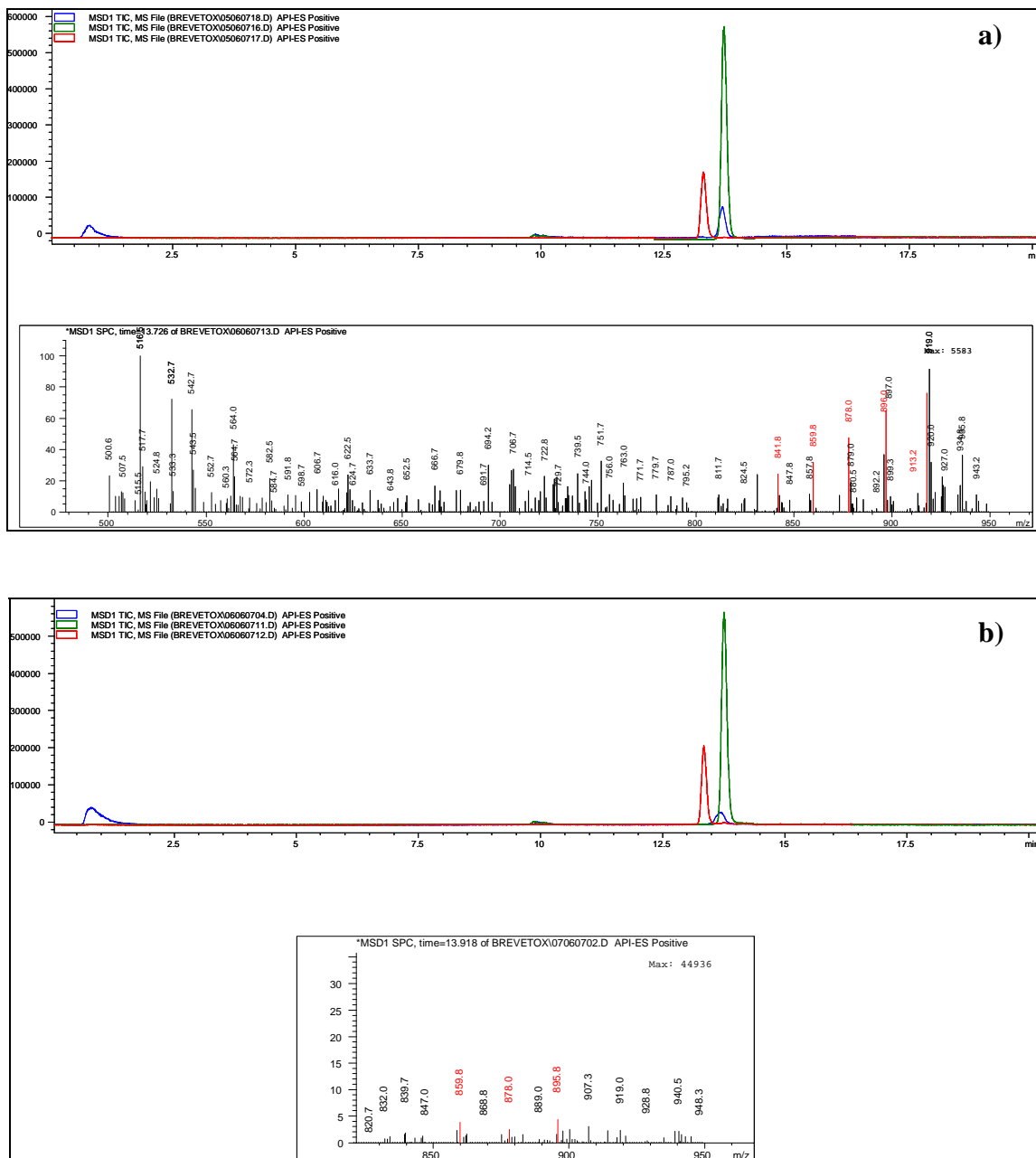
**Tabla IX.** Toxinas paralizantes detectas en tejidos de *L. vannamei* durante el ensayo crónico por ingestión.

Tejido/Órgano	Días						
	1	5	10	15	30	45	60
Hepatopáncreas	ND	dcSTX NEO	ND	dcSTX NEO GTX2,3	dcSTX GTX2,3	dcSTX, NEO GTX2,3 GTX1,4	dcSTX NEO GTX2,3 GTX1,4
Músculo	ND	dcSTX NEO	ND	dcSTX NEO GTX2,3 PO-GTX1,4	ND	dcSTX NEO GTX2,3 GTX1,4	ND
Protocerebro	ND	dcSTX NEO	ND	ND	ND	dcSTX NEO	ND
Corazón	ND	ND	ND	ND	ND	dcSTX GTX2,3 PO-GTX1,4	ND

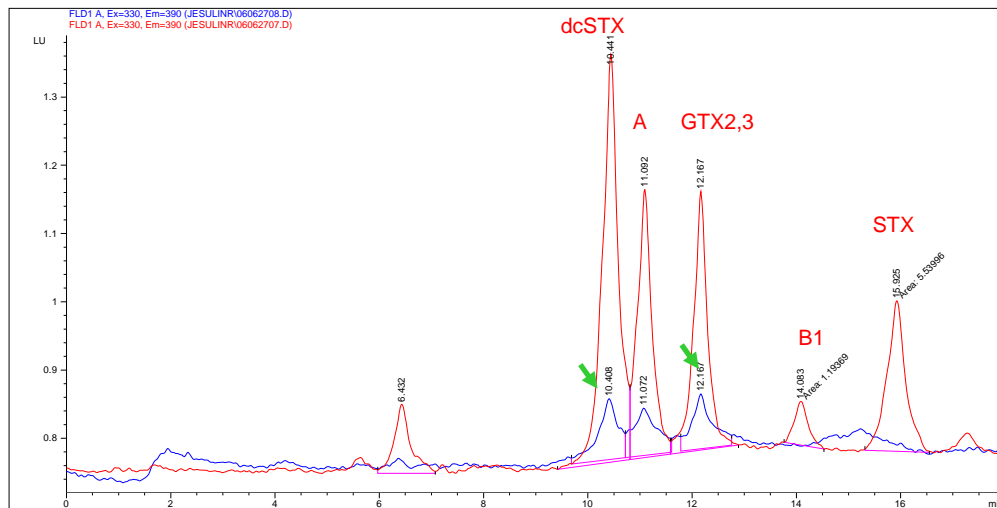
**PO-GTX1,4**= producto de oxidación secundaria de GTX1,4; **ND**= No se detectaron toxinas paralizantes.



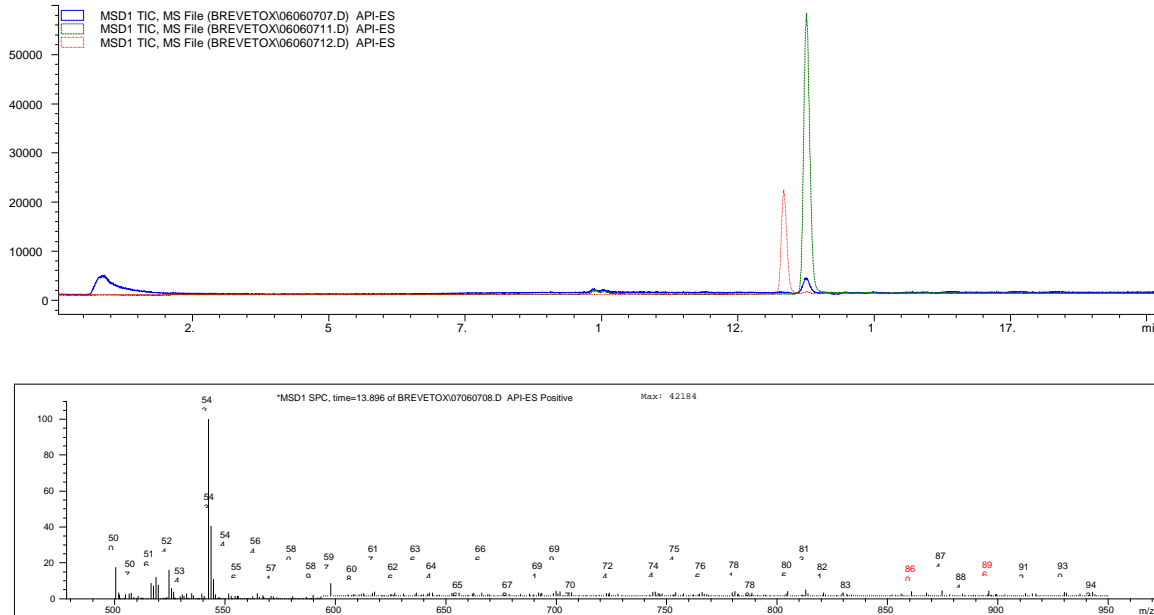
**Figura 26.** Cromatogramas del análisis de toxinas paralizantes en hepatopáncreas de camarón durante el ensayo crónico por ingestión (días 5 y 45). **Líneas azules:** extracto de hepatopáncreas; **Líneas rojas:** mezcla de estándares [Mix II: dcSTX, GTX2,3, B1 y SXT]. **a)** En el día 5 se corrobora la presencia de la dcSTX (flecha); **b)** En el día 45 se detectaron dcSTX y GTX2,3 (flechas). **▲**= producto de oxidación secundaria de dcSTX). Oxidación:  $H_2O_2$  [10%].



**Figura 27.** Cromatogramas y espectros obtenidos en el análisis de neurotoxinas en hepatopáncreas de camarón durante el ensayo crónico por ingestión (días 30 y 45). **Líneas azules:** extracto de hepatopáncreas; **Líneas verdes:** estándares de PbTx-2; **Líneas rojas:** estándares de PbTx-3. **a)** En el día 30 se detectó PbTx-2; **b)** En el día 45 también fue detectada la PbTx-2. En ambos espectros, abajo aparecen las extracciones de iones (en líneas rojas) derivados de las pérdidas de agua y aductos con  $\text{NH}_4$  y MeOH de PbTx-2. LC-MS [SIM].



**Figura 28.** Cromatograma del análisis de toxinas paralizantes en hepatopáncreas de camarón durante el ensayo crónico por ingestión (día 60). **Línea azul:** extracto de hepatopáncreas; **Línea roja:** mezcla de estándares [Mix II: dcSTX, GTX2,3, B1 y SXT]. En el día 60 se pudieron detectar las toxinas paralizantes dcSTX y GTX2,3 (flechas), aún después del periodo de depuración. **A=** producto de oxidación secundaria de dcSTX). Oxidación:  $\text{H}_2\text{O}_2$  [10%].



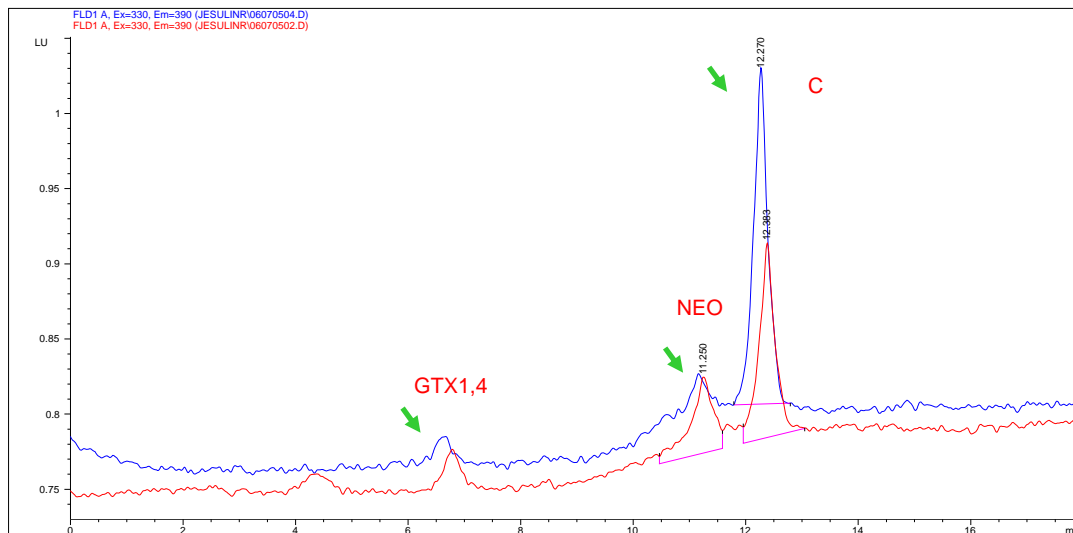
**Figura 29.** Cromatograma y espectro obtenidos en el análisis de neurotoxinas en hepatopáncreas de camarón durante el ensayo crónico por ingestión (día 60). **Línea azul:** extracto de hepatopáncreas; **Línea verde:** estándar de PbTx-2; **Línea roja:** estándar de PbTx-3. En el día 60 se pudo detectar PbTx-2, aún después del periodo de depuración. En la parte inferior aparecen las extracciones de iones (en líneas rojas) derivados de las pérdidas de agua y aductos con  $\text{NH}_4$  y MeOH de PbTx-2. LC-MS [SIM].

Estos resultados coinciden con los trabajos de Foxall *et al.* (1979), Roberts *et al.* (1979), Hwang *et al.* (1990) y Walter *et al.* (2004) que reportaron que la glándula gástrica de los crustáceos es un órgano capaz de acumular las toxinas paralizantes y neurotoxinas con un largo tiempo de retención. Además sus observaciones en el comportamiento de los crustáceos en experimentación coinciden con lo observado durante el ensayo crónico: aletargamiento, parálisis parcial de los pereiópodos, disminución cardíaca, reflejos lentos y anormalidad en los apéndices de ventilación y natatorios.

También se identificaron toxinas paralizantes en el músculo, pero probablemente la capacidad de depurar o modificar las ficotoxinas es más rápida. En el caso de las toxinas paralizantes se detectaron sólo en los días 5, 15 y 45 (Fig. 30; Tabla IX) y en día 45 para las neurotoxinas (Fig. 31).

Al parecer éste órgano presenta un proceso de acumulación/depuración rápido en este organismo. Pierce (1995) describe un comportamiento similar en calamares de la especie *Styela alicata* expuestos a dosis subletales de brevetoxinas durante una proliferación natural de *K. brevis* en las costas de Florida. Los organismos acumulan la toxina en sus vísceras y músculo después de 2 meses de exposición pero 20 días después la toxina no se detectó a pesar de que seguían en contacto con las células de *K. brevis*. Las toxinas paralizantes se pueden acumular rápidamente en los tejidos de crustáceos pero se presume que su presencia no es prolongada (Foxall *et al.*, 1979; Llewellyn, 1997; Oikawa *et al.*, 2002), y que presentan periodos relativamente cortos de depuración, por lo que el organismo tiene la capacidad de eliminar y/o transformar las toxinas. Además, se ha reportado que varios organismos pueden depurar la toxina por medio de orina y heces, pero que el músculo funge como un reservorio provisional de toxinas paralizantes y

neurotoxinas (Poli *et al.*, 1990; Cattet y Geraci, 1993; Andrinolo *et al.*, 1999). Es importante remarcar lo anterior debido a que este tejido es el que se consume en mayor medida y por lo tanto representa un peligro potencial de salud pública.

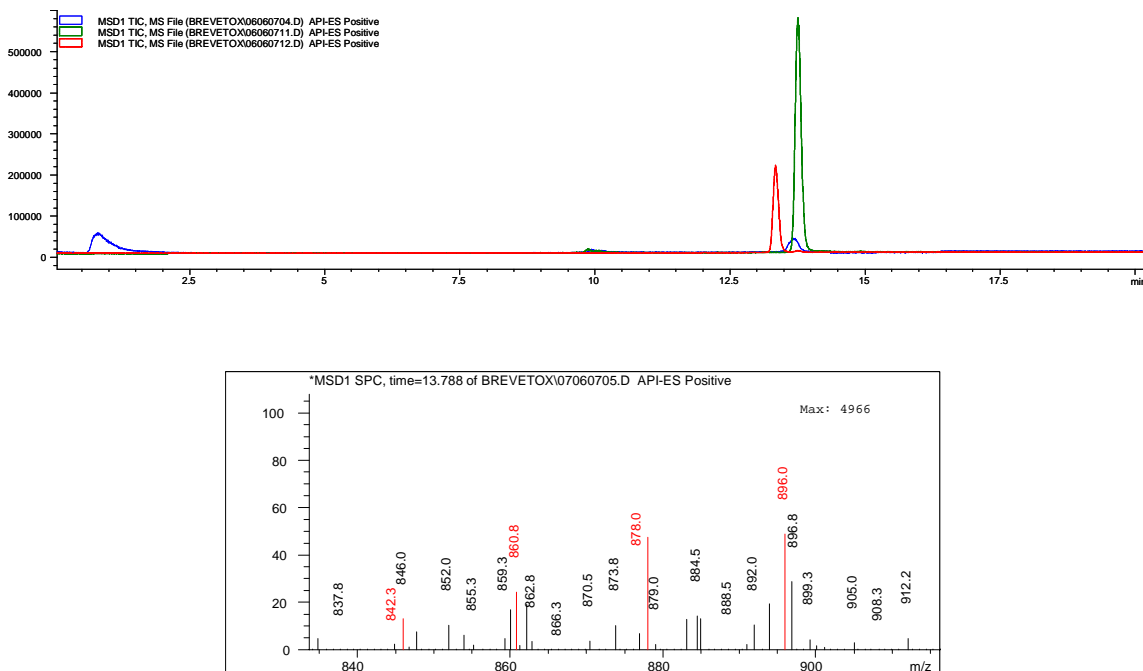


**Figura 30.** Cromatograma del análisis de toxinas paralizantes en músculo de camarón durante el ensayo crónico por ingestión (día 45). **Línea azul:** extracto de músculo; **Línea roja:** mezcla de estándares [Mix I: NEO y GTX1,4]. En el día 45 se pudieron detectar las toxinas paralizantes NEO y GTX1,4 (flechas). **C=** producto de oxidación secundaria de GTX1,4). Oxidación:  $\text{HIO}_4$  [0.03M].

Acerca de otros tejidos, como el protocerebro y el corazón, se observaron toxinas paralizantes en los días 5 y 45, pero en los demás días no (Tabla IX). Además, no se detectaron neurotoxinas en estos tejidos. Los resultados en estos tejidos nos indican que existe una retención rápida pero a corto tiempo de toxinas paralizantes y una capacidad de depuración más alta. Para el caso de las neurotoxinas, la acumulación en estos órganos requiere de más tiempo de exposición o densidad celular. El metabolismo del crustáceo y la actividad metabólica de estos órganos probablemente contribuyeron para la depuración y/o modificación de estas moléculas. Se ha reportado que las toxinas paralizantes y las neurotoxinas se acumulan principalmente en tejido hepático y en ocasiones pueden



encontrarse cantidades no significativas en cerebro, corazón, vísceras y tracto digestivo (Poli *et al.*, 1990; Cattet y Geraci, 1993; Andrinolo *et al.*, 1999)



**Figura 31.** Cromatograma y espectro obtenidos en el análisis de neurotoxinas en músculo de camarón durante el ensayo crónico por ingestión (día 45). Línea azul: extracto de músculo; Línea verde: estándar de PbTx-2; Línea roja: estándar de PbTx-3. En el día 45 se pudo detectar PbTx-2. En la parte inferior aparecen las extracciones de iones (en líneas rojas) derivados de las pérdidas de agua y aductos con  $\text{NH}_4$  y MeOH de PbTx-2. LC-MS [SIM].

Solo en el ensayo con GCCV-6 se pudieron recuperar organismos que murieron a lo largo del experimento. Estos ejemplares se procesaron su análisis en HPLC-FLD y se pudieron detectar toxinas paralizantes dcSTX y GTX1,4 y productos de su oxidación secundaria (cromatograma no incluido). La presencia de algunas toxinas en los cadáveres nos provee evidencia de la probable causa de muerte, ya que se han reportado mortalidades en varios estadios de vida del camarón por efecto de proliferaciones de *G. catenatum* en estanques

de cultivo (Cortés-Altamirano *et al.*, 1997; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004a y b) Sin embargo, es importante hacer hincapié que en estos reportes se cuantificaron densidades celulares  $>10^6$  cél/L, y que no se han realizado estudios de cronicidad con estas toxinas en camarón.

Por otro lado existen varios reportes donde se menciona que las toxinas paralizantes pueden causar inmunosupresión en los organismos haciéndolos susceptibles a patógenos y enfermedades (Fleming *et al.*, 1995; Cortés-Altamirano *et al.*, 1997; Bossart *et al.*, en FAO, 2004). Las anormalidades en el comportamiento alimenticio y problemas en el tracto digestivo de crustáceos y otros organismos por causa de la ingestión de microalgas tóxicas también es un tema explorado. Se han evidenciado inflamaciones del epitelio intestinal, daños en la glándula gástrica y una menor tasa de alimentación, trayendo en consecuencia bajas tasas de crecimiento (Cortés-Altamirano *et al.*, 1997; Saker y Eaglesham, 1999; Pérez-Linares *et al.*, 2003; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004a). Todos estos factores adversos probablemente contribuyeron al bajo porcentaje de alimentación observado y a la diferencia en la ganancia en peso promedio durante los últimos días que estuvieron expuestos los organismos, comparado con los controles.

#### **4.3.4 Daños en tejidos**

Los tejidos/órganos de los organismos muestreados se procesaron de igual manera que en el experimento agudo (ver apartado 1.6.5 *Técnicas histológicas* y 3.3.5 *Daños en tejidos*). No todos los tejidos se conservaron completamente (especialmente los del experimento con KBTX-3) a pesar de haber cumplido con los tiempos y procedimientos de fijación como se recomiendan (Karnovsky, 1965; Bell y Lightner, 1988). Sin embargo, se

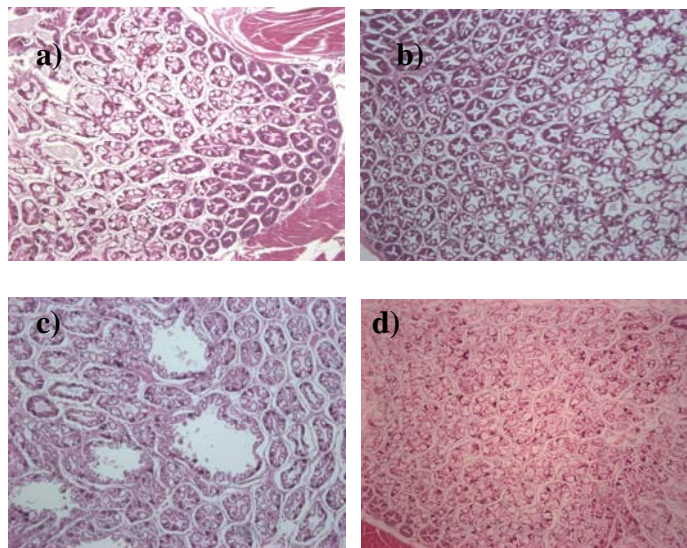
revisaron todas las laminillas procedentes de los experimentos y se seleccionaron las más representativas de acuerdo a lo que han reportado otros autores.

#### **4.3.4.1 Hepatopáncreas**

Las células en los túbulos de los organismos control y de los expuestos al inicio del experimento se observan sin cambios (Fig. 32a y d), con el lumen estelado debido a que el organismo estaba digiriendo alimento en el momento de la fijación (Bell y Lightner, 1988). Las células R (o de reserva) son las más conspicuas por sus vacuolas que las caracterizan. También se pueden observar algunas células E (o germinares) en la periferia del órgano, identificadas por su núcleo basal pignótico. En la glándula digestiva de algunos organismos expuestos se observan daños (Fig. 32c), igual que en el ensayo de exposición aguda, principalmente lisis en las células que conforman los túbulos del hepatopáncreas. La degradación de las células que se encuentran en la superficie del lumen de los túbulos es evidente, incluso abarcando varios de ellos (Fig. 32c). Sin embargo, algunas muestras de individuos expuestos no presentaron daños después de varios días del experimento (Fig. 32b). Lo anterior se debe a que es un órgano con una tasa alta de regeneración debido a su importancia en el crecimiento y nutrición del organismo (Lightner, 1996; Alday y Flegel, 1999).

Estos daños, aunado a las toxinas detectadas en este órgano, nos proveen de información importante para poder explicar el comportamiento y el impacto negativo en el porcentaje de alimentación y por consiguiente en su ganancia en peso, comparándolos con los organismos control. Se han reportado varios estudios sobre las toxinas paralizantes y neurotoxinas en diferentes organismos (vertebrados e invertebrados) teniendo como

común denominador el consenso de que en la mayoría de los casos los organismos pueden desechar las toxinas vía orina o heces, pero que estas ficotoxinas se retienen por más tiempo en tejidos hepáticos (Cattet y Geraci, 1993; Poli *et al.*, 1990; Andrinolo *et al.*, 1999; Lehane, 2000).

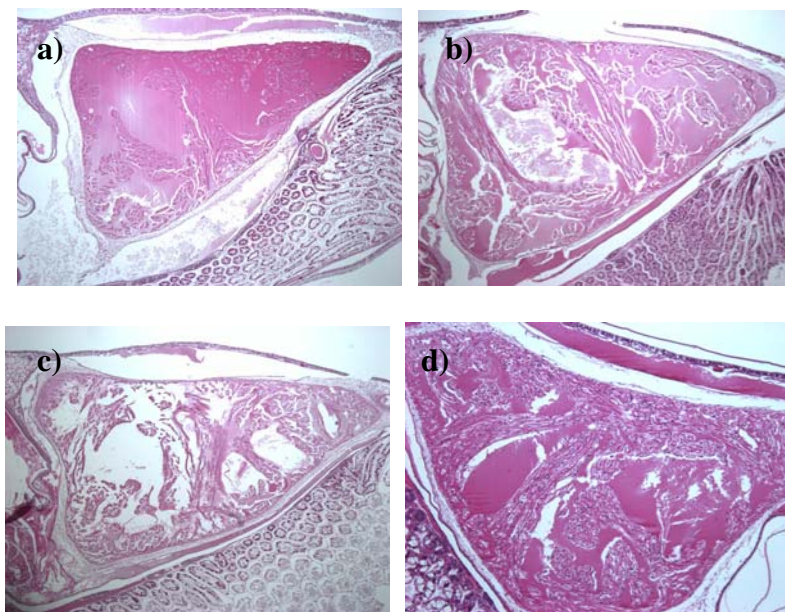


**Figura 32.** Cortes transversales de la glándula gástrica de *L. vannamei* expuesto crónicamente a  $10^3$  cél/L de GCCV-6 durante 45 días. **a)** día 1; **b)** día 30; **c)** día 45; **d)** control del día 45. Tinción H-E [10x].

#### 4.3.4.2 Corazón

El tejido cardiaco de los camarones fue analizado con la misma técnica que en las muestras del ensayo agudo y los resultados fueron similares. Se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las densidades promedio de fibras que conforman el miocardio de los organismos expuestos comparándolos con los controles. No hubo diferencia significativa en el área promedio del órgano. Lo anterior sugiere que el corazón no presentó alteraciones en su tamaño pero si hubo cambios en la cohesión de las miofibrillas (Fig. 33).

En el tejido de los organismos expuestos durante los primeros días, así como de los controles se observan las fibras del miocardio densas (Fig. 33a y d), pero al transcurrir el los días del experimento estas fibras presentan falta de cohesión y densidad, rompiéndose y perdiendo elasticidad (Fig. 33b y c). Como se mencionó previamente, estos resultados son consistentes con experimentos realizados en mamíferos, detectando toxinas paralizantes en el corazón y daños en los tejidos que traen como consecuencia paros cardiacos, arritmias e incluso muerte (Guo *et al.*, 1987; Poli *et al.*, 1990; Andrinolo *et al.*, 1999; Lehane, 2000).



**Figura 33.** Cortes transversales de corazón de *L. vannamei* expuesto crónicamente a  $10^3$  cél/L de GCCV-6 durante 45 días. **a)** día 1; **b)** día 45; **c)** día 60; **d)** control del día 60. Tinción H-E [**a**, **b** y **c** 4x; y **d** 10x].

#### 4.3.4.3 Ganglio supraesofagal

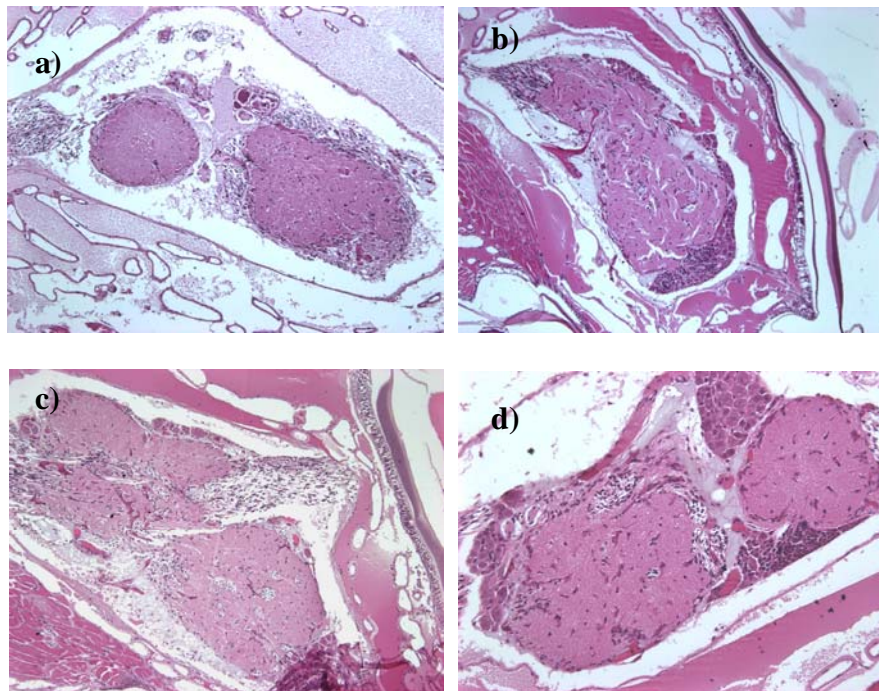
En la Figura 34 se pueden observar algunas microfotografías de cortes transversales de ganglios supraesofagales de los camarones del experimento crónico. Se observó la misma tendencia que en el ensayo agudo, solo que el daño que se evidencia es directamente

proporcional a los días en que los organismos estuvieron expuestos a los dinoflagelados tóxicos. Los primeros días, así como los organismos control presentaron la médula del protocerebro con células sin daños (Fig. 34a y d). Algunos de los vacíos que se pueden observar en el tejido son senos que irrigan este órgano con hemolinfa (Bell y Lightner, 1988; Oliveira-Soares *et al.*, 2004). Sin embargo, en las micrografías de los tejidos provenientes de organismos expuestos más de 40 días se presentan daños en las fibras gliales del neuropilema (Fig. 34b y c; 35a y b). Las células gliales presentan un deterioro al haber estado bajo el estrés que causan las ficotoxinas, desencadenando una serie de problemas mecánicos y fisiológicos en los camarones que se pudieron evaluar en su comportamiento, alimentación, crecimiento y supervivencia. Como se mencionó antes, la médula del ganglio supraesofagal es una de las zonas sinápticas más importantes, donde se integran y procesan los impulsos nerviosos (Trainer y Baden, 1999; Oliveira-Soares *et al.*, 2004).

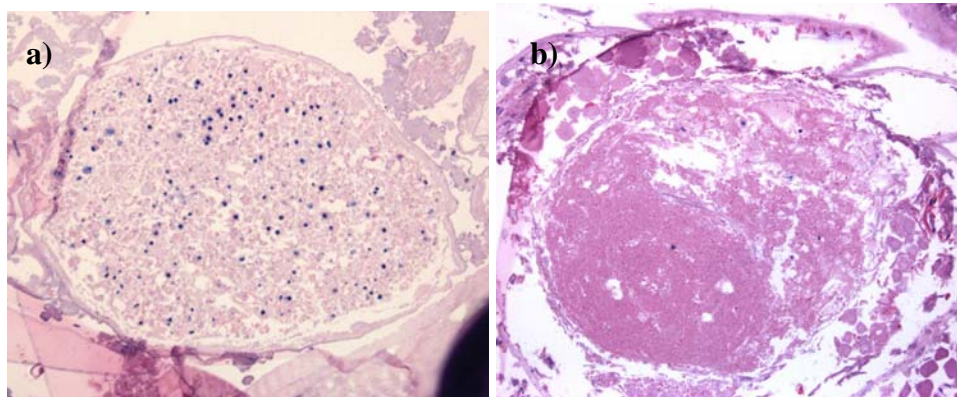
#### **4.3.3.4 Músculo**

Se realizaron algunas pruebas estadísticas de la longitud de las bandas H, de las bandas A y de la distancia entre las membranas Z de regiones al azar de las fibras musculares de organismos expuestos a KBTX-3 comparándolas con los controles y no se encontró diferencia significativa. La longitud de estas porciones del músculo varía dependiendo de la contracción-relajación del tejido (Estrada *et al.*, 1982; Lesson *et al.*, 1990). Sin embargo, los resultados no son concluyentes debido a que no se obtuvieron suficientes regiones conservadas de tejido muscular abdominal.





**Figura 34.** Cortes transversales de ganglio supraesofágico de *L. vannamei* expuesto crónicamente a  $10^3$  cél/L de GCCV-6 durante 45 días. **a)** día 1; **b)** día 45; **c)** día 60; **d)** control del día 60. Tinción H-E [**a**, **b** y **c** 10x; y **d** 20x].

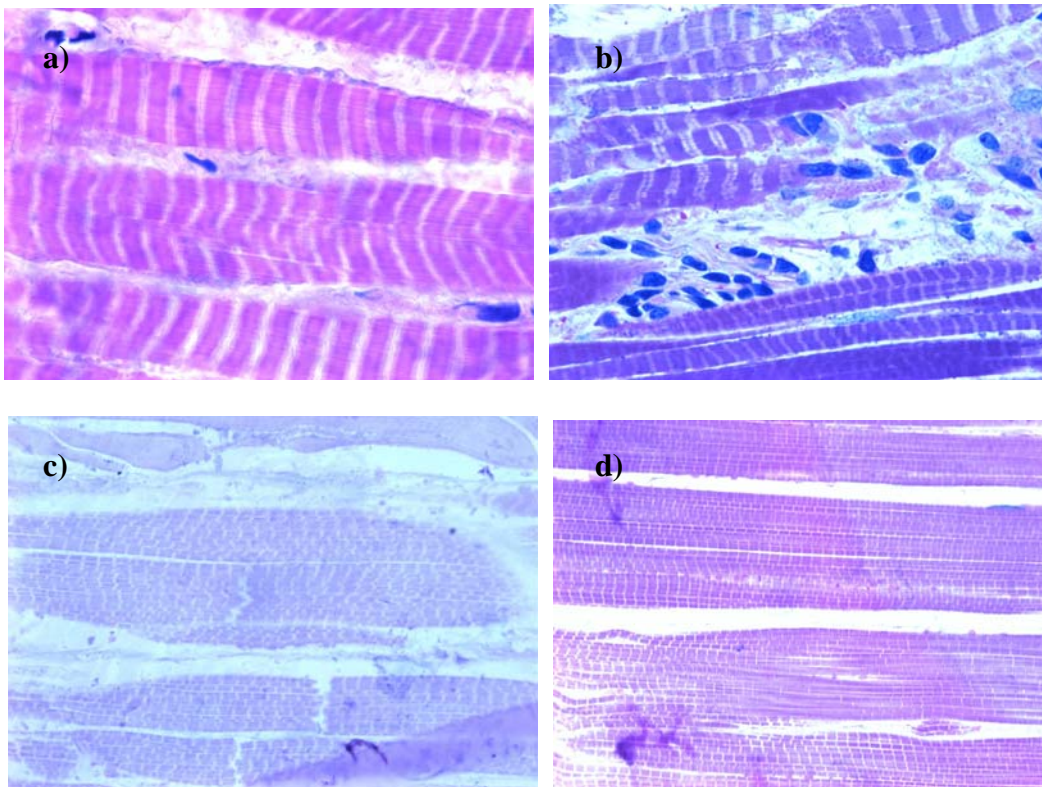


**Figura 35.** Cortes transversales de ganglio supraesofágico de *L. vannamei* expuesto crónicamente a  $10^3$  cél/L de KBTX-3 durante 45 días. **a)** Día 45 y **b)** día 60. Tinción policrómica [20x].

En la Figura 36 se presenta algunas micrografías obtenidas del experimento con KBTX-3. Las bandas H (regiones claras), las bandas A (regiones oscuras) y al lado de ellas la membrana Z (línea delgada entre las bandas A) se observan claramente dentro de las fibras musculares (Fig. 36a y b). En la Figura 36c se observan porciones de fibras rotas

entre los paquetes musculares (descartando que hayan sido provocadas por manipulación de la muestra), lo que indica que estas fibras musculares presentan daños. Esta observación fue hecha en varias ocasiones sólo en tejido de organismos expuestos a KBTX-3, pero no fue constante.

Algunas investigaciones realizadas con neurotoxinas en diferentes organismos proponen que el tejido muscular no se ve afectado por ellas, pero que si representa un reservorio transitorio de ellas mientras el organismo las va depurando del tejido hepático lentamente (Poli *et al.*, 1990; Cattet y Geraci, 1993; Pierce, 1995).



**Figura 36.** Cortes longitudinales de músculo abdominal de *L. vannamei* expuesto crónicamente a  $10^3$  cél/L de KBTX-3 durante 45 días. **a)** día 45; **b)** día 45 control; **c)** día 60 y **d)** día 60 control. Tinción policrómica [100x].



#### 4.4 Conclusiones

Se puede concluir en este capítulo lo siguiente:

1. Los camarones presentaron efectos negativos en la supervivencia, porcentaje de alimentación, ganancia en peso y comportamiento al estar expuestos de manera crónica a densidades celulares subletales de GCCV-6 y KBTX-3.
2. Los efectos en ganancia en peso promedio de los camarones fueron más rápidos cuando estuvieron expuestos a GCCV-6 pero pudieron recuperarse después del período de depuración. En el caso de los camarones expuestos a KBTX-3, el efecto fue más lento pero no pudieron recuperarse después del período de depuración.
3. Las toxinas paralizantes se retienen más rápido y causan daños en corto tiempo en los camarones y sus tejidos comparadas con las neurotoxinas.
4. La exposición crónica a densidades celulares subletales de GCCV-6 y KBTX-3 puede provocar acumulación de toxinas paralizantes (dcSTX, GTX2,3, NEO y GTX1,4) y neurotoxinas (PbTx-2) en tejidos comestibles de camarón (hepatopáncreas y músculo).
5. Algunos tejidos/órganos como el corazón y ganglio supraesofagal, presentaron mayor capacidad para depurar/transformar las toxinas paralizantes y neurotoxinas. Mientras que el hepatopáncreas y el músculo retienen por más tiempo las ficotoxinas.
6. Se observaron daños significativos en hepatopáncreas, corazón y ganglio supraesofagal de los camarones expuestos de manera crónica a densidades celulares subletales de GCCV-6 y KBTX-3.

7. Los daños observados en los tejidos/órganos de camarón (hepatopáncreas, corazón y ganglio supraesofagal) apoyan las diferencias encontradas en su comportamiento, el porcentaje de alimentación, ganancia en peso promedio y supervivencia.
8. Los camarones cultivados son vectores potenciales de toxinas paralizantes y neurotoxinas para la población.

## **Capítulo V**

### **Ensayo agudo por inyección**

## **5.1 Objetivo general**

Conocer los efectos de toxinas paralizantes (PSP) producidas por *Gymnodinium catenatum* en el camarón patiblanco *Litopenaeus vannamei* por medio de un ensayo agudo por inyección.

## **5.1 Objetivos específicos**

1. Conocer el perfil de toxinas de la cepa GCCV-6 de *Gymnodinium catenatum*
2. Conocer la toxicidad de la cepa GCCV-6 de *Gymnodinium catenatum* por medio del bioensayo en ratón
3. Exponer a juveniles y adultos de *L. vannamei* a diferentes dosis de toxinas paralizantes para conocer el tiempo de muerte, su comportamiento y los posibles daños en sus tejidos/órganos.

## **5.2 Material y Métodos**

### **5.2.1 Análisis de toxinas paralizantes**

Para conocer el perfil de toxinas y la toxicidad de los extractos obtenidos del cultivo de GCCV-6 se realizaron dos pruebas validadas por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC).

#### **5.2.1.1 Cromatografía de alta eficacia y detección con fluorescencia (HPLC-FLD)**

El análisis de las toxinas paralizantes se llevó a cabo utilizando el método oficial para PSP (AOAC, 1997; Lawrence *et al.*, 2004; Horowitz, 2006) que inicialmente propuso Lawrence y colaboradores en 1995. Las condiciones generales para la extracción y

detección de PSP se pueden revisar en el apartado *1.6.2 Extracción y análisis de toxinas paralizantes*.

#### **5.2.1.2 Bioensayo en ratón**

Los extractos obtenidos de las cosechas de GCCV-6 (ver apartados *1.6.1.3 Cultivo y cosecha de los dinoflagelados* y *1.6.2 Extracción y análisis de toxinas paralizantes*) fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realizar el bioensayo en ratón (Sommer y Meyer, 1937; AOAC, 1997) y obtener la toxicidad de los extractos en Unidades Ratón (UR/g) que se expresa en  $\mu\text{g}$  de equivalentes saxitoxina ( $\mu\text{g STXeq/g}$  de biomasa) de acuerdo a Oshima (1995). Brevemente, los extractos de toxinas paralizantes se diluyeron (1:10) para poder inyectar 1 mL intraperitonealmente (i.p.) a 3 ratones machos CD-1 de 20-23 g (Fig. 37). Se observaron los síntomas y se anotó el tiempo que tardaron en morir. Con el peso promedio de los ratones, el tiempo promedio de muerte y las tablas de la AOAC (1997) se obtuvieron los equivalentes de saxitoxina y las unidades de ratón (UR) por mL de cada uno de los extractos (Sommer y Meyer, 1937; AOAC, 1997). Posteriormente con estos resultados, con el volumen de cultivos cosechados y el conteo celular se pudo obtener la toxicidad promedio de cada célula expresada en picogramos equivalentes de saxitoxina por célula (pg eqSTX/cél).

Posteriormente se prepararon varias diluciones del extracto para obtener las distintas dosis que se utilizaron en el ensayo con camarones: 0.5 MU ( $0.11 \mu\text{g/g STXeq}$ ), 1.0 MU ( $0.22 \mu\text{g/g STXeq}$ ), 5.0 MU ( $1.1 \mu\text{g/g STXeq}$ ) y 20 MU ( $4.4 \mu\text{g/g STXeq}$ ).



**Figura 37.** Bioensayo en ratón para obtener la toxicidad del extracto de toxinas paralizantes de la cepa GCCV-6. **a)** ratones CD-1 (20-23g) utilizados para realizar bioensayo en ratón; **b)** inyección intraperitoneal en ratón CD-1. Fotos: **a)** J. Pérez-Linares y **b)** L. Rivera-González y A. Falcón-Valdés.

### 5.2.1 Diseño del Bioensayo

Una vez que se obtuvo la toxicidad del extracto mediante el bioensayo en ratón, se realizó un experimento agudo por inyección intramuscular en juveniles y adultos de *L. vannamei*. Para lo anterior se utilizaron camarones juveniles de  $4.5 \pm 0.4$  g de peso promedio y  $8.0 \pm 0.5$  cm de longitud promedio (del rostro al telson) (Fig. 38a y b) y adultos reproductores de  $41.7 \pm 4.4$  g de peso promedio y  $18.3 \pm 0.6$  cm de largo promedio (Fig. 39a y b). Los camarones juveniles fueron proporcionados por el Laboratorio de Genética Acuícola (CIBNOR) y los adultos por Acuicultora Mahr, S.A. de C.V.

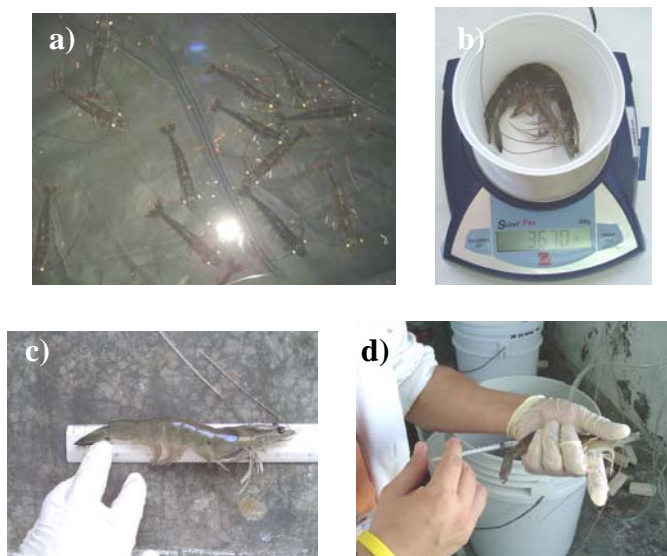
En el caso de los camarones juveniles se hicieron 3 grupos de 5 individuos cada uno. A los organismos del grupo 1 se les inyectaron 100  $\mu$ L de extracto de toxinas paralizantes equivalente a 0.5 UR/g (0.11  $\mu$ g/g STXeq), a los del grupo 2 el equivalente a 1.0 UR/g (0.22  $\mu$ g/g STXeq) y al grupo 3 el equivalente a 5.0 UR (1.1  $\mu$ g/g STXeq). El grupo control fueron inyectados con 100  $\mu$ L del vehículo (HCl 0.1 N). Las inyecciones fueron intramusculares aplicándose las de manera lateral en el último segmento abdominal (VI) (Fig. 38c). Para los adultos se siguió el mismo procedimiento, formando 3 grupos de 4 individuos cada uno. A los organismos del grupo 1 se les inyectó 1 mL de extracto de

toxinas paralizantes equivalente a 5 UR ( $1.1 \mu\text{g/g STXeq}$ ), a los del grupo 2 el equivalente a 20 UR ( $4.4 \mu\text{g/g STXeq}$ ) y a los del grupo 3 fungieron como control y se inyectaron con 1 mL del vehículo (HCl 0.1 N). Las inyecciones fueron intramusculares aplicándose las de manera lateral en el último segmento abdominal (VI) (Fig. 39d).

Una vez inyectados se observó el comportamiento de los organismos y se tomó el tiempo de muerte. Los organismos control se sacrificaron a los 5-7 minutos.



**Figura 38.** Ensayo agudo por inyección intramuscular de toxinas paralizantes en juveniles de *L. vannamei*. **a)** camarones juveniles  $4.5 \pm 0.4\text{g}$  de peso promedio y  $8.0 \pm 0.5\text{cm}$  de longitud promedio **(b)**. Se inyectaron  $100 \mu\text{L}$  de extracto de toxinas paralizantes en concentraciones de 0.5, 1.0 y 5.0 UR en el segmento abdominal VI **(c)**.



**Figura 39.** Ensayo agudo por inyección intramuscular de toxinas paralizantes en adultos de *L. vannamei*. **a)** camarones reproductores machos de  $41.7 \pm 4.4\text{g}$  de peso promedio **(b)** y  $18.3 \pm 0.6\text{cm}$  de longitud promedio **(c)**. Se inyectó  $1\text{mL}$  de extracto de toxinas paralizantes en concentraciones de 5.0 y 20 UR en el segmento abdominal VI **(d)**.

### **5.2.3 Técnicas histológicas**

Todos los organismos muertos en el experimento y los controles que se sacrificaron al final fueron procesados para su análisis histológico. Se fijaron con medio Davidson como se mencionó en el apartado 1.6.5 *Técnicas histológicas*. La única diferencia fue que los camarones adultos, por su tamaño, posteriormente fueron disecados en el primer segmento abdominal para poder manipularlos con los protocolos de deshidratación e inclusión en parafina (Anexo V). Se hicieron observaciones principalmente en el hepatopáncreas, músculo, corazón y ganglio supraesofagal.

## **5.3 Resultados y discusión**

### **5.3.1 Perfil tóxico del extracto**

En el capítulo II se mencionan los protocolos que se siguieron para el análisis del perfil de toxinas paralizantes en la cepa GCCV-6. En el apartado 2.3.1 *Perfil de toxinas* se discuten los resultados obtenidos y en la Figura 12 se pueden observar los cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras de la cepa GCCV-6 y su perfil de toxinas.

Con el bioensayo en ratón se pudo obtener la toxicidad del extracto, la cual fue en promedio de 27.55 UR/mL (6.06 µg eqSTX/mL) y 58.8 pg eqSTX/cél. Estos resultados de toxicidad casi doblan la toxicidad reportada previamente (31 pg eqSTX/cél) para la misma cepa aislada en 2001 (Band-Schmidt *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos son el promedio de más de 20 meses de cultivo de la cepa GCCV-6, varios litros de cultivo cosechados y extractos obtenidos con toxicidades similares. Se ha reportado que el cultivo de cepas tóxicas de dinoflagelado, bajo condiciones de laboratorio, pueden variar (aumentar o disminuir) la toxicidad, el perfil de toxinas y los



ciclos de vida de los dinoflagelados (Marshall *et al.*, 2000; FAO, 2004; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005).

### **5.3.2 Tiempo de muerte y comportamiento**

Los camarones juveniles inyectados con 0.5 UR presentaron un tiempo promedio de muerte de 2' 11", los que fueron inyectados con 1.0 UR de 1' 41" y los de 5.0 UR de 0' 55". Los organismos control no murieron y se sacrificaron a los 5 minutos de haber comenzado el ensayo (Tabla X). Por otro lado, los camarones adultos inyectados con 5 UR tuvieron un tiempo promedio de muerte de 6' 36", mientras que los que fueron inyectados con 20 UR presentaron un tiempo promedio de muerte de 2' 56". Los organismos control se sacrificaron 7 minutos después de haber comenzado el ensayo (Tabla X).

Todos los organismos inyectados (juveniles y adultos) presentaron anomalías en su comportamiento, iniciando con parálisis en los pereiópodos (apéndices caminadores), perdiendo el equilibrio y permaneciendo inmóviles, postrados de costado en el fondo del contenedor. Los movimientos de las branquias así como el de los apéndices mandibulares y pleópodos eran lentos e intermitentes. Se pudieron observar movimientos de órganos internos a pesar de que los camarones ya se encontraban parcialmente paralizados. Todos presentaron espasmos abdominales antes de morir (Tabla X). Los organismos control aún después de haberlos manipulado e inyectado se mantuvieron en posición vertical normal, sostenidos por sus pereiópodos, con movimientos normales de branquias, antenas y apéndices mandibulares. Nunca presentaron espasmos musculares y finalmente se sacrificaron a los 5 minutos.

**Tabla X.** Resumen del ensayo agudo por inyección de toxinas paralizantes de GCCV-6 en juveniles y adultos de *L. vannamei*.

Estadio	Peso prom. g	Largo prom. cm.	Dosis UR	Dosis eq.STX/g	Tiempo de muerte	Síntomas
Juvenil <sup>1</sup>	3.8±0.3	8.3±0.6	0.5	0.11	02'11"	Parálisis de pereiópodos y antenas.
			1.0	0.22	01'41"	
			5.0	1.1	00'55"	Desequilibrio y nado anormal.
			5.0	1.1	06'36"	
Adulto <sup>2</sup>	41.7±4.4	18.3±0.6	20.0	4.4	02'56"	Movimientos irregulares de pleópodos, branquias y maxilípedos.
						Convulsiones, espasmos abdominales y muerte.

<sup>1</sup>100 µL inyectados

<sup>2</sup>1.0 mL inyectado

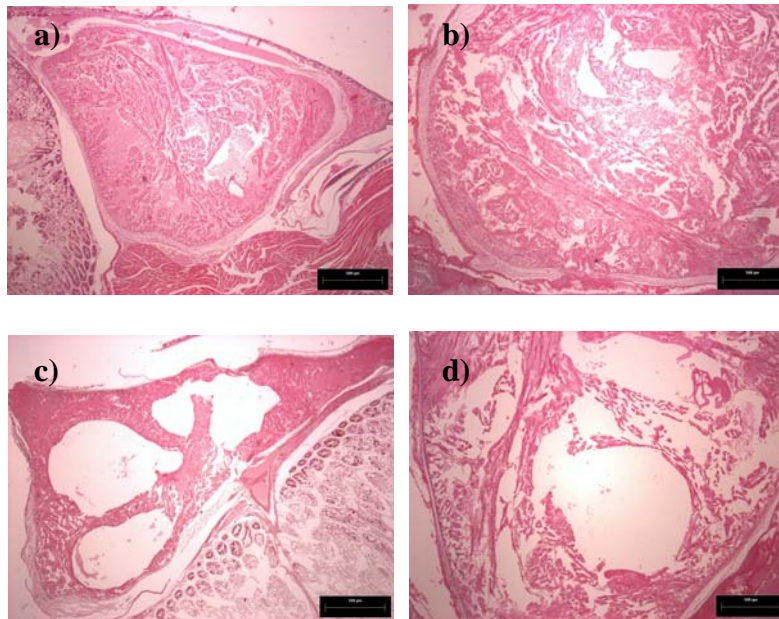
### 5.3.4 Daños en tejidos

Se pudieron evidenciar daños serios en el corazón y el protocerebro de los organismos inyectados (Fig. 40 y Fig. 41). El tejido cardiaco está constituido de paquetes de fibras musculares delgadas (Estrada *et al.*, 1982; Bell y Lightner, 1988; Lesson *et al.*, 1990) por lo que son más susceptibles a cambios abruptos en su capacidad elástica y al estrés causado por la parálisis. Las fibras del miocardio perdieron cohesión y densidad (Fig. 40c y d), al igual que en los experimentos agudo y crónico por ingestión. Al realizar pruebas estadísticas (ANOVA y *t*-Student) entre la densidad promedio de tejido cardiaco de los camarones expuestos y los controles, se corroboró la diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, el neuropilema del ganglio supraesofagal de los camarones inyectados sufrió visibles daños, como en los ensayos agudos y crónicos por ingestión. Las células gliales de la médula del neuropilema presentan lisis y/o pérdida de cohesión (Fig. 41c y d). Como ya se ha discutido previamente, esta región del protocerebro es de suma importancia para el funcionamiento del organismo y cualquier daño o inflamación puede

causar severos problemas a nivel nervioso, fisiológico y de comportamiento (Oliveira-Soares *et al.*, 2004).

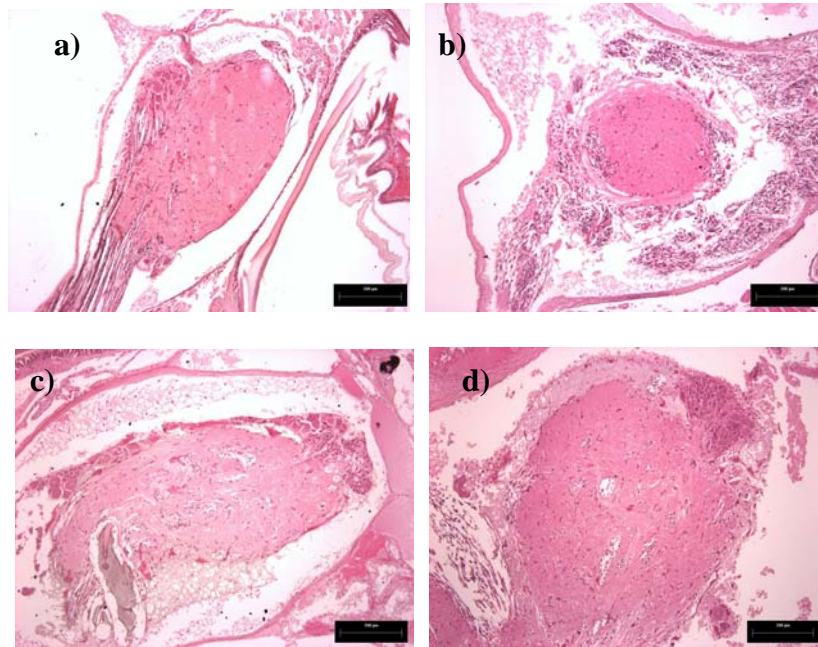
Además de estos tejidos, no se observó daño aparente o anomalías en los otros tejidos/órganos analizados (hepatopáncreas y músculo abdominal).



**Figura 40.** Corte transversal de corazón de camarones inyectados con extractos de GCCV-6. Las micrografías de arriba corresponden a los organismos control: **a)** juvenil y **b)** adulto. Las micrografías de abajo a los organismos inyectados: **c)** juvenil [5.0 UR, 1.1  $\mu\text{g/g}$  STXeq] y **d)** adulto [20.0 UR, 4.4  $\mu\text{g/g}$  STXeq]. Barra= 500  $\mu\text{m}$ . Tinción H-E.

Estos resultados son consistentes con los experimentos realizados por Hwang y colaboradores (1990) quienes encontraron una dosis letal ( $\text{LD}_{99}$ ) de 0.5 UR para tres diferentes especies de camarón. Por otro lado Foxall y colaboradores (1979) reportaron una  $\text{LD}_{99}$  de 0.01  $\mu\text{g}$  PSP/g de peso corporal en *Cancer irroratus* expuesto a toxinas paralizantes de *Gonyaulax tamarensis* con un tiempo de muerte promedio de 20 minutos. Es importante hacer hincapié que el perfil de toxinas que produce cada especie de

dinoflagelado determina la respuesta y el tiempo de muerte de los organismos expuestos (FAO, 2004). Por lo anterior, la cepa GCCV-6 resultó más tóxica que *G. tamarensis*.



**Figura 41.** Corte transversal de ganglio supraesofágico de camarones inyectados con extractos de GCCV-6. Las micrografías de arriba corresponden a los organismos control: **a)** juvenil y **b)** adulto. Las micrografías de abajo a los organismos inyectados: **c)** juvenil [5.0 UR, 1.1  $\mu\text{g/g}$  STXeq] y **d)** adulto [20.0 UR, 4.4  $\mu\text{g/g}$  STXeq]. Barra= 500  $\mu\text{m}$ . Tinción H-E

La ausencia de daños aparentes en el músculo y hepatopáncreas indican que estos tejidos no se ven afectados por estas toxinas suministradas de manera aguda y por vía intramuscular por inyección y/o quizás son órganos que se pueden regenerar rápidamente (Bell y Lightner, 1988; Lesson et al., 1990; Lehane, 2000), que depuran o transforman la toxina a tasas más rápidas que otros (Poli *et al.*, 1990; Cattet y Geraci, 1993; Lehane, 2000).

Como se ha discutido en el capítulo III y IV de los ensayos por ingestión, los daños que se observaron en las células gliales del neuropilema de los camarones, pueden explicar el comportamiento observado (desequilibrio, nado anormal, parálisis de patas, espasmos

abdominales y muerte; Tabla X). Todos estos síntomas son el resultado de la obstrucción del proceso de estímulos y/o interrupción de las conexiones entre el protocerebro y los apéndices y músculos del organismo (Trainer y Baden, 1999; Lehane, 2000; Oliveira-Soares *et al.*, 2004). Estudios en mamíferos han demostrado que altas dosis de toxinas paralizantes afectan las fibras del miocardio, reduciendo la presión sanguínea y causando arritmia, fibrilación ventricular y ataque cardíaco (Guo *et al.*, 1987; Andrinolo *et al.*, 1999; Lehane, 2000), resultados similares a los observados en los camarones.

#### **5.4 Conclusiones**

Del presente capítulo se puede concluir lo siguiente:

1. La cepa GCCV-6 presentó una toxicidad promedio de 27.55 UR/mL (6.06  $\mu\text{g}$  eqSTX/mL) y 58.8 pg eqSTX/cél, con un perfil de toxinas paralizantes dominado por la dcSTX y GTX2,3. Sin embargo, también se detectaron GTX-1,4, NEO y STX.
2. Los camarones juveniles inyectados con 0.5 UR presentaron un tiempo promedio de muerte de 2' 11", los que fueron inyectados con 1.0 UR de 1' 41" y lo de 5.0 UR de 0' 55".
3. Los camarones adultos inyectados con 5 UR tuvieron un tiempo promedio de muerte de 6' 36", mientras que los que fueron inyectados con 20 UR presentaron un tiempo promedio de muerte de 2' 56".
4. Todos los organismos inyectados (juveniles y adultos) presentaron anomalías en su comportamiento, parálisis en los pereiópodos, movimientos irregulares de las branquias, apéndices mandibulares y pleópodos, pérdida del equilibrio y espasmos abdominales.

5. Se encontraron daños en tejidos cardiacos y nerviosos, diferencia significativa en la densidad promedio de las fibras musculares cardiacas de organismos expuestos a las toxinas paralizantes y deterioro de las células gliales del neuropilema del protocerebro. Estos daños explican el comportamiento de los organismos y su muerte.

### **Discusión general**

A lo largo del trabajo se ha presentado la interpretación y discusión de los resultados de cada uno de los capítulos. Esta sección se enfocará en la integración general de los datos obtenidos con una perspectiva sobre la investigación de ficotoxinas y vectores poco convencionales a la población y su análisis.

#### ***Perfil de toxinas de GCCV-6 y KBTX-3***

Los perfiles de toxinas de las dos cepas de dinoflagelados tóxicos utilizadas (GCCV-6 y KBTX-3) se pudieron obtener mediante el uso de técnicas analíticas validadas en estudios interlaboratorio (Lawrence *et al.*, 2004; McNabb *et al.*, 2007). Estos métodos presentan alta sensibilidad y son más confiables que el bioensayo en ratón (Inami *et al.*, 2004; McNabb *et al.*, 2004) y obedecen a la propuesta de nivel internacional para reducir el uso de animales para pruebas en laboratorio y en el caso específico de ficotoxinas, a sustituir el bioensayo en ratón por técnicas alternativas como RBA (Receptor Binding Assay), RIA (Radioimmunoassay), ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), cromatografía líquida y espectrometría de masas (Doucette *et al.*, 1997; Van Dolah y Ramsdell, 2001; Jellett *et al.*, 2002; Woofter *et al.*, 2003; Inami *et al.*, 2004; McNabb *et al.*, 2004; BfR, 2005).

Ambas cepas producen toxinas peligrosas que pueden comprometer la salud del ambiente y de la población. Los resultados mostraron que GCCV-6 posee un perfil de toxinas potentes (STX, NEO, dcSTX, GTX) y con un rendimiento por célula de 58.8 pg eqSTX, ambos datos diferentes a los previamente reportados para la misma cepa o cepas aisladas en la misma región que GCCV-6 (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004a y b; Band-Schmidt *et al.*, 2005; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005; Band-Schmidt *et al.*, 2006). Algunos autores mencionan que el cultivo de cepas tóxicas bajo condiciones de laboratorio pueden modificar sus perfiles de toxinas haciendo difícil su caracterización (Marshall *et al.*, 2000; FAO, 2004; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2005). Sin embargo, otros autores han propuesto utilizar estos perfiles como marcadores bioquímicos de regiones geográficas para *G. catenatum* (Oshima *et al.*, 1993; Band-Schmidt *et al.*, 2006). Debido a estas inconsistencias, es importante hacer hincapié en estandarizar métodos de análisis y utilizar técnicas validadas. La extracción con concentraciones bajas [0.1 N HCl] y tiempos cortos de calentamiento (<5 min.), así como la separación en fase sólida de la muestra (“cleanup” SPE C-18) son pasos clave para obtener un perfil de toxinas de la muestra lo más prístino posible (Gago-Martínez *et al.*, 2001b; Lawrence *et al.*, 2004). Además, este paso ayuda a eliminar compuestos con fluorescencia natural que poseen los dinoflagelados y tejido de camarón para evitar una sobreestimación de su toxicidad (Pérez-Linares *et al.*, 2008).

Por otro lado, la cepa KBTX-3 produce cuatro brevetoxinas (PbTx-1, 2, 3 y 10), de las cuales la PbTx-2 y PbTx-3 son los análogos más comunes en la especie y la PbTx-1 el más peligroso por su toxicidad (Poli *et al.*, 1999; Plakas *et al.*, 2002; Baden *et al.*, 2005). Las condiciones de cultivo pueden variar el perfil de toxinas en *K. brevis* también

(Villareal *et al.*, 2001; Ishida *et al.*, 2004; Baden *et al.*, 2005; Magaña y Villareal, 2006). Al utilizar una extracción con metanol y el análisis con LC-MS se pudo evitar sobreestimar el perfil de toxinas por artificios derivados de los solventes (Plakas *et al.*, 2002; Ishida *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004) y corroborar la presencia de PbTx-1 y PbTx-10. Esto último es una ventaja importante en el método que permite la confirmación de toxinas en los extractos y/o verificar su presencia aunque se carezca de estándares (McNabb *et al.*, 2007).

### ***Ensayos con camarones***

La retención de ficotoxinas en crustáceos ha sido poco investigada y los resultados de este trabajo proveen información valiosa para continuar estudios sobre la cinética de estas toxinas en los camarones y la intervención de su metabolismo en la acumulación, modificación y depuración de neurotoxinas y toxinas paralizantes (Foxall *et al.*, 1979; Roberts *et al.*, 1979; Hwang *et al.*, 1990; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004a; Walker *et al.*, 2004; Pérez-Linares *et al.*, 2008). Con los ensayos realizados se pudo confirmar la susceptibilidad de los camarones a las toxinas de los dinoflagelados, en densidades celulares  $>10^4$  cél/L en tiempos cortos de exposición ( $>48$  h), en densidades celulares bajas ( $10^3$  cél/L) en tiempos más largos de exposición (45 días) y mediante inyección intramuscular ( $>0.11$   $\mu\text{g}$  eqSTX). Debido a la naturaleza química de ambos grupos de ficotoxinas (PSP y NSP), algunos efectos en el camarón fueron diferentes (*e.g.* supervivencia, peso promedio). Las toxinas paralizantes (hidrosolubles) pueden asimilarse de manera más rápida pero al mismo tiempo pueden eliminarse fácilmente por desechos metabólicos (Schantz, 1986; Shimizu *et al.*, 1989; Hwang *et al.*, 1990; Oikawa



*et al.*, 2002 y 2004a), mientras que las brevetoxinas (liposolubles) toman más tiempo en retenerse pero son más persistentes (Poli *et al.*, 1999; Baden *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 1979; Pierce y Henry, 1996; Poli *et al.*, 1999). Los camarones poseen órganos con mayor propensión a retener toxinas paralizantes y neurotoxinas (hepatopáncreas y músculo) debido a la cantidad de sitios de unión (canales de Na<sup>+</sup>) que poseen comparados con otros tejidos, lo que está al mismo tiempo relacionado al tamaño del tejido en proporción al peso corporal del organismo (Poli *et al.*, 1990; Trainer *et al.*, 1990; Andrinolo *et al.*, 1999; Lehane, 2000). Esto es importante para la salud pública, ya que incluso después del período de depuración retuvieron las ficotoxinas en tejidos comestibles. Por otro lado, los daños causados a los órganos (corazón, ganglio supraesofagal y hepatopáncreas) pueden explicar el comportamiento registrado en los organismos, así como los efectos negativos en su porcentaje de alimentación, crecimiento y supervivencia. El hepatopáncreas es el primer órgano de digestión del alimento de los camarones, es muy susceptible a cambios por lo que si presenta algún daño, el organismo se verá afectado en su crecimiento (Lightner, 1996). El protocerebro procesa todos los impulsos nerviosos del organismo (Villa, 1997; Oliveira-Soares *et al.*, 2004) y cualquier daño o lisis en las células gliales desencadena una serie de problemas fisiológicos y motores (Trainer y Baden, 1999). Por su parte, el corazón es el órgano que permite el transporte de la hemolinfa a todo el organismo y se sabe que la irrigación sanguínea es una de las principales vías para la transferencia de toxinas paralizantes y neurotoxinas de un órgano a otro (Guo *et al.*, 1987; Lehane, 2000; Woofter *et al.*, 2003). Todos estos datos son importantes ya que afectan directamente la calidad y producción en la acuicultura de camarón en México.

Finalmente, integrando todos los resultados de los múltiples ensayos que se realizaron en este trabajo se podrá sugerir a la Secretaría de Salud y a la industria camaronícola, tomar medidas serias en el tratamiento de productos de consumo humano si se presume que estuvieron expuestos a dinoflagelados tóxicos. La Norma Oficial Mexicana de Emergencia (NOM-EM-005-SSA1-2001) y los sitios públicos de la Secretaría de Salud y de órganos de gobierno (periódicos, páginas en la Internet, comunicados, etc.) deberán incluir otros vectores de ficotoxinas para la población diferentes a los moluscos y los efectos por exposición crónica a toxinas de dinoflagelados.

### **Conclusiones finales**

Las cepas de *G. catenatum* (GCCV-6) y *K. brevis* (KBTX-3) producen toxinas peligrosas que pueden causar daños severos a los tejidos de los organismos, impactar seriamente la producción camaronícola y la salud pública. Con los resultados obtenidos en los experimentos realizados en este trabajo se pudo corroborar que la exposición aguda y crónica a células de ambos dinoflagelados, así como la inyección intramuscular de extractos de GCCV-6 pueden causar problemas a los camarones, afectando su comportamiento, el porcentaje de alimentación, su crecimiento, supervivencia y resistencia en sus tejidos. Las toxinas paralizantes y las neurotoxinas de GCCV-6 y KBTX-3 provocan daños severos en tejidos gástricos, cardiacos y nerviosos que pueden traer como consecuencia bajo rendimiento en su crecimiento y supervivencia. Además, estas ficotoxinas pueden acumularse en tejidos comestibles (músculo y hepatopáncreas) con períodos cortos de exposición en densidades  $>10^4$  cél/L (considerado ya una “marea roja”) y por períodos largos de tiempo, con densidades bajas de exposición ( $10^3$  cél/L).

Esto es importante para la salud pública ya que los camarones cultivados pueden ser vectores de potentes ficotoxinas para la población.

Este trabajo contribuye al estudio de vectores poco convencionales de ficotoxinas para la población en México, ayudando al mismo tiempo a proteger la producción camaronícola y a fortalecer las investigaciones en salud pública.

### **Recomendaciones**

Los resultados obtenidos en este trabajo podrían servir de base para plantear a las autoridades sanitarias las siguientes recomendaciones:

1. Realizar estudios más profundos y con varios estadios de vida del camarón, sobre la exposición aguda y crónica de ficotoxinas para cuantificar la toxicidad hacia sus órganos y compararla con los límites máximos permitidos a nivel internacional.
2. Realizar estudios sobre la cinética de las toxinas paralizantes y neurotoxinas en los diferentes tejidos de camarón.
3. Llevar a cabo un control riguroso de las ficotoxinas presentes en alimentos de origen marino utilizando metodologías analíticas oficialmente validadas, o en su defecto suficientemente fiables para asegurar la calidad de dichos alimentos y preservar la salud del consumidor.
4. Incluir en la Norma Oficial Mexicana de Emergencia y en comunicados de la Secretaría de Salud datos sobre el peligro potencial de exposiciones crónicas a ficotoxinas tomando en cuenta otros vectores posibles diferentes a los moluscos bivalvos (*e.g.* camarones, cangrejos, calamares, pulpos, peces).

## Referencias

- Alday, V.** y T.W., Flegel. 1999. Diagnosis of shrimp diseases: with emphasis in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). FAO/Asia Co. Bangkok, Thailandia.
- Alonso-Rodríguez, R.** y F. Páez-Osuna. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture*, 219: 317-336.
- Alonso-Rodríguez, I.** Gárate-Lizárraga, B. Luckas, K. Reinhardt y J. Bustillos. 2004a. Mortalidad de larvas y camarón en cultivos de Sinaloa, México, asociado a mareas rojas de *Gymnodinium catenatum*. XIII Reunión Internacional de la Sociedad de Planctología, A.C.. Nayarit, México.
- Alonso-Rodríguez, R.,** Páez-Osuna, F. y Gárate-Lizárraga, I. 2004b. El fitoplancton en la camaronicultura y larvicultura: importancia de un buen manejo. CESASIN-ICMyL, UNAM. México, 147 pp.
- Anderetta, E.** y E. Alfonso. 1997. Estado de produção mundial de pós-arvas de camarão marhino. *In: Memorias II Curso Internacional "Produção de pós-larvas de camarão marhino"*. LCM, UFSC. Univ. Fed. de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil.
- Andrinolo, D.,** L.F. Micheab y N. Lagos. 1999. Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats. *Toxicon*, 37(3): 447-464.
- AOAC.** 1997. Official Method 959.08. Paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. Pp 22-23. *In: Chapter 35: Fish and other marine products, Sec. 35.1.37. AOAC International*, Gaithersburg, MD, E.U.A.

- Baden**, D.G., A.J. Bourdelais, H. J., S. Michelliza y J. Naar. 2005. Natural and derivative Brevetoxins: Historical Background, Multiplicity, and Effects. *Environmental Health Perspectives*. 113(5): 621-625.
- Band-Schmidt**, C.J., J.J. Bustillos-Guzmán, I. Gárate-Lizárraga, C.H. Lechuga-Devéze, K. Reinhard y B. Luckas. 2005. Paralytic shellfish toxin profile in strains of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten ventricosus* G.B. Sowerby II from Bahía Concepción, Gulf of California, México. *Harmful Algae*, 4(1):21-23.
- Band-Schmidt**, C., J. Bustillos-Guzman, L. Morquecho, I. Gárate-Lizárraga, R. Alonso—Rodríguez, A. Reyes-Salinas, K. Erler and B. Luckas. 2006. Variations of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (dinophyceae) strains isolated from three locations in the Gulf of California, Mexico. *Journal of Phycology*, 42(4): 757-768.
- Bell**, T.A. y D.V. Lightner. 1988. A handbook of normal Penaeid shrimp histology. Aquaculture Development Program, State of Hawaii, E.U.A. 114 pp.
- BfR** (Bundesinstitut für Risikobewertung). 2005. Analysis of marine biotoxins. Approaches to validation and regulatory acceptance of alternative methods to the mouse bioassay as method of reference. Position paper. BfR Nr 013/2005. Alemania, 42 pp.
- Biegalski**, S.R. y T.A. Villareal. 2005. Correlations between atmospheric aerosol trace element concentrations and red tide at Port Aransas, Texas, on the Gulf of Mexico. *J. of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 263(3): 767-772.

- Blackburn**, S. I., G. M. Hallegraeff y C. J. Bolch. 1989. Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania, Australia. *J. Phycol.* 25: 577-590.
- Burkholder**, J.M. 1998. Implications of harmful algal microalgae and heterotrophic dinoflagellates in management of sustainable marine fisheries. *Ecological Applications*, 8(1): 537-562.
- Bury**, N.R., A.D. Newlands, F.B. Eddy y G.A. Codd. 1998. *In vivo* and *in vitro* intestinal transport of <sup>3</sup>H-microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 42:139-148.
- Cattet**, M. y J.R. Geraci. 1993. Distribution and elimination of ingested brevetoxin (PbTx-3) in rats. *Toxicon*, 31(11): 1483-1486.
- Carmichael**, G.M. y I.R. Falconer. 1993. Disease related to freshwater algal blooms. Pp 187-209. *In*: I.R. Falconer (ed.). Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press. E.U.A. 540 pp.
- Catterall**, W.A. y M. Risk. 1981. Toxin T4(6) from *Ptychodiscus brevis* (formerly *Gymnodinium breve*) enhances activation of voltage-sensitive sodium channels by veratridine. *Mol Pharmacol.*, 19(2):345-348.
- Cembella**, A.D., L. Milenkovic, G. Dousette y M. Fernández. 1995. *In vitro* biochemical methods and mammalian bioassays for phycotoxins. Pp. 177-228. *In: Manual on harmful marine microalgae*. Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cembella y H.O. Enevoldsen (eds). IOC-UNESCO. Francia, 551 pp.

- Cheng**, Y.S., T.A. Villareal, Y.Zhou, J. Gao, R.H. Pierce, D. Wetzel, J. Naar y D.G. Baden. 2005. Characterization of red tide aerosol on the Texas coast. *Harmful Algae*, 4: 87-94.
- Codd**, G.A., C.J. Ward, K.A. Beattie y S.G. Bell. 1999. Widening perceptions of the occurrence and significance of cyanobacterial toxins. En: Peshek, G.A., W. Loffelhardt y G. Schmetterer (eds.). *The Phototrophic prokaryotes*. Kluwer Academic Press. E.U.A. 460 pp.
- CONAPESCA**. 2007. Estadísticas de producción de camarón de acuicultura y pesca. CONAPESCA: Dirección General de Planeación, Programación y Evaluación. México. 47 pp.
- Cortés-Altamirano**, R. y L. Núñez-Pastén. 1992. Doce años de registros de mareas rojas en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Anal. Inst. Ciencias del Mar y Limnología. UNAM*. 19: 113-121.
- Cortés-Altamirano**, R. y D.U. Hernández-Becerril. 1995. Especies responsables y probables de mareas rojas. Pp. 43-79. *In: Las Mareas Rojas*. Cortés-Altamirano, R. (ed.). AGT Editor, S.A. México, 161 pp.
- Cortés-Altamirano**, R., A. F. Manrique y R. Luna-Soria. 1995. Mareas Rojas en México: una revisión. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 37: 343-352.
- Cortés-Altamirano**, R., F.A. Manrique y R. Luna-Soria. 1997. Harmful phytoplankton blooms in shrimp farms from Sinaloa, México. Pp. 50. *In: Abstracts VIII International Conference on Harmful Algae*. IOC-UNESCO. Vigo, España.
- Cortés-Altamirano**, R. y A. Sierra-Beltrán. 2008. Biotoxins from freshwater and marine harmful algal blooms occurring in Mexico. *Toxin Reviews* , 27: 27-77.

- De la Cruz**, S. 1992. Prueba de resistencia a baja salinidad de las poslarvas de *Penaeus schmitti*. *Rev. Inv. Marinas*, 13(2): 152-158.
- De la Garza**, J. 1983. Intoxicación alimentaria por ingestión de mariscos contaminados. *Salud Pública México*. 25:145-150.
- Doucette**, G.J., M.M. Logan, J.S. Ramsdell and F.M. Van Dolah. 1997. Development and preliminary validation of a microtiter plate-based receptor binding assay for paralytic shellfish poisoning toxins. *Toxicon* 35: 625–636.
- Dore**, I. y F. Claus. 1987. An illustrated guide to shrimp of the world. Van Nostrand Reinhold. New York, E.U.A., 229 pp.
- Estrada** F.E., Z.L. Peralta y M.P. Ricas. 1982. Manual de Técnicas Histológicas. AGT Eitores, México. 230 pp.
- FAO**. 2004. Marine Biotoxins. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Roma, Italia, 281 pp.
- FAO**. 2006. Yearbook of Fishery Statistics 2004. Aquaculture production. Vol. 98/2. Roma, Italia. FAO, 212 pp.
- Falconer**, I. 1993. Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press. E.U.A. 380 pp.
- FDA**. 2001. Natural Toxins. Ch. 6. *In Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*. 3<sup>rd</sup> ed., p. 73-82. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington, DC.
- Fernández**, M.L., A. Miguez, A. Morono, E. Cacho, A. Martínez y J. Blanco. 1998. Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. Pp. 449-452. *In: Harmful Algae*. Reguera, B., J.



Blanco, M.L. Fernández y T. Wyatt (eds.). Xunta de Galicia and IOC-UNESCO. España, 650 pp.

**Fleming**, L.E., J.A. Bean y D.G. Baden. 1995. Epidemiology and public health. Pp 475-487. *In: Manual on harmful marine microalgae*. Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cembella y H.O. Enevoldsen (eds). IOC-UNESCO. Francia, 551 pp.

**Flewelling**, J.L., J.P. Naar, J.P. Abbott, D.G. Baden, N.B. Barros, G.D. Bossart, M.D. Bottein, D.G. Hammond, E.M. Haubold, C.A. Heil, M.S. Henry, H.M. Jacocks, T.A. Leighfield, R.H. Pierce, T.D. Pitchford, S.A. Rommel, P.S. Scott, K.A. Steidinger, E.W. Truby, F.M. Van Dolah y J.H. Landsberg. 2005. Brevetoxicosis: Red tides and marine mammal mortalities. *Nature* (Brief Communication), 435: 755-756.

**Flores-Campaña**, L.M. 1990. La problemática del cultivo de camarón en Sinaloa. *Inter.*, 1(1): 11-17.

**Foxall**, T.L., N.H. Shoptaugh, M. Ikawa y J.J. Sasner . 1979. Secondary intoxication with PSP in *Cancer irroratus*. Pp. 413-418. *In: Toxic Dinoflagellate Blooms*. Taylos, D.L. y H.H. Seliger (eds). *Elsevier*. E.U.A., 505 pp.

**Gago-Martínez**, A., S. Aldea-Moscoso, J.M. Leão-Martins, J.A. Rodríguez-Vázquez, B. Niedzwiadek y J.F. Lawrence. 2001a. Effect of pH on the oxidation of paralytic shellfish poisoning toxins for analysis by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 905: 351-357

**Gago-Martínez**, A., S. Aldea-Moscoso, J.M. Leão-Martins, B. Niedzwiadek y J.F. Lawrence. 2001b. Improvement in sample preparation steps for the

prechromatographic oxidation HPLC-fluorescence determination of paralytic Shellfish toxins in naturally contaminated samples of shellfish and algae. *In: Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium*. Pp. 393-399. Ponsen & Looyen, Wageningen, Holanda.

**Gárate-Lizárraga**, I., J.J. Bustillos-Guzmán, K. Erler, M.S. Muñetón-Gómez, B. Luckas y A. Tripp-Quezada. 2004a. Paralytic shellfish toxins in the chocolata clam, *megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae), in Bahía de La Paz, Gulf of California. *Rev. Biol. Trop.*, 52(1): 133-140.

**Gárate-Lizárraga**, I., J.J. Bustillos-Guzmán, R. Alonso-Rodríguez y B. Luckas. 2004b. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in two marine bivalves during outbreaks of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 378-402.

**Gárate-Lizárraga**, I., J.J. Bustillos-Guzmán, L. Morquecho, C.J. Band-Schmidt, R. Alonso-Rodríguez, K. Erler, B. Luckas, A. Reyes-Salinas and D.T. Góngora-González. 2005. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in the strains of *Gymnodinium catenatum* Graham from the Gulf of California, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 50: 208–236.

**Guillard**, R.R.L. y J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.

**Guillard**, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Pp. 26-60. *In: Smith, W.L. y M.H. Chanley (eds.). Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press. New York, EUA.

- Guilland**, J.A. y B.J. Rothschild. 1984. Penaeid shrimps, their biology and management. Fishing News Books Limited. Gran Bretaña, 308 pp.
- Guo**, X.T., A. Uehara, A. Ravindran, S. Bryant, S. Hall y E. Moczydlowski. 1987. Kinetic basis for insensitivity to tetrodotoxin and saxitoxin in sodium channels of canine heart and denervated rat skeletal muscle. *Biochemistry* 26(24): 7546–7556.
- Hall**, S., G. Strichartz, E. Moczydlowski, A. Ravindran y P.B. Reichardt. 1990. The saxitoxins. Pp. 29-65. *In: Marine toxins. Origin, structure, and molecular pharmacology.* Hall, S. y G. Strichartz (eds.). American chemical Society. E.U.A., 377 pp.
- Hallegraeff**, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32(2): 79-99.
- Hallegraeff**, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cembella y H.O. Enevoldsen. 1995. *Manual on harmful marine microalgae.* IOC-UNESCO. Francia, 551 pp.
- Hendrickx**, M.E. 1996. Los camarones penaeidos bentónicos (Crustacea: Decápoda: Dendrobranquiata) del Pacífico Mexicano. CONABIO. ICMYL. UNAM. México, 147 pp.
- Hewitt**, C.L., R.B. Martin, C. Sliwa, F.R. McEnulty, N.E. Murphy, T. Jones y S. Cooper. 2002. Editors. National Introduced Marine Pest Information System. Web publication <<http://crimp.marine.csiro.au/nimpis>>, Date of access: 17-Aug-2005
- Hokama**, Y. 1993. Recent methods for detection of seafood toxins: recent immunological methods for ciguatoxin and related polyethers. *Food Addit. Contam.* 10:71-82.

- Horowitz**, W. 2006. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International. Maryland, EUA, 254 pp.
- Hummert**, C., Ritscher, M., Reinhardt, K., Luckas, B., 1997. Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of Alexandrium by HPLC based on ion-pair chromatographic separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia*, 45:312–316.
- Hwang**, D.F., C.H. Chueh y S.S. Jeng. 1990. Susceptibility of fish, crustacean and mollusk to tetrodotoxin and paralytic shellfish poison. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(2): 337-343.
- Inami**, G.B., C. Crandall, D. Csuti, M. Oshiro and R.A. Brenden. 2004. Feasibility of reduction in use of the Mouse Bioassay: presence/absence screening for saxitoxin in frozen acidified mussel and oyster extracts from the coast of California with in vitro methods. *J. of AOAC International*, 87(5): 1133-1142.
- Ishida**, H., A. Nozawa, H. Nukaya, L. Rhodes, P. McNabb, P.T. Holland and K. Tsuji. 2004. Confirmation of brevetoxin metabolism in cockle, *Austrovenus stutchburyi*, and greenshell mussel, *Perna canaliculus*, associated with New Zealand neurotoxic shellfish poisoning, by controlled exposure to *Karenia brevis* culture. *Toxicon*, 43(6): 701-712.
- Jellett**, J.F., R.L. Roberts, M.V. Laycock, M.A. Quilliam and R.E. Barrett. 2002. Detection of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in shellfish tissue using MIST Alert (TM), a new rapid test, in parallel with the regulatory AOAC (R) mouse bioassay. *Toxicon*, 40(10): 1407–1425.

- Jeong**, H.J., H.R. Kim, K.I. Kim, K.Y. Kim, K.H. Park, S.T. Kim, Y.D. Yoo, J.Y. Song, J.S. Kim, K.A. Seong, W.H. Yih y S.J. Pae. 2002. NaOCl produced by electrolysis of natural seawater as a potential method to control marine red-tide dinoflagellates. *Phycologia*, 41(6): 643-656.
- Jory**, D.E. 2001. Manejo integral del alimento de camarón, de estanques de producción camaroneros y principios de bioseguridad. Memorias del Curso Lance en Acuicultura. Monterrey, N.L. México. 26-30 Marzo, 2001.
- Karnovsky**, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixation of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137-138.
- Karunasagar**, I., S.K. Otta y I. Karunasagar. 1997. Harmful algal blooms in shrimp culture ponds in India. Pp. 111. En: Abstracts VIII International Conferencie on Harmful Algae. IOC-UNESCO. Vigo, España.
- Khan**, S.A., M.L. Wickstrom, W.M. Hashek, D.J. Schaeffer, S. Gosh y V.R. Beasley. 1996. Microcystin-LR and kinetics of cytoskeletal reorganization in hepatocytes, kidney cells and fibroblast. *Natural Toxins*, 4: 206-214.
- Landsberg**, J.H. 1996. Neoplasia and biotoxins in bivalves: is there a connection? *J. of Shellfish Research*. 15(2): 203-230.
- Landsberg**, J.H. y S.E. Shumway. 1998. Harmful algal blooms and their effects on marine and estuarine animals. Memorias del III Simposio Internacional de Salud en Animales Acuáticos. E.U.A. pp 58-63.
- Lawrence**, J.F., C. Mènard, and C. Cleroux. 1995. Evaluation of prechromatographic oxidation for liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poisons in shellfish. *Journal of AOAC International*. 78: 514-520.

- Lawrence, J.F., B. Niedzwiadek y C. Ménard.** 2004. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*, 87(1): 83-100.
- Lawrence, A.L., F.L. Castille, M. Speed, D.A. McKee y K.I. Page.** 1998. A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae. *Aquaculture*, 165: 233-242.
- Leño-Martins, J.M.** 1998. Nuevos estudios sobre la determinación de toxinas paralizantes en moluscos bivalvos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica y Alimentaria. Universidad de Vigo, España, 287 pp.
- Leño-Martins, J.M., A. Gago, J.A. Rodríguez-Vázquez, E.C. Agüete, M.M. Omil y M. Comesaña.** 1998. Solid phase extraction and High performance liquid chromatography procedures for the analysis of paralytic shellfish toxins. *J. of Chromatography*, 798: 131-136.
- Lehane, L.** 2000. Paralytic Shellfish Poisoning: A review. National Office of Animal and Health, Agriculture, Fisheries and Forestry Plant. Canberra, Australia, 56 pp.
- Lesson, T.S., C.R. Lesson y A.A. Paparo.** 1990. Texto/Atlas de Histología. Interamericana McGraw-Hill. México, 741 pp.
- Lightner, D.V.** 1983. Diseases of cultured penaeid shrimps. Pp. 289-320. En: McVey, J.P. y J.R. Moore (eds.). *CRC handbook of mariculture*. Vol. I. CRC Press. Florida, E.U.A. 422 pp.
- Lightner, D.V.** 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*. E.U.A., 321 pp.

- Llewellyn**, L.E. 1997. Haemolymph protein in xanthid crabs: its selective binding of saxitoxin and possible role in toxin bioaccumulation. *Marine Biology*, 128:599-606.
- López-Cortés**, A. 1999. Population changes of benthic cyanobacteria during a shrimp production operation. *Algological Studies*, 94: 245-248.
- Magaña**, H.A., C. Contreras y T.A. Villareal. 2003. A historical assessment of *Karenia brevis* in the western Gulf of Mexico. *Harmful Algae*, 2: 163-171.
- Magaña**, H.A. y T.A. Villareal. 2006. The effect of environmental factors on the growth rate of *Karenia brevis* (Davis) G. Hansen and Moestrup. *Harmful Algae*, 5:192–198.
- Marshall**, H.G., A.S. Gordona, D.W. Seaborn, B. Dyera, W.M. Dunstanb and A. M. Seaborn. 2000. Comparative culture and toxicity studies between the toxic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* and a morphologically similar cryptoperidiniopsoid dinoflagellate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 255(1): 51-74.
- Mazón**, J.M., F. Magallón, G. Portillo y A. Hernández. 1996. Cultivo de camarón *Penaeus* sp. Pp551-569. En: Casas-Valdéz, M. y G. Ponde-Díaz (eds.). Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. FAO.
- McFarren**, E.F., M.L. Schaffer, J.E. Campbell, K.H. Lewis, E.T. Jensen y E.J. Schantz E.J. 1958. Public health significance of paralytic shellfish poison. *Adv. Food Res.* 10: 135-179.
- McNabb**, P., P. Holland, V.R. Ginkel and A. Selwood. 2004. Using liquid chromatography spectrometry (LCMS) to manage shellfish harvesting and

protect public health. Book of abstracts, 5<sup>th</sup> International Conference on Molluscan Shellfish Safety, 14th-18th June, 2004. National University of Ireland at Galway.

**McNabb**, P.S., P.T. Holland, A.I. Selwood y R.V. Ginkel. 2007. Single laboratory validation of an LC-MS method for brevetoxin in shellfish. *Book of Abstracts 121<sup>st</sup> AOAC International Annual Meeting & Exposition*. Anaheim, CA, EEUU., 165 pp.

**Muñoz-Cabrera**, L. 1998a. Toxicología de las mareas rojas. Pp 81-87. *In: Las Mareas Rojas*. Cortés-Altamirano, R. (ed.). AGT Editor, S.A. México, 161 pp.

**Muñoz-Cabrera**, L. 1998b. Intoxicación en humanos. Pp 89-93. *In: Las Mareas Rojas*. Cortés-Altamirano, R. (ed.). AGT Editor, S.A. México, 161 pp.

**NOM-EM-005-SSA1-2001** (Norma Oficial de Emergencia). 2001. Salud Ambiental. Especificaciones sanitarias para el control de los moluscos bivalvos expuestos a la marea roja. Criterios para proteger la salud de la población. Diario Oficial. México, 14 pp.

**Ochoa**, J.L. A. Sánchez-Paz, A. Cruz-Villacorta, E. Núñez-Vázquez y A. Sierra-Beltrán. 1997. Toxic events in the northwest Pacific coastline of México during 1992-1995: origin and impact. *Hydrobiologia*, 352: 195-200.

**Ochoa**, J.L., A. Sierra-Beltrán, G. Alonso-Colmenares, H. Barradas-Sánchez, A. Cruz-Villacorta, E. Núñez-Vázquez y A. Sánchez-Paz. 1998. Biotoxins in the Pacific Coast of México. Pp. 441-448. *In: Mycotoxins and Phycotoxins. Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*. Miraglia, M., H. Van Egmond, C. Brera y J. Gilbert (eds.). E.U.A.



- Ochoa**, J.L. 2003. Mareas rojas. Proliferaciones micro-algales nocivas y biotoxinas marinas en México. SEP/CIBNOR/Gob. Est. BCS. 83 pp.
- Ochoa**, J.L., E.J. Néñez-Vázquez y J. Saad. 2003. Diferentes términos utilizados para describir las “mareas rojas”. *Rev. Biol. Trop.* 51(3-4): 621-628.
- Ochoa**, J.L., J. Pérez-Linares, C. Rodríguez-Jaramillo y E. Núñez-Vázquez. 2004. Impacto de cianobacterias tóxicas en el cultivo de camarón blanco en México. *Panorama Acuícola*. Nov/Dic., 34-36 pp.
- Oikawa**, H., T. Fujita, M. Satomi, T. Suzuki, Y. Kotani, y Y. Yano. 2002. Accumulation of paralytic shellfish poisoning toxins in the edible shore crab *Telmessus acutidens*. *Toxicon*, 40: 1593-1599.
- Oikawa**, H., M. Satomi, S. Watabe y Y. Yano. 2004a. Accumulation and depuration rates of paralytic shellfish poisoning toxins in the shore crab by feeding toxin mussel under laboratory controlled conditions. *Toxicon*, 45(2): 163-169.
- Oikawa**, H., T. Fujita, K. Saito, S. Watabe, M. Satomi y Y. Yano. 2004b. Comparison of paralytic shellfish poisoning toxin between carnivorous crabs (*Telmessus acutidens* and *Charybdis japonica*) and their prey mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in an inshore food chain. *Toxicon*, 43(6), 713-719.
- Oliveira-Soares**, P. A., J.H. Charles-Delabie y J.E. Serrão. 2004. Neuropile Organization in the Brain of *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae) during the Post-Embryonic Development. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 4:635-641.
- Orbe**, A. y A. Arias. 1987. Métodos de cultivo de camarón en México. SEPESCA, 2a ed. México, 29 pp.

- Oshima, Y., S.I. Blackburn and G.M. Hallegraeff.** 1993. Comparative study on paralytic shellfish toxin profiles of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Marine Biology*, 116(3): 471-476.
- Oshima, Y.** 1995. Post-column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons. *In: Manual on harmful marine microalgae.* Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cembella y H.O. Enevoldsen (eds), p. 81-94. IOC-UNESCO. Francia.
- Patockaa, J. y L. Stredab.** 2002. Brief review of natural nonprotein neurotoxins. *Applied Science Analysis Newsletter*. 89(2): 1-13.
- Pérez Farfante, I. y B. Kensley.** 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle*, Paris, France. 233 pp
- Pérez-Linares, J., M. Cadena, C. Rangel, M.L. Unzueta-Bustamante y J.L. Ochoa.** 2003. Effect of *Schizotrix calcicola* on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (*Penaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture*, 218: 55-65.
- Pérez-Linares, J., J.L. Ochoa y A. Gago-Martínez.** 2008. Effect of PSP Toxins in White Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *J.Food Science*, 73(4): 233-237.
- Pierce, R.H.** 1995. Mote Marine Red Tide Studies July 11, 1994-June 30, 1995. Florida Department of Environmental Protection. Contract No. MR042. Mote Marine Technical Report No. 429. Mote Marine Laboratory Library. Florida, EUA, 64 pp.
- Pierce, R. y M. Henry.** 1996. Brevetoxin analysis in Manatee mortality-related samples: Results of Manatee lung tissue analyses. Marine Pathobiology, Eckard College.

- Mote Marine Laboratory Technical Report No 474. Mote Marine Laboratory Library. Florida, EUA, 4 pp.
- Plakas, S.M, K.R. El Said, E.L.E. Jester, H.R. Granade, S. M. Musser and R.W. Dickey.** 2002. Confirmation of brevetoxin metabolism in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by controlled exposures to pure toxins and to *Karenia brevis* cultures. *Toxicon*, 40(6): 721-729.
- Poli, M. A., C.B. Templeton, W.L. Thompson y J.F. Hewetson.** 1990. Distribution and elimination of brevetoxin PbTx-3 in rats. *Toxicon*, 28(8): 903-910.
- Poli, M. A., C.B. Templeton, J.G. Pace y H.B. Hines.** 1999. Detection, metabolism and patophysiology of Brevetoxins. Pp. 176-191. *In: Marine toxins. Origin, strusture, and molecular pharmacology.* Hall, S. y G. Strichartz (eds.). American chemical Society. E.U.A., 377 pp.
- Premazzi, G. y L. Volterra.** 1993. Microphyte toxins. Joint Research Center. Italy. 336 pp.
- Provasoli, L., J.J.A. McLaughlin y M.R. Droop.** 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* 25: 392-428.
- Ramírez-Camarena, C., E. Cabrera-Mancilla y L. Muñoz-Cabrera.** 1999. Mortandad de peces asociada a florecimientos de *Gymnodinium breve*, en las costas del Golfo de México, México. En: VIII Congreso Latinoam. Ciencias del Mar. Pp. 604-605.
- Rodríguez de la Cruz, C.** 1987. Crustáceos Decápodos del Golfo de California. SEPESCA. México, 306 pp.
- Roberts, B.S., G.E. Henderson y R.A. Medlyn.** 1979. The effects of *Gymnodinium breve* toxin(s) on selected mollusks and crustaceans. Pp. 419-424. *In: Toxic*

- Dinoflagellate Blooms. Taylos, D.L. y H.H. Seliger (eds). Elsevier. E.U.A., 505 pp.
- Saker**, M.L. y G.K. Eaglesham. 1999. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissue of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon*, 37: 1065-1077.
- Schantz**, E.J. 1986. Chemistry and biology of saxitoxin and related toxins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 479 (1): 15–23.
- Scoging**, A.C. 1998. Marine biotoxins. *J. of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 84: 41-50.
- Shimizu**, Y., S. Gupta, K. Masuda, L. Maranda, C.K. Walker y R. Wang. 1989. Dinoflagellate and other microalgal toxins: chemistry and biochemistry. *Pure and App. Chem.*, 61(3): 513-516.
- Shumway**, S.E. 1990. A review of the effects of global blooms on shellfish and aquaculture. *J. of World Aquaculture Society*, 21(2): 65-104.
- Sierra-Beltrán**, A.P., A. Cruz, E. Nuñez, L.M. Del Villar, J. Cerecero y J.L. Ochoa. 1998. An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon* 36(11): 1493-1502.
- Sommer**, H. y K.F. Meyer. 1937. Paralytic shellfish poisoning. *American Medical Association Archives of Pathology*. 24:560–98.
- Strichartz**, G. y N. Castle. 1990. Pharmacology of marine toxins: effects on membrane. Pp. 2-20. *In: Marine toxins. Origin, structure, and molecular pharmacology*. Hall, S. y G. Strichartz (eds.). American chemical Society. E.U.A., 377 pp.

- Throndsen, J.** 1995. Estimating cell numbers. Pp 63-94. *In: Manual on harmful marine microalgae.* Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cembella y H.O. Enevoldsen (eds). IOC-UNESCO. Francia, 551 pp.
- Tolivia, J., A. Navarro y D. Tolivia.** 1994. Polychromatic staining of epoxy semithin sections: a new and simple method. *Histochemistry*, 101:51-55.
- Trainer, V.L., R.A. Edwards, A.M. Szmant, A.M. Stuart, T.J. Mende y D.G. Baden.** 1990. Brevetoxins: unique activators of voltage-sensitive sodium channels. Pp. 167-175. *In: Marine toxins. Origin, structure, and molecular pharmacology.* Hall, S. y G. Strichartz (eds.). American chemical Society. E.U.A., 377 pp.
- Trainer, V.L. y D.G. Baden.** 1999. High affinity binding of red tide neurotoxins to marine mammal brain. *Aquatic Toxicology*, 46(2): 139-148.
- UNESCO.** 1979. Ninth report of the joint panel on oceanographic tables and standards. UNESCO, ICES, SCOR, IAPSO. Paris, Francia, 33 pp.
- Van Dolah, F.M. and J.S. Ramsdell.** 2001. Review and assessment of in vitro detection methods for algal toxins. *Journal of AOAC International*, 84: 1617–1625.
- Villa, M.** 1997. Vías nerviosas: neuronas y neurofibrillas. *Electroneurobiología*, 4(3):1-53.
- Villalón, J.R.** 1991. Practical manual for semi-intensive commercial production of marine shrimp. Texas A&M Sea Grant College Program. E.U.A. 104 pp.
- Villareal, T.A., M.A. Brainard y L.W. McEachron.** 2001. *Gymnodinium breve* (Dinophyceae) in the western Gulf of Mexico: resident versus advected populations as a seed stock for blooms, p. 153-156. *In: Hallegraeff, G.M., S.I.*

- Blackburn, C.J. Bolch y R.J. Lewis (eds). Harmful Algal Blooms. 2000. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Paris, Francia.
- Walker**, C., J. Winstead, S. Foss, J. Kurtz, J. Watts, J. Scott y W. Fisher. 2004. Acute and chronic toxicity of brevetoxin to oysters and grass shrimp. Abstracts of the 25<sup>th</sup> Annual Meeting of The Society of Environmental Toxicology and Chemistry. SETAC, Oregon, EUA.
- Wang**, Z., S.M. Plakas, K.R. El Said, E.L.E. Jester, H.R. Granade and R.W. Dickey. 2004. LC/MS analysis of brevetoxin metabolites in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Toxicon*, 43: 455-465.
- Wannemacher**, R. W. 1989. Procedures for Inactivation and Safety Containment of Toxins. *In: Proceeding of the Symposium on Agents of Biological Origin*, U.S. Army Research, Development and Engineering Center. *Aberdeen Proving Ground*, Maryland, EUA, 15-122 pp.
- WHO**. 1989. Report of WHO consultation on public health aspects of seafood-borne zoonotic diseases. *World Health Organisation*, Hanover, Alemania. 14–16 pp.
- Woofter**, R., M.Y. Bottein-Dechraoui, I. Garthwaite, N.R. Towers, C. J. Gordon, J. Córdova and J.S. Ramsdell. 2003. Measurement of brevetoxin levels by radioimmunoassay of blood collection cards after acute, long-term, and low-dose exposure in mice. *Environmental Health Perspectives*, 111(13): 1595-1600.

**Anexos**

## Anexo I

### Preparación del medio f/2 + Se

(Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975)

Para preparar 1000 mL de medio utilizar agua marina a 33 ups y filtrada en membrana de 0.5  $\mu$ m. Esterilizar en autoclave (121°C, 15 lb, 20 min.) y dejar enfriar. Posteriormente se adicionan las siguientes cantidades de soluciones stock:

Cantidad	Solución stock
1 mL	Nitratos
1 mL	Fosfatos
1 mL	Metales traza
0.5 mL	Vitaminas

#### Preparación de Soluciones Stock:

1. Para preparar cada solución stock utilizar 100 mL de agua destilada y agregar:

Cantidad	Compuesto	Solución Stock
7.5 g	NaNO <sub>3</sub>	Nitratos
0.5 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	Fosfato
0.315 g	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Metales traza
0.436 g	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	
25 $\mu$ L	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	
75 $\mu$ L	H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	
100 $\mu$ L	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	
100 $\mu$ L	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	
100 $\mu$ L	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	
100 $\mu$ L	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	

Homogenizar cada stock y esterilizar en autoclave (121°C, 15 lb, 20 min.). Conservar a 4°C y protegidos de la luz. Usar hasta que estén fríos.

2. Para preparar la solución stock de vitaminas utilizar 100 mL de agua destilada y agregar:

Cantidad	Compuesto	Concentración [M]
0.1 mL	Vitamina B <sub>12</sub> (cianocobalamina)	1 x 10 <sup>-10</sup> M
1 mL	Biotina	2 x 10 <sup>-9</sup> M
20 mg	Tiamina · HCl	3 x 10 <sup>-7</sup> M

Homogenizar y esterilizar mediante filtración con membrana de 0.2  $\mu$ m. ya que si se esteriliza en autoclave se pueden desnaturalizar las vitaminas. Conservar a 4°C y protegido de la luz. Usar hasta que esté frío.



## Anexo II

### Preparación del medio GSe

(Provasoli *et al.*, 1957)

Para preparar 1000 mL de medio utilizar agua marina a 33 ups y filtrada en membrana de 0.5  $\mu\text{m}$ . Esterilizar en autoclave (121°C, 15lb, 20 min.) y dejar enfriar. Posteriormente se adicionan las siguientes soluciones:

Cantidad	Solución stock
20 mL	Nutrientes
5 mL	Extracto de suelo

#### Preparación de Soluciones Stock:

1. Para preparar cada solución stock utilizar 100 mL de agua destilada y agregar:

Cantidad	Compuesto	Solución Stock
10 g	$\text{NaNO}_3$	Nitratos
3.4 g	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfatos
0.029 g	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Metales traza
0.600 g	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
0.685 g	$\text{H}_3\text{BO}_3$	
0.006 g	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	
0.003 g	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	
0.086 g	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	

Homogenizar cada stock y esterilizar en autoclave (121°C, 15 lb, 20 min.). Conservar a 4°C y protegidos de la luz. Usar hasta que estén fríos.

2. Para preparar la solución stock de vitaminas utilizar 100 mL de agua destilada y agregar:

Cantidad	Compuesto	Concentración [M]
0.1 mL	Vitamina B <sub>12</sub> (cianocobalamina)	$1 \times 10^{-10}$ M
1 mL	Biotina	$2 \times 10^{-9}$ M
20 mg	Tiamina · HCl	$3 \times 10^{-7}$ M

Homogenizar y esterilizar mediante filtración con membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  ya que si se esteriliza en autoclave se pueden desnaturalizar las vitaminas. Conservar a 4°C y protegido de la luz. Usar hasta que esté frío.

3. Para preparar 500 mL de solución de nutrientes agregar:

Cantidad	Compuesto
50 mL	Stock de Nitratos
25 mL	Stock de Fosfatos
25 mL	Stock de Vitaminas
125 mL	Stock de Metales traza
25 mL	Selenio [H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> ]
250 mL	Agua destilada esterilizada

Homogenizar y esterilizar mediante filtración con membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  ya que si se esteriliza en autoclave se pueden desnaturalizar las vitaminas. Conservar a 4°C y protegido de la luz. Usar hasta que esté frío.

4. Extracto de suelo.

Se tamizaron 500 g de tierra libre de fertilizantes y herbicidas mediante una red de 1 mm de luz de malla. El tamizado fino se mezcló con 1 L de agua destilada y se esterilizó en autoclave (121°C, 15 lb, 60 min.). Transcurridas 24 h y fría la mezcla, se filtra con una membrana de fibra de vidrio de 0.45  $\mu\text{m}$  y la solución obtenida se centrifuga a 2500 x g. Se recupera el sobrenadante y se vuelve a filtrar con una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ . El extracto obtenido de la filtración se vuelve a esterilizar y una vez que se enfría se mantiene a 4°C y protegido de la luz hasta su utilización.

### Anexo III

#### Preparación de solución Davidson

(Bell y Lightner, 1988; Lightner, 1996)

1. Para preparar 1000 mL:

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Etanol [95%]	330 mL
Formaldehído [100%]	220 mL
Ácido acético glacial	115 mL
Agua de mar filtrada	335 mL

\*Almacenar a temperatura ambiente

2. Para fijar muestras inyectar 300-1000  $\mu$ L de solución Davidson y sumergir el tejido/organismo en el fijador de 24-48 h. Posteriormente traspasar las muestras a Etanol [70%] hasta su deshidratación e inclusión.

## Anexo IV

### Preparación de solución Karnovsky

(Karnovsky, 1965)

1. Para preparar 100 mL:

Compuesto	Cantidad
Solución de trabajo	80 mL
Glutaraldehído [25%] <sup>‡</sup>	10 mL
Sacarosa	8 g
Ajustar pH	7.4

\*Almacenar a temperatura ambiente

2. Solución de Trabajo: amortiguador de fosfatos y solución de lavado (1:3).

3. Amortiguador de fosfatos (100 mL):

Compuesto	Cantidad
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g
NaCl	8.8 g

4. Para preparar la solución de lavado (100 mL):

Compuesto	Cantidad
Solución de trabajo	80 mL
Agua destilada	20 mL
Sacarosa	8 g

Para fijar muestras inyectar 300-1000 µL de solución Karnovsky y sumergir el tejido/organismo en el fijador de 24-48 h. Posteriormente se elimina el fijador mediante 2 baños de 30 minutos cada uno en la solución de lavado y dejar sumergidos en solución de lavado nueva por 24 h<sup>‡</sup>. Finalmente las muestras se sumergen en Etanol [30%] hasta su deshidratación e inclusión.

<sup>‡</sup> Cuidado! El glutaraldehído es un irritante de la piel, ojos y vías respiratorias.

## Anexo V

### Técnica histológica para cortes en parafina

(Bell y Lightner, 1988; Lightner, 1996)

Una vez que se tienen fijados los tejidos/órganos y se han traspasado a Etanol [70%], seguir los siguientes pasos:

Solución	Tiempo
Etanol [70%]	24 h
Etanol [80%]	1 h
Etanol [90%]	1 h
Etanol [96%]	1 h
Etanol [100%]	1h (2x)
Etanol-Xilol (1:1)	20 min.*
Xilol [100%]	5-10 min.**
Xilol-Parafina (1:1)	20 min.**
Parafina (I, II y III)	1 h c/u
Parafina [100%]	1 h

Al finalizar los pasos de la deshidratación de los tejidos/órganos, se deberán colocar en cartuchos para su inclusión en cubos de parafina.

---

\* punto crítico, no dejar más del tiempo límite marcado.

♦ dependerá del tamaño del tejido.

## Anexo VI

### Protocolo para cortes histológicos incluidos en resina

Una vez que se tienen fijados los tejidos/órganos y se han traspasado a Etanol [30%], seguir los siguientes pasos:

<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
Etanol [50%]	1 h
Etanol [60%]	1 h
Etanol [70%]	1 h
Etanol [80%]	1 h
Etanol [90%]	1h
Etanol [100%]	1h

Después de haber deshidratado los tejidos/órganos se incluyen en resina, utilizando el producto comercial JB-4 Plus<sup>®</sup> Embedding Kit<sup>®</sup> (Polysciences Inc. Warrington PA, USA), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

---

<sup>®</sup> Este producto puede causar irritación o reacción alérgica en la piel. Se recomienda evitar el contacto con los ojos, piel, mucosas y ropa, así como la inhalación de los vapores resultantes de la reacción. Para mayor información consultar: <http://www.polysciences.com>.

## Anexo VII

### Tinción de Hematoxilina y Eosina (H-E)

(Lightner, 1996).

Una vez que se tiene las laminillas con los cortes de los tejidos/órganos deseados en los portaobjetos, seguir los siguientes pasos:

<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
Xilol I, II y III	5 min. c/u
Etanol [96%] I y II	5 min. c/u
Etanol [70%] I y II	2 min. c/u
Agua destilada	5 min.
Hematoxilina	2 min.
Agua corriente	2 min.
Agua destilada	20 seg.
Eosina	5 min.
Etanol [96%] I y II	2 min. c/u
Etanol [100%] I y II	2 min. c/u
Xilol I y II	5 min. c/u

Finalmente se limpiar el exceso de parafina y colorante alrededor del tejido, cuidando que no se reseque el tejido y se monta con un medio de baja viscosidad evitando la formación de burbujas al colocar el cubreobjetos. Se deja secar la laminilla 24-48 h antes de su observación.

## Anexo VIII

### Tinción Policrómica

(Tolivia *et al.*, 1994)

Una vez que se tiene las laminillas con los cortes de los tejidos/órganos deseados en los portaobjetos, es necesario re-hidratar las muestras con agua destilada por 10 minutos y posteriormente seguir los siguientes pasos:

<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
Policrómica I	2 min.
Agua destilada	15 min.*
Policrómica II	1 min.
Agua destilada	15 min.*

Una vez teñidos los tejidos se dejan secar y se montan con un medio de baja viscosidad evitando la formación de burbujas al colocar el cubreobjetos. Se deja secar la laminilla 24-48 h antes de su observación.

1. Para preparar 250 mL de colorante Policrómico I:

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Azul de Metileno	0.325 g
Azure II	0.050 g
Glicerol	25 mL
Metanol	25 mL
Agua destilada	200 mL

2. Para preparar 250 mL de colorante Policrómico II:

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
Fucsina básica	0.5 g
Agua destilada	200 mL

Filtrar ambas soluciones con filtros Whatman<sup>®</sup> (No. 1) y mantener en frascos color ámbar para protegerlos de la luz. En el caso del colorante Policrómico II, se debe diluir 1:3.5 con agua destilada antes de utilizarse.

\* Es necesario que en estos pasos se cambie el agua destilada varias veces, dependiendo de la cantidad de colorante que se desprenda de las laminillas.



## Anexo IX

### Participación en congresos nacionales e internacionales

- Pérez-Linares, J.**, Ochoa, J.L., Gago Martínez, A., Possani Postay, L.D., Unzueta Bustamante, M.L., Aguilar Ramírez, M.B. 2005. Histopathology, accumulation and depuration of saxitoxin (STX) and brevetoxin (BvTX) in postlarvae and juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Book of abstracts of Marine and Freshwater Toxins Analysis. First Joint Symposium and AOAC Task Force Meeting. Baiona, España, 100 pp. [11-14 de Abril, 2005]
- Pérez-Linares, J.** 2005. Histopatología, acumulación y depuración de PSP's de *Gymnodinium catenatum* y NSP's de *Karenia brevis* en postlarvas y juveniles de camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Memorias del I Taller sobre Proliferaciones Algales Nocivas: diagnóstico y perspectivas de investigación. Programa de Planeación Ambiental y Conservación, CIBNOR. La Paz, B.C.S., México, 22 pp. [17-18 de Noviembre, 2005]
- Pérez-Linares, J.**, M.B. Aguilar-Ramírez, L.D. Possani-Postay, M.L. Unzueta-Bustamante, A. Gago Martínez y J.L. Ochoa. 2006. Accumulation, depuration, and tissue harm of STX and PbTX in white leg shrimps. Reunión sobre Proliferaciones Algales Nocivas en México. Programa de Planeación Ambiental y Conservación del CIBNOR. La Paz, B.C.S., México. [10 de Noviembre, 2006]
- Pérez Linares, J.**, López Lago, I., Leão Martins, J.M., Ochoa J.L. and Gago-Martínez, A. 2006. A new application of the pre-column oxidation HPLC-FLD Method recently approved as official method by AOAC, for the evaluation of Paralytic Shellfish Poisoning toxins present in Crustacean tissues from Baja California Sur, Mexico. Resúmenes de la VI Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines. Vigo, España. [08-10 de Noviembre, 2006]
- Pérez-Linares, J.**, Possani-Postay, L.D., Unzueta-Bustamante, M.L., Aguilar-Ramírez, M.B., Ochoa J.L., and Gago-Martínez, A. 2007. Retention and tissue damage of saxitoxin and brevetoxin in shrimp: is cultured shrimp a potential vector of toxins to the population?. Abstracts Book of AOAC 121<sup>st</sup> Int. Meeting & Exposition. Anaheim, U.S.A. 168 pp. [16-20 de Septiembre, 2007]
- Pérez-Linares, J.**, Unzueta-Bustamante, M.L., Aguilar-Ramírez, M.B., Possani-Postay, L.D., Gago-Martínez, A. y Ochoa J.L. 2007. Retención y daño en tejidos producidos por las toxinas de *Gymnodinium catenatum* (PSP) y *Karenia brevis* (NSP) en el camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei*. Libro de Resúmenes II Taller sobre Florecimientos Algales Nocivos. CICESE-CETMAR. Ensenada, México. 49 pp. [21-23 de Noviembre, 2007]