



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE TOXINAS PARALIZANTES EN PRIMEROS
ESTADIOS LARVARIOS DEL CAMARÓN BLANCO (*Penaeus
vannamei*).**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

P r e s e n t a

Joshua Gutiérrez Pacheco

La Paz, Baja California Sur, septiembre de 2024.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 19 del Mes de Agosto del 2024, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Efecto de toxinas paralizantes en primeros estadios larvarios del camarón blanco (*Penaeus vannamei*)"

Presentada por el alumno:

Joshua Gutiérrez Pacheco

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biología Marina**

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

LA COMISIÓN REVISORA



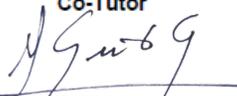
Francisco E. Hernández Sandoval
Director de Tesis



Carmen Rodríguez Jaramillo
Co-Tutor



Patricia Ramírez Romero
Co-Tutor



Dra. Alejandra Nieto Garibay,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



La Paz, Baja California Sur, a 22 de agosto de 2024.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Joshua Gutierrez Pacheco del Programa de Maestría en Uso Manejo y Preservación de Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas
Excluir bibliografía
- Porcentajes de similitud:
6%
Se muestra captura de pantalla

RVARIOS DEL		Citas excluidas	6%
		Bibliografía excluida	SIMILAR
Resumen de Coincidencias			
1	Internet 275 palabras Copiado el 25-May-2023 doczz.es		1%
2	Internet 258 palabras Copiado el 06-May-2021 repositoriodigital.ipn.mx		1%
3	Internet 218 palabras Copiado el 24-Oct-2022 cibnor.repositorioinstitucional.mx		1%
4	Internet 68 palabras Copiado el 07-Sep-2021 docplayer.es		<1%
5	Internet 58 palabras Copiado el 19-Jul-2020 biblio.uabcs.mx		<1%
6	Internet 47 palabras Copiado el 15-Feb-2023 www.researchgate.net		<1%
7	Internet 34 palabras Copiado el 22-Nov-2022		<1%

Firmas del Comité

Francisco E. Hernández Sandoval

Carmen Rodríguez Jaramillo

Patricia Ramírez Romero

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Francisco Eduardo Hernández Sandoval
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Director de Tesis

Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dra. Patricia Ramírez Romero
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
Co-Tutora de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Francisco Eduardo Hernández Sandoval
Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo
Dra. Patricia Ramírez Romero

Jurado de Examen

Dr. Francisco Eduardo Hernández Sandoval
Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo
Dra. Patricia Ramírez Romero

Suplente

Dr. Leyberth José Fernández Herrera

Resumen

El camarón blanco (*Penaeus vannamei*) es uno de los recursos pesqueros y acuícolas más importantes del país, sin embargo, su producción puede verse afectada por la presencia de florecimientos algales nocivos (FAN). Las toxinas paralizantes (TP: Saxitoxinas y análogos), producidas por algunas especies de dinoflagelados, cianobacterias y bacterias, son un grupo de neurotoxinas no proteicas, hidrosolubles y termoestables, las cuales interfieren en los procesos de sinapsis, bloqueando los canales de sodio-potasio y calcio, provocando parálisis y en casos extremos la muerte por paro respiratorio en organismos eucariontes. Estas TP pueden solubilizarse en el medio y entrar a los sistemas de cultivo causando daños directamente a los organismos, aun cuando no se detecte la presencia de las especies productoras de TP. La dificultad para extraer las TP disueltas (TPd) del medio acuoso ha dificultado los estudios sobre sus efectos en organismos acuáticos. Por esta razón, ha surgido el interés de evaluar los efectos de las TPd en los organismos, principalmente aquellos de interés comercial como *P. vannamei*, especialmente durante su desarrollo larvario, el cual es un estadio fundamental para asegurar una óptima producción. Por esta razón, se implementó, una metodología reciente para la extracción de TPd, realizada con ayuda de columnas de extracción de fase solida con cartuchos GCB, para poder identificar y cuantificar la presencia de TP y sus análogos de manera disuelta en cultivos de *Gymnodinium catenatum* mediante HPLC-FLD. Se identificaron 8 análogos de TP, con predominio de las toxinas de tipo sulfocarbamoil (>89%) seguido del grupo decarbamoil (<9%) y en menor medida por toxinas carbamoil (<1%) tanto de manera particulada como disuelta. Los resultados muestran tasas de recuperación de TPd de 72.19%. Posteriormente se estudió el efecto de estas TPd en larvas *P. vannamei* mediante bioensayos de exposición aguda a diferentes diluciones de extractos con TPd (100, 75, 50, 25, y 12%) en los primeros estadios larvarios (nauplio, zoea, mysis y postlarva 11). Las Concentraciones letales medias (CL₅₀) en cada uno de los estadios fueron equivalentes a concentraciones de 179.44, 157.35, 49.47 y 59.38 ng STXeq mL⁻¹ respectivamente, siendo mysis y Postlarva 11 (PL11) los estadios más susceptibles a los efectos de las TPd (p< 0.05) y con tiempos de mortalidad menores a 2h. Adicionalmente, se analizaron los procesos de biotransformación mediante la extracción y cuantificación de las TP en tejidos de camarones PL11 (TPc); se encontró una predominancia del análogo C1 (>60%) en todos los tratamientos, cuya concentración aumenta directamente en relación a la concentración de exposición. Finalmente, Los resultados histopatológicos de larvas PL11 muestran lesiones como edema y atrofia en hepatopáncreas (células Hpb, Hpf y Hpr), y tejido muscular, encontrando diferencias significativas (p< 0.05) entre el grupo control y las diluciones de 50, 75 y 100%, en cuanto al tamaño de células (<20µm) y porcentaje de cobertura muscular(<60%); también se identificó inflamación, infiltración de hemocitos en sistema nervioso, ruptura de fibras musculares y pérdida de hemolinfa en corazón (<50%) así como atrofia, descamación y ruptura de epitelios, al igual que un nuevo registro de vacuolización en intestino de PL11 expuestas a TPd. Estos resultados sugieren que la exposición de los primeros estadios larvarios a TPd tiene efectos significativos en la sobrevivencia y, por lo tanto, en la producción de larvas en los laboratorios cuando los FAN de especies productoras de TP se encuentran en la zona.

Palabras clave: Toxinas Paralizantes Disueltas, *Penaeus vannamei*, FAN, Cultivo de camarón, lesiones histopatológicas.

ORCID ID: 0009-0008-7782-5269



Vo. Bo. Dr. Francisco E. Hernández Sandoval

Summary

White shrimp (*Penaeus vannamei*) is one of the most important fishery and aquaculture resources in México; however, its production can be affected by algal blooms (HAB). Paralytic toxins (PT: Saxitoxins and analogues), produced by some dinoflagellates, cyanobacteria and bacteria species, are a non-protein, water-soluble and heat-stable neurotoxins group, which interfere with synapse processes, blocking sodium-potassium and calcium channels, producing paralysis and death in extreme cases by a respiratory arrest in eukaryotic organisms. These PT can be solubilized in the medium and get in the culture systems damaging the organisms, even when PT-producing species are not detected. The difficulty in extracting dissolved PT (PTd) from the aqueous medium has hindered the studies of its effects on aquatic organisms. For this reason, there has been an interest in evaluating the effects of PTd on organisms, mainly those of commercial interest, such as *P. vannamei*, especially during their larval development, which is a fundamental stage to ensure optimal production. For this reason, a recent PTd extraction methodology was implemented, with solid phase extraction columns with GCB cartridges, to identify and quantify the presence of PT and its analogues dissolved in *Gymnodinium catenatum* cultures mediums by HPLC-FLD. There were identified eight PT analogues, with sulfocarbamoyl toxins predominance (>89%), followed by the decarbamoyl group (<9%) and carbamoyl toxins (<1%) in particulate and dissolved form. The results show a 72.19% PTd recovery rate, and The PTd effects on *P. vannamei* larvae were evaluated by bioassays of exposure to cellular extracts dilutions with PTd (100, 75, 50, 25, and 12%) in the first larval stages (nauplius, zoea, mysis and postlarva 11). The median lethal concentrations (CL₅₀) at each stage were 179.44, 157.35, 49.47 and 59.38 ng STXeq mL⁻¹ respectively; Mysis and Postlarva 11 (PL11) were the most susceptible stages to the effects of TPd (p< 0.05) and with mortality times lower than 2h. Furthermore, the biotransformatio processes analysis was carried out by cuantification of PT accumulated in PL11 shrimp tissues (PTc), showing C1 analog predominance (>60%) in all treatments, increasing with exposure shrimp concentration. Finally, the histopathological results of PL11 larvae showed lesions such as edema and atrophy in hepatopancreas (Hpb, Hpf and Hpr cells), and muscle tissue, finding significant differences (p <0.05) between the control group and the dilutions of 50, 75 and 100 %, in terms of cell size (<20 µm) and percentage of muscle coverage (<60%); Additionally, inflammation, hemocyte infiltration in the nervous system, muscle fiber rupture and hemolymph loss in the heart (<50%) were identified; also atrophy, desquamation and epithelial rupture, as well as a new record of vacuolization in the intestine of PL11 exposed to PTd. These results suggest that first larval stages exposure to PTd has harmful effects on their survival, and may affect larvae production in laboratories when HABs of TP-producing species are present in the area.

Keywords: Disolved Paralytic Toxins, *Penaeus vannamei*, HAB, Shrimp culture, histopathological lesions.

ORCID iD: 0009-0008-7782-5269



Vo. Bo. Dr. Francisco E. Hernández Sandoval

Dedicatoria

*A mi madre y mis hermanas, por siempre impulsarme para salir adelante
con ayuda de su amor y apoyo*

*A mis abuelos, por ser mis segundos padres, y enseñarme que la vida es un
instante.*

Con todo mi amor

Agradecimientos

Quiero agradecer en primera instancia al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. por brindarme las instalaciones y el equipo necesario para llevar a cabo este proyecto. De la misma manera, a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos por el apoyo en todos los procesos y tramites que fueron necesarios.

Gracias al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el otorgamiento de la beca de manutención con número 829008, además del proyecto PRONACES SSyS 319104 “Atención de la problemática asociada a florecimientos algales nocivos en baja california: integración del conocimiento a necesidades socioambientales y económicas” por el financiamiento.

Un reconocimiento especial a mi comité de tesis, a los doctores Francisco E. Hernández Sandoval, Carmen Rodríguez Jaramillo, Patricia Ramírez Romero y a quien inició este proyecto, el Dr. José Jesús Bustillos Guzmán; Gracias por todas sus enseñanzas, consejos, apoyo y todo el tiempo dedicado a mi persona y este trabajo, pero sobre todo por ser una mano amiga durante todo este proceso y darme la seguridad y tranquilidad de que podíamos sacar el trabajo adelante, siempre con una sonrisa en el rostro.

Igualmente, a todas las personas que colaboraron para poder llevar a cabo todo este trabajo. A la Dra. Christine J. Band Schmidt, por sus enseñanzas y prestarme el espacio para llevar a cabo los cultivos de las microalgas; Al Biol. Mar. Erick Julián Núñez Vázquez y al Dr. Leyberth José Fernández Herrera por asesorías y comentarios que ayudaron a enriquecer el presente estudio.

A la Lic. Mónica Areli Ibarra Alcaraz, así como a la empresa “Comercializadora de Larvas, Nauplios y Camarón S.A. de C.V.” por haber donado a los organismo con los cuales se llevaron a cabo los experimentos; Al Dr. Memo Portillo por todas sus enseñanzas y ayuda; A la Dra. Sandra de la Paz Reyes, y el Técnico Gabriel Robles Villegas, por brindarnos un espacio en el Laboratorio Húmedo de Nutrición Acuícola de CIBNOR para el recibimiento y mantenimiento de los camarones así como a Julián Alfonso Garzón Favela, y al técnico Octavio Atilano Ramírez del Laboratorio de

Alimento Vivo del CIBNOR por brindarnos la microalga. Al igual que al Dr. Ricardo Pérez Enriquez y a la empresa “Blue Genetics” por su disposición en colaborar con nuestro proyecto.

A la Técnico del laboratorio de Histología Eulalia Meza Chávez, por sus servicios en el procesamiento y montaje de las laminillas, sin las cuales todo el trabajo histológico no hubiera sido posible; de igual manera, a los Dres. Ernesto Goytortua Bores y Bertha Olivia Arredondo Vega (Kitty) por brindarnos el espacio y el equipo necesario para el procesamiento de las muestras de toxinas.

A los niños Delfín, Aarón Vincenth Barajas, Miguel Ramírez, pero especialmente a Elena Torruco e Iván Morales, al igual que al estudiante de intercambio Jostin Cruz, porque con su trabajo colaboraron a enriquecer este proyecto, sin dejar de lado que fue todo un placer y una aventura contar con su presencia en el laboratorio.

Sin todas y cada una de estas personas, este trabajo no se hubiera podido llevar a cabo.

De manera personal, agradezco en primera instancia a mi madre, a mis hermanas, mis abuelos y a toda la familia Pacheco por todo su amor y apoyo, que me ha impulsado a llegar cada vez más lejos, especialmente a mi tía Lulú y mi tío Fer. También gracias a mi padre.

A mis mejores amigos Alexis y Fanni, por ser mi segunda familia y estar a mi lado, por todos sus consejos, escucharme y estar pendiente de mí durante todo este tiempo aún a la distancia.

De igual forma a mis amigas desde la infancia Camila, Airy, Coral y Yuri, por tantos años de amistad y por ser siempre mi recarga emocional en cada visita a CDMX.

A Ariadna Pico Rojas, al igual que toda la Familia Pico, por abrirme las puertas de sus hogares y recibirme como parte de la familia choyera, pero sobre todo a Ariadna por recordarme que la vida, la salud y la familia son el tesoro más preciado que tenemos, y que hay que vivir la vida con amor todos y cada uno de nuestros días.

Finalmente, pero no menos importante, a mis compañeros y amigos de la maestría de la generación 2022, pero especialmente a Natalia Joachin, mi piojis, y a Jair Rojas por ser siempre mis compañeros de aventuras, y por todas esas tardes en el malecón “Chanekeando”, así como a mis bandidos, Dante Guinjion, Cindy Dávalos, Laura Cota, Jesús contreras el pollo, Andy Murillo, Chapoy y JC, María Aguilar, Jesús Castro, Julián Camacho y a mis primeros compañeros de desconecte, Levi Arellano y Víctor Espinosa; Gracias por todas las risas, vivencias, anécdotas y chismes, pero sobre todo por no funarme, que hicieron de mi estancia en el CIBNOR una experiencia inigualable y extremadamente divertida, que probablemente con convirtió en la generación más escandalosa pero alegre de este centro. Los amo y los llevo en mi corazón.

No me queda más que agradecer a Dios por esta oportunidad que me ha dado y por dar un paso más en mi vida profesional.

MUCHAS GRACIAS.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vii
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Abreviaturas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Toxinas paralizantes	4
2.2 Toxinas paralizantes y acuicultura	8
2.3 Toxinas paralizantes en el desarrollo larvario.....	10
2.4 Toxinas paralizantes disueltas.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivos particulares	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1 Cultivo y cosecha de dinoflagelados.	18
6.2 Obtención de muestras para el análisis de toxinas paralizantes	18
6.3 Extracción de toxinas paralizantes particulada y disuelta	19
6.3.1 Identificación y cuantificación de toxinas paralizantes por HPLC.....	19
6.4 Estandarización del método.....	20
6.5 Diseño experimental	21
6.5.1 Ensayo de toxicidad aguda.....	21
6.6 Extracción de TP en tejidos de PL11 de <i>Penaeus vannamei</i>	24
6.7 Evaluación de lesiones histopatológicas	25
6.7.1 Descriptiva.....	25
6.7.2 Semi-cuantitativa	26
6.7.3 Cuantitativa	26
6.8 Análisis estadísticos de variables histológicas cualitativas y cuantitativas.....	26
7. RESULTADOS	28
7.1 Estandarización del método: Porcentaje de recuperación	28
7.2 Cuantificación y perfil de toxinas de extractos de cultivo de <i>G. catenatum</i>	29
7.2.1 Perfil de toxinas.....	30
7.3 Bioensayo de toxicidad aguda con larvas de <i>Penaeus vannamei</i>	32
7.3.1 Concentraciones letales medias (CL50)	33
7.3.2 Descripción del comportamiento de las larvas expuestas al contenido celular de <i>G. catenatum</i>	35
7.4 Acumulación de TP en tejidos de PL11	36
7.5 Lesiones histopatológicas.....	38

7.5.1 Músculo	38
7.5.2 Hepatopáncreas	42
7.5.3 Tracto digestivo	45
7.5.4 Corazón	49
7.5.5 Sistema nervioso	51
8. DISCUSIÓN	54
8.1 Cuantificación y perfil de toxinas paralizantes de <i>G. catenatum</i>	54
8.1.2 Estandarización del método de extracción de TPd	56
8.2 Bioensayos de toxicidad	57
8.2.1 Mortalidad en <i>Penaeus vannamei</i>	57
8.2.2 Comportamiento de larvas expuestas a TPd	59
8.3 Acumulación de TP en tejidos de PL11	60
8.4 Daños histopatológicos producidos por TPd en larvas de <i>P. vannamei</i>	62
9. CONCLUSIONES	67
10. LITERATURA CITADA	68

Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de las toxinas paralizantes. Tomado de Hernández-Sandoval <i>et al.</i> , 2009.....	5
Figura 2. Procesos de transformación de las toxinas paralizantes en bivalvos marinos (de Cembella <i>et al.</i> , 1993, 1994; Oshima <i>et al.</i> , 1995; Bricelj y Shumway, 1998; Wiese <i>et al.</i> , 2010). 1. epimerización, 2. Reducción, 3. Hidrólisis ácida, 4. Hidrólisis enzimática por dinoflagelados. El símbolo + significa una mayor toxicidad. Cis, cisteína; GSH, glutatión; NeoSTX, neosaxitoxina; STX, saxitoxina; GTX, goniauotoxinas; dc, decarbamoil; GC, toxinas Benzoato.	7
Figura 3. Ciclo de vida de un camarón peneido típico (Modificada de Bayley y Jham, 1992).	11
Figura 4. Diseño experimental para bioensayos con larvas de <i>P. vannamei</i> en placas de 96 pozos.	22
Figura 5. Diseño experimental para bioensayos con Postlarvas de <i>P. vannamei</i> en placas de 12 pozos.	23
Figura 6. Concentraciones de TP particuladas y disueltas a lo largo de las etapas de cultivo de <i>G. catenatum</i>	29
Figura 7. Porcentaje promedio de análogos por grupo de TP particuladas y disueltas en cultivo de <i>G. catenatum</i>	31
Figura 8. Porcentaje de análogos por grupos de TP particuladas y disueltas en cultivo de <i>G. catenatum</i> a lo largo del tiempo de cultivo; A) TPp; B) TPd.	32
Figura 9. Porcentaje de mortalidad por estadio larvario de <i>P. vannamei</i> ante diferentes diluciones de extracto celular disuelto de <i>G. catenatum</i> . (a)(b): Diferencias significativas entre grupos. ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.	32
Figura 10. Modelo Dosis-Respuesta y estimación de CL_{50} en larvas de <i>P. vannamei</i> . Mediante la función drm en programa Rstudio. ($p < 0.05$). A) nauplio; B) zoea; C) mysis; D) PL11.	33
Figura 11. Concentración total promedio por organismo de TP en tejidos de PL11 de <i>Penaeus vannamei</i>	37
Figura 12. Porcentaje molar por larva de análogos de TP en tejidos de PL11 de <i>Penaeus vannamei</i> en los diferentes tratamientos.	38
Figura 13. Corte histológico de músculo en larvas PL11 de <i>P. vannamei</i> . A) Control; B) Tratamiento 12%; C) Tratamiento 25%; D) Tratamiento 50%; E) Tratamiento 75%; F) Tratamiento 100%; Ruptura de los fascículos musculares (r), Infiltración hemocítica (h), Edema (e), Atrofia (a). Tinción H&E (Magnificación 40x).	40
Figura 14. Corte histológico de musculo en larvas PL11 de <i>P. vannamei</i> , Tratamiento 100%; Infiltración hemocítica (h), Edema (e), Atrofia (a), Acumulación hemocítica atípica (O). Tinción H&E (Magnificación 40x).	41
Figura 15. Porcentaje de cobertura de musculo en larvas PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.	41
Figura 16. Corte histológico de hepatopáncreas en larvas PL11 de <i>P. vannamei</i> , A) Control; B) Tratamiento 12%; C) Tratamiento 25%; D) Tratamiento 50%; E) Tratamiento 75%; F) Tratamiento 100%; Delaminación de túbulos (dt), atrofia (a), Descamación de epitelios (d), Infiltración hemocítica (h), Células B (Hpb). Tinción H&E (Magnificación 40x).	43
Figura 17. Altura de células Hpb del hepatopáncreas en PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni.	44

- Figura 18.** Altura de células Hpf y Hpr del hepatopáncreas en PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.....44
- Figura 19.** Cortes histológico de intestino en larvas PL11 de *P. vannamei*; A) Control; B) Tratamiento 12%; C) Tratamiento 25%; D) Tratamiento 50%; E) Tratamiento 75%; F) Tratamiento 100%; Epitelio intestinal (Epm); Lumen (Lum); Vacuolas (v); Atrofia (a); Ruptura de los epitelios (r); Infiltración hemocítica (h); Fibras musculares (Mus); Hepatopáncreas (Hep). Tinción H&E (Magnificación 40x).....46
- Figura 20.** Corte histológico en intestino de larvas PL11 de *P. vannamei*; Tratamiento 100%: Atrofia (a); Descamación de epitelios (d), Infiltración hemocítica (h); Tinción H&E (Magnificación 40x).....47
- Figura 21.** Altura de células epiteliales de intestino en PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.48
- Figura 22.** Diametro de vacuolas en intestino de PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí. ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.48
- Figura 23.** Corte histológico de corazón en larvas PL11 de *P. vannamei*; A) Control; B) Tratamiento 12%; C) Tratamiento 25%; D) Tratamiento 50%; E) Tratamiento 75%; F) Tratamiento 100%; Pericardio (Per), Válvula (Val), Hepatopáncreas (Hep), Fibras musculares (Mus) Hemolinfa (He), Ruptura de los fascículos musculares (r), Infiltración hemocítica (h). Tinción H&E (Magnificación 40x).....50
- Figura 24.** Porcentaje de cobertura de hemolinfa en corazón de larvas PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.....51
- Figura 25.** Corte histológico de ganglios en larvas PL11 de *P. vannamei* A) Control; B) Tratamiento 12%; C) Tratamiento 25%; D) Tratamiento 50%; E) Tratamiento 75%; F) Tratamiento 100%; Ganglio (Gan), Fibras interneuronales (Fsm), Células neurosecretoras (Nsc), Edema (e). Tinción H&E (Magnificación 40x).....52
- Figura 26.** Porcentaje de cobertura de tejido nervioso en larvas PL11 entre tratamientos. (a)(b)(c): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.53

Lista de tablas

Tabla 1. Factor de toxicidad relativa (FTR) de análogos de toxinas paralizantes aplicado para calcular la toxicidad total <i>Gymnodinium catenatum</i> . Tomado de: Hernández-Sandoval, 2010; Actualizado de Guinle, <i>et al.</i> , 2023 ¹	6
Tabla 2. Volúmenes de toxina disuelta/agua de mar a agregar en cada pozo por tratamiento para prueba experimental en placa de 96 pozos. Volumen final: 120 µL.....	23
Tabla 3. Volúmenes de toxina disuelta/agua de mar a agregar en cada pozo por tratamiento para prueba experimental en placa de 12 pozos. Volumen final: 4 mL.....	24
Tabla 4. Porcentaje de recuperación por análogos de TPd con el método de extracción de Lijun <i>et al.</i> , (2020).	28
Tabla 5. Porcentaje de mortalidad en nauplios para cada tratamiento durante el bioensayo de exposición a TPd.....	34
Tabla 6. Porcentaje de mortalidad en zoeas para cada tratamiento durante el bioensayo de exposición a TPd.....	34
Tabla 7. Porcentaje de mortalidad en mysis para cada tratamiento durante el bioensayo de exposición a TPd.....	35
Tabla 8. Porcentaje de mortalidad en PL11 para cada tratamiento durante el bioensayo de exposición a TPd.....	35
Tabla 9. Signos clínicos en PL11 expuestas a extractos celulares <i>G. catenatum</i>	36

Abreviaturas

a	Atrofia
ADN	Acido desoxirribonucleico
b	Tracto digestivo bloqueado
BCS	Baja California Sur
cél L⁻¹	Células sobre Litro
cél mL⁻¹	Células sobre mililitro
Cis	Cisteina
CL₅₀	Concentración letal media
d	Descamación de epitelios
dc	Toxinas decarbamoil
do	Toxinas deoxidecarbamoil
dt	Delaminación de tubulos
e	Edema
EPM	Envenenamiento paralizante por moluscos
ERO	Especies reactivas de oxigeno
FAN	Florecimientos algales nocivos
FAO	Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura
Fsm	Fibras interneuronales
FTR	Factor de toxicidad relativa
Gan	Ganglio
GC	Toxinas benzoato
GF/F	Fitros de microfibra de vidrio
GSH	Glutación
GTX	Goniautoxinas
h	Infiltración hemocítica
H&E	Hematoxilina-eosina
He	Hemolinfa
HILIC-HRMS	Cromatografía líquida de interacción hidrofílica-espectrometría de masas de alta resolución
Hpb	Células B del hepatopáncreas
Hpf	Células F del hepatopáncreas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
Hpr	Células R del hepatopáncreas
IC	Intervalo de confianza
Lum	Lumen
MU	Unidad ratón (Mouse unit)
Mus	Musculo
mL m⁻¹	Mililitro por minuto
N	Nitrógeno

neoSTX	Neosaxitoxinas
ng STXeq mL⁻¹	Nanogramos de saxitoxina equivalente sobre mililitro
nm	Nanómetro
NOM	Norma oficial mexicana
Nsc	Células neurosecretoras
Per	Pericardio
PL	Postlarva
PL m⁻²	Postlarvas por metro cuadrado
PL11	Postlarva 11
PSP	Paralytic shelfish poisoning
r	Ruptura de fascículos musculares
rpm	Revoluciones por minuto
SPE	Extracción de fase sólida
STX	Saxitoxina
STXeq	Saxitoxinas equivalentes
TP	Toxinas paralizantes
TPc	Toxinas paralizantes en tejidos de camarones
TPd	Toxinas paralizantes disueltas
TPp	Toxinas paralizantes particuladas
USD	Dólares Estadounidenses
v	Vacuolas
Val	Válvula
µg	Microgramos
µg Kg⁻¹	Microgramos sobre kilogramo
µg STXeq 100g⁻¹	Microgramos de saxitoxina Equivalente sobre 100g
µg STXeq kg⁻¹	Microgramos de saxitoxina equivalentes por kilogramo de peso corporal
µL	Microlitos
µmol m⁻² s⁻¹	Micromoles sobre metro cuadrado por segundo

1. INTRODUCCIÓN

El camarón blanco (*Penaeus vannamei*, Boone 1931), es uno de los recursos pesqueros y acuícolas más importantes del país, específicamente en la región del Pacífico Mexicano. La temporada nacional de captura de camarón en 2021 registró un volumen de 249,958 toneladas, de las cuales alrededor del 73% de la producción total del país proviene de la acuicultura; Por su volumen, ocupa el tercer lugar de la producción en México, sin embargo, por su valor económico se encuentra en el puesto número uno, con un monto estimado para ese mismo año de \$23,776 millones de pesos, siendo los estados de Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Nayarit y Baja California Sur son los principales productores de este recurso (CONAPESCA, 2021).

En los últimos años se han registrado diversos problemas en la camaronicultura, como la sanidad acuícola (Frías-Espericueta *et al.*, 2011), la contaminación por metales pesados (Páez-Osuna, 2001; Wu y Yang, 2011) así como la presencia de fenómenos biológicos como la aparición de virus, bacterias, hongos y florecimientos algales nocivos (Gómez-Gil *et al.*, 2001; Barraza-Guardado *et al.*, 2004).

Los florecimientos algales nocivos (FAN), son un fenómeno natural que se caracteriza por una acumulación de biomasa algal que puede tener un impacto negativo sobre el medio ambiente, la salud pública, organismos acuáticos y/o actividades económicas, etc. Sin embargo, el término FAN es un descriptor socioeconómico, pero no estrictamente científico, porque se refiere a la percepción humana de la nocividad y la variedad de impactos negativos causados por microalgas tales como daños físicos a otros organismos (obstrucción de branquias) causar intoxicaciones a través de la producción de sustancias químicas (toxinas), producidas por diatomeas, dinoflagelados, cianobacterias, y macroalgas (Smayda, 1997; Kudela *et al.*, 2015). A escala mundial, incluyendo algunas de las zonas costeras de México, el número de especies formadoras de FAN se está incrementando rápidamente al igual que el tiempo de duración de los FAN (Cortés-Altamirano *et al.*, 1999; Gárate-Lizárraga, 2001; Band-Schmid *et al.*, 2011, Glibert, 2020).

Una de las causas antrópicas que han favorecido estos FAN es la incorporación de agua de desecho a los cuerpos acuáticos producida en las ciudades, las industrias, actividades agrícolas y

acuícolas, con lo cual se incrementan las concentraciones de nutrientes como, el nitrógeno y fósforo en sus diversas formas químicas y la relación N:P en la zona costera (Cantoral-Uriza *et al.*, 2017). Estas condiciones, además de las físicas, como la temperatura, corrientes, turbulencia, etc., permite que algunas microalgas proliferen en tiempos relativamente cortos y, por tanto, potencian los efectos negativos del exceso de biomasa y los metabolitos en la salud humana y los ecosistemas acuáticos (Carreto *et al.*, 2008; Aké-Castillo, 2014; Cortés *et al.*, 2015; Cantoral-Uriza *et al.*, 2017).

Durante un FAN, se producen una amplia gama de metabolitos con diversas actividades biológicas, dentro de los cuales destaca la Saxitoxina y sus análogos, denominados colectivamente toxinas paralizantes (TP) producidos principalmente por algunos dinoflagelados marinos como: *Alexandrium* spp., *Pyrodinium bahamense* y *Gymnodinium catenatum*; al igual que por algunas cianobacterias en ambientes dulce acuícolas (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* y *Lyngbya*), las cuales son un riesgo para la salud ambiental y humana (Takser *et al.*, 2016; Flores-Chavarría *et al.*, 2023). La Saxitoxina es conocida como el alcaloide neurotóxico natural más potente (Wiese *et al.*, 2010), y en conjunto con sus análogos son los causantes del síndrome de envenenamiento paralizante por mariscos (EPM ó PSP, Paralytic Shellfish Poisoning, por sus siglas en inglés) (MacKenzie, 2014; Zhou *et al.*, 2018; Vilariño *et al.*, 2018), Las cuales se distribuyen ampliamente a nivel mundial y se ha observado una correlación entre el incremento en la duración de los FAN debido al cambio climático global y al deterioro del ambiente marino (Chen *et al.*, 2016).

Las toxinas paralizantes son neurotoxinas no proteicas, termoestables e hidrosolubles (Huang y Zimba, 2019) que actúan bloqueando los canales de sodio activados por voltaje en las células nerviosas, así como a los canales de potasio y calcio, lo que puede causar parálisis muscular y la muerte por paro respiratorio al interrumpir la transmisión de los impulsos nerviosos (Strong *et al.*, 1993; Carmichael, 1994; Aráoz *et al.*, 2010; Cusick, *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2018 ; Zhou *et al.*, 2018; Huang y Zimba, 2019), además de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (O'Neill *et al.*, 2016; Ramos *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018).

En las costas de México, específicamente para la región del Pacífico Norte, se ha reportado la recurrencia de FAN de *G. catenatum* (Band-Schmid *et al.*, 2010; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2016; Escarcega-Bata *et al.*, 2023), especie productora de TP, que ha sido relacionada con diversas afectaciones en el ambiente, mortandades de organismos silvestres y en cultivo, así como intoxicaciones y muertes de personas, al igual que pérdidas económicas en estanques de cultivo de camarón y laboratorios de producción de larvas (Huei-Meei *et al.*, 1993; Pérez-Camacho, 1989; Cortés-Altamirano *et al.*, 1997; Band-Schmidt *et al.*, 2010; Núñez-Vázquez *et al.*, 2011; García-Mendoza *et al.*, 2015; Farabegoli *et al.*, 2018).

Hasta el momento son escasos los estudios que describan y cuantifiquen los efectos de las TP particulada en los tejidos de *P. vannamei* (Pérez-Linares *et al.*, 2003; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004; Flores-Chavarría, 2018; Flores-Chavarría *et al.*, 2023). Sin embargo, estos estudios no consideraban los efectos de las TP disueltas en el medio, dado a que son compuestos hidrosolubles, pueden estar presentes en la columna de agua y generar daños a los cultivos, en parte, debido a que hasta hace pocos años no se contaba con la metodología necesaria para extraer las TP disueltas del medio.

2. ANTECEDENTES

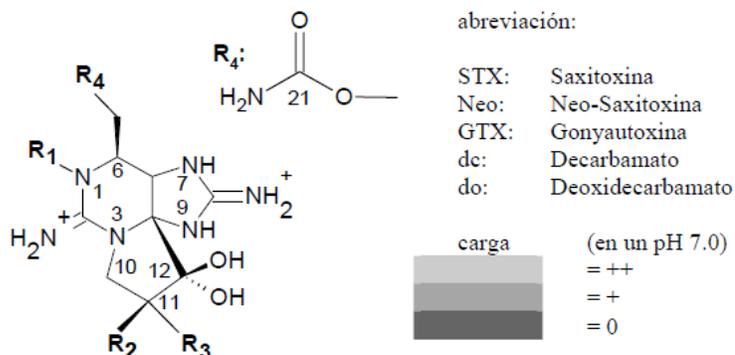
2.1 Toxinas paralizantes

Las toxinas paralizantes (TP) son compuestos hidrosolubles, estables al calor y al ácido, y cuando se cocina el organismo con las toxinas (mariscos, pescado, etc.) estas pueden permanecer en el alimento e incluso aumentar su toxicidad (Etheridge, 2010). Estas potentes neurotoxinas se acumulan en los mariscos y se transfieren a los consumidores a través de la cadena alimenticia (Yang *et al.*, 2017; Tamele *et al.*, 2019). Los síntomas que presentan las personas intoxicadas son: hormigueo, entumecimiento, dolores de cabeza, debilidad, dificultad para respirar, ataxia, náuseas, vómitos, disminución de la coordinación, disfagia y muerte por paro cardio-respiratorio “asfixia” (Keevil, 1991; Carmichael, 1994; Hunter, 1995; Toyofuku, 2006; Etheridge, 2010). Los síntomas serán dependientes de la concentración ingerida, además de algunos otros factores metabólicos como: la edad y el estado de salud de la persona intoxicada.

Miles de casos de intoxicación humana relacionados con las TP se han producido en todo el mundo desde el siglo XX, especialmente en las costas del Océano Pacífico y el Atlántico de América (Tamele *et al.*, 2019; García *et al.*, 2004; Kacem *et al.*, 2015; Farabegoli *et al.*, 2018; Anderson *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2019). Anualmente a nivel mundial se han registrado aproximadamente 2000 casos de intoxicados con una tasa de mortalidad humana promedio del 15% (Orr *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016).

Desde el primer aislamiento de la Saxitoxina (STX) en almeja mantequilla de Alaska (*Saxidomus giganteus*) en 1957 por Schantz *et al.*, se han descrito más de 57 análogos naturales de STX, que varían principalmente en la sustitución de los grupos laterales (R1–R5) del esqueleto tricíclico de perhidropurina. Según la combinación de los grupos químicos en las posiciones de los radicales R1 a R5, los análogos de STX se pueden clasificar como no sulfatada (neoSTX), monosulfatada (GTX1-6), disulfatada (C1-4), descarbamoilada (dcSTX, dcneoSTX, dcGTXs1-4), y deoxy-decarbamoilada (doSTX, doGTXs1-3), además de los análogos hidrofóbicos recientemente descritos de tipo benzoatos (Negri *et al.*, 1995, 2007; Briand *et al.*, 2003; Wiese *et al.*, 2010; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2011; Cusick y Sayler, 2013; Duran-Riveroll *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2019). Cabe destacar que la afinidad de cada uno de estos análogos hacia los canales de sodio-

potasio y calcio depende del grupo químico en los radicales R1-R5, debido a la carga neta que le confiere a la toxina (Fig. 1), y por tanto su factor de toxicidad relativo (FTR) con respecto a la STX, la cual es el análogo con mayor potencia (Tabla 1).



			TOXINAS			
			Carbamato	N-Sulfocarbamato	Decarbamato	Deoxidecarbamato
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄ : OCO-NH ₂	R ₄ : OCONH-SO ₃ ⁻	R ₄ : OH	R ₄ : H
H	H	H	STX	B ₁	dcSTX	doSTX
OH	H	H	Neo	B ₂	dcNeo	-
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX ₁	C ₃	dcGTX ₁	-
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX ₂	C ₁	dcGTX ₂	doGTX ₂
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX ₃	C ₂	dcGTX ₃	doGTX ₃
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX ₄	C ₄	dcGTX ₄	-

Figura 1. Estructura química de las toxinas paralizantes. Tomado de Hernández-Sandoval *et al.*, 2009.

Tabla 1. Factor de toxicidad relativa (FTR) de análogos de toxinas paralizantes aplicado para calcular la toxicidad total *Gymnodinium catenatum*. Tomado de: Hernández-Sandoval, 2010; Actualizado de Guinle, *et al.*, 2023¹.

	FTR
STX	1
GTX 1	0.99
GTX 2	0.36
GTX 3	0.64
dcSTX	0.51
dcGTX2	0.15
dcGTX3	0.038
B1	0.06
C1	0.006
C2	0.096

Nota: ¹Los factores de toxicidad relativa (FTR) se calcularon a partir de la actividad específica en unidades de ratón (MU) por mmol determinada mediante bioensayo en ratón.

Por otra parte, una vez que las toxinas son ingeridas y asimiladas por los seres vivos, estos análogos pueden biotransformarse en el tracto digestivo de un análogo a otro cambiando así su toxicidad. Diversos trabajos han descrito los principales procesos de biotransformación de análogos de Saxitoxina en moluscos bivalvos (Fig. 2) (Cembella *et al.*, 1993, 1994; Oshima *et al.*, 1995; Bricelj y Shumway, 1998; Wiese *et al.*, 2010). La oxidación, hidrólisis, reducción y glucuronidación son las rutas de metabolización de las TP que convierten a los análogos en una forma molecular de mayor o menor toxicidad (García *et al.*, 2010; Guéguen *et al.*, 2011) para que estas puedan ser eliminadas en la orina y las heces fecales (Andrinolo *et al.*, 1999; Botelho *et al.*, 2012; Bragg *et al.*, 2015). Si bien el metabolismo busca transformar estos compuestos en formas menos tóxicas, se ha visto que algunos de estos procesos tienen la capacidad convertirlos en análogos de mayor toxicidad, sin embargo, algunas de estas rutas pueden realizarse de manera reversible.

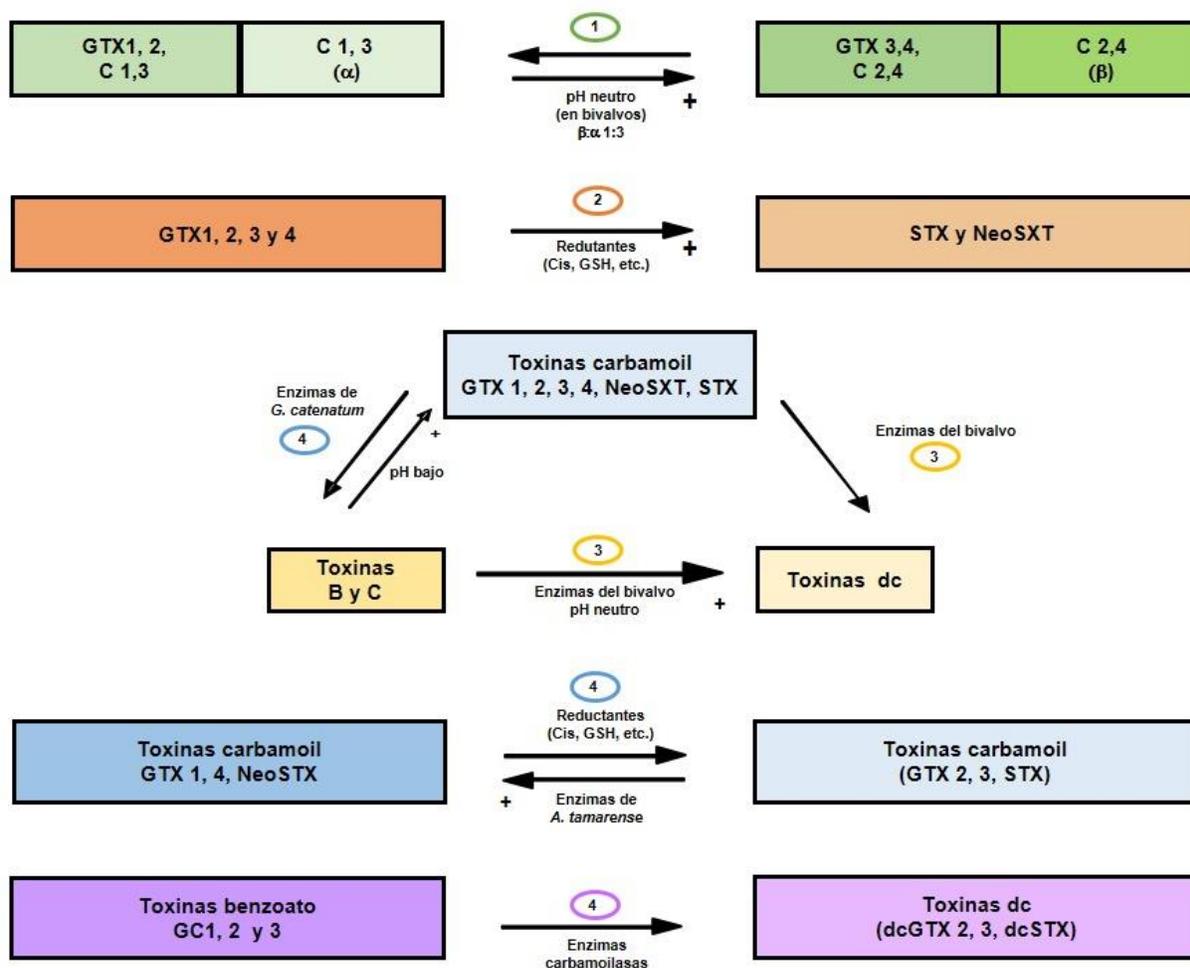


Figura 2. Procesos de transformación de las toxinas paralizantes en bivalvos marinos (de Cembella et al., 1993, 1994; Oshima et al., 1995; Bricelj y Shumway, 1998; Wiese et al., 2010). 1. epimerización, 2. Reducción, 3. Hidrólisis ácida, 4. Hidrólisis enzimática por dinoflagelados. El símbolo + significa una mayor toxicidad. Cis, cisteína; GSH, glutatión; NeoSTX, neosaxitoxina; STX, saxitoxina; GTX, goniauotoxinas; dc, decarbamoil; GC, toxinas Benzoato.

La adsorción y depuración de toxinas dentro de los tejidos de los moluscos varía de una especie a otra (Bricelj y Shumway, 1998; Mak et al., 2003; Yu et al., 2004; Kwong et al., 2006; Ding et al., 2017). En 1998, Bricelj y Shumway clasificaron a los bivalvos dependiendo del tiempo necesario para detoxificarse por debajo del límite máximo permisible ($800 \mu\text{g STXeq kg}^{-1}$; Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, 2015); donde las especies de baja depuración presentan tasas de detoxificación entre 0,1 y 4% de STX eq por día, es decir, que requieren varios meses a años para depurarse. Por otro lado, un bivalvo con rápida tasa de depuración tiene una tasa de eliminación entre 6 y 17 % de toxina por día, lo cual representa entre 1 y 10 semanas, dependiendo de la cantidad de toxina adsorbida (Bricelj y Shumway, 1998). Sin embargo, pese a

que se cuenta con esta descripción en moluscos bivalvos, los estudios realizados para conocer la dinámica y depuración de estos análogos, en diferentes organismos como lo es camarón blanco son escasos.

2.2 Toxinas paralizantes y acuicultura

La presencia de TP ha sido recurrente en zonas donde se desarrollan actividades acuícolas y pesqueras alrededor de todo el mundo (Costa *et al.*, 2012; Pacheco *et al.*, 2016) donde provocan impactos económicos considerables debido a su importancia en materia de riesgo a la salud. Se ha estimado que al año se invierten \$895 millones dólares estadounidenses (USD) en todo el mundo, para el monitoreo y planes de mitigación de las afectaciones producidas por la presencia de TP en los productos pesqueros y acuícolas (Orr *et al.*, 2013), sin contar las pérdidas económicas a consecuencia de las vedas sanitarias.

En cuanto a los efectos tóxicos y de absorción de TP en algunos organismos acuáticos, se ha demostrado una acumulación, depuración y transferencia trófica de TP en almejas, peces, langostas, estrellas de mar y bentos marino (Choi *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Madigan *et al.*, 2018; Dean *et al.*, 2020); alteraciones morfológicas y de comportamiento en pez cebra (*Danio rerio*) y trucha arcoíris (Lefebvre *et al.*, 2004; Bakke *et al.*, 2010); estrés oxidativo, daño molecular y del ADN en peces y bivalvos (Clemente *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011; Fabioux *et al.*, 2015).

Otros efectos provocados por los FAN de especies productoras de TP en los organismos van desde una disminución del crecimiento, debido al estrés expuesto por ciertas especies y abundancia de microalgas, hasta la disminución de las defensas y el consecuente incremento en la susceptibilidad a las enfermedades virales, (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004). Lo anterior se refleja significativamente en pérdidas económicas para la industria de la acuicultura. Por ejemplo, Fuentes *et al.*, (2008), reportaron en el norte de la Región de Aysén en Chile siete casos de intoxicaciones humanas y un deceso, además de comportamiento anormal en salmones en cultivos, irritación en las branquias, producción excesiva de mucus y mortandad causadas por un FAN de *Alexandrium catenella*, especie productora de TP, con pérdidas económicas estimadas de alrededor de 9 millones de dólares.

En México, la industria camaronícola se encuentra mayormente en la ecorregión del Golfo de California, siendo principalmente de tipo semi-intensivo (89%), y en menor proporción las de tipo intensivo (2%) y extensivo (9%), con una densidad media de siembra de 13.58 y 7 Postlarvas por metro cuadrado (PL m⁻²), respectivamente (Schur, 2002; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004). Esta industria no ha sido la excepción en cuanto a las afectaciones producidas por la recurrencia de FAN en las costas del Pacífico y varios eventos de mortalidad han afectado a esta industria, particularmente en los meses de febrero a mayo en los años de 1979, 1985, 1997, 2001 y 2003, causando problemas en granjas de peces, camarón adulto y en el medio natural, así como afectación en laboratorios de producción de larvas en Sinaloa (Huei-Meei *et al.*, 1993; Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003).

Estos eventos coinciden con la presencia de “mareas rojas” en la zona costera de donde se abastecen de agua los laboratorios y granjas, en los cuales se ha encontrado que recurrentemente está presente el dinoflagelado *G. catenatum*. En un evento de FAN en estanques de camarón de *P. vannamei* en noviembre de 1998, en La Paz, B.C.S., Alonso-Rodríguez *et al.*, (2004) midieron concentraciones de TP en camarones, encontrándose valores de 10 µg STXeq 100g⁻¹, aunque en las muestras de fitoplancton no se observaron especies tóxicas, por lo que estos autores infirieron que era posible que la ingestión de especies tóxicas haya sido previa a la recolección de las muestras de camarón para el análisis de toxinas.

En estudios recientes, se probó la toxicidad de este dinoflagelado en condiciones de laboratorio exponiendo a Postlarvas y juveniles de camarón a concentraciones agudas (de 10³, 10⁴ y 10⁶ cél L⁻¹) y crónicas (45 días a 10³ cél L⁻¹) de *G. catenatum*, donde se observó mortalidad en pocas horas (entre 6 y 17 horas), además de reportar la presencia de TP en todos los tejidos comestibles del camarón y daños como: lisis en las células del hepatopáncreas, disminución de la densidad en las fibras cardíacas y deterioro en las células del sistema nervioso (Pérez-Linares, 2008; Pazos-Mandujano, 2012). Por otra parte, Flores-Chavarría (2018) también describió el comportamiento anormal, nado errático, desorientación y pérdida del equilibrio tras ser expuestos a diferentes concentraciones celulares de cultivo de *G. catenatum* (10⁴, 10⁵ y 10⁶ cél mL⁻¹), adicionalmente, en este trabajo se describió la acumulación de TP en diferentes tejidos de los organismos, así como

las lesiones histopatológicas provocadas por estas moléculas en sistema nervioso, hepatopáncreas, musculo, branquias, etc.

Dichos estudios se llevaron a cabo en postlarvas y juveniles de esta especie, sin embargo, no existen estudios en cuanto a los efectos de estos compuestos en los primeros estadios del desarrollo de *P. vannamei*.

2.3 Toxinas paralizantes en el desarrollo larvario

Bajo condiciones naturales las microalgas proporcionan una mezcla balanceada de sustancias nutritivas para alimentar a los crustáceos durante sus primeros estadios larvales y al zooplancton que forma parte de la cadena alimenticia (Brown, 1997). En los camarones, este desarrollo larvario comprende tres estadios: nauplio, zoea y mysis, antes de ser una postlarva (PL) (Fig. 3). Cada estadio larval comprende de 3 a 6 subestadios en las cuales hay cambios en la morfología, capacidad natatoria y en el comportamiento alimenticio (García-Pinto y Ewald, 1974).

Durante sus primeros estadios, estas larvas se desarrollan en el ambiente oceánico y a medida que avanzan en su desarrollo se acercan a la costa, llegando a las fases de PL y juvenil a refugiarse en ambientes estuarinos. Una vez alcanzada su etapa adulta nuevamente presentan hábitos predominantemente oceánicos (Rodríguez y Reprieto 1984; Martínez y Torres 1995). Por tanto, durante el proceso de reproducción de *P. vannamei*, la calidad de las larvas es crucial para incrementar las tasas de supervivencia, crecimiento y metamorfosis. Por consiguiente, la presencia de un FAN productor de TP durante su desarrollo afectará directamente el éxito o el fracaso de la producción de camarón tanto de cultivo como silvestre (Ramos *et al.*, 2022).

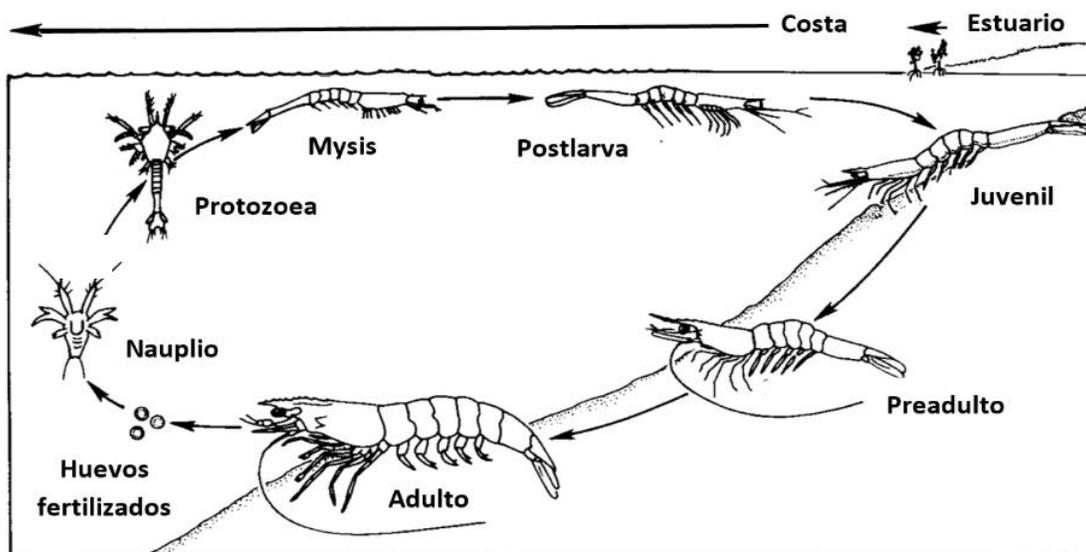


Figura 3. Ciclo de vida de un camarón peneido típico (Modificada de Bayley y Jham, 1992).

Es posible que un FAN de *G. catenatum* durante el desarrollo larvario pueda afectar el crecimiento del camarón, producir bajo rendimiento o prolongar el ciclo de cultivo hasta alcanzar la talla comercial, además de incrementar el riesgo de infecciones provocando mortalidad del camarón (Pérez-Linares *et al*, 2003), aunado a ello y debido a la escasez de personal capacitado para la identificación de las especies que las producen, así como la falta de monitoreo y el desconocimiento de que las TP pueden encontrarse de manera disuelta en el medio acuático e intoxicar a los organismos, es posible que en algunos casos se produzcan pérdidas significativas en la producción camaronícola desde el proceso de producción de larvas (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004).

2.4 Toxinas paralizantes disueltas

En los eventos de mortalidad masiva de larvas de camarón en laboratorios de Sinaloa en los años 1997, 2001 y 2003 reportados por Huei-Meei, *et al.*, (1993) y Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna (2003), pese a que no se encontraron células de fitoplancton en el agua bombeada de la playa, se sugiere que, dado que la toxina es hidrosoluble, es muy probable que estas moléculas hayan pasado a través del filtro del agua de bombeo hacia los laboratorios.

La influencia de los factores ambientales en la producción de TP de dinoflagelados se ha convertido en una nueva línea de investigación debido a los daños que estos metabolitos provocan a la industria de reproducción marina y la salud humana (Lim *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2017; Guan *et al.*, 2018; Griffin *et al.*, 2019; Hii *et al.*, 2019). Sin embargo, todos estos estudios solo se han centrado en la producción de TP intracelulares de las algas toxigénicas, solo unos pocos trabajos se han enfocado en las toxinas extracelulares (Lefebvre *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2010), debido a la falta de un método eficaz para la extracción de estas moléculas disueltas en el agua. De hecho, se ha planteado que la concentración de las TP extracelulares de algunas algas pueden ser incluso mayor que las toxinas TP intracelulares (Yang *et al.*, 2011).

La notable reducción en la tasa de supervivencia de camarones mrisidos en el medio de cultivo de algas productoras de TP indica que estos compuestos extracelulares causan daños significativos a los organismos acuáticos (Chen *et al.*, 2007). Por tanto, conocer el perfil y concentración de TP extracelulares en el medio de cultivo de *G. catenatum* es significativo para comprender su efecto nocivo y persistencia en el medio acuático; para ello es esencial contar con un método preciso para la extracción de TP en el medio de cultivo de algas toxigénicas. Sin embargo, hasta hace poco no se contaba con un método para la extracción TP extracelulares en el medio.

Hasta hace algunos años, la cromatografía líquida de interacción hidrofílica-espectrometría de masas de alta resolución (HILIC-HRMS) se ha utilizado ampliamente para la detección e identificación rápida de varias TP en algas y mariscos (Hummer *et al.*, 1997, Yu *et al.*, 1998; Blay *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016). En 2020 Lijun *et al.*, desarrollaron un método para la extracción de toxinas paralizantes extracelulares, combinando HILIC-HRMS con un método de pretratamiento; estos autores reportan tasas de recuperación de TP superiores al 85.5%. Adicionalmente, con este método, determinaron cuantitativamente por primera vez la concentración de TP extracelulares en el medio de cultivo de *Alexandrium minutum* y *Alexandrium tamarense* en un cultivo que se llevó durante 35 días, alcanzando concentraciones celulares de 8.5×10^4 y 3.3×10^4 céls mL⁻¹ respectivamente.

Cabe destacar que cuando hablamos de especies productoras de TP, cada una de ellas presenta perfiles diferentes en cuanto a la biosíntesis de análogos de STX; en este trabajo realizado por Lijun *et al.*, (2020) se cuantificaron las toxinas para los dinoflagelados de las especies *A. minutum* y *A. tamarense*, encontrando seis análogos para estas cepas (GTX1, GTX2, GTX3 y GTX4, así como C1 y C2). En 2010 Band-Schmidt *et al.*, reportaron el perfil de TP producidos por *Gymnodinium catenatum* para cepas mexicanas, correspondiente a los análogos STX, neoSTX, GTX2-3, dcGTX2-3, B1, C1 y C2, al igual que se ha reportado la presencia de análogos de tipo benzoato GC1-GC6, GC1a-GC6a y GC1b-GC6b (Negri *et al.*, 2007; Vale 2008a; Vale 2008b; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2011; Durán-Riveroll *et al.*, 2013), sin embargo, aún no se ha caracterizado el perfil de toxinas extracelulares para esta especie.

Por otra parte, pese a que la Norma Oficial Mexicana (NOM-129-SSA1-1995) establece un valor límite de 800 $\mu\text{g STXeq kg}^{-1}$ de tejido para consumo humano, y a que se tiene establecido una DL_{50} intraperitoneal en ratones para la Saxitoxina purificada de 10 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso, y por vía oral de 263 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso (Chorus y Bartram, 1999), y dado a que se ha demostrado la presencia de estos compuestos de manera disuelta en el medio de cultivo, es imperativo adoptar un enfoque toxicológico distinto al evaluar las TP más allá de considerar únicamente las dosis, se debe analizar las concentraciones a las que estas sustancias tóxicas pueden inducir mortalidad en los organismos acuáticos.

Por tal motivo, este estudio se enfocó en la evaluación de los efectos en los primeros estadios larvarios de *P. vannamei*, así como los daños en sus diferentes tejidos, originados por las exposiciones a toxinas paralizantes disueltas. Para ello, se implementó y estandarizó una metodología para la extracción de TPd en medio de cultivo, y cuantificación mediante cromatografía líquida de alta precisión (HPLC-FLD). Adicionalmente, para conocer los síntomas y daños de estas toxinas en larvas *P. vannamei*, se realizaron bioensayos de exposición aguda a diferentes diluciones de extractos con TPd (100, 75, 50, 25, y 12%) en los primeros estadios larvarios (nauplio, zoea, mysis y postlarva), para su posterior análisis histopatológico.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, se ha reportado la presencia de FAN de *Gymnodinium catenatum* de manera recurrente en las zonas del Pacífico norte mexicano (Band-Schmidt *et al.*, 2010; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2016; Escárcega-Bata *et al.*, 2023) donde se desarrollan una gran cantidad de actividades acuícolas, como la industria camaronícola, que es una de las actividades más importantes del país por su volumen de producción y valor económico.

Estos organismos productores de TP representan un riesgo potencial para la producción acuícola nacional, sin embargo, debido a la falta de estudios enfocados en la evaluación de su impacto en la salud de los organismos, así como de metodologías para la extracción de las toxinas disueltas, incluidas las TP y sus análogos en el agua, este riesgo no ha sido completamente delucidado.

Dado que las TP son hidrosolubles y persistentes en el ambiente, es crucial comprender los posibles efectos y daños que pueden generar a los organismos, principalmente aquellos que representan un interés económico, como lo es el camarón blanco (*Penaeus vannamei*) entre otros. Especialmente durante las primeras etapas de su desarrollo larvario (nauplio, zoea, mysis, hasta llegar a postlarva) donde se debe prestar atención especial a su desarrollo y estado óptimo, con el objetivo de asegurar una buena producción.

Este trabajo ayudará a comprender los efectos de las exposiciones agudas en las larvas de camarón, el papel de estas toxinas disueltas presentes en condiciones naturales, así como sus posibles impactos en la producción de larvas para el cultivo, dando lugar a las siguientes preguntas de investigación:

- I. ¿Cuáles son los análogos de TP que produce *G. catenatum* de manera extracelular y en qué concentraciones?
- II. ¿Cuál es la concentración letal media (CL₅₀) del contenido celular disuelto de *G. catenatum*, incluidas las toxinas paralizantes, en los primeros estadios larvarios del camarón blanco?

- III. ¿En alguno de los estadios larvarios del camarón es más susceptible a los efectos de las TP disueltas?

- IV. ¿Cuáles son los efectos a nivel histopatológico en los diferentes tejidos de las larvas cuando son expuestas a diferentes concentraciones del contenido celular disuelto de *G. catenatum*, incluidas las toxinas paralizantes?

4.HIPÓTESIS

La exposición de *Penaeus vannamei* a extractos celulares disueltos de *Gymnodinium catenatum*, tiene efectos letales en los primeros estadios larvarios, además, producirá daños tisulares en los organismos, siendo alguno de los estadios (nauplio, zoea, mysis o postlarva) más susceptibles a los efectos de estas toxinas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar los efectos de la exposición aguda del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) al contenido celular disuelto de *Gymnodinium catenatum*, en los primeros estadios larvarios.

5.2 Objetivos particulares

- Implementar una técnica para la extracción de toxinas disueltas y transformación química de análogos de Saxitoxina.
- Cuantificar las toxinas disueltas de cultivos del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*.
- Determinar la CL₅₀ en los primeros estadios larvarios de Camarón blanco.
- Describir y cuantificar los daños a nivel tisular en los diferentes órganos de las larvas producidos por la exposición a extractos celulares disueltos de *Gymnodinium catenatum*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo y cosecha de dinoflagelados.

Se cultivó la cepa BAPAZ_10 de *Gymnodinium catenatum* aislada de la Bahía de La Paz por la Dra. Christine Johana Band Schmidt, en agua de mar filtrada, esterilizada y enriquecida con medio GSe, adicionado con extracto de lombricompostaje (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015). Las cepas se mantuvieron a una temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, salinidad de 34, con una iluminación de $150 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y con un ciclo de luz-oscuridad 12:12h. Los cultivos se escalaron progresivamente desde tubos de ensaye de 50 mL con 20 mL de medio GSe hasta matraces de 2 L con 1 L de medio de cultivo. Para conocer la cinética de crecimiento de *G. catenatum* se tomaron muestras cada 8-10 días y se realizaron conteos celulares utilizando una cámara Sedgewick-Rafter.

6.2 Obtención de muestras para el análisis de toxinas paralizantes

Una vez que los cultivos de *G. catenatum* alcanzaron la biomasa requerida, estos fueron cosechados para su análisis de toxinas. La cosecha se llevó a cabo mediante la filtración de cada cultivo, utilizando filtros de fibra de vidrio GF/F de 47 mm de diámetro de $0.7 \mu\text{m}$ de tamaño de poro y con ayuda de una bomba manual de vacío. De cada muestra, se registró el volumen filtrado y el conteo celular para establecer la relación de células presentes en cada filtro, los cuales fueron preservados en congelación para su posterior análisis de TP.

Por otra parte, el extracto de TP se obtuvo mediante la metodología propuesta por Frangópulos *et al.* (2004), donde los filtros equivalentes a una concentración 4×10^6 células de *G. catenatum* se maceraron con 2mL de agua de mar filtrada y esterilizada; Una vez obtenida una mezcla homogénea, el extracto fue sonicado en 3 ciclos de 1 min x 1 min de reposo. Posteriormente, se centrifugó por 25 min (12,000 rpm a 15°C) y utilizando una jeringa, el sobrenadante se pasó a través de acrodiscos de fibra de vidrio (25 mm de diámetro) y $0.45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro para finalmente ser aforado a 100 mL con agua de mar filtrada y esterilizada.

6.3 Extracción de toxinas paralizantes particulada y disuelta

La extracción de toxinas intracelulares o particuladas (TPp) se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por Yu *et al.*, (1998) La cual consiste en macerar los filtros GF/F marca Whatman utilizando una varilla de vidrio, Posteriormente, se adicionaron 4 mL de ácido acético 0.03 N. Una vez macerados los filtros, estos son sonicados en 3 ciclos de 1 min x 1 min de reposo. Posteriormente se pasaron a tubos de centrifuga y se centrifugaron por 25 min (12,000 rpm a 15°C) y el sobrenadante se pasó a través de acrodiscos de fibra de vidrio (25 mm de diámetro) y 0.45 µm de tamaño de poro utilizando jeringas para su posterior análisis por HPLC.

La extracción de toxinas paralizantes disueltas (TPd) se realizó basado en la metodología descrita por Lijun *et al.*, (2020), donde las TP extracelulares en el cultivo de *G. catenatum* fueron concentradas en columnas de extracción de fase sólida (SPE) usando cartuchos de (Graphitized Carbon Blacken) (250 mg, 6mL) producidos por NanoChrom; Los cartuchos se preconditionaron con 3mL de acetonitrilo y posteriormente con 3mL de acetonitrilo/agua/ácido acético (20:80:1,v/v/v), luego, se hicieron fluir en los cartuchos 100 mL de medio de cultivo con las toxinas disueltas ajustando el pH a 3 con ácido fórmico (Ácido fórmico 2.5%) a una velocidad de flujo de 3mL min⁻¹. Los cartuchos fueron enjuagados con 1mL de solución de ácido fórmico (pH 3) y se secaron al vacío durante 5 min. Las TPd contenidas en la columna se recuperaron eluyendo acetonitrilo/agua/ácido acético (75:25:0.25,v/v/v); con la finalidad de maximizar el porcentaje de recuperación de toxinas, se realizaron cinco enjuagues con 3mL de esta mezcla en lugar de tres como lo plantean los autores; de igual manera para concentrar las toxinas, se sustituyó el método de evaporación con rotaevaporador por el uso de una Liofilizadora durante 24 h, para ello, fue necesario previamente evaporar los solventes con ayuda de nitrógeno gas. El residuo recuperado fue resuspendido con 2mL ácido acético 0.03 N y se filtró a través de una membrana de 0.22 µm (nylon 66), el extracto se mantuvo a -20 °C hasta su análisis por HPLC-FLD.

6.3.1 Identificación y cuantificación de toxinas paralizantes por HPLC

Para la derivatización, 150 µL de cada extracto se mezclaron con 37 µL de ácido hidrociorhídrico 1.0 N, esto se incubó por 15 min a 90 °C para convertir las toxinas N-sulfocarbamatadas a sus

toxinas carbamatadas correspondientes. Luego de enfriarse a temperatura ambiente, la muestra se neutralizó con 75 µL de acetato de sodio 1 N. Los hidrolizados y las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis (antes de 24 h).

Los extractos hidrolizados y no hidrolizados se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos en corridas independientes para la identificación y cuantificación de las TP. Las toxinas N-sulfocarbamatadas (incluyendo GTX5/B1 y GTX6/B2) se cuantificaron calculando el incremento del pico máximo para relacionarlas con las toxinas carbamatadas formadas durante el tratamiento con HCl (B1 a STX, B2 a neoSTX, C1 a GTX2, C2 a GTX3, C3 a GTX1 y C4 a GTX4).

El sistema de cromatografía utilizado fue un HP 1260 infinity II que consiste en un auto-muestreador, desgasificador, bomba cuaternaria, dos bombas binarias usadas para las reacciones post-columna, un detector de fluorescencia, una columna C-18 y un reactor postcolumna. Las TP se detectaron usando una longitud de onda de excitación de 333 nm y una de emisión de 390 nm. La identificación de las TP tanto particuladas como disueltas se realizó utilizando el método comatográfico de Hummert *et al.*, 1997 (modificado por Yu *et al.*, 1998), comparando los tiempos de retención de las muestras y por coelución con estándares comerciales de: saxitoxina (STX), neosaxitoxina (neoSTX), goniautoxinas-1,4 (GTX 1,4), decarbamoilsaxitoxina (dcSTX), decarbamoilgoniautoxinas-2,3 (dc GTX 2,3) y N-sulfocarbamoil-11-hydrosulfato (C1,2) (National Research Council Canada, Halifax, NS, Canadá).

6.4 Estandarización del método

Para corroborar la efectividad del método, se evaluó el porcentaje de recuperación de TPd con este método de extracción; Para ello, se extrajeron las TP de 2 filtros provenientes de un mismo cultivo, con el mismo volumen filtrado.

Uno de estos filtros se extrajo utilizando el método tradicional de extracción de TPp propuesto por Yu *et al.*, (1998) como control, el otro filtro se procesó mediante la metodología planteada por Lijun *et al.*, (2020).

Para evitar la subestimación de estos porcentajes de recuperación, se realizó el ajuste de recuperación de toxinas considerando la pérdida de muestra que pudiera generarse durante el procesamiento para la liofilización y reconstitución de la muestra para su posterior análisis por HPLC; Para ello, también se evaluó el porcentaje de recuperación de un tercer filtro proveniente del mismo cultivo el cual se extrajo utilizando de igual forma la metodología de Yu *et al.*, (1998) el cuál adicionalmente pasó por los procesos de liofilización y reconstitución de la muestra.

La posterior identificación y cuantificación de análogos de TP mediante HPLC se realizó mediante la metodología previamente descrita en la sección 6.3.1.

6.5 Diseño experimental

Se evaluaron los efectos Agudos de las TPd en larvas de *P. vannamei* en sus primeros estadios larvarios (nauplio, zoea, mysis y postlarva 11). Estas larvas fueron donadas por la empresa “Comercializadora de Larvas, Nauplios y Camarón, S.A de C.V.”, ubicada en Mazatlán, Sinaloa. Cada estadio correspondió a un lote de 5,000 larvas almacenadas en una bolsa con inyección de oxígeno y contenidas en una hielera. La movilización de los organismos se realizó vía aérea evitando un tiempo de entrega mayor a 24 h. Se transportaron a las instalaciones del laboratorio húmedo de nutrición acuícola del CIBNOR donde pasaron por un proceso de aclimatación para evitar el estrés térmico, utilizando baño maría incrementando la temperatura 1 °C cada media hora, hasta poder ser depositadas en contenedores de 20 L, donde se mantuvieron en agua de mar a 27 °C con aeración y una salinidad de 34.

Para el mantenimiento de los organismos, se adicionó todos los días alimento vivo (microalga *Isochrysis sp.* obtenida del Laboratorio de Alimento vivo de CIBNOR, S.C., así como 2 g de alimento paletizado específico para cada subestadio; una vez aclimatados y en condiciones óptimas para cada estadio, el bioensayo se llevó a cabo de la siguiente manera:

6.5.1 Ensayo de toxicidad aguda

Para determinar la CL₅₀ en *L. vannamei* se utilizó la metodología planteada por Llanos-Rivera y Astuya-Villalón (2023), utilizando placas de 96 pozos, en las cuales, para evitar que ocurra la

evaporación del contenido de los pocillos, se rellenaron con 1.2 mL de agua de mar la primera y última fila, además de la primera y última columna de la placa (Líneas en figura 4).

Con el uso de micropipetas desde una caja Petri con el material biológico, se tomó cada larva en un volumen de 20 μ L (en el caso de los estadios mysis y PL11, para evitar lastimar a los organismos, se recortó la punta de la micropipeta para coleccionar las larvas), y se depositaron al azar un organismo en cada uno de los pozos que correspondieron al control y los distintos tratamientos, con un total de 30 organismos por condición experimental. El grupo control correspondió a 1.3 mL de agua de mar filtrada. En el caso de los tratamientos, se realizaron diluciones seriadas al 50% del extracto de *G. catenatum* (100%, 75%, 50%, 25%, y 12.5%) quedando un volumen final en cada pocillo de 1.2 mL (Figura 4; Tabla 2). Los bioensayos se realizaron en cada uno de los estadios larvarios (nauplio, zoea, mysis).

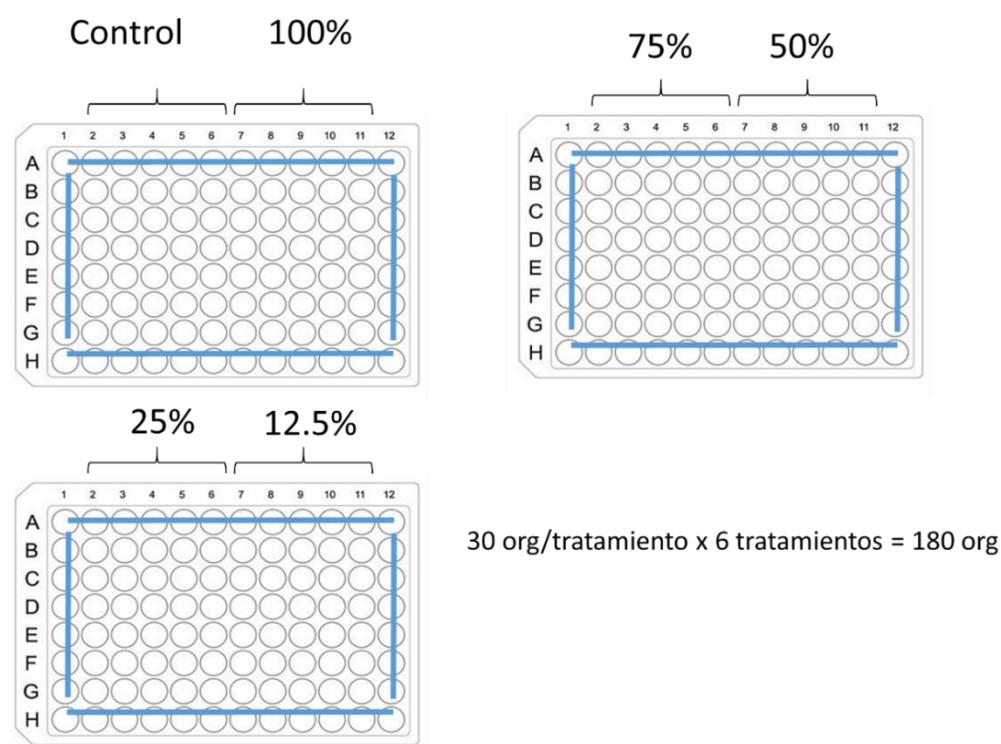


Figura 4. Diseño experimental para bioensayos con larvas de *P. vannamei* en placas de 96 pozos.

Tabla 2. Volúmenes de toxina disuelta/agua de mar a agregar en cada pozo por tratamiento para prueba experimental en placa de 96 pozos. Volumen final: 120 μ L.

Tratamiento	Vol. De agua de mar (μ L)	Vol. De extracto de toxinas (μ L)
Control	100	0
100%	0	100
75%	25	75
50%	50	50
25%	75	25
12.5%	87.5	12.5

Nota: 100 μ L. de volumen agregado + 20 μ L. para la toma del organismo

Para el caso de PL11, debido a que los organismos tenían una mayor talla, se utilizaron placas de 12 pozos; Cada pozo con 6 larvas en un volumen total de 4 mL, con 6 pozos por condición experimental (Fig. 5), manteniendo la proporción 1:5 de volumen para la toma de los organismos con relación al volumen adicionado para cada tratamiento (Tabla 3).

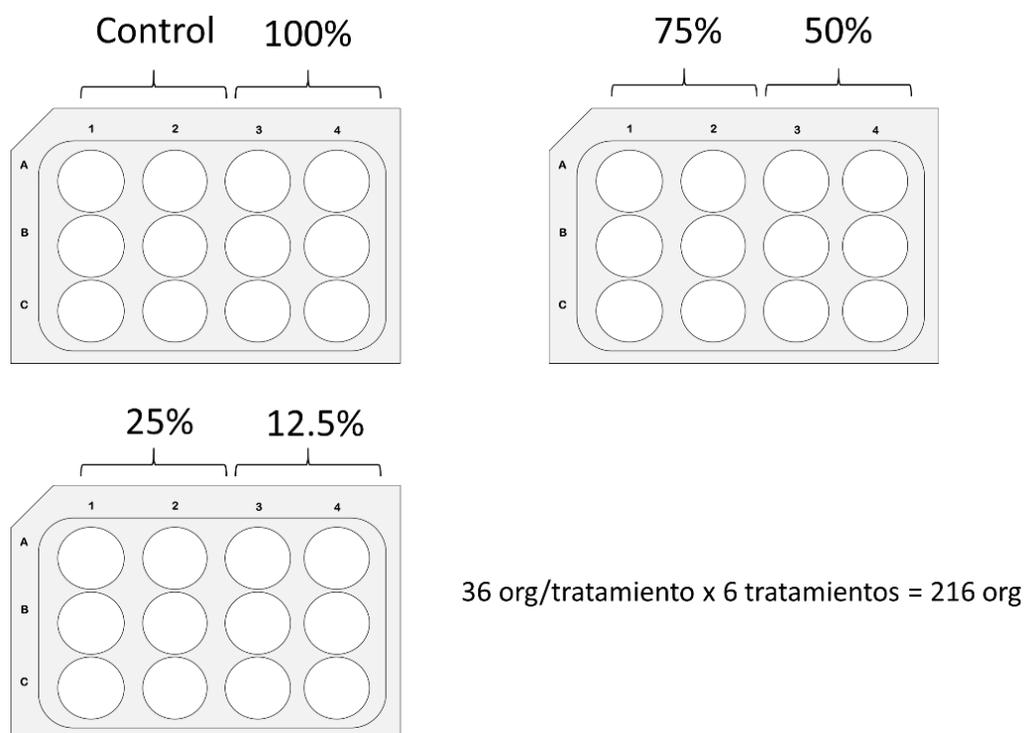


Figura 5. Diseño experimental para bioensayos con Postlarvas de *P. vannamei* en placas de 12 pozos.

Tabla 3. Volúmenes de toxina disuelta/agua de mar a agregar en cada pozo por tratamiento para prueba experimental en placa de 12 pozos. Volumen final: 4 mL.

Tratamiento	Vol. De agua de mar (mL)	Vol. De extracto de toxinas (mL)
Control	3.33	0
100%	0	3.33
75%	0.83	2.5
50%	1.66	1.66
25%	2.5	0.83
12.50%	2.92	0.41

Nota: 3.33 mL. de volumen agregado + 660 μ L. para la toma de organismos (110 μ L por larva)

Dado que cada uno de los estadios y subestadios transcurren en lapsos de horas, la mortalidad se cuantificó a las 4 horas de iniciado el bioensayo, llevando a cabo observaciones cada 15 a 20 min, donde se observó el comportamiento de las larvas (Nado errático, parálisis, o que no respondan a estímulos físicos con una pipeta). Al finalizar el experimento, los organismos fueron recuperados y procesados para la extracción (apartado 6.3), identificación y cuantificación (apartado 6.3.1) de TP en los tejidos de los camarones, así como para la evaluación de las posibles lesiones histopatológicas que pudieran generar las TP extracelulares diferentes tejidos.

Mediante la función “drm” del programa estadístico Rstudio, se modelaron y graficaron las curvas Dosis-respuesta para cada estadio, a partir de las cuales se calcularon las concentraciones de contenido celular disuelto capaz de generar mortalidad en el 50% de los individuos en cada fase del desarrollo larvario (CL₅₀).

6.6 Extracción de TP en tejidos de PL11 de *Penaeus vannamei*

Se tomaron 6 organismos de cada tratamiento para extraer las TP acumuladas en los tejidos de los camarones (TPc). Estas larvas fueron filtradas a través de un filtro de fibra de vidrio GF/F con ayuda de una bomba manual de vacío y congeladas en sobres de papel aluminio. Posteriormente, la extracción de TP en los tejidos de las PL11 se llevó a cabo mediante la metodología propuesta por Yu *et al.*, 1998 (Apartado 6.3).

La cuantificación de TP en tejidos de camarones de igual forma se realizó utilizando la metodología previamente descrita en el apartado 6.3; La extracción y cuantificación de TPc se realizó por triplicado (apartado 6.3.1).

6.7 Evaluación de lesiones histopatológicas

Las larvas de cada condición experimental y de los controles se fijaron en solución de Davidson durante 48 h (Bell y Lightner, 1988). Posteriormente los tejidos de los camarones fueron deshidratados en una serie ascendente de etanol (70% a 100%), aclarados con xileno, e infiltrados en parafina en un procesador automático de tejidos LEICA ASP200S, para pasar a un proceso de inclusión en parafina líquida a 60 °C. La inclusión de las muestras se llevó a cabo en Paraplast X-Tra con punto de fusión de 54-56 °C en un centro de inclusión LEICA EG1150H y EG1150C. Se realizaron cortes histológicos de 4 µm de espesor en un micrótopo de rotación LEICA RM2155, para extenderlos se colocaron en un baño de flotación con agua y grenetina al 1% a 43°C. Para observar la mayor parte de tejidos se elaboraron cortes en serie, obteniendo de 10 a 20 laminillas de cada bloque de parafina conteniendo de 5 a 10 larvas. Enseguida se tomaron los cortes del baño de flotación con portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24h. Los tejidos se tiñeron con Hematoxilina de Harris-eosina (H&E) en un teñidor automático LEICA ST5020 y se montaron en resina sintética con cubreobjetos (Lightner, 1996). Finalmente, las preparaciones histológicas se observaron bajo el microscopio óptico compuesto OLYMPUS BX41 con objetivos 4, 10, 20, 40 y 100×. Se tomaron imágenes con una cámara digital para microscopio marca Nikon Digital Sight DS-Ri1® conectada a una computadora.

Los daños y/o alteraciones estructurales en los órganos y tejidos de los camarones causados por las TPd se evaluaron en el estadio PL11 y se realizaron de la siguiente manera:

6.7.1 Descriptiva

Con base en la descripción histológica de camarones sanos por Bell y Lightner (1988), se describieron las lesiones histopatológicas observadas en los tejidos de las larvas de camarones expuestos a las TPd producidas por *G. catenatum* con imágenes digitalizadas en magnificaciones de 4, 10, 20, 40 y 100×.

6.7.2 Semi-cuantitativa

La evaluación semi-cuantitativa se llevó a cabo utilizando imágenes digitalizadas (microfotografías) de los tejidos, obtenidas mediante un sistema de análisis digital de imágenes (Image Pro-Premier v.9.0), registrando los daños en los órganos, dándole un valor numérico al nivel de daños y/o alteraciones en los órganos y tejidos de acuerdo con el grado de afectación según lo propuesto por Lightner (1996), provocados por las Tpd en las larvas de camarón.

El grado de daño histológico observado en los tejidos de cada tratamiento se determinó de acuerdo con el porcentaje del total de campos con daño histológico encontrado sobre el total observado en el número de muestras de cada tratamiento (ninguno, leve, moderado y severo = 0, 1, 2 y 3) de los campos con daño histológico, en comparación con las secciones control. La prevalencia de daño en los tejidos se determinó según Bush *et al.* (1997).

6.7.3 Cuantitativa

El tamaño (altura) de las células Hpb del hepatopáncreas se determinó usando un sistema de análisis digital de imágenes Image Pro Premier (v. 9.0). Las mediciones se realizaron en imágenes a 40× a partir de tres secciones diferentes de cada muestra, midiendo la altura desde la región basal (en contacto con la membrana basal) hasta la región apical (borde libre) donde se localiza el lumen, expresándose el tamaño de las células epiteliales en micras lineales.

El área ocupada por el músculo fue determinada en imágenes a 40× a partir de cinco secciones diferentes de cada muestra. El análisis de imágenes se basa en la intensidad del color específico del tejido del músculo y el tejido conectivo, se calcula automáticamente en píxeles y se expresa en micras cuadradas.

6.8 Análisis estadísticos de variables histológicas cualitativas y cuantitativas

La normalidad de los datos de histología se verificó con la prueba Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianza fue determinada mediante la prueba Levene. Dado que los datos presentaron una distribución no normal, las diferencias entre los tratamientos se compararon por análisis de

varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, con valor de significancia de $p < 0.05$. En los casos donde se encontraron diferencias significativas se realizó un análisis *a posteriori* de comparación de medianas, utilizando la prueba de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico Rstudio 4.3.0.

7. RESULTADOS

7.1 Estandarización del método: Porcentaje de recuperación

Se identificaron 8 análogos de saxitoxina en la cepa BPAZGC_10, los porcentajes de recuperación de cada uno de los análogos identificados obtenidas con el método de extracción propuesto por Lijun *et al.*, (2020) para toxinas disueltas se muestran en la tabla 4. Los análogos que presentaron el mayor porcentaje de recuperación fueron B1, GTX3, C1 y C2 (98.27, 97.22, 84.63 Y 70.54 %, respectivamente).

Cabe destacar que los valores de TP obtenidos a partir del método propuesto por Yu *et al.*, (1998) fueron ajustados al porcentaje de recuperación de toxinas después de su procesamiento de liofilización y reconstitución de muestra, el cual fue del 92.61%.

Tabla 4. Porcentaje de recuperación por análogos de TPd con el método de extracción de Lijun *et al.*, (2020).

Análogo	Conc. Muestra particulada ¹ (ng STXeq mL ⁻¹)	Conc. Muestra disuelta (ng STXeq mL ⁻¹)	% Recuperación
GTX 2	1.66	0.70	42.14
GTX 3	0.84	0.82	97.22
dcSTX	0.83	0.26	31.06
dcGTX2	5.04	1.57	31.06
dcGTX3	3.66	1.55	42.38
B1	0.13	0.13	98.27
C1	116.77	98.83	84.63
C2	652.1	460.01	70.54
Total	781.03	563.86	72.19

Nota: Valores ajustados al porcentaje de recuperación después del proceso de liofilización.

Con este método de extracción y recuperación de toxinas disueltas y tras realizar las modificaciones de incrementar el número de enjuagues a las columnas, al igual que optar por el proceso de liofilización, se logró obtener un porcentaje de recuperación total del 72.19% de las TPd presentes en el medio de cultivo de *G catenatum*.

7.2 Cuantificación y perfil de toxinas de extractos de cultivo de *G. catenatum*

Se obtuvieron las concentraciones de TP de *G. catenatum* tanto particuladas (TPp; intracelulares) como disueltas (TPd; extracelulares) durante la cinética de crecimiento de un cultivo de *G. catenatum* con una duración de 35 días (Fig. 6).

En el caso de las TPp, las concentraciones para el día 3 de cultivo fue de 22.81 ng STXeq mL⁻¹, alcanzando las mayores concentraciones en el día 14 con un valor de 77.46 ng STXeq mL⁻¹; Estas concentraciones TPp son consistes con la etapa de cultivo en la que se presentó la mayor densidad celular (1032 cél mL⁻¹). Posterior a este muestreo, comenzó la etapa de decaimiento y muerte del cultivo, llegando al día 35 con un valor mínimo de 4.28 ng STXeq mL⁻¹ (Fig. 6).

En cuanto a las TPd, las concentraciones oscilaron desde los 1.9 ng STXeq mL⁻¹ al día 3 de cultivo, hasta llegar a una concentración final de 252 ng STXeq mL⁻¹ al día 35. Las toxinas disueltas incrementaron de manera significativa a partir del día 21, donde inició el decaimiento del cultivo, lo cual corresponde a la liberación de las TP particuladas, al ser diseminadas al medio tras la lisis celular (Fig. 6).

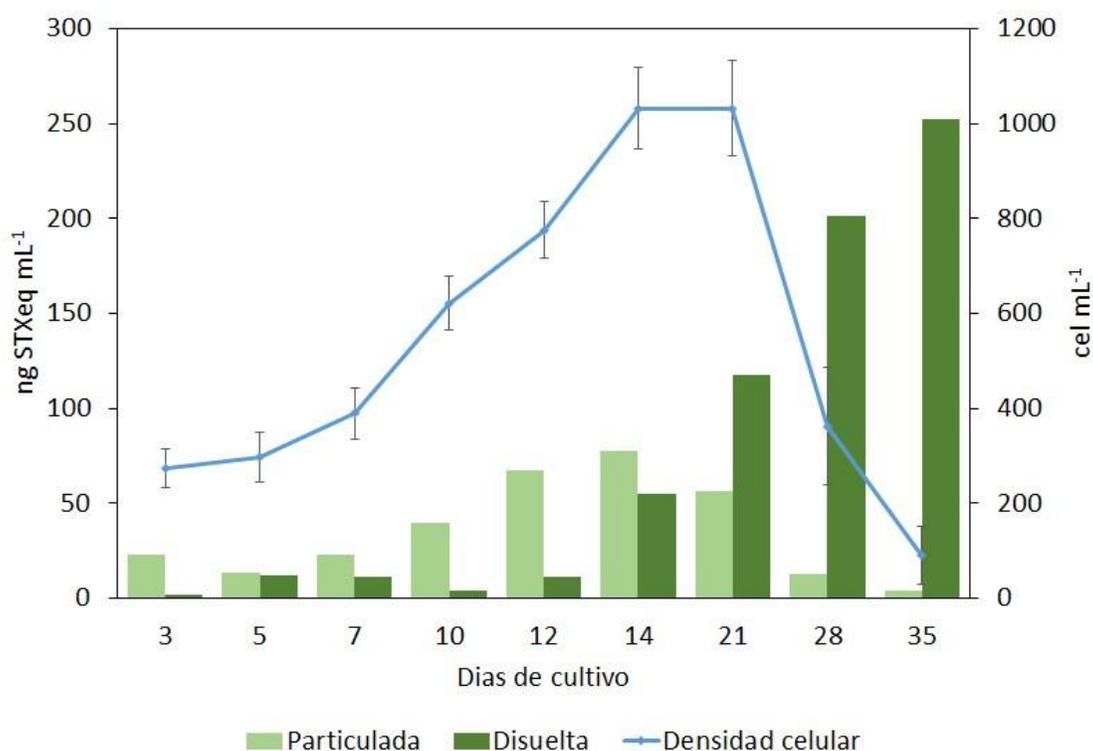


Figura 6. Concentraciones de TP particuladas y disueltas a lo largo de las etapas de cultivo de *G. catenatum*.

7.2.1 Perfil de toxinas

Se identificaron 8 análogos de la STX de la cepa GCBAPAZ_10 de *G. catenatum* tanto particuladas como disueltas, correspondiendo a una composición de los siguientes análogos de STX en porcentaje molar:

Disuelta:

C1 > C2 > dcGTX2 > dcSTX > dcGTX3 > GTX2 > GTX3 > B1

Particulada:

C2 > C1 > dcGTX3 > dcGTX2 > GTX3 > GTX2 > dcSTX > B1

Esta composición presenta variaciones en la dominancia de sus análogos; si bien de manera particulada está compuesta predominantemente por el análogo C2 y C1 (76.76 y 19.35 %, respectivamente). Por otro lado, en las TPd C1 es el análogo que se encuentra en mayor porcentaje molar con 43.34%, mientras que el análogo C2 corresponde a un 39.82%, ambos análogos (C1 y C2) pertenecen a las toxinas de tipo Sulfocarbamoil.

En términos de porcentaje molar promedio por grupo, las toxinas de tipo sulfocarbamoil representan el 92.72% y 89.99% (TPp y TPd, respectivamente), seguidas por las toxinas decarbamoil, con un 6.34% y 9.52%, mientras que las toxinas carbamoil únicamente se encuentran en porcentajes menores al 1% en ambos casos (Fig. 7).

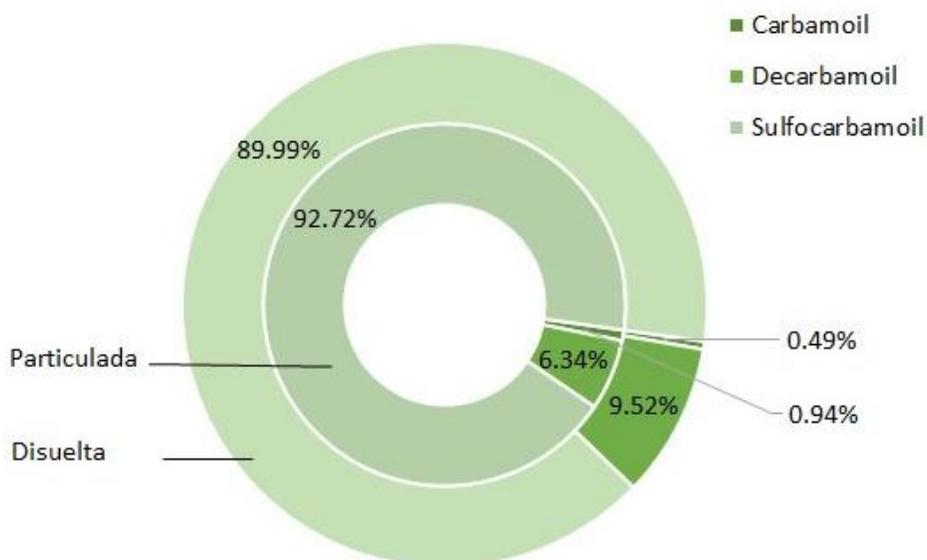


Figura 7. Porcentaje promedio de análogos por grupo de TP particuladas y disueltas en cultivo de *G. catenatum*.

El grupo de toxinas con mayor aporte a las TPs al inicio del cultivo pertenecen al grupo de las toxinas sulfocarbamoil con un 98.03% molar, sin embargo, a los 35 días del experimento, este porcentaje disminuyó hasta un 64.35%. Por otro lado, las toxinas decarbamoil incrementaron desde 1.09% en el tiempo inicial, hasta un 30.30% al día 35. De igual forma, los análogos de toxinas carbamoil aumentaron desde un 0.88% hasta un 5.35% al finalizar el cultivo (Fig. 8A).

Durante las fases de crecimiento de *G. catenatum* la proporción de estos análogos muestra variaciones principalmente en la fase estacionaria y de muerte, donde se observa una transformación de análogos de tipo sulfocarbamoil a análogos de tipo decarbamoil. Por otra parte, en las TPd, las toxinas sulfocarbamoil al inicio del cultivo representaban un 88.09%, al final del cultivo, estas disminuyeron a un 77.70%; Por otra parte, los análogos de toxinas decarbamoil aumentaron de un 10.14% a un 22.15%. Finalmente, los análogos de tipo carbamoil también disminuyeron desde 1.78% iniciado el cultivo, hasta un 0.14% al final del experimento (Fig. 8B).

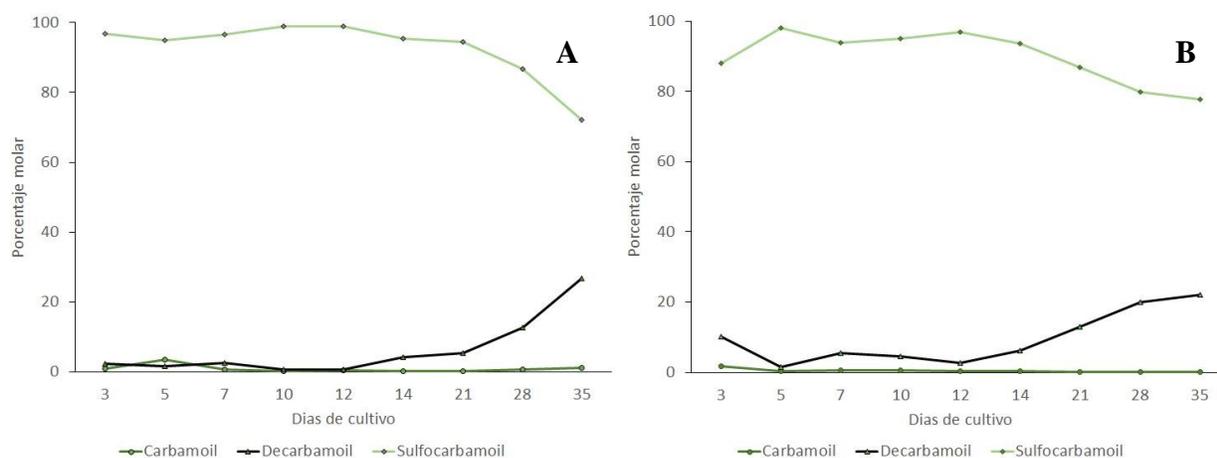


Figura 8. Porcentaje de análogos por grupos de TP particuladas y disueltas en cultivo de *G. catenatum* a lo largo del tiempo de cultivo; A) TPp; B) TPd.

7.3 Bioensayo de toxicidad aguda con larvas de *Penaeus vannamei*.

Se obtuvieron los porcentajes de mortalidad para cada uno de los estadios, obteniendo diferencias significativas mediante la prueba de Kruskal-Wallis y mediante la prueba post-hoc de Bonferroni, se determinó que los estadios más susceptibles a los efectos de las TPd en cuanto a su sobrevivencia corresponden a los estadios de mysis y PL11; Los estadios de nauplio y zoea no son estadísticamente diferentes entre sí (Fig. 9).

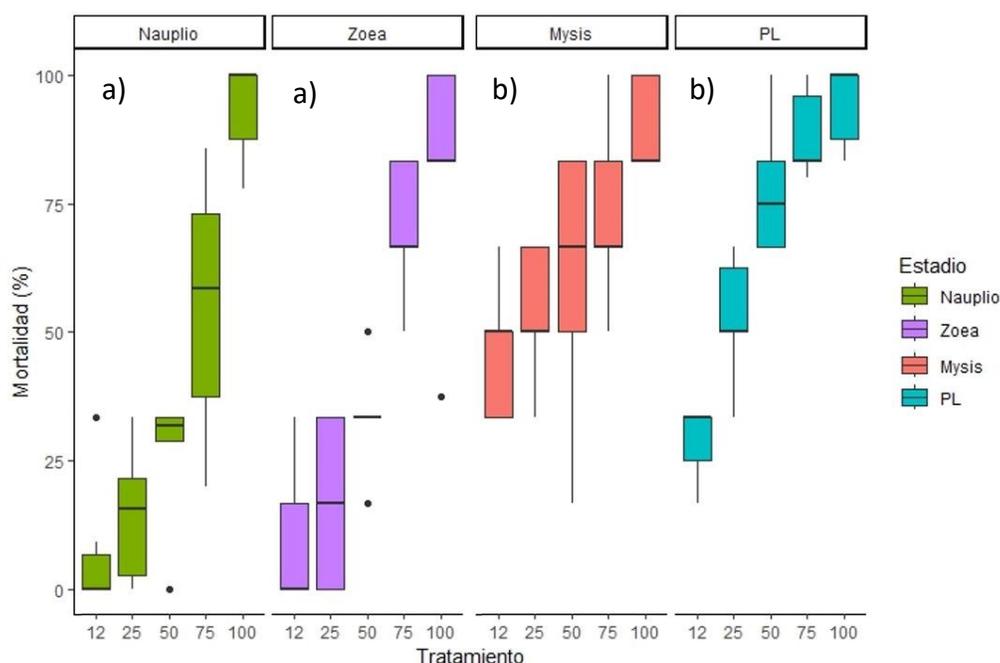


Figura 9. Porcentaje de mortalidad por estadio larvario de *P. vannamei* ante diferentes diluciones de extracto celular disuelto de *G. catenatum*. (a)(b): Diferencias significativas entre grupos. ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.

7.3.1 Concentraciones letales medias (CL50)

Se obtuvieron modelos dosis-respuesta mediante la función “drm” del programa estadístico Rstudio, a partir de los cuales se calcularon las CL₅₀ para cada uno de los estadios con sus respectivos intervalos de confianza; las CL₅₀ para cada uno de los estadios (nauplio, zoea, mysis y PL11) fueron de 65.72 (± 5.94), 57.63 (± 3.80), 18.12 (± 1.22) y 21.75 % (± 1.92), respectivamente (Fig. 10).

La concentración de Tpd en el extracto de contenido celular de *G. catenatum* corresponde a una concentración de 273.05 ng STXeq mL⁻¹, por lo que dichas CL₅₀ para cada estadio son equivalentes a concentraciones de 179.44, 157.35, 49.47 y 59.38 ng STXeq mL⁻¹, respectivamente.

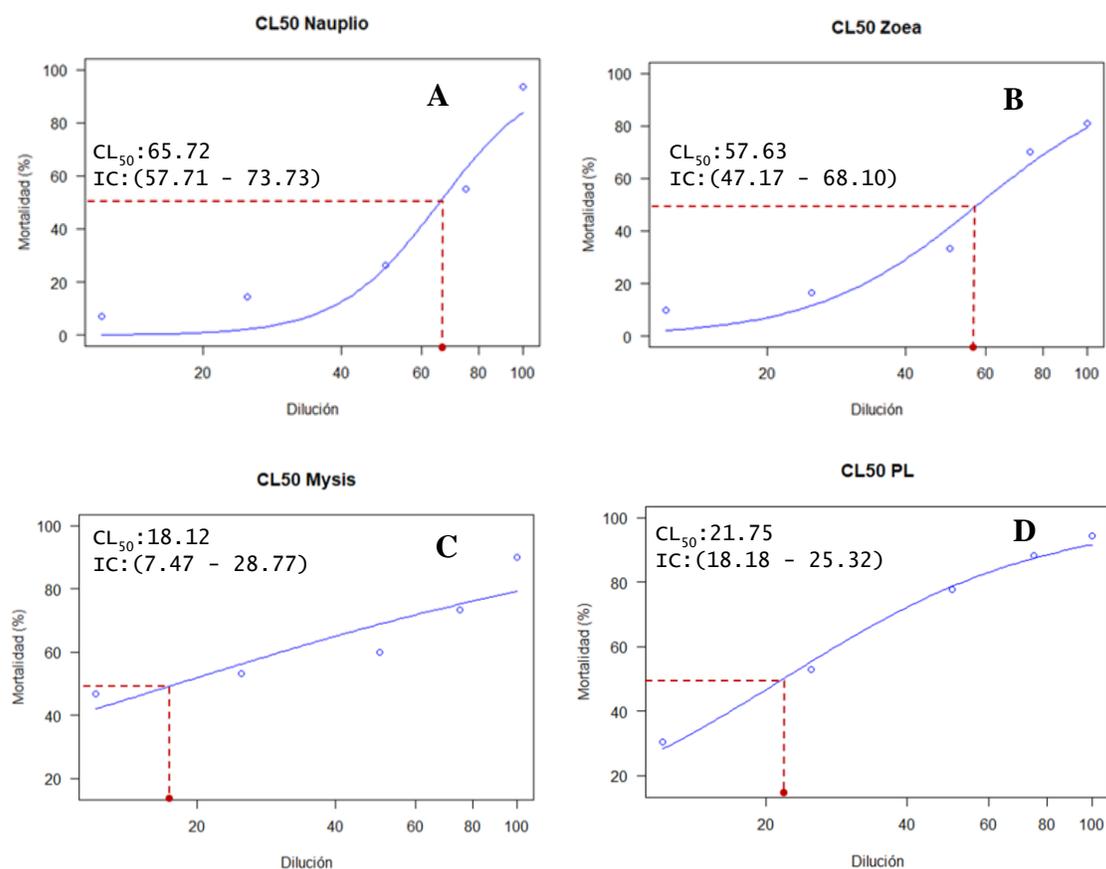


Figura 10. Modelo Dosis-Respuesta y estimación de CL₅₀ en larvas de *P. vannamei*. Mediante la función drm en programa Rstudio. ($p < 0.05$). A) nauplio; B) zoea; C) mysis; D) PL11.

En el caso de los estadios de nauplio y zoea, las primeras mortalidades en las mayores diluciones se presentaron a partir de los 30 min; mientras que las mortalidades registradas luego de 4 horas de iniciada la exposición al extracto de *G. catenatum*, se presentaron en todas las concentraciones probadas (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Porcentaje de mortalidad en nauplios para cada tratamiento durante el bioensayo de exposición a TPd.

Tiempo (min)	Mortalidad (%)					
	Control	100%	75%	Dilución		
				50%	25%	12%
5	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
30	0	13	0	4	0	4
60	0	23	14	7	4	4
90	0	46	14	7	7	4
120	0	60	20	10	7	7
150	0	66	24	10	7	7
180	0	73	40	10	10	7
210	0	80	47	14	14	7
240	0	80	54	17	14	7

Tabla 6. Porcentaje de mortalidad en zoeas para cada tratamiento durante el bioensayo de exposición a TPd.

Tiempo (min)	Mortalidad (%)					
	Control	100%	75%	Dilución		
				50%	25%	12%
5	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
30	0	13	4	4	0	4
60	0	23	10	7	4	4
90	0	46	14	7	7	4
120	0	60	20	10	7	7
150	0	66	37	17	7	7
180	0	73	47	20	10	7
210	0	80	55	24	14	10
240	0	80	70	33	16	10

Para el caso de los estadios de mysis y PL11, además que sus mortalidades son estadísticamente diferentes a los estadios anteriores, se registraron las mayores mortalidades transcurridas apenas 2 horas, registrando las primeras muertes desde los 5 min de iniciada la exposición (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Porcentaje de mortalidad en mysis para cada tratamiento durante el bioensayo de exposición a TPd.

Tiempo (min)	Mortalidad (%)					
	Control	Dilución				
		100%	75%	50%	25%	12%
5	0	10	3	0	0	0
15	0	30	18	15	10	10
30	0	46	36	30	26	18
60	0	60	50	46	40	30
90	0	76	73	53	46	36
120	0	90	73	60	53	47

Tabla 8. Porcentaje de mortalidad en PL11 para cada tratamiento durante el bioensayo de exposición a TPd.

Tiempo (min)	Mortalidad (%)					
	Control	Dilución				
		100%	75%	50%	25%	12%
5	0	6	3	0	0	0
15	0	30	20	18	12	7
30	0	46	43	36	27	19
60	0	63	56	46	40	25
90	0	80	80	66	44	28
120	0	94	88	78	53	31

Las larvas del estadio PL11 fueron utilizada para el análisis histológico, debido a que es el estadio en el cual se realiza la entrega de las larvas a los acuicultores para la siembra y por ende, es de gran interés conocer el estado de estas larvas a la hora de la entrega y buscar opciones para mitigar y/o prevenir el contacto toxinas-larvas y así garantizar una mejor calidad de entrega y con ello, una buena producción de camarón en las granjas.

7.3.2 Descripción del comportamiento de las larvas expuestas al contenido celular de *G. catenatum*

Adicionalmente, se registraron los signos clínicos ante la exposición de las larvas a los extractos celulares disueltos de *G. catenatum*, que dependiendo del estadio y el tiempo de exposición se describieron de manera general en los organismos (Tabla 9).

Tabla 9. Signos clínicos en PL11 expuestas a extractos celulares *G. catenatum*

Nivel de exposición	Signos clínicos
Inicial	Nado activo en círculos.
Bajo	Aletargamiento, ataxia, perdida de equilibrio, disminución de respuesta de fototaxis, reducción en rango de movimiento de apéndices.
Medio	Nado errático, ataxia, sin desplazamiento dentro del pozo, falta de respuesta a estímulos físicos.
Terminal	Parálisis, espasmos en ojos y apéndices, palpitación del corazón visible.
Muerte ecológica	No se aprecia ningún espasmo en ojos ni apéndices, no hay actividad cardíaca visible en el organismo.

7.4 Acumulación de TP en tejidos de PL11

Después de ser expuestas a diferentes tratamientos del extracto de TPd, es importante conocer la dinámica de estas toxinas al ingresar al organismo. Es por ello por lo que se cuantificaron las concentraciones de TP en los tejidos de camarones (TPc).

Los resultados obtenidos demostraron que las concentraciones totales promedio de TPc por organismo son consistentes con la presencia de TPd: Los tratamientos con mayores concentraciones de TPc corresponden a los tratamientos de mayores concentraciones (100, 75 y 50%) con valores superiores a los 14 ngSTXeq org⁻¹, mientras que en los tratamientos menores (25 y 12%) se encuentran concentraciones de TPc inferiores a los 6 ngSTXeq org⁻¹ (Fig. 11).

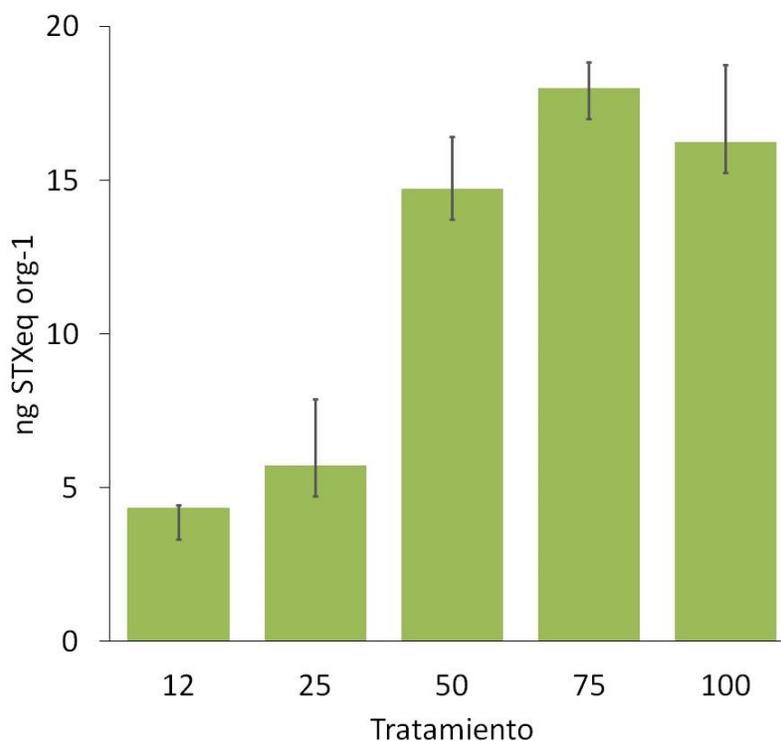


Figura 11. Concentración total promedio por organismo de TP en tejidos de PL11 de *Penaeus vannamei*.

Por otra parte, de los 8 análogos presentes en el extracto de TP de *G. catenatum* al que fueron expuestas las larvas, solo 7 de ellos fueron identificados en los tejidos de los camarones siendo los siguientes:

TPd:

C1 / C2 / dcGTX2 / dcSTX / dcGTX3 / GTX2 / GTX3 / B1

TPc:

C1 / C2 / dcGTX2 / dcSTX / dcGTX3 / GTX2 / B1

La composición de los análogos en términos de porcentaje molar fue variable entre los tejidos de las PL11 entre los tratamientos (Fig. 12), en donde se observa que a mayor concentración de toxina a la que fueron expuestas las larvas, se presenta una mayor proporción del análogo C1 seguidos de análogo C2 en el caso de los tratamientos de 12, 25 y 50%, lo cual probablemente puede significar que este es el resultado final de la biotransformación de estas toxinas en el metabolismo de los camarones. Cabe destacar que en todos los tratamientos se observa la predominancia del análogo C1, con porcentajes molares superiores al 60% en los tejidos de los camarones.

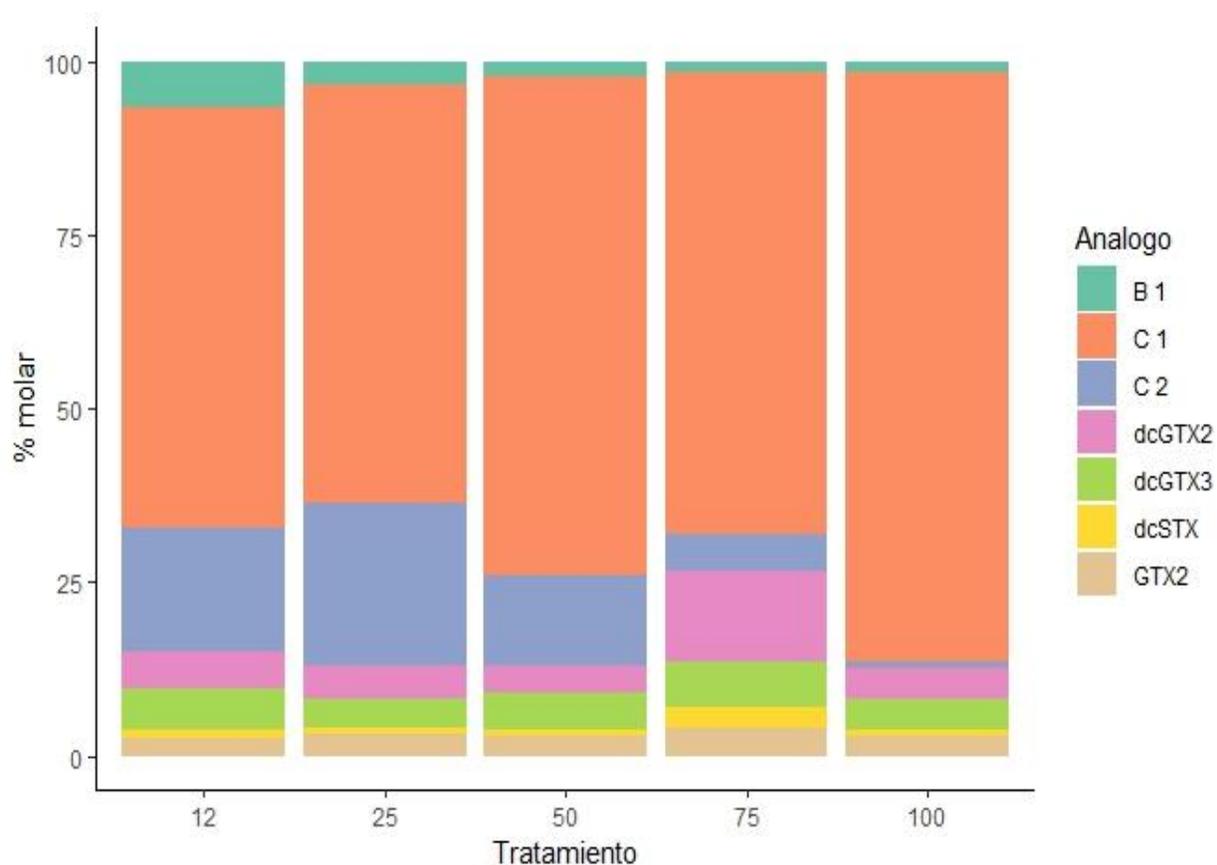


Figura 12. Porcentaje molar por larva de análogos de TP en tejidos de PL11 de *Penaeus vannamei* en los diferentes tratamientos.

7.5 Lesiones histopatológicas

7.5.1 Músculo

En PL11 expuestas a los tratamientos de contenido extracelular disuelto de *G. catenatum*, se ha identificado edema en el músculo de los organismos; el grado de afectación en los tejidos es consistente con la dilución del extracto (Fig. 13), mostrando edema de grado 1, en los tratamientos de 12 y 25% (Figs. 13B y 13C), y edema de grado 2 en los tratamientos de 50 y 75% (Figs. 13D y 13E). Los tratamientos en los que se identificó edema grado 3 fueron el de 100% así como en algunos organismos del tratamiento de 75%. Aunado a ello, en estos últimos tratamientos es posible identificar la infiltración hemocítica, correspondiente a respuesta inmune de los organismos, así como la ruptura de fascículos (desgarre) musculares; Estas lesiones pueden considerarse a nivel de atrofia en los tratamientos de 75 y 100% (Figs. 13E y 13F). Adicionalmente en los tratamientos con mayores concentraciones del extracto (75 y 100%) se observaron algunas

regiones en la que se aprecia una infiltración y acumulación hemocítica atípica en el musculo (Fig. 14).

Además de las lesiones antes descritas, de manera cuantitativa se obtuvieron disminuciones significativas en el porcentaje de cobertura de fibras musculares en los tratamientos del 50, 75 y 100% con respecto al grupo control (Fig. 15), debido al considerable daño causado por el edema y la ruptura de los fascículos musculares con respecto a tejidos musculares sanos presentes en los controles; Pese a que se ha observado y descrito la inflamación y edema en el tratamiento del 12%, estas afectaciones no representan diferencias significativas con respecto al grupo control en cuanto al porcentaje de cobertura muscular en estos organismos.

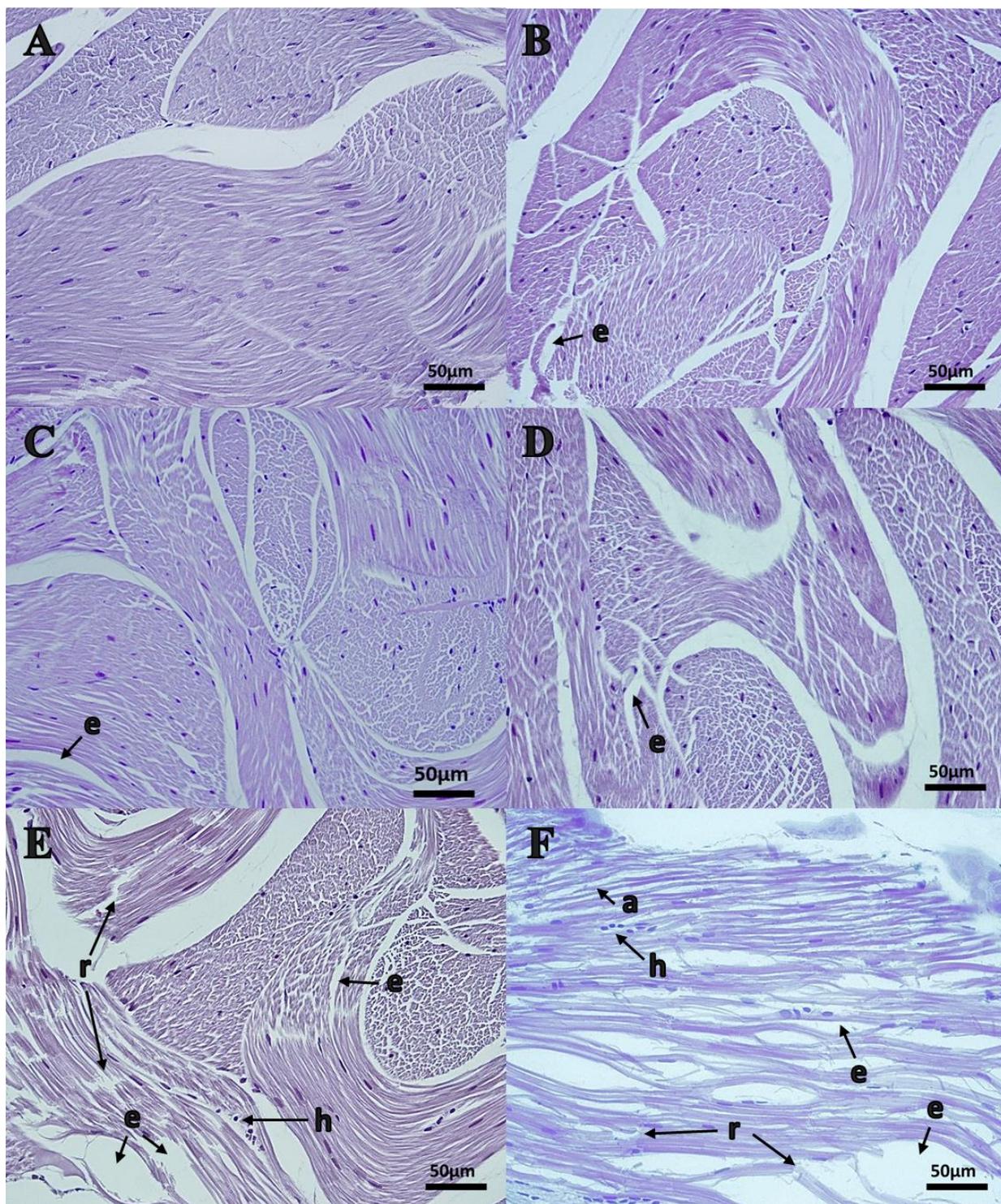


Figura 13. Corte histológico de músculo en larvas PL11 de *P. vannamei*. A) Control; B) Tratamiento 12%; C) Tratamiento 25%; D) Tratamiento 50%; E) Tratamiento 75%; F) Tratamiento 100%; Ruptura de los fascículos musculares (r), Infiltración hemocítica (h), Edema (e), Atrofia (a). Tinción H&E (Magnificación 40x).

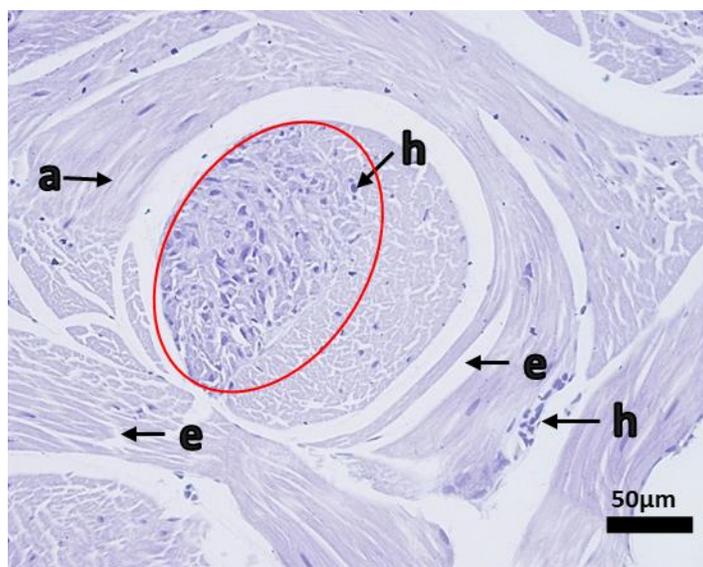


Figura 14. Corte histológico de musculo en larvas PL11 de *P. vannamei*, Tratamiento 100%; Infiltración hemocítica (h), Edema (e), Atrofia (a), Acumulación hemocítica atípica (O). Tinción H&E (Magnificación 40x).

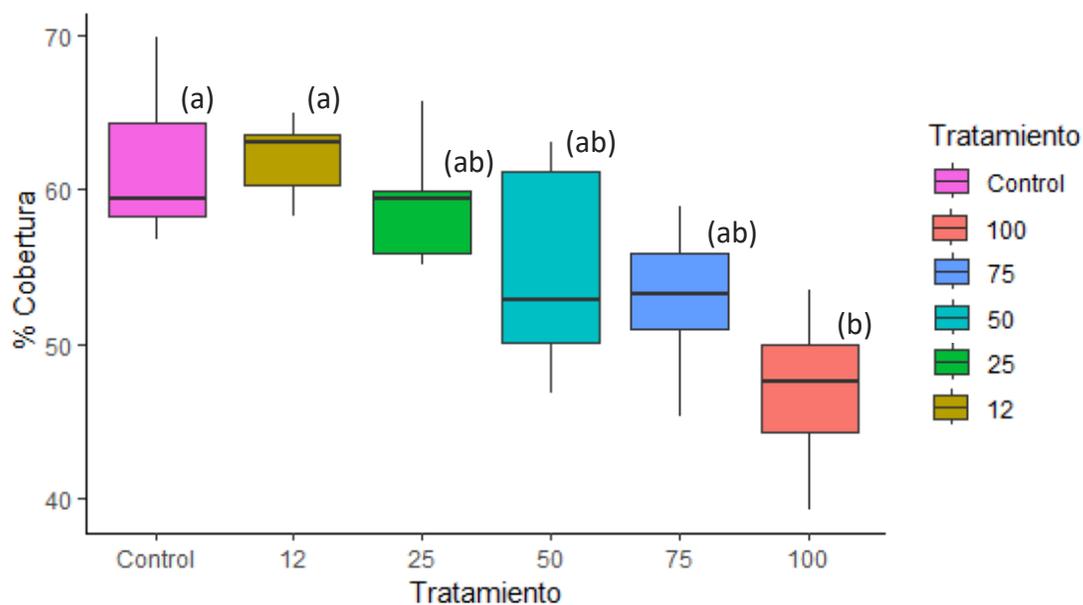


Figura 15. Porcentaje de cobertura de musculo en larvas PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.

7.5.2 Hepatopáncreas

En hepatopáncreas se registraron daños en las células Hpb y el resto de las células epiteliales (Hpf y Hpr); en larvas expuestas a los tratamientos de 12, 25 y 50% (Figs. 16B, 16C y 16D) se identificaron disminuciones en el tamaño de algunas células, sin embargo, en el caso del tratamiento de 50% las células Hpb presentaron un mayor tamaño. Por otra parte, en los tratamientos de 75 y 100% (Figs. 16E y 16F), también se observó pérdida de la forma de estrella típica y delaminación de túbulos del hepatopáncreas, así como en algunas regiones se presenta el perdida de volumen de las células epiteliales, al igual que en el caso de tratamiento de 100% es posible identificar el desprendimiento celular de la membrana basal y descamación de epitelios, los daños en los tratamientos con mayores concentraciones corresponden a atrofia en este órgano.

Las mediciones de células Hpb y el resto de las células epiteliales (Hpf y Hpr) del hepatopáncreas de los organismos, se han encontrado disminuciones significativas en cuanto a la altura de dichas células entre los tratamientos del 100, 75 y 50 % con respecto al grupo control (Figs. 17 y 18), los tratamientos de 12 y 25%, pese a que registraron disminución en el tamaño de las células, esta no fue estadísticamente significativa.

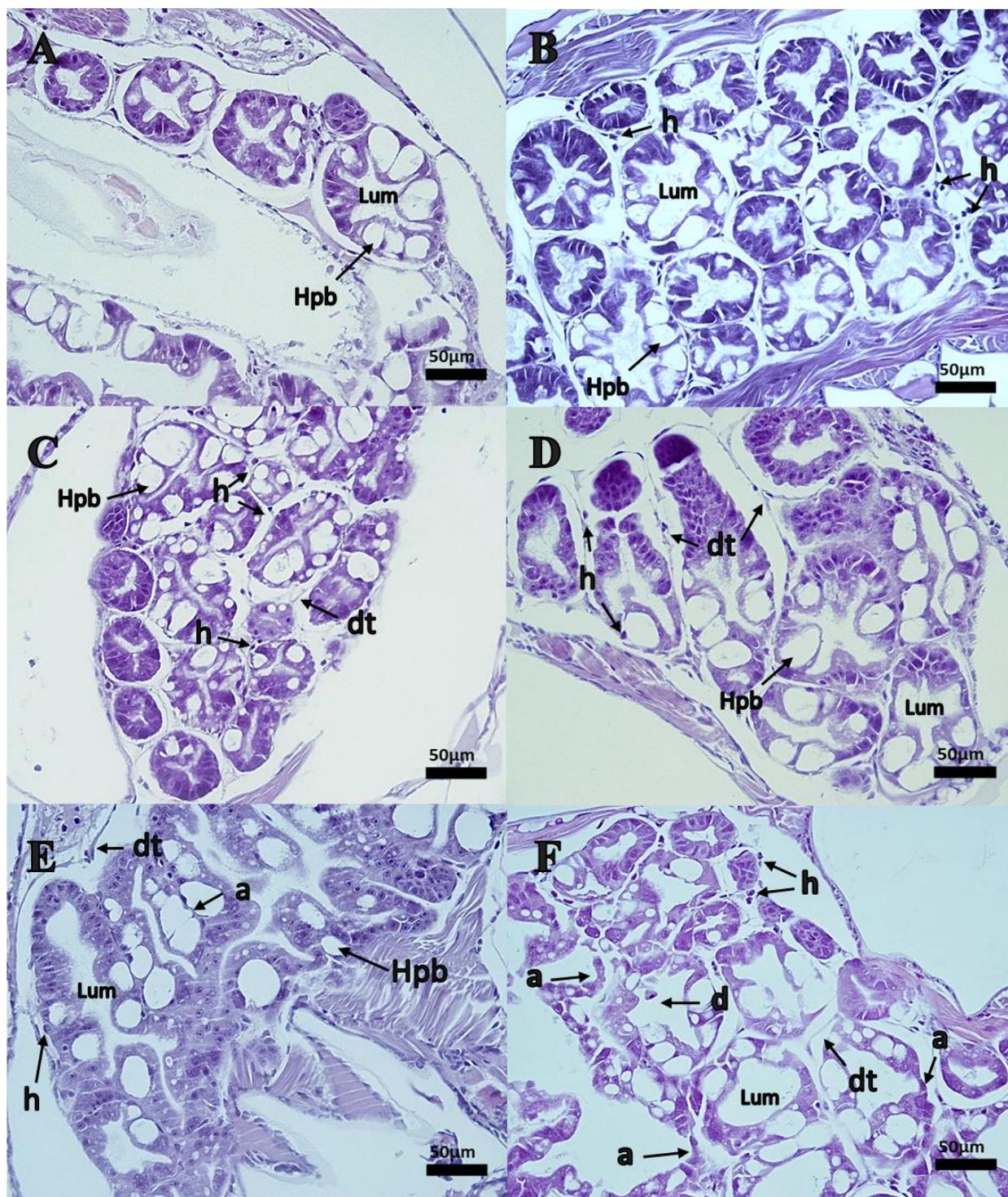


Figura 16. Corte histológico de hepatopáncreas en larvas PL11 de *P. vannamei*, A) Control; B) Tratamiento 12%; C) Tratamiento 25%; D) Tratamiento 50%; E) Tratamiento 75%; F) Tratamiento 100%; Delaminación de túbulos (dt), atrofia (a), Descamación de epitelios (d), Infiltración hemocítica (h), Células B (Hpb). Tinción H&E (Magnificación 40x).

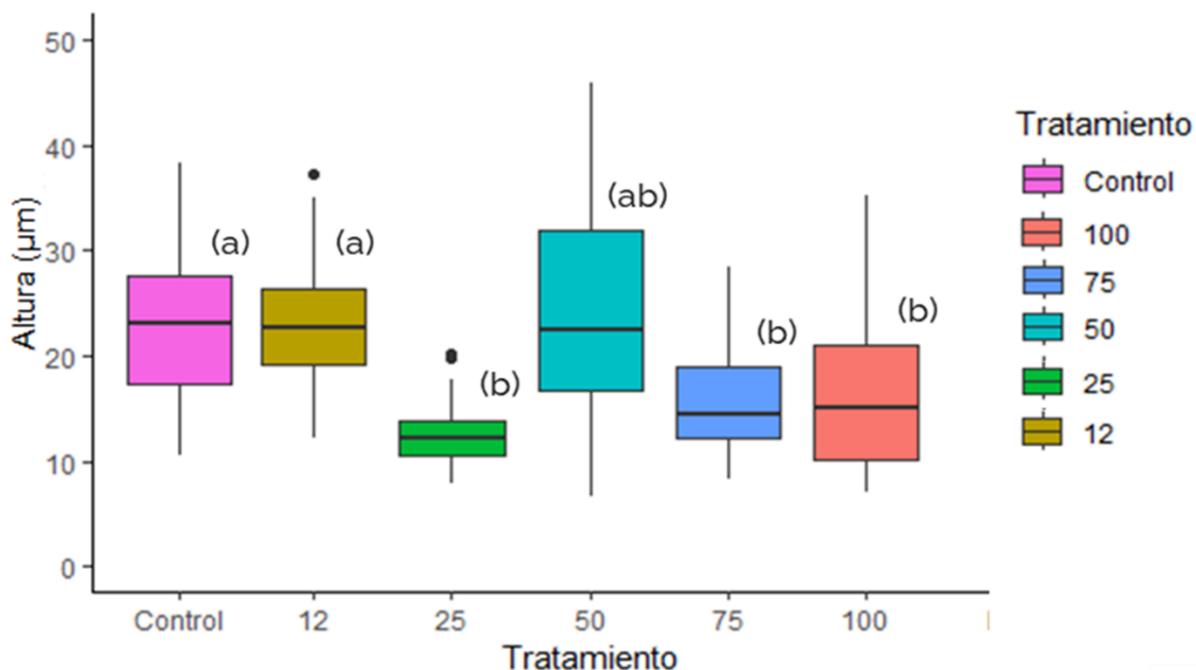


Figura 17. Altura de células Hpb del hepatopáncreas en PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni.

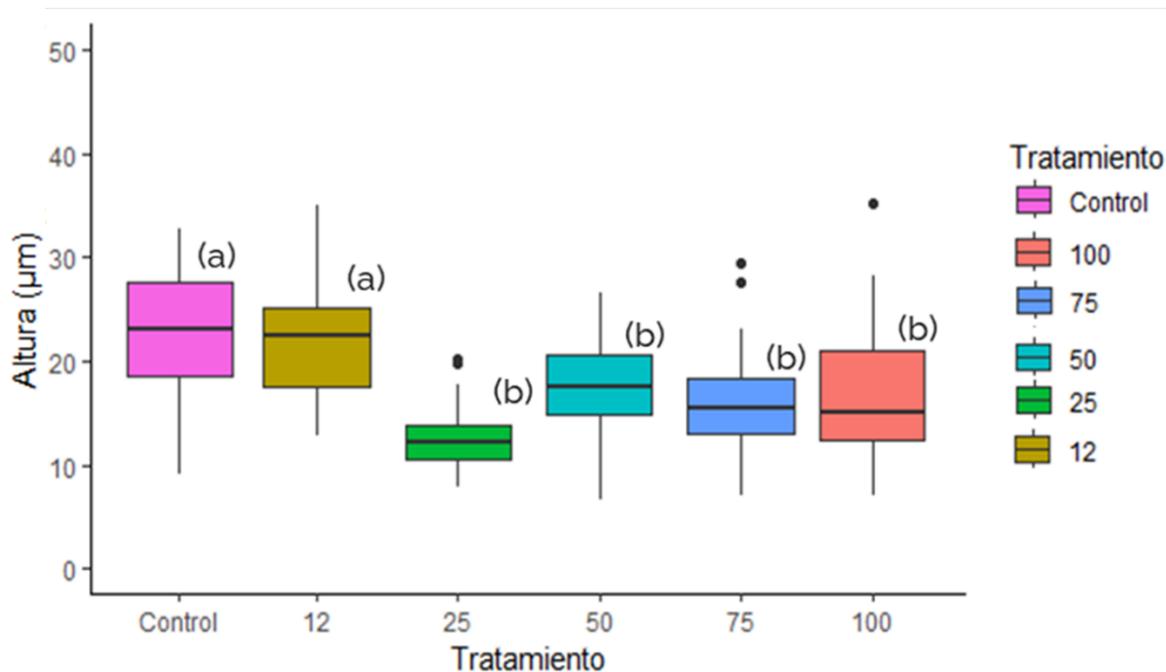


Figura 18. Altura de células Hpf y Hpr del hepatopáncreas en PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.

7.5.3 Tracto digestivo

Pese a que en este estudio no se evaluó la ingesta de microalgas productoras de TP por parte de los camarones, sino que las toxinas se encontraban disueltas en el medio, se observaron daños en los epitelios del tracto digestivo de los organismos bajo los diferentes tratamientos.

Por una parte, no se observa disminución significativa de tamaño (altura) en las células de los tratamientos de 12 y 25% (Figs. 19A y 19B), sin embargo, es posible identificar la presencia de aparentes vacuolas que se encuentran presentes en todos los tratamientos, lo cual hasta el momento no se había registrado en células epiteliales del tracto digestivo del camarón. Si bien en el grupo control existen alguna de estas vacuolas, la recurrencia es muy baja. La presencia de estas vacuolas en los tratamientos de 12 y 25% representan un daño de grado 1 en estos tratamientos, mientras que en el tratamiento de 50% (Fig. 19C), además de una mayor presencia de vacuolas en los epitelios, se observan regiones con atrofia en las células, representando así un daño a los tejidos de grado 2.

Por otra parte, en este estudio se observó que los tratamientos con concentraciones del 75% y 100% (Figs. 19E y 19F) tienen efectos significativamente negativos en la morfología y función de las células del tracto digestivo, lo que puede tener consecuencias graves para la salud; en el caso del Tratamiento de 100% se produce una reducción importante del volumen celular en varias regiones del tracto digestivo; En algunas regiones las células pierden su estructura normal y pueden incluso romperse, representando un daño en los epitelios de grado 3, correspondiente a atrofia. En cuanto al tratamiento de 75% se observa una alta incidencia de vacuolas en la mayoría de las células del tracto digestivo, por ello, algunas células aumentan su tamaño, debido a la presencia de grandes vacuolas en su interior. En general, las células comienzan a perder su forma y conformación, volviéndose redondeadas y desorganizadas.

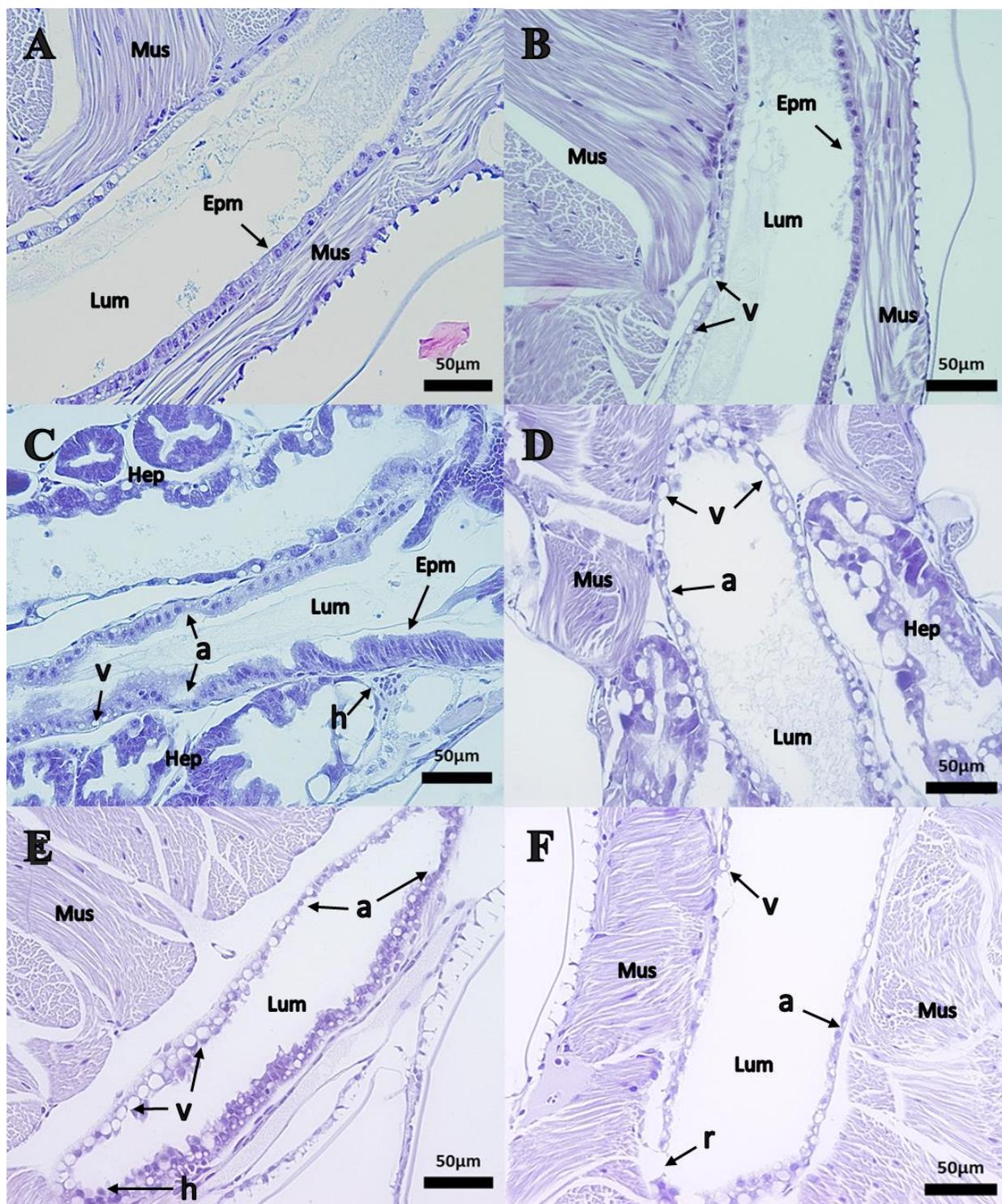


Figura 19. Cortes histológico de intestino en larvas PL11 de *P. vannamei*; A) Control; B) Tratamiento 12%; C) Tratamiento 25%; D) Tratamiento 50%; E) Tratamiento 75%; F) Tratamiento 100%; Epitelio intestinal (Epm); Lumen (Lum); Vacuolas (v); Atrofia (a); Ruptura de los epitelios (r); Infiltración hemocítica (h); Fibras musculares (Mus); Hepatopáncreas (Hep). Tinción H&E (Magnificación 40x).

Adicionalmente, se han identificado regiones del tracto digestivo donde se aprecia una acumulación importante de células desorganizadas, que pudieran estar bloqueando el paso del alimento, y presentando intestino permeable, además zonas con elevada descamación celular (células que fueron expulsadas del epitelio) e infiltración hemocítica (Fig. 20), en los epitelios del tracto digestivo de los organismos tratados con las mayores diluciones de los extractos de toxinas (75 y 100%).

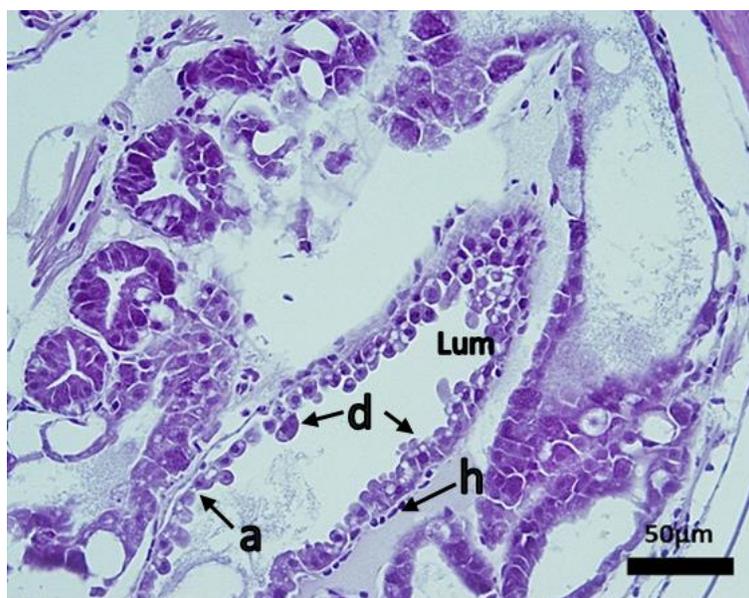


Figura 20. Corte histológico en intestino de larvas PL11 de *P. vannamei*; Tratamiento 100%: Atrofia (a); Descamación de epitelios (d), Infiltración hemocítica (h); Tinción H&E (Magnificación 40x).

Al evaluar cuantitativamente el tamaño de las células epiteliales del intestino de los camarones, se encontraron disminuciones significativas entre los epitelios de los tratamientos de 25, 50, 75 y 100% con respecto al grupo control (Fig. 21). Siendo el tratamiento del 100% el que presenta una mayor atrofia o pérdida de volumen. Por otra parte, al evaluar el tamaño de las vacuolas presentes en estas células, se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el resto de los tratamientos (Fig. 22), siendo el tratamiento de 75% el que presentó las vacuolas de mayor tamaño; las vacuolas en el tratamiento de 100% son menores a las del 75% y esto puede deberse en gran medida a que cuando las larvas son expuestas al 100% del extracto, estas más bien demuestran una pérdida de tamaño o volumen severo de los epitelios, razón por la cual, el tamaño promedio de las vacuolas disminuye.

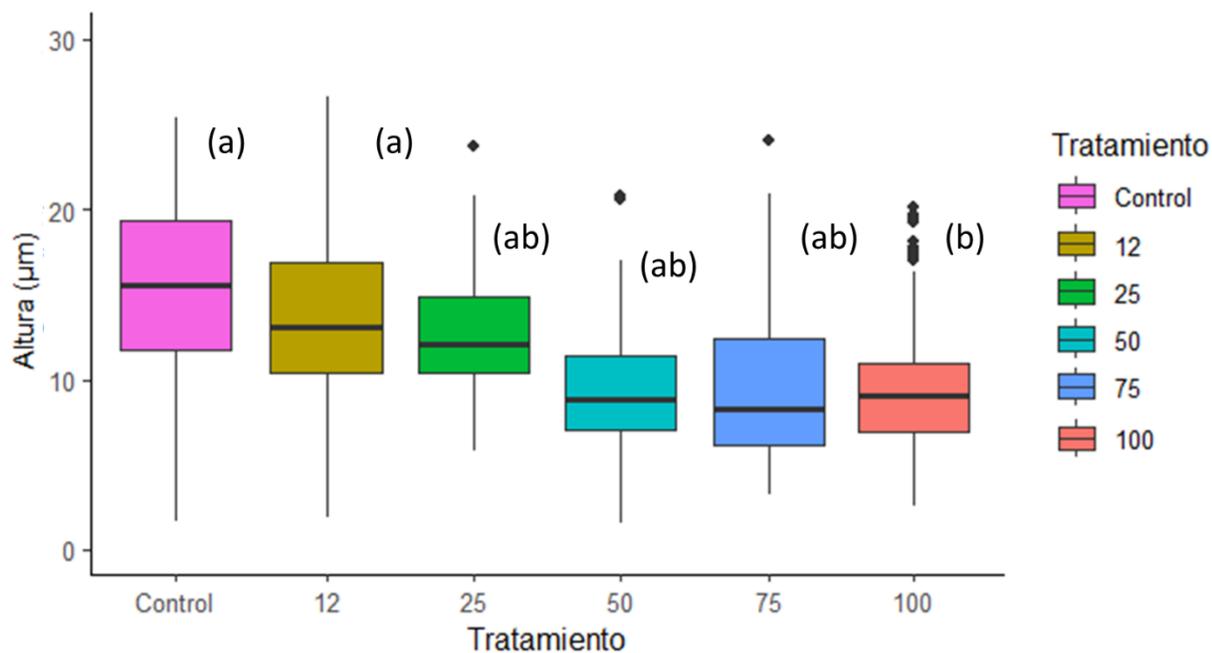


Figura 21. Altura de células epiteliales de intestino en PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.

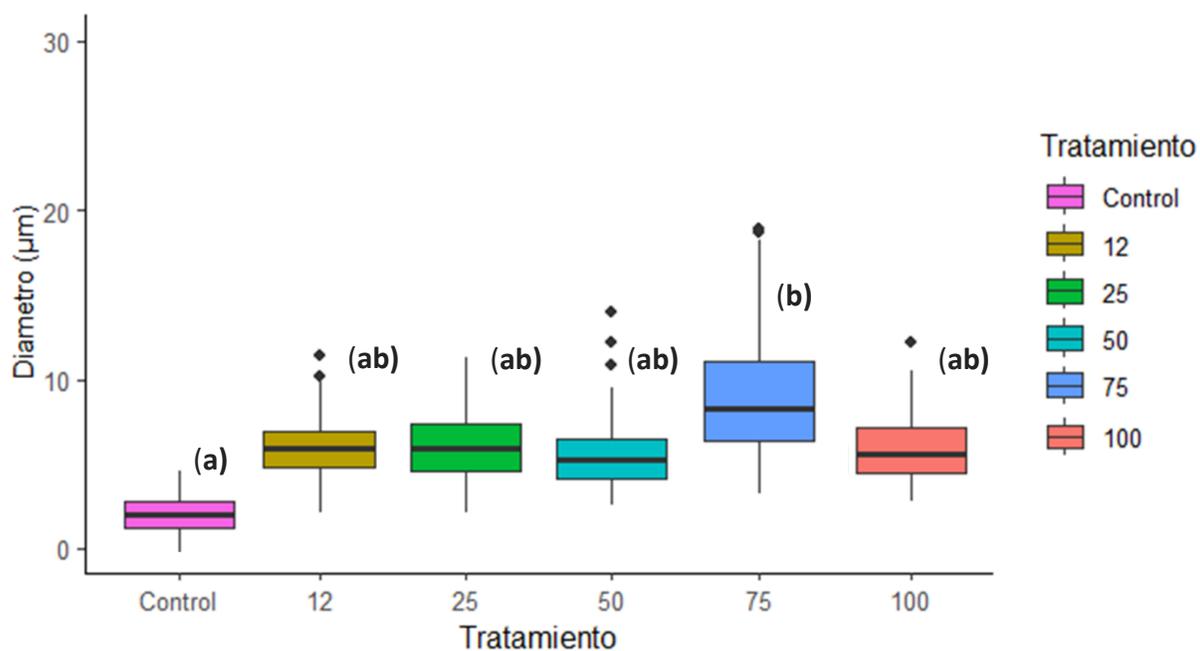


Figura 22. Diametro de vacuolas en intestino de PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí. ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.

7.5.4 Corazón

En cuanto al corazón, se puede observar una pérdida de hemolinfa en el interior de este, en función del tratamiento (Fig. 23). Mientras que en el control se observa al corazón aún lleno de hemolinfa (Fig. 23A), en los tratamientos de 12 y 25% se logra apreciar una menor cantidad de hemolinfa presente en este órgano, presentándose un daño de grado 1 (Figs. 23B y 23C). Por otra parte, en el tratamiento de 50% se observan corazones con una disminución considerable de la hemolinfa en el interior, así como infiltración hemocítica, lo cual correspondería a corazones con daño de grado 2.

Finalmente, en los tratamientos de 75 y 100% se observan corazones con pérdida severa de hemolinfa; También se observa la pérdida de músculo cardíaco, en la figura 21F solo quedan las fibras musculares cardíacas de la pared del corazón, ya no se ven las fibras musculares en el interior, las que forman aurículas y ventrículos (Figs. 23E y 23F).

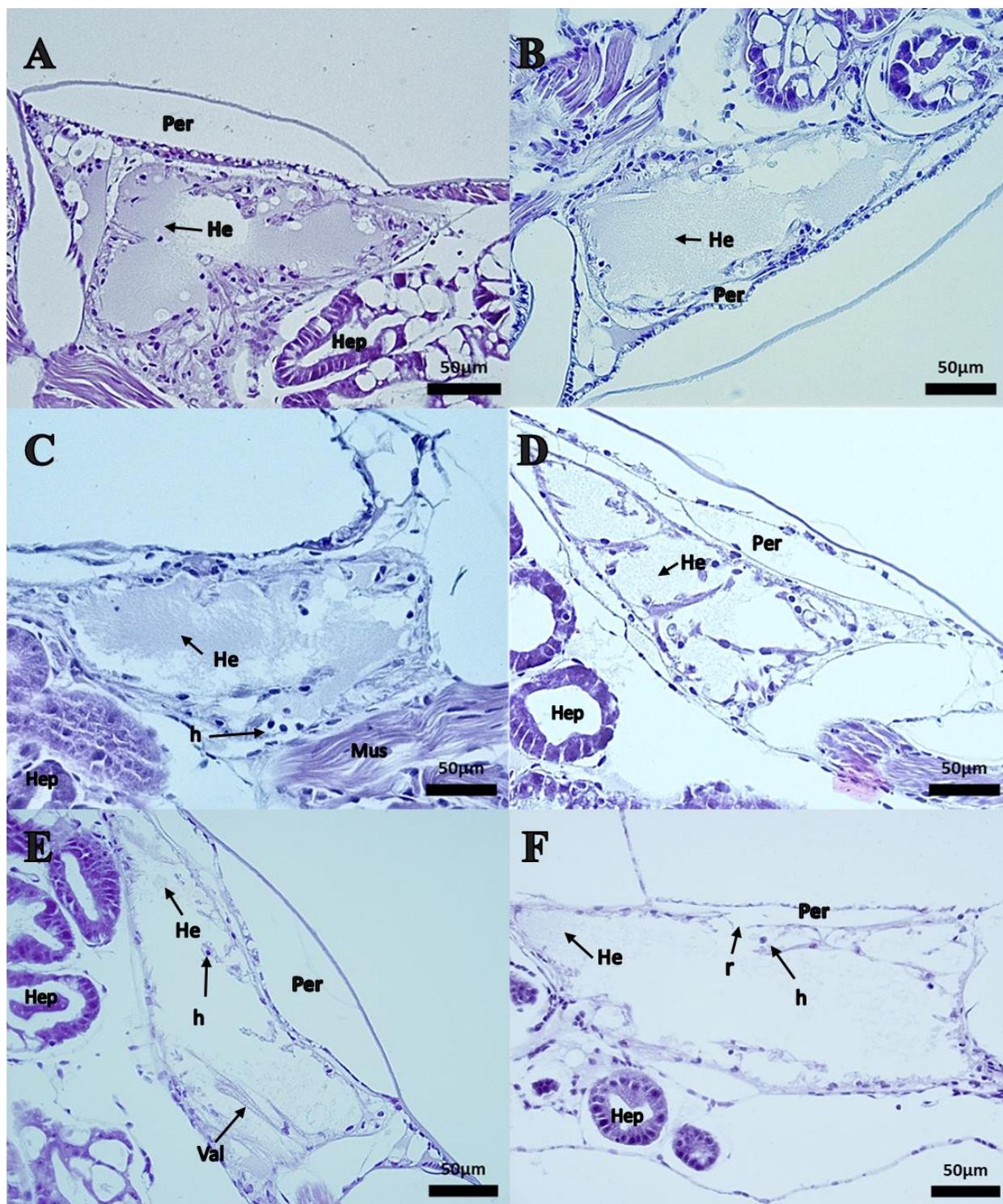


Figura 23. Corte histológico de corazón en larvas PL11 de *P. vannamei*; A) Control; B) Tratamiento 12%; C) Tratamiento 25%; D) Tratamiento 50%; E) Tratamiento 75%; F) Tratamiento 100%; Pericardio (Per), Válvula (Val), Hepatopáncreas (Hep), Fibras musculares (Mus) Hemolinfa (He), Ruptura de los fascículos musculares (r), Infiltración hemocítica (h). Tinción H&E (Magnificación 40x).

Al evaluar cuantitativamente el porcentaje de cobertura de hemolinfa y fibras cardíacas entre los diferentes tratamientos, encontramos que no existen diferencias significativas entre el grupo control con respecto a los tratamientos de 12 y 25%, sin embargo, los daños generados a los corazones de los tratamientos de 50, 75 y 100% presentan diferencias significativas con respecto al grupo control (Fig. 24).

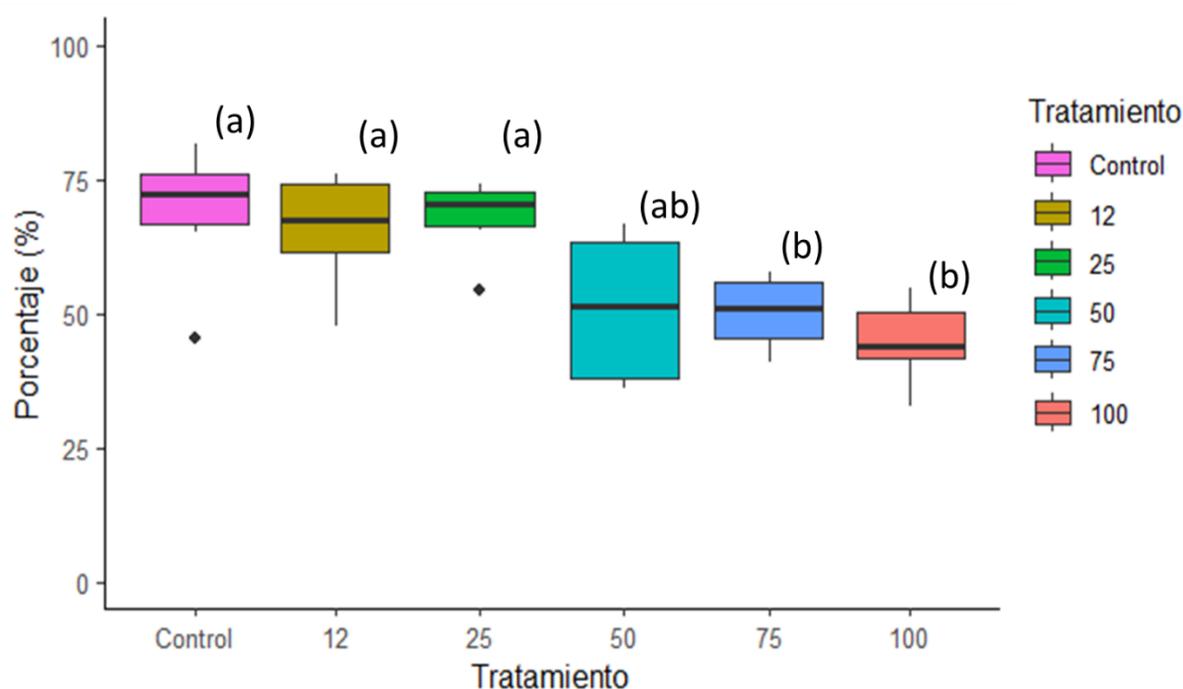


Figura 24. Porcentaje de cobertura de hemolinfa en corazón de larvas PL11 entre tratamientos. (a)(b): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.

7.5.5 Sistema nervioso

Se identificaron daños a los ganglios nerviosos, consistentes con las diluciones del extracto de *G. catenatum* con respecto al control (Fig. 25). En ellos se puede observar edema de tipo 1 en los tratamientos de 12 y 25% (Figs. 25B y 25C), mientras que comenzamos a ver edema de tipo 2 e infiltración hemocítica en el tratamiento del 50% (Fig. 25D). Finalmente encontramos daños severos como edema grado 3, infiltración hemocítica y ruptura de cordones nerviosos en los tratamientos de 75 y 100% (Figs. 25E y 25F).

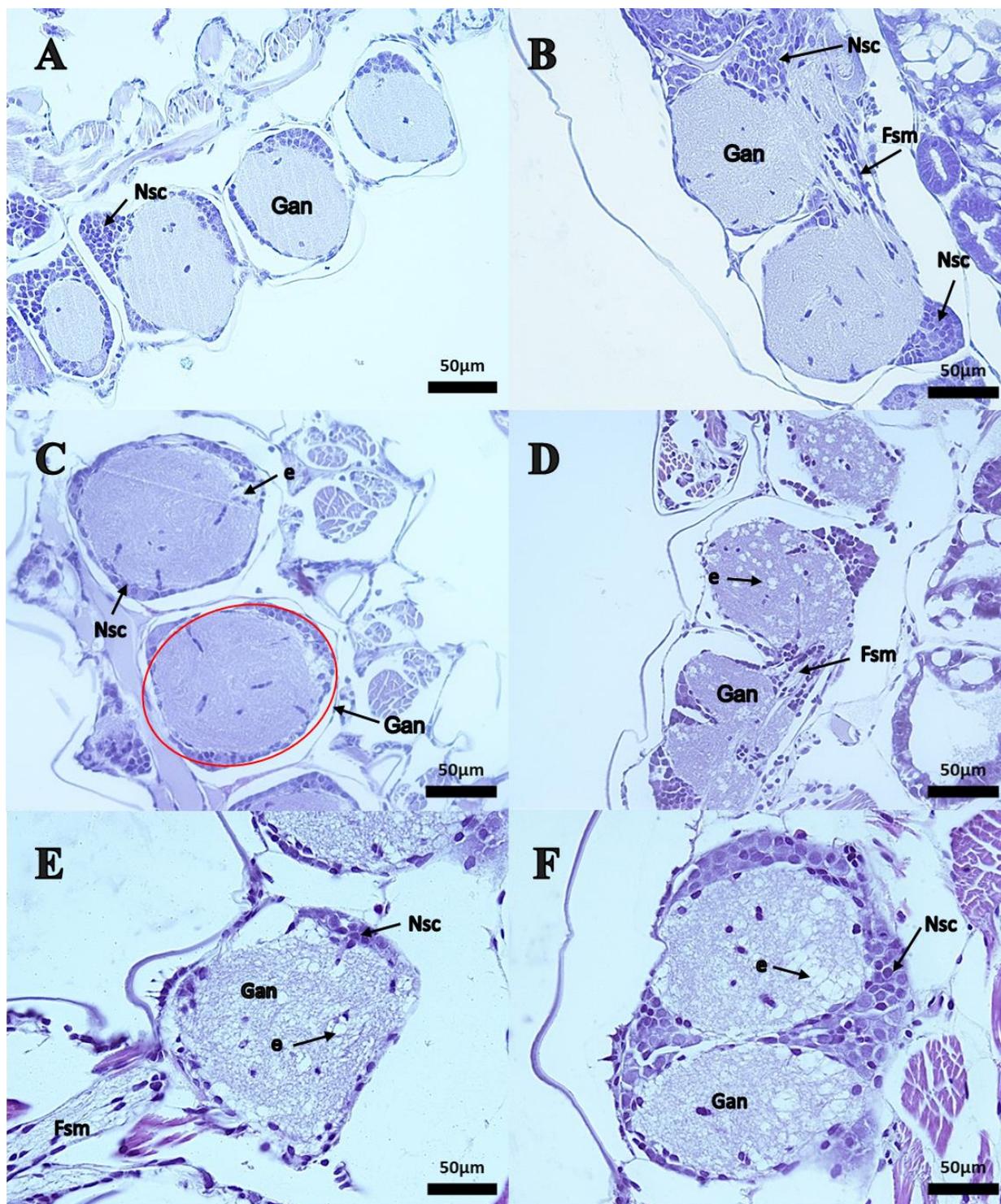


Figura 25. Corte histológico de ganglios en larvas PL11 de *P. vannamei* A) Control; B) Tratamiento 12%; C) Tratamiento 25%; D) Tratamiento 50%; E) Tratamiento 75%; F) Tratamiento 100%; Ganglio (Gan), Fibras interneuronales (Fsm), Células neurosecretoras (Nsc), Edema (e). Tinción H&E (Magnificación 40x).

Al evaluar de manera cuantitativa estos daños, encontramos que existen diferencias significativas entre el grupo control y el resto de los tratamientos en cuanto al porcentaje de cobertura del tejido nervioso en los ganglios de los organismos debido a la inflamación provocada por la exposición a estas toxinas (Fig. 26). Incluso existen diferencias significativas entre los tratamientos del 12 y 25% (Figs. 26B y 26C) con respecto a los tratamientos del 75 y 100% (Figs. 26 E y 26F), lo cual indica que, bajo estos últimos tratamientos, las lesiones generadas a los tejidos son bastante severas, mientras que el tratamiento de 50% correspondería a un daño de tipo intermedio, y los tratamientos de 12 y 25% representan lesiones leves, pero significativamente distintas al grupo control.

A diferencia del resto de los órganos evaluados en este trabajo, el tejido nervioso es el único que presenta diferencias significativas entre todos los tratamientos con respecto al grupo control, lo cual lo convierte en el tejido más sensible a los efectos de las toxinas disueltas.

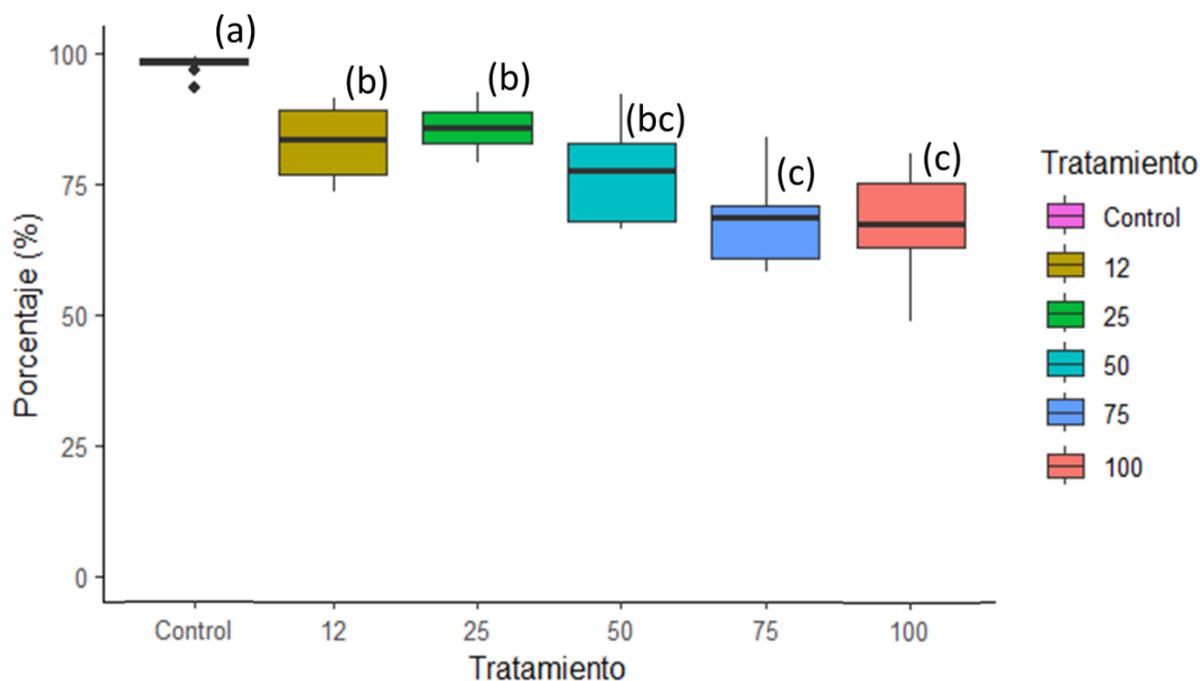


Figura 26. Porcentaje de cobertura de tejido nervioso en larvas PL11 entre tratamientos. (a)(b)(c): Las barras que no comparten la misma letra son significativamente diferentes entre sí ($p < 0.05$) para prueba de Kruskal-Wallis; Prueba Post-hoc de Bonferroni. Programa Rstudio.

8. DISCUSIÓN

8.1 Cuantificación y perfil de toxinas paralizantes de *G. catenatum*

En el trabajo realizado por Lijun *et al.* (2020), se cuantificaron por primera vez las concentraciones de TPd extracelulares en el medio de cultivo de *A. minutum*, el perfil de toxinas que presentó fue GTX2, GTX3, GTX1, GTX4 del grupo carbamoil, así como toxinas sulfocarbamoil de tipo C1 y C2. Las concentraciones totales de los seis análogos extracelulares durante la curva de crecimiento oscilaron entre 4.0 y 754.7 ng STXeq mL⁻¹. En el presente trabajo, las concentraciones de TPd oscilaron entre los 1.9 y 252 ng STXeq mL⁻¹ (Fig. 6), lo que representa una concentración considerable en el medio con respecto a la toxina intracelular e indudablemente, estas toxinas tienen un efecto importante en los organismos acuáticos, como los que evaluamos en este trabajo.

Por otra parte, es crucial comprender que cuando tenemos especies diferentes de microalgas productoras de TP, cada una de ellas presenta variaciones en cuanto a su perfil y biosíntesis de análogos de STX, por tanto, las concentraciones y perfiles de TPd pueden variar entre especies, e incluso entre cepas de la misma especie. Ortiz *et al.*, (2019) reportaron para *Alexandrium catenella* la presencia de los análogos GTX4, GTX3, GTX2, dcGTX2 y dcGTX3, con el predominio de los análogos C2 y C1; Mientras que Lijun *et al.* (2020) identificaron en *A. minutum* seis análogos GTX2, GTX3, GTX1, GTX4, C1 y C2, en este estudio se lograron identificar ocho análogos tanto de manera disuelta como particulada (C1, C2, dcGTX2, dcSTX, dcGTX3, GTX2, GTX3, B1) dominados principalmente por análogos de tipo sulfocarbamoil en un 92.72 y 89.99%, respectivamente (Fig. 7). Estos resultados son similares a los encontrados en trabajos previos en los que se han caracterizado el perfil de toxinas de cepas de *G. catenatum* aisladas del Golfo de California, las cuales se caracterizan por un alto porcentaje molar de análogos de toxinas tipo sulfocarbamoil (C1 y C2), por encima del 70% en base molar (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015; Fernández-Herrera, *et al.*, 2022; Hernández-Sandoval *et al.*, 2022).

Adicionalmente, este estudio presenta por primera vez una comparación entre el perfil de TP tanto de manera intracelular como extracelular; Si bien en ambos casos las toxinas de tipo sulfocarbamoil representan en gran medida la toxicidad total de *G. catenatum*, existen ligeras

variaciones en cuanto a la proporción de análogos en esta cepa entre las particuladas y las disueltas. Por consiguiente, es posible observar variaciones en las proporciones de los diferentes análogos a lo largo de las fases de crecimiento, principalmente en las últimas etapas del cultivo, donde se observa una transformación de análogos de tipo sulfocarbamoil a análogos de tipo decarbamoil (Fig. 8). Esto puede deberse principalmente a que existe un vínculo entre el estado nutricional del cultivo y la biosíntesis de STX en dinoflagelados marinos y cianobacterias (Hwang y Lu, 2000; Lim *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2020), debido a que la molécula de STX, consiste en un 33% de N (Taroncher-Oldenburg *et al.*, 1999). En diferentes estudios se ha demostrado que las concentraciones de TP en dinoflagelados se ven afectados significativamente por factores químicos como la fuente y concentración de N y P disponibles (John y Flynn, 2000; Leong *et al.*, 2004; Hernández-Sandoval *et al.*, 2022). Es por ello, que en nuestro estudio encontramos una mayor producción de TPp el día 14 del cultivo, donde este se encontraba bajo condiciones óptimas (Fig. 6).

Las concentraciones de TPd aumentan de manera importante al llegar a la fase de decaimiento y muerte del cultivo, que no es más que el acumulado de las toxinas que ya se estaba produciendo de manera extracelular por el cultivo, más las TPp que fueron liberadas al medio tras la lisis de las células por el envejecimiento del cultivo (Martín *et al.*, 2007). Esto es importante ya que usualmente se asocia que tras la finalización de un FAN de especies productoras de TP, la problemática de toxicidad ha terminado, sin embargo, es en esta etapa donde se presentan las mayores concentraciones de estos compuestos de manera disuelta (Fig. 6).

Por otro lado, se tiene registro que para saxitoxinas en agua superficial se ha observado una persistencia de entre 1 a 2 meses (Cantoral-Uriza *et al.*, 2017), lo cual representa un nuevo reto de manejo ante la recurrencia de FAN de especies productoras de TP para las industrias acuícolas, ya que aún pasado un evento de FAN de *G. catenatum* estas toxinas todavía pueden encontrarse disueltas, entrar en los sistemas de criaderos o cultivos de camarón cercanos y transportarse en la fuente de agua, a pesar del uso de sistemas de filtración, ya que cuando no se tiene un control específico de las aguas que van a ser utilizada como medio de cultivo, se puede provocar retrasos y muchos inconvenientes a lo largo del proceso de producción (Prasertsri *et al.*, 2014).

8.1.2 Estandarización del método de extracción de TPd

La implementación del método para la extracción de análogos de TPd presentes en el medio de cultivo de *G. catenatum* representó un reto metodológico para el presente trabajo, en parte, debido a la naturaleza hidrosoluble de estas toxinas, lo cual dificulta la extracción del medio acuoso, además que el medio de cultivo de estos dinoflagelados tiene un alto contenido en sales y una matriz compleja; es por ello que hasta el 2020 las TPd en el medio de cultivo no podían ser cuantificadas directamente por métodos instrumentales (Lefebvre *et al.*, 2008; Jansson y Astot, 2015; Castrec *et al.*, 2018; Lijun *et al.*, 2020). En este estudio, después de realizar modificaciones al método descrito por Lijun *et al.* (2020), se logró un porcentaje de recuperación de TPd de 72.19%, cercano al reportado por estos autores superiores al 85.5% ($\pm 7.6\%$).

Si bien los autores reportan porcentajes de recuperación mayores utilizando la misma mezcla de disolventes (Acetonitrilo/Agua/Ácido acético) para los análogos GTX2 (98,8%), GTX3 (79,4%), GTX1 (95,9%) y C1 (95,4%), cabe destacar que estos mismos autores mencionan que el flujo de carga de muestra también es un factor importante que afecta la recuperación de toxinas. Lijun *et al.*, (2020) establecieron como óptimo un flujo de 3 mL min⁻¹, encontrando disminuciones significativas en la recuperación de los diferentes análogos de toxinas con respecto a flujos de 1 y 6 mL min⁻¹. En este estudio, debido a la falta de instrumentación especializada, no fue posible controlar el flujo a través de las columnas con precisión, por tanto, es posible que esto haya influido en un menor porcentaje de recuperación reportado en el presente trabajo. Por consiguiente, para tratar de ajustar esta disminución en la recuperación de las TPd se realizó la modificación de realizar un mayor número de enjuagues de la columna GCB, con lo cual se obtuvo un mejor rendimiento de este método ya que con un mayor número de enjuagues nos aseguramos de recuperar la mayor cantidad posible de las toxinas que quedan retenidas en las columnas (Boundy *et al.*, 2015; Rey *et al.*, 2018).

Finalmente, debido a que se optó por sustituir el uso del rotaevaporador por la liofilización de la muestra para ser concentrada, se realizó el ajuste del porcentaje de recuperación de las toxinas después de ser procesadas para la liofilización con la finalidad de no subestimar este porcentaje de recuperación, tomando en consideración que durante este proceso se realizaron cambios de

recipientes, con lo cual es posible que se produzca pérdida de muestra; Sin embargo, pese a ello, los porcentajes de recuperación tras la liofilización corresponden al 92.61%.

8.2 Bioensayos de toxicidad

8.2.1 Mortalidad en *Penaeus vannamei*

En este estudio se modelaron y calcularon por primera vez las CL_{50} en los primeros estadios larvarios de *P. vannamei* expuestas a TPD en el medio de cultivo. Si bien los trabajos de Pérez-Linares, (2008) y Flores-Chavarría (2018), fueron los primeros trabajos en determinar la mortalidad de *P. vannamei* ante la presencia de *G. catenatum* en diferentes concentraciones celulares de este dinoflagelado (10^4 , 10^5 y 10^6 cél mL^{-1}), estos trabajos no consideraron la presencia de estas toxinas de manera disuelta, y dejaron de lado los efectos de estas toxinas en etapas previas del desarrollo larvario, proceso durante el cual ocurren diversos cambios morfológicos, metabólicos y nutricionales, en los cuales las larvas pueden ser susceptibles a la presencia de xenobióticos que puedan afectar su desarrollo y supervivencia, y por ende afectar la sobrevivencia de organismos que alcancen las tallas de interés comercial (García-Pinto y Edward, 1974; Ramos *et al.*, 2022).

En este estudio se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad entre los estadios de nauplio y zoea con respecto a los porcentajes de mortalidad de los estadios de mysis y PL11, siendo estos últimos los más susceptibles a los efectos de estas toxinas.

Contrario a lo que se esperaría, los primeros dos estadios fueron más resistentes a la exposición de estos extractos; es posible que en el caso del estadio de nauplio se deba a que, durante esta fase, las larvas sobreviven fundamentalmente de las reservas del vitelo (Alonso Castillo y Hernández Fernández, 2011), y por tanto no sean tan susceptibles a la presencia de xenobióticos como estas toxinas disueltas. Por otra parte, en el caso de las larvas zoea, a pesar de que son organismos que ya se alimentan de microalgas, estas aun no presentan una cavidad bucal desarrollada (Ramírez Aquino, 2011), pero una de las principales hipótesis a la que se le atribuye esta diferencia entre estadios es a que durante los estadios de nauplio y zoea, el sistema nervioso aún no se encuentre del todo desarrollado. Muhammad *et al.*, (2012) afirman que es hasta los

estadios de mysis y PL donde el cerebro muestra una expansión importante, razón por la cual durante estos estadios se puede dar una mayor sensibilidad a los efectos neurotóxicos de la TP, ya que, según los análisis histopatológicos, el sistema nervioso es el más susceptible a estos compuestos.

Adicional a los mayores porcentajes de mortalidad, los tiempos de mortalidad entre estos estadios fueron diferentes, presentándose mortalidades en 4 horas para los estadios de nauplio y zoea, mientras que en mysis y PL11 las mayores mortalidades se dieron transcurridas las 2 horas de iniciado el experimento, e incluso observándose las primeras mortalidades transcurridos 5 minutos. Estos tiempos de muerte en larvas expuestas a TPd, fueron considerablemente más rápidos que los reportados en los experimentos de Pérez-Linares, (2008) y Flores-Chavarría (2018); Pérez-Linares, (2008) registró que todas las PL expuestas a densidades celulares de 10^6 cél mL⁻¹ del dinoflagelado murieron a las 6 horas y el 100% de los organismos de la concentración 10^3 cél mL⁻¹ murieron a las 17 h. Mientras que en los juveniles expuestos a densidades de 10^6 cél mL⁻¹ en el trabajo de Flores-Chavarría (2018) presentaron mortalidades a las 8 h de iniciada la exposición a *G. catenatum*.

Cabe destacar que a diferencia de los trabajos anteriores en donde las Postlarvas y juveniles fueron expuestos a concentraciones celulares de 10^4 , 10^5 y 10^6 cél mL⁻¹ de *G. catenatum* (material particulado), en este estudio la exposición a las toxinas de manera disueltas demostró tener mayores efectos letales en los camarones, debido a que se reportaron porcentajes de mortalidad mayores, mientras que los tiempos de mortalidad fueron significativamente menores, en comparación a los efectos de la exposición a material particulado, aun cuando estas larvas fueron expuestas a concentraciones de TPd equivalentes y menores a 4×10^4 cél mL⁻¹ (Similares a las menores concentraciones de los trabajos anteriores). Por otra parte, en ambos casos (Pérez-Linares, 2008 y Flores-Chavarría, 2018) se realizaron en las últimas etapas de PL al igual que en juveniles y como se ha reportado en este estudio, la letalidad de las toxinas está estrechamente relacionado con la etapa del desarrollo de los camarones.

Como se han reportado daños en el desarrollo de estas larvas de camarón, Guinle *et al.*, 2023 han demostrado que la exposición a STX tiene efectos negativos en los porcentaje de eclosión de

huevos del pez Jurel de aleta larga (*Seriola rivoliana*), Esto sugiere que la exposición de TPd juega un papel importante tanto para el desarrollo de los primeros estadios larvarios, como para el éxito reproductivo de los organismos, lo cual representa un riesgo para la producción tanto de esta especie, como de otras especies silvestres y de cultivo de interés comercial en sus primeras etapas.

8.2.2 Comportamiento de larvas expuestas a TPd

Con respecto a las respuestas de comportamiento de los individuos expuestos a los extractos celulares disueltos de *G. catenatum* se observaron los signos clínicos típicos reportados por diferentes trabajos, provocados por la intoxicación por TP; la parálisis suele ser característica en la exposición a TP (Bricelj y Shumway, 1998; Bricelj *et al.*, 2005; Estrada *et al.*, 2010) debido al bloqueo de los canales de sodio-potasio y calcio por parte de las toxinas (Catterall *et al.*, 1979), estos signos de intoxicación concuerdan con los documentados en experimentos con PL y juveniles de camarón (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004; Pérez-Linares *et al.*, 2008), artemia, *T. japonicus* (Han *et al.*, 2021), en larvas de peces (Gosselin *et al.*, 1989; Lefebvre *et al.*, 2004; Lefebvre *et al.*, 2005) expuestos a células de *G. catenatum* o TP, quienes de igual forma reportan síntomas de parálisis como inmovilidad, natación errática, desorientación y ataxia; también, se ha reportado afectaciones en el comportamiento de bivalvos y copépodos (Bricelj *et al.*, 2005) donde han respondido negativamente a las dietas que contienen STX, mostrando una menor ingesta de alimentos, depresión metabólica, crecimiento reducido (Shumway *et al.*, 1985; Li *et al.*, 2002; Bricelj *et al.*, 2005; Presa, 2013).

Este comportamiento de las larvas tiene implicaciones importantes en la industria de la camaronicultura, puesto que, a la hora de llevar a cabo un control de calidad de los cultivos, siguiendo lo propuesto por el manual de la FAO (2004), que establece que “Como los nauplios presentan una fuerte fototaxis positiva, aquellos que están sanos, pueden ser cosechados usando una luz para atraerlos hasta la superficie del agua. Aquellos que permanezcan en el fondo del tanque son descartados”. En este trabajo, se reportó una disminución significativa de la respuesta de fototaxis, así como aletargamiento, lo cual provoca una disminución de la cosecha de nauplios en los estanques de producción.

Por otro lado, para postlarvas se establece como criterio de calidad la actividad natatoria de los organismos, puntuando a los cultivos de la siguiente manera: “si observamos que el >95% de las larvas nadan activamente, entonces son puntuadas con un 10; si están activas del 70-95%, se puntúa 5; y si son <70% las activas entonces se puntúa 0” (FAO, 2004), con ello, se puede decir que la presencia de síntomas de intoxicación por TP en larvas de *P. vannamei* disminuye de manera importante la calidad de los cultivos de las larvas en sus primeros estadios, lo cual repercute en la capacidad de producción de larvas por parte de los laboratorios ante la presencia de un FAN de especies productoras de TP.

8.3 Acumulación de TP en tejidos de PL11

Se cuantificaron las concentraciones de TP presentes en los tejidos de los camarones (TPc) en donde se observó que los procesos de biotransformación llevados a cabo por el metabolismo de los camarones durante su desarrollo de PL11 presentan una tendencia hacia la conversión al análogo C1, la cual es consistente con el grado de exposición a la toxina, ya que conforme incrementa la concentración de la toxina en los tratamientos, también aumenta la predominancia de este análogo en los tejidos de los camarones. En moluscos bivalvos se ha reportado que los procesos de biotransformación conllevan reacciones de epimerización de los epímeros β (C2, GTX3, GTX4) transformándolos en epímeros α de una forma más termoestable incrementando así estos análogos (C1, GTX2, GTX1) (Bricelj *et al.*, 1991, Ortiz *et al.*, 2019).

Otro aspecto importante a considerar es que de los 8 análogos presentes en el extracto de TPd al que fueron expuestas las larvas, solo 7 de ellos fueron identificados en los tejidos de los camarones, donde el análogo GTX3 no fue identificado; Como se mencionó anteriormente, este análogo puede pasar a ser transformado a toxinas de tipo C1 por el metabolismo de los organismos; Un caso contrario fue reportado por Ortiz *et al.*, (2019) en juveniles y adultos de la almeja *Diplodon chilensis*, donde se describió la N-desulfonación de C1-2, incrementando las concentraciones de los análogos GTX2-3 tras 30 días de exposición a TP; Cabe destacar que esta ruta metabólica es bidireccional (de Cambella *et al.*, 1993, 1994; Oshima *et al.*, 1995; Bricelj y Shumway, 1998; Wiese *et al.*, 2010), por tanto es posible que en las larvas de los camarones se esté llevando a cabo este proceso pero de manera inversa ya que se sabe que el proceso de

biotransformación y acumulación de toxinas es diferenciado para cada especie (Bricelj *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2003).

Contrario a lo reportado en el estudio de Flores-Chavarría (2018) donde se registró la presencia del análogo GTX3 en los tejidos de los camarones, en algunos tejidos como músculo, intestino y branquias, éste análogo representó porcentajes molares menores al 2%; Únicamente en el hepatopáncreas se registró en porcentajes mayores (12%); sin embargo, en ese estudio se analizaron los tejidos de juveniles de una talla mayor en comparación con las larvas de este trabajo, por tanto, también es posible que este análogo si pudiera estar presente en los tejidos, pero a concentraciones inferiores al límite de detección del equipo (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015).

Las especies difieren no sólo en el tipo de biotransformación de toxinas, sino también en la distribución de toxinas en los tejidos y la cinética de depuración. (Oshima *et al.*, 1990; Cambella *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 2003). Además, la incorporación de estas toxinas a los tejidos de los organismos puede diferir entre las distintas etapas de vida de una especie determinada, corroborando la alta sensibilidad de los organismos principalmente las etapas tempranas del desarrollo (Ortiz *et al.*, 2019).

Otro punto que considerar es que se ha reportado la existencia de análogos de tipo benzoato en cepas de *G. catenatum* (Negri *et al.*, 2007; Vale 2008a; Vale 2008b; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2011 y Durán-Riveroll *et al.*, 2013). En este trabajo no fue posible evaluar la presencia de las toxinas de tipo benzoato ya que estas no son detectadas con el método de detección por HPLC-FLD (Negri *et al.*, 2003). No se debe dejar de lado que estas toxinas, también pueden servir de sustrato para la transformación a análogos hidrosolubles. Vale (2008a) demostró que en algunos bivalvos las toxinas tipo benzoato son biotransformadas por la acción de la enzima carbamoilasa, perdiendo la cadena lateral que contiene al grupo benzoato, produciendo análogos decarbamoil, de mayor toxicidad.

8.4 Daños histopatológicos producidos por TPd en larvas de *P. vannamei*

En el presente estudio se describieron y cuantificaron los daños y lesiones histopatológicas en diferentes órganos producidos por la exposición de larvas de camarones a TPd. Recientemente el trabajo reportado por Flores-Chavarría *et al.* (2023) confirma que las TPd y otros metabolitos producidos por *G. catenatum* son captados, incorporados al sistema circulatorio y distribuidos a los diferentes tejidos del camarón *P. vannamei* causando varios daños tisulares.

Cabe desatacar que si bien la descripción de tejidos sanos realizada por Bell y Lightner (1988) es una descripción detallada y en extenso de los diferentes tejidos de los camarones, este trabajo se realizó en tejidos de organismos adultos; Asimismo, las descripciones realizadas por Pérez-Linares, (2008) y Flores-Chavarría (2018), se llevaron a cabo en Postlarvas y juveniles de *P. vannamei*, sin embargo, los trabajos enfocados a la descripción y cuantificación de daños y lesiones histológicas en los primeros estadios larvarios son escasos; en el trabajo realizado por Muhammad *et al.*, (2012) se muestran una descripción del proceso de formación y desarrollo del sistema nerviosos de *P. vannamei* en sus primeros estadios larvarios, sin embargo, hasta donde tenemos conocimiento, esta es la primera vez que se realiza una descripción de lesiones histopatológicas en PL11 de diferentes órganos, y actualmente no se cuenta con el material base para realizar una comparación y descripción de los tejidos en los estadios previos.

En el presente trabajo, todos los órganos evaluados presentaron daños y diferencias significativas entre el grupo control y los organismos expuestos a los tratamientos con las mayores concentraciones de extractos celulares (50, 75 y 100%). Por ejemplo, en musculo se observaron disminuciones importantes en el porcentaje de área de cobertura muscular. En este estudio, los porcentajes de cobertura de músculo disminuyeron desde el 70% presente en los controles, hasta el 40% en el tratamiento de 100%, encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 13); En los resultados obtenidos por Flores-Chavarría (2018) se cuantificó la pérdida de músculo de todos los tratamientos con una variación entre el 44.7% y el 48.7% sin diferencias significativas. Esta pérdida en la integridad de musculo se debe principalmente al incremento de inflamación y edema, así como la pérdida de masa muscular, lo cual a su vez está relacionado con la alteración de los modos de locomoción, baja capacidad de nado (aletargamiento) y a la falta de

respuesta a los estímulos físicos observadas. Estos daños en la integridad de los tejidos musculares también están relacionados con los daños observados al corazón, que, de igual forma, pierde su capacidad de bombear hemolinfa a través del sistema circulatorio de los organismos, y por ende se ve reflejado en la disminución de cobertura de hemolinfa y tejido cardíaco.

Se observó daño progresivo en el hepatopáncreas, se ha descrito un daño progresivo, así como la disminución de la altura de las células Hpb y el resto de las células epiteliales (Hpf y Hpr), similares a los reportados por Flores-Chavarría (2018); El hepatopáncreas es un órgano de principal interés, debido a que es el centro de desintoxicación, metabolismo e inmunidad del camarón (Shi *et al.*, 2010). Es por ello que varios estudios han informado daños visibles en el hígado o el hepatopáncreas, alteraciones inmunitarias y cambios funcionales en organismos expuestos a ficotoxinas (Chen *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020; Ma *et al.*, 2021).

El intestino también es un tejido diana importante ya que la absorción TPd por parte de los camarones puede llevarse a cabo a través de tejidos permeables (Henry *et al.*, 2012; Mardones *et al.*, 2015; Castrec *et al.*, 2018). En este estudio se identificaron daños severos a los epitelios del tracto digestivo que incluyeron la descamación, atrofia, ruptura y acumulaciones anómalas de células epiteliales. Estudios relacionados a la toxicidad de otras ficotoxinas como las Microcistinas-LR señalan que estas pueden ingresar a las células epiteliales intestinales provocando lesiones de la mucosa, inflamación y disbacteriosis en animales acuáticos (Chen *et al.*, 2016; Duan *et al.*, 2020).

Adicionalmente, en este trabajo se registró por primera vez la presencia de vacuolas en células del tracto digestivo de las larvas expuestas a TPd. El primer informe sobre la vacuolación por citotoxinas producidas por algunas cepas de *Helicobacter pylori* en cultivos de diferentes líneas celulares fue publicado en 1988 por Leunk *et al.*; en ese momento, la actividad de vacuolación de los sobrenadantes de cultivos de *H. pylori* se atribuía a la actividad de la ureasa más que a una citotoxina específica (Xu *et al.*, 1990). Sin embargo, también se ha reportado vacuolación celular causada por toxinas épsilon producida por *Clostridium perfringens* en un cultivo de células epiteliales de riñón canino (Madin Darby), donde se observó que esta toxina provocó la formación de vacuolas originadas a partir de los endosomas tardíos y los lisosomas (Petit *et al.*, 1997; Abrami

et al., 1998; Nagahama *et al.*, 2011). Por otro lado, Ohishi y Odagiri (1984) informaron sobre la vacuolización celular producida por la exposición de células epiteliales intestinales murinas tras la acción de la toxina C2 de *Clostridium botulinum*, en donde los autores observaron que la gravedad de los cambios morfológicos en el intestino aumentaba progresivamente con el tiempo después de la inyección de estas toxinas, reportando que en la parte superior de las vellosidades intestinales se detectó vacuolación citoplasmática de las células epiteliales y una ligera lesión edematosa de la lámina propia.

Es probable que esta vacuolación celular reportada en el intestino de los camarones corresponda a un mecanismo fisiológico de respuesta al estrés, ya que se sabe que las vacuolas están relacionadas con los procesos de endocitosis y los mecanismos responsables de la clasificación molecular de proteínas, lípidos y sustancias de desecho. La endocitosis se caracteriza por la formación continua y regulada de vesículas de membrana en la membrana plasmática. Las cuales pueden formar fagosomas para la captación de partículas, así como vesículas responsables de la internalización de líquido extracelular y ligandos unidos a receptores. En general, estos tipos de vesículas da como resultado la entrega de su contenido a los lisosomas para su degradación (Martirosian *et al.*, 2005).

Por otra parte, se sabe que cuando los organismos están expuesto a diferentes agentes tóxicos, se genera daños en los mecanismos de respiración y homeostasis celular, produciendo edema celular y degeneración vacuolar, la cual puede llevar al estallamiento celular; esta degeneración vacuolar se caracteriza por la acumulación de grasa en el interior de las células la cual puede ser por aumento de la síntesis de lípidos, por la disminución en la eliminación o salida de lípidos de las células o por un proceso de degradación de lípidos presentes en los organelos celulares (Feria-Velasco y Martínez Saldaña, 2006).

Finalmente, las alteraciones observadas en el sistema nervioso son lo más representativo en cuanto a los daños generados en los camarones, puesto que en este órgano se presentaron daños en todos los tratamientos, incluyendo las menores concentraciones (12 y 25%), las cuales fueron significativamente diferentes con respecto al grupo control, esto se debe a la naturaleza neurotóxica de las TP, las cuales se unen directamente a los canales de sodio-potasio y calcio

dependientes de voltaje en las membranas de las células nerviosas y musculares. Flores-Chavarría *et al.* (2020) señalan que la pérdida grave del cordón nervioso puede ser un daño distintivo de *G. catenatum* en los camarones (Pantoja y Lightner, 2008; Morales-Covarrubias, 2008).

En los organismos marinos, varios trastornos fisiológicos, como la disminución en la tasa de crecimiento y la reproducción, la mortalidad y el daño morfológico, se han asociado con la exposición a TP (Lefebvre *et al.*, 2004; Mello *et al.*, 2013), sin embargo, los efectos tóxicos y sus mecanismos moleculares en respuesta a la exposición a TP siguen siendo poco conocidos. Pese a que en el presente estudio no se evaluaron las respuestas moleculares y los indicadores de estrés oxidativo, es posible que los daños generados a los tejidos estén estrechamente relacionado con daños ocasionados por el desbalance de radicales libres y antioxidantes en el organismo (estrés oxidativo), que puede provocar diversas afectaciones como inflamación crónica, peroxidación de lípidos y por ende daños a las membranas (Pham-Huy *et al.*, 2008; Fernández-Sánchez *et al.*, 2011) lo cual puede explicar los daños en la estructura, pérdida de la forma y organización en los epitelios de los órganos dañados.

Se ha reportado que la “vía del estrés oxidativo” representa una de las vías de toxicidad más importantes; cuando hay un daño neurológico, el estrés oxidativo se considera un contribuyente patológico importante (Uttara *et al.*, 2009). Bajo estrés oxidativo, el factor de transcripción proteico llamado Nrf2 (Itoh, 1997) puede translocarse al núcleo y regular genes posteriores implicados en la desintoxicación y los antioxidantes (Ma, 2013). Estudios previos informan sobre el estrés oxidativo inducido por TP en *T. japonicus*, donde se sugiere que Nrf2 es un mecanismo de defensa primario para el estrés oxidativo y la neurotoxicidad por la exposición a TP (Zhou *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020). Sin embargo, existen vacíos en cuanto a la comprensión de los mecanismos moleculares que inducen los daños en los tejidos, así como la respuesta inmune y antioxidante que estas desencadenan en los organismos para hacer frente a estos compuestos.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, tanto de mortalidad, como en daños a los tejidos, se sugiere que el contenido celular disuelto de *G. catenatum*, incluidas las TP representa un riesgo potencial para la producción de camarón blanco *P. vannamei*, tanto de cultivo como silvestres, por tanto, puede representar pérdidas económicas para una industria de gran

importancia para el país, por lo que se sugiere continuar con estudios como el presente para entender estos procesos y buscar estrategias de mitigación que permitan disminuir la exposición en ambientes controlados.

9. CONCLUSIONES

- El método implementado para la extracción de TPd en medio de cultivo mediante columnas de carbón activado resultó ser exitoso en los porcentajes de recuperación de STX y análogos.
- La concentración de TPd en el medio está directamente relacionado con la etapa de crecimiento del cultivo de *G. catenatum*, siendo en las etapas de decaimiento/muerte en las cuales las concentraciones de TPd incrementan de manera significativa.
- La exposición de *P. vannamei* a metabolitos celulares disueltos de *Gymnodinium catenatum* tienen efectos negativos en la sobrevivencia de larvas durante sus primeros estadios larvarios, siendo los estadios de mysis y PL los más sensibles a estos metabolitos.
- Las lesiones histopatológicas provocadas en los tejidos de las larvas demostraron que estas toxinas afectan el estado de salud de los organismos, aun cuando no producen la muerte, lo cual se puede ver reflejado en una disminución y retraso considerable en la producción de larvas, trayendo consigo grandes pérdidas económicas en la industria.
- El sistema nervioso es el tejido más susceptible a los efectos de las TPd en camarones y por ende, puede fungir como indicador para la evaluación de daños a los organismos por la presencia de estas toxinas.

10. LITERATURA CITADA

- Akbar, M.A., Mohd-Yusof, N.Y., Tahir, N.I., Ahmad, A., Usup, G., Sahrani, F.K., y Bunawan, H. (2020). Biosynthesis of saxitoxin in marine dinoflagellates: an omics perspective. *Marine Drugs*, 18(2): 103. DOI: 10.3390/md18020103
- Aké-Castillo, J.A., Okolodkov, Y.B., Rodríguez-Gómez, C.F., y Campos-Bautista, G. (2014). Florecimientos algales nocivos en Veracruz: especies y posibles causas (2002-2012), pp. 133-146. En: Botello, A.V., Rendón von Osten, J., Benítez, J.A., y Gold-Bouchot, G. (eds.) *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias*. UAC, UNAM-ICMYL, CINVESTAV-Unidad Mérida. ISBN 978-607-7887-71-3.
- Almandoz, G.O., Cefarelli, A.O., Diodato, S., Montoya, N.G., Benavides, H.R., Carignan, M., Hernando, M., Fabro, E., Metfies, K., Lundholm, N., Schloss, I.R., Alvarez, M., y Ferrario, M.E. (2019). Harmful phytoplankton in the Beagle Channel (South America) as a potential threat to aquaculture activities. *Marine Pollution Bulletin*, 145: 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.05.026>
- Alonso-Rodríguez, R. y Páez-Osuna, F. (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(1-4): 317-336. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00509-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00509-4)
- Andrinolo, D., Michea, L.F., y Lagos, N. (1999). Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PST), in cats. *Toxicon*, 37: (3): 447–464. DOI: 10.1016/S0041-0101(98)00173-1
- Bagoien, E., Miranda, A., Reguera, B., y Franco, J.M. (1996). Effects of two paralytic shellfish toxin producing dinoflagellates on the pelagic harpacticoid copepod *Euterpina acutifrons*. *Marine Biology*, 126: 361-369. <https://doi.org/10.1007/BF00354618>
- Bakke, M.J., Hustoft, H.K., y Horsberg, T.E. (2010). Subclinical effects of saxitoxin and domoic acid on aggressive behaviour and monoaminergic turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 99: 1–9. DOI:10.1016/j.aquatox.2010.03.013
- Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D.J., Gárate-Lizárraga, I., Núñez-Vázquez, E.J., y Hernández-Sandoval, F.E. (2010). Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific. *Marine Drugs*, 8 (6): 1935-1961. DOI:10.3390/md8061935
- Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D.J., Núñez-Vázquez, E., y Hernández-Sandoval, F.E. (2011). El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiológica*, 21(3): 381-413. ISSN 0188-8897
- Barraza-Guardado, R., Cortés-Altamirano, R., y Sierra-Beltrán, A. (2004). Marine die-offs from *Chattonella marina* and *Chattonella cf. ovata* in Kun Kaan Bay, Sonora in the Gulf of California. *Harmful Algae News*, 25: 7–8.
- Bayley, B. y Jham, S. (1992). Penaeid taxonomy, biology and zoogeography. En: Fast, A., y Lester, J. (eds.) *Marine shrimp culture: principles and practices*. Elsevier Science Publishers, pp. 9–27. ISBN:1483291049, 9781483291048
- Blay, P., Hui, J.P.M., Chang, J., y Melanson, J.E. (2011). Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400: 577–585. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4772-2>
- Boone, L. (1931). A collection of anomuran and macruran Crustacea from the Bay of Panama and the fresh waters of the Canal Zone. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 63: 137-189.

- Botelho, M.J., Vale, C., Grilo, R.V., y Ferreira, J.G. (2012). Uptake and release of paralytic shellfish toxins by the clam *Ruditapes decussatus* exposed to *Gymnodinium catenatum* and subsequent depuration. *Marine Environmental Research*, 77: 23–29. DOI:10.1016/j.marenvres.2012.01.002
- Bragg, W.A., Lemire, S.W., Coleman, R.M., Hamelin, E.I., y Johnson, R.C. (2015). Detection of human exposure to saxitoxin and neosaxitoxin in urine by online-solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxicon*, 99: 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.03.017>
- Briand, J.F., Jacquet, S., Bernard, C., y Humbert, J.F. (2003). Health hazard for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *American Journal of Veterinary Research*, 34: 361–377. DOI: 10.1051/vetres:2003019
- Bricelj, V.M. y Shumway, S.E. (1998). Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Reviews in Fisheries Science*, 6(4): 315-383. DOI:10.1080/10641269891314294
- Brown, R.M., Jeffrey, J.K., y Dunstan, G.A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1-4): 315-331. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01501-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01501-3)
- Bustillos-Guzmán, J.J., Vale, P., y Band-Schmidt, C.J. (2011). Presence of benzoate type toxins in *Gymnodinium catenatum* Graham isolated from the Mexican Pacific. *Toxicon*, 57(6): 922-926. DOI: 10.1016/j.toxicon.2011.02.023
- Cantoral Uriza, E.A., Asencio Martínez, A.D., y Aboal Sanjurjo, M. (2017). Cianotoxinas: efectos ambientales y sanitarios. Medidas de prevención. *Hidrobiológica*, 27(2): 241-251. ISSN 0188-8897
- Carmichael, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites, the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 445-459. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x
- Carmichael, W.W. (1994). Toxins the cyanobacteria. *Scientific American*, 270: 78-86. DOI: 10.1038/scientificamerican0194-78
- Carreto, J.I., Montoya, N., y Carignan, M. (2008) *Florecimientos de algas nocivas*. Atlas de sensibilidad ambiental del mar y costa. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero, Mar de Plata, Argentina. 1-11
- Cembella, A.D., Shumway, S.E., y Larocque, R. (1994). Sequestering and putative biotransformation of paralytic shellfish toxins by the sea scallop *Placopecten magellanicus*: seasonal and spatial scales in natural populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 180(1): 1-22. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(94\)90075-2](https://doi.org/10.1016/0022-0981(94)90075-2)
- Cembella, A.D., Shumway, S.E., y Lewis, N.I. (1993). Anatomical distribution and spatio-temporal variation in paralytic shellfish toxin composition in two bivalve species from the Gulf of Main. *Journal of Shellfish Research*, 12(2): 389-403.
- Cho, Y., Tsuchiya, S., Yoshioka, R., Omura, T., Konoki, K., Oshima, Y., Yotsu-Yamashita, M. (2016). Column switching combined with hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of saxitoxin analogues, and their biosynthetic intermediates in dinoflagellates. *Journal of Chromatography. A*, 1474: 109–120. DOI:10.1016/j.chroma.2016.10.065
- Cho, Y., Tsuchiya, S., Yoshioka, R., Omura, T., Konoki, K., Oshima, Y., Yotsu-Yamashita, M. (2015). The presence of 12 β -deoxydecarbamoysaxitoxin in the Japanese toxic dinoflagellate *Alexandrium* determined by simultaneous analysis for paralytic shellfish toxins using HILIC-LC-MS/MS. *Harmful Algae*, 49: 58–67. DOI: 10.1016/J.HAL.2015.09.003

- Choi, M.C., Hsieh, D.P., Lam, P.K., Wang, W.X. (2003). Field depuration and biotransformation of paralytic shellfish toxins in scallop *Chlamys nobilis* and green-lipped mussel *Perna viridis*. *Marine Biology*, 143: 927–934. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1148-y>
- Choi, N.M.C., Yeung, L.W.Y., Siu, W.H.L., So, I.M.K., Jack, R.W., Hsieh, D.P.H., Wu, R.S.S., Lam, P.K.S. (2006). Relationships between tissue concentrations of paralytic shellfish toxins and antioxidative responses of clams, *Ruditapes philippinarum*. *Marine Pollutant Bulletin*, 52(5):572–597. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2006.01.009](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.01.009)
- Clemente, Z., Busato, R., Oliveira Ribeiro, C.A., Cestari, M.M., Ramsdorf, W., Magalhães, V.F., Silva De Assis, H.C. (2010). Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a Southern Brazilian reservoir. *Toxicon*, 55(2-3): 396–406. DOI: [10.1016/j.toxicon.2009.09.003](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.09.003)
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA) (2021). *Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2021*, Sinaloa, México.
- Cortés-Altamirano, R., Licea-Duran, S. (1999). Florecimientos de microalgas nocivas en estanques para cultivo semi-intensivo de camarón en México. *Revista Latinoamericana Microbiología*, 41: 157–166.
- Costa, P.R., Botelho, M.J., Lefebvre, K.A. (2010). Characterization of paralytic shellfish toxins in seawater and sardines (*Sardina pilchardus*) during blooms of *Gymnodinium catenatum*. *Hydrobiologia*, 655: 89–97. DOI: [10.1007/s10750-010-0406-5](https://doi.org/10.1007/s10750-010-0406-5)
- de Moraes Calado, S.L., Santos, G.S., Wojciechowski, J., de Magalhães, V.F., de Assis, H.C.S. (2019). The accumulation dynamics, elimination and risk assessment of paralytic shellfish toxins in fish from a water supply reservoir. *Science of The Total Environment*, 651(2): 3222–3229. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.046>
- Dean, K.J., Hatfield, R.G., Lee, V., Alexander, R.P., Lewis, A.M., Maskrey, B.H., Teixeira-Alves, M., Hatton, B., Coates, L.N., Capuzzo, E., Ellis, J.R., y Turner, A. D. (2020). Multiple new paralytic shellfish toxin vectors in offshore North Sea benthos, a deep secret exposed. *Marine Drugs* 18(8): 400. doi: [10.3390/md18080400](https://doi.org/10.3390/md18080400).
- Ding, L., Qiu, J., Li, A. (2017). Vías de biotransformación propuestas de nuevos metabolitos de toxinas paralizantes de mariscos basadas en muestras de mejillón experimentales y de campo. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 65: 5494–5502. doi: [10.1021/acs.jafc.7b02101](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02101).
- Durán-Riveroll, L.M., Peralta-Cruz, J., Bustillos-Guzmán, J.J., Band-Schmidt, C.J. (2013). Presencia de toxinas tipo benzoato en una cepa de *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) aislada de Manzanillo, Colima, México. *Hidrobiológica*, 23(2): 169–175. ISSN 0188-8897
- Escarcega-Bata, A.D.J., Nuñez-Resendiz, M.L., Ruiz-de la Torre, M.C., Dreckmann, K.M., Zamudio-Resendiz, M.E., Senties, A. (2023). Diversidad de dinoflagelados atecados del orden Gymnodiniales (Dinophyceae), con énfasis en aquellos formadores de florecimientos algales nocivos en las costas del Pacífico Mexicano. *Acta Botanica Mexicana*, 130: 1-13. DOI: [10.21829/abm130.2023.2126](https://doi.org/10.21829/abm130.2023.2126)
- Etheridge, S.M. (2010). Paralytic shellfish poisoning: seafood safety and human health perspective. *Toxicon*, 56: 108–122. DOI: [10.1016/j.toxicon.2009.12.013](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.013)
- Fabioux, C., Sulistiyani, Y., Haberkorn, H., Hégaret, H., Amzil, Z., Soudant, P. (2015). Exposure to toxic *Alexandrium minutum* activates the detoxifying and antioxidant systems in gills of the oyster *Crassostrea gigas*. *Harmful Algae*, 48: 55–62. DOI: [10.1016/j.hal.2015.07.003](https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.07.003)
- Feria-Velasco, A., y Martínez-Saldaña. (2006). Daño estructural producido por Xenobioticos. En: *Toxicología básica*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. pp. 107-117. ISBN 970-728-048-4.

- FAO. (2004). Manejo sanitario y mantenimiento de la bioseguridad de los laboratorios de postlarvas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en América Latina. FAO Documento Técnico de Pesca No. 450. Roma. 66p. ISBN 92-5-305022-5.
- Frías-Espericueta, M. G., Aguilar-Juárez, M., Osuna-López, I., Abad-Rosales, S., Izaguirre-Fierro, G., Voltolina, D. (2011). Los metales y la camaronicultura en México. *Hidrobiológica* 21(3): 217–228. ISSN 0188-8897
- Fuentes, C., Clement, A., Aguilera, A. (2008). Summer *Alexandrium catenella* bloom and the impact on farming in the XI Aysén region, Chile. En: Moustrop, O., Doucette, G., Enevoldsen, H., Godhe, A., Hallegraeff, G., Luckas, B., Lundholm, N., Lewis, J., Rengefors, K., Sellner, K., Steidinger, K., Tester, P., Zingone, A. (Eds.). Proceeding of the International Conference on Harmful Algae. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Copenhagen: 183–186.
- Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J. J., Erler, K., Muñeton-Gómez, M. S., Luckas, B., Tripp-Quezada, A. (2004). Paralytic shellfish toxins in the chocolata clam, *Megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae), in Bahía de La Paz, Gulf of California. *Revista de Biología Tropical*, 52: 133–140. PMID: 17465127
- Gárate-Lizárraga, I., Okolodkov, Y., Cortés-Altamirano, R. (2016). Microalgas formadoras de florecimientos algales en el Golfo de California. En: *Florecimientos algales nocivos en México*. CICESE, Ensenada, México. pp. 130–145. ISBN: 978-607-95688-5-6
- García, C., Barriga, A., Díaz, J.C., Lagos, M., Lagos, N. (2010). Route of metabolization and detoxication of paralytic shellfish toxins. *Toxicon* 55: 135–144. DOI:10.1016/j.toxicon.2009.07.018
- García-Mendoza, E., Medina-Elizalde, J., Ruíz de la Torre, M. C., Rosas-Campos, A., Sánchez-Bravo, Y., Bustillos-Guzmán, J. J., Núñez-Vázquez, E. J. (2015). Lecciones aprendidas del florecimiento algal nocivo de enero del 2015 en el norte del Golfo de California. II. Mortandad de organismos marinos. p. 31. III Congreso de la Sociedad Mexicana para el Estudio de los Florecimientos Algales Nocivos. 28-30 de octubre de 2015. Champotón, Campeche, México.
- Glibert, P. M. (2020). Harmful algae at the complex nexus of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 91: 10158. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.001>
- Gómez-Gil, B., Roque, A., Guerra-Flores, A. L. (2001). Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En: *Camaronicultura y medio ambiente*. ICMYL-UNAM: México. p. 452. ISBN: 9683696791.
- Griffin, J. E., Park, G., Dam, H. G. (2019). Relative importance of nitrogen sources, algal alarm cues and grazer exposure to toxin production of the marine dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae*, 84: 181–187. DOI: 10.1016/j.hal.2019.04.006
- Guéguen, M., Baron, R., Bardouil, M., Truquet, P., Haberkorn, H., Lassus, P., Barillé, L., Amzil, Z. (2011). Modelling of paralytic shellfish toxin biotransformations in the course of *Crassostrea gigas* detoxification kinetics. *Ecological Modelling* 222: 3394–3402. DOI:10.1016/J.ECOLMODEL.2011.07.007
- Guinle, C., Núñez-Vázquez, E.J., Fernández-Herrera, L.J., Corona-Rojas, D.A., Tovar-Ramírez, D. (2023). Toxicogenomic Effects of Dissolved Saxitoxin on the Early Life Stages of the Longfin Yellowtail (*Seriola rivoliana*). *Marine Drugs*, 21(11): 597. doi: 10.3390/md21110597.
- Hernández-Sandoval, F. E. (2010). *Efecto de la proporción N en el crecimiento y toxicidad de Gymnodinium catenatum de la Bahía de La Paz y Bahía de Mazatlán*. Tesis Doctoral. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, BCS.

- Hernández-Sandoval, F.E., Bustillos-Guzmán, J.J., Band-Schmidt, C.J., Núñez-Vázquez, E.J., López-Cortés, D.J., Fernández-Herrera, L.J., Poot-Delgado, C.A., Moreno-Legorreta, M. (2022). Effect of different N ratios on the growth, toxicity, and toxin profile of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains from the Gulf of California. *Toxins*, 14(7): 501. doi: 10.3390/toxins14070501.
- Hii, K. S., Lim, P. T., Kon, N. F., Usup, G., Gu, H., Leaw, C. P. (2019). Transcriptional and physiological responses to inorganic nutrition in a tropical Pacific strain of *Alexandrium minutum*: implications for nutrient uptakes and assimilation. *Gene*, 711: 143950–143963. DOI:10.1016/j.gene.2019.143950
- Huang, I.-S., Zimba, P. V. (2019). Cyanobacterial bioactive metabolites - A review of their chemistry and biology. *Harmful Algae*, 83: 42–94. DOI:10.1016/J.HAL.2019.05.001
- Huei-Meei, S., I-Chiu, L., Young-Men, C. (1993). Mass mortality of prawn caused by *Alexandrium tamarense* blooming in a culture pond in southern Taiwan. En: *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier Science Publications, New York, pp. 329-333. oai:140.112.114.62:246246/116975
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF02505576>
- Hunter, P. R. (1995). Cyanobacterial toxins and their potential risk to drinking water supplies. *Microbiology Europe*, 3: 8–10. doi: 10.1289/ehp.00108s1113.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*, 236: 313–322. doi: 10.1006/bbrc.1997.6943.
- Jiang, T., Wang, D., Niu, T., Xu, Y. (2007). Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from the cladoceran (*Moina mongolica*) to larvae of the fish (*Sciaenops ocellatus*). *Toxicon*, 50: 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.046>
- Jones, G. J., Negri, A. P. (1997). Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. *Water Research*, 31: 525–533. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00134-0)
- Keevil, C. W. (1991). Toxicological and detection of cyanobacterial (blue-green algal) toxins. En: *Public health aspects of cyanobacteria (blue-green algal)*. PHLS Microbiology Digest Supplement, London, pp. 134-137.
- Kudela, R. M., Berdalet, E., Bernard, S., Burford, M., Fernand, L., Lu, S., Roy, S., Tester, P., Usup, G., Magnien, R., Anderson, D. M., Cembella, A., Chinain, M., Hallegraeff, G., Reguera, B., Zingone, A., Enevoldsen, H. y Urban (Eds.) (2015) Harmful Algal Blooms. A Scientific Summary for Policy Makers. IOC/UNESCO, Paris (IOC/INF-1320).
- Kwong, R. W., Wang, W. X., Lam, P. K. y Peter, K. N. (2006) La absorción, distribución y eliminación de toxinas de mariscos paralizantes en mejillones y peces expuestos a dinoflagelados tóxicos. *Aquatic Toxicology*, 80: 82-91. DOI: 10.1016/j.aquatox.2006.07.016.
- Lefebvre, K. A., Elder, N. E., Hershberger, P. K., Trainer, V. L., Stehr, C. M., Scholz, N. L. (2005). Dissolved saxitoxin causes transient inhibition of sensorimotor function in larval Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Marine Biology*, 147: 1393-1402. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0048-8>

- Lefebvre, K. A., Trainer, V. L., Scholz, N. L. (2004) Morphological abnormalities and sensorimotor deficits in larval fish exposed to dissolved saxitoxin. *Aquatic Toxicology*, 66: 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.08.006>
- Li, S. C., Wang, W. X., Hsieh, D. P. F. (2002) Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Marine Environmental Research*, 53: 145-160. DOI: 10.1016/s0141-1136(01)00117-9
- Li, X., Li, Z. Y., Chen, J. H., Shi, Q., Zhang, R., Wang, S., Wang, X. R. (2014) Detection, occurrence and monthly variations of typical lipophilic marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in the coastal seawater of Qingdao City, China. *Chemosphere*, 111: 560-567.
- Lijun, L., Junhui, C., Xiuping, H., Shuang, H., Zirui, L., Baodong, W. (2020) First determination of extracellular paralytic shellfish poisoning toxins in the culture medium of toxigenic dinoflagellates by HILIC–HRMS. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 204: 111042. ISSN 0147-6513. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111042>.
- Llanos-Rivera, A. y Astuya-Villalón, A. (2023) Guía de actividades prácticas. En: Curso Toxinas marinas: Generalidades y bioensayos in vivo e in vitro para su detección. CIBNOR, La Paz, BCS.
- MacKenzie, L., Harwood, T., Watts, A., Webber, S. (2012) *Alexandrium catenella* blooms and associated saxitoxin contamination of shellfish, March to June 2012. A report for the Ministry of Primary Industries Food Safety. *Cawthron Report* no. 2182, Cawthron Institute, Nelson, New Zealand. 28 p. <http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/alexandrium-catenella-blooms.pdf>
- Madigan, T., Malhi, N., Tan, J., McLeod, C., Stewart, I., Harwood, T., Mann, G., Turnbull, A. (2018). Experimental uptake and depuration of paralytic shellfish toxins in southern rock lobster, *Jasus edwardsii*. *Toxicon*, 143:44-50. <http://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.01.001>
- Mak, K. C., Li, A. M., Hsieh, D. P., Wong, P. S., Lam, M. H., Wu, R. S., Richardson, B. J. y Lam, P. K. (2003). Toxinas parálíticas de mariscos en mejillones de labios verdes, *Perna viridis*, en Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 258–268. doi:10.1016/S0025-326X(02)00462-9.
- Martínez, S. L. y Torres, V. M. (1995) Producción de semilla de camarones penaeidos en laboratorio, pp. 21-59. En: *Fundamentos de acuicultura marina*. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. Serie Fundamentos Núm. 2. Bogotá, Colombia.
- Mee, L. D., Espinosa, M. y Díaz, G. (1986) Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific Coast of Mexico. *Marine Environmental Research*, 19: 77-92. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(86\)90040-1](https://doi.org/10.1016/0141-1136(86)90040-1)
- Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. (Eds.) (2008). Enfermedades bacterianas. Guía técnica – patología e inmunología de camarones peneidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá, p. 270.
- Nagahama, M., Itohayashi, Y., Hara, H., Higashihara, M., Fukatani, Y., Takagishi, T., Oda, M., Kobayashi, K., Nakagawa, I., Sakurai, J. (2011). Cellular vacuolation induced by *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *FEBS Journal*, 278(18): 3395-3407. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08263.
- Negri, A. P., Jones, G. J., Hindmarsh, M. (1995). Sheep mortality associated with paralytic shellfish poisoning toxins from the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Toxicon*, 33: 1321–1329. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00068-W](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00068-W)
- Nishihama, Y. (1982). Seasonal abundance of *Protogonyaulax* sp. causing paralytic shellfish poisoning in Funka Bay, Hokkaido, Japan, 1978–1980. In: Proceeding of The North Pacific Aquaculture Symposium. Report 82-2., University of Alaska, Sea Grant College Program, Fairbanks, Alaska., pp. 319–327.

- Núñez-Vázquez, E. J., Gárate-Lizárraga, I., Band-Schmidt, C. J., Cordero-Tapia, A., López-Cortes, D. J., Hernández-Sandoval, F. E., Heredia-Tapia, A., Bustillos-Guzmán, J. J. (2011). Impact of harmful algal blooms on wild and cultured animals in the Gulf of California. *Journal of Environmental Biology*, 32(4): 413-423. PMID: 22315821
- O'Neill, K., Musgrave, I. F., Humpage, A. (2016). Extended low-dose exposure to saxitoxin inhibits neurite outgrowth in model neuronal cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 120: 390–397. DOI: 10.1111/bcpt.12701
- Ogata, T., Kodama, M., Fukuyo, Y., Inoue, T., Kamiya, H., Matsuura, F., (1982). The occurrence of *Protogonyaulax spp.* in Ofunato Bay, in association with the toxicification of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48: 563–566.
- Ortiz, A., Navarro, J. M., Pizarro, G., Villanueva, P. A., Segura, C. J. (2019). Accumulation and biotransformation dynamics of the neurotoxic complex, saxitoxin, in different life stages of *Ostrea chilensis*. *Marine Environmental Research*, 144: 240-245. doi: 10.1016/j.marenvres.2019.01.014.
- Oshima, Y. (1995). Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. En: *Harmful Marine Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp. 475-480. ISBN: 2852069725.
- Pacheco, L., Kunrath, N., Costa, C., Foes, G.K., Wasielesky, J., Yunes, J.S. (2016). Identification of the toxic pentapeptide Nodularin in a cyanobacterial bloom in a shrimp farm in South American Atlantic coast. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 07: DOI: 10.4172/2153-2435.1000479.
- Pantoja, C., Lightner, D.V. (2008). *Enfermedades virales*. En: Guía Técnica - Patología e Inmunología de camarones penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, República de Panamá, pp. 55-114.
- Pazos-Mandujano, R.A. (2012). *Evaluación de la concentración letal media de Gymnodinium catenatum Graham, 1943 (cultivo, medio de cultivo y células)* en postlarvas de *Penaeus vannamei* Boone, 1931. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 56.
- Pearl, H.W. (1988) Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine and inland waters. *Limnology and Oceanography*, 33: 823-847. ISSN:1988, 823-847
- Pérez-Camacho, A.P. (1989). Las mareas rojas y la acuicultura en Galicia. *Cuadernos da Área de Ciencias Marinas*, 4: 111-120. <http://hdl.handle.net/10261/312643>
- Pérez-Linares, J. (2008) *Retención de toxinas y daños en tejidos de camarón patiblanco Penaeus vannamei producidos por la exposición a Gymnodinium catenatum (PSP) y Karenia brevis (NSP)*. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, BCS. 151 p.
- Pérez-Linares, J., Ochoa, J.L., Gago-Martínez, A. (2009). Retention and tissue damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population?. *Toxicon*, 53: 185-195. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.022>
- Prasertsri, S., Limsuwan, C., Churchird, N. (2014). El efecto de una infección con microsporidios sobre el crecimiento del camarón *Litopenaeus vannamei*. *AQUA cultura*, 44-47. Corpus ID: 80678563
- Price, D.W., Kizer, K.W., Hansgen, K.H. (1991). California paralytic shellfish poisoning prevention program. *Journal of Shellfish Research*, 10: 119-145.
- Ramírez Agudelo, M.E., Rojas López, M. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *IATREIA*, 23(2): 166-177. ISSN: 0121-0793.

- Ramos, P., Schmitz, M., Gama, S., Portantiolo, A., Durruthy, M.G., de Souza Votto, A.P., Cornetet, L.R., dos Santos Machado, K., Werhli, A., Tonel, M.Z., Fagan, S.B., Yunes, J.S., Monserrat, J.M. (2018) Cytoprotection of lipoic acid against toxicity induced by saxitoxin in hippocampal cell line HT-22 through in silico modeling and in vitro assays. *Toxicology*, 393: 171-184. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2017.11.004>.
- Ramos, P.B., Diehl, F., dos Santos, J.M., Monserrat, J.M., Yunes, J.S. (2014). Oxidative stress in rats induced by consumption of saxitoxin contaminated drink water. *Harmful Algae*, 37: 68-74. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2014.04.002>.
- Rodríguez-Marín, M.F., Reprieto-García, J.F. (Eds.) (1984). El cultivo del camarón azul *Penaeus stylirostris Stimpson*. Sigma Gráfica S.A. de C.V., Sonora, México, 126 p.
- Romani, D., Tsuchiya, S., Yotsu-Yamashita, M., Brandán, S.A. (2016) Spectroscopic and structural investigation on intermediates species structurally associated to the tricyclic bisguanidine compound and to the toxic agent, saxitoxin. *Journal of Molecular Structure*, 119: 25-38. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.04.039>
- Schuur, M.A. (2003). Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming. *Aquaculture Engineering*, 28: 3-20. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(02\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(02)00053-5)
- Shi, X.Z., Li, X.C., Wang, S., Zhao, X.F., Wang, J.X. (2010). Transcriptome analysis of hemocytes and hepatopancreas in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, challenged with white spot syndrome virus. *Invertebrate Survival Journal*, 7: 119-131.
- Shumway, S.E., Hurst, J.W., Sherman-Caswell, S.S. (1988). Paralytic shellfish poisoning in Maine: monitoring a monster. *Journal of Shellfish Research*, 7(1): 175.
- Silva, C.A., Ramsdorf, W., Magalhães, V.F., Cestari, M.M., Oliveira, R.C.A., Silva de Assis, H.C. (2011). First report about saxitoxins in freshwater fish *Hoplias malabaricus* through trophic exposure. *Toxicon*, 57: 141-147.
- Smith, J.L., Boyer, G.L., Zimba, P.V. (2008). A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*, 280: 5-20. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.05.007>.
- Takser, L., Benachour, N., Husk, B., Cabana, H., Gris, D. (2016). Cyanotoxins at low doses induce apoptosis and inflammatory effects in murine brain cells: potential implications for neurodegenerative diseases. *Toxicology Reports*, 3: 180-189. <http://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.12.008>.
- Tamele, I.J., Silva, M., Vasconcelos, V. (2019). The incidence of marine toxins and the associated seafood poisoning episodes in the African countries of the Indian Ocean and the Red Sea. *Toxins*, 11: 58-108. doi: 10.3390/toxins11010058
- Tazawa, T., Ito, T., Ishige, M., Satoh, N. (1988). Seasonal variation of paralytic shellfish poison in scallops from Funka Bay. *Rep Hokkaido Institute of health*, 38: 63-65.
- Toyofuku, H. (2006). Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Pollution Bulletin*, 52: 1735-1745. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2006.07.007
- Vale, P. (2008a). Fate of Benzoate paralytic shellfish poisoning toxins from *Gymnodinium catenatum* in shellfish and fish detected by pre-column oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1190: 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.009>
- Vale, P. (2008b). Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poison compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection

- and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1195: 85-93. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.04.073
- Vale, P. (2010). New Saxitoxin analogues in the marine environment: Developments in toxin chemistry, detection and biotransformation during the 2000s. *Phytochemistry Reviews*, 9: 525-535. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9196-7>
- Vale, P. (2011). Hydrolysis of Hydroxybenzoate Saxitoxin analogues originating from *Gymnodinium catenatum*. *Food Chemistry*, 125: 1160-1165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.019>
- Vilariño, N., Louzao, M., Abal, P., Cagide, E., Carrera, C., Vieytes, M., Botana, L. (2018). Human poisoning from marine toxins: unknowns for optimal consumer protection. *Toxins*, 10: 324-362. DOI: 10.3390/toxins10080324
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C., Neilan, B.A. (2010). Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogues. *Marine Drugs*, 8: 2185-2211. DOI: 10.3390/md8072185
- Xu, J., Ho, A.Y.T., He, L., Yin, K., Hung, C., Choi, N., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., Anderson, D.M., Harrison, P.J. (2012). Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two *Alexandrium* species from Hong Kong. *Harmful Algae*, 16: 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2012.02.006>
- Yang, I., Beszteri, S., Tillmann, U., Cembella, A., John, U. (2011). Growth- and nutrient-dependent gene expression in the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Harmful Algae*, 12: 55-69. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.08.012>
- Yu, K.N., Choi, M.C., Shen, X., Wu, R., Wang, W., Lam, P. (2005). Modeling of depuration of paralytic shellfish toxins in *Chlamys nobilis* y *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, 50: (4) 463-484. doi: 10.1016/j.marpolbul.2005.01.019.
- Yu, R.C., Hummert, C., Luckas, B., Qian, P.Y., Zhou, M.J. (1998). Modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. *Chromatographia*, 48: 671-676. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02467597>
- Zheng, X., Hu, B., Gao, S.X., Liu, D.J., Sun, M.J., Jiao, B.H., Wang, L.H. (2015). A saxitoxin-binding aptamer with higher affinity and inhibitory activity optimized by rational site-directed mutagenesis and truncation. *Toxicon*, 101: 41-47. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.04.017.
- Zhou, Z., Tang, X., Chen, H., Wang, Y. (2018). Comparative studies of saxitoxin (STX)-induced cytotoxicity in Neuro-2a and RTG-2 cell lines: an explanation with respect to changes in ROS. *Chemosphere*, 192: 66-74. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.083.