



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Unidad Académica Mazatlán

Universidad Nacional Autónoma de México



**“Efecto ictiotóxico del dinoflagelado
Cochlodinium polykrikoides (Margalef, 1961)
en el pargo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869)”**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

**Maestro en Ciencias
(Biología Marina)**

presenta

Ocean. Juan José Dorantes Aranda

Directoras de Tesis: **Dra. Luz Ma. García de la Parra
Dra. Rosalba Alonso Rodríguez**

Comité Tutorial: **Dr. Martín G. Frías Espericueta
Dra. Lourdes Morquecho Escamilla
Dr. Fausto D. Voltolina Lobina**

Mazatlán, Sinaloa; Octubre de 2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Tesis desarrollada en los siguiente laboratorios:

- ü Laboratorio de Geoquímica y Contaminación Costera, Laboratorio de Geoquímica y Sedimentología, del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán.
- ü Laboratorio de Ecotoxicología, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Mazatlán.
- ü Laboratorio de Ecología de Fitoplancton, del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, B.C.S.
- ü Laboratorio de Alimento Vivo y Cultivo de Microalgas, del Acuario Mazatlán, S.A. de C.V.

DEDICATORIA

A mis padres por su amor, confianza, apoyo incondicional y por ser unos gigantes.

A mis hermanas y sobrinos “los monkikis” por ser parte de mi vida y darme la oportunidad de compartirla con ellos con juegos, risas, enseñanzas y experiencias.

Al Tenor Gerardo Gálvez Salinas por su compañerismo, por brindarme una mano, darme palabras de ánimo y aliento y por hacer que siempre mantenga una sonrisa.

A mis grandes amigos cMC. Karina Lugo I., pAntrop. Elvira Castro A., y cDr. Alexis Rodríguez S. simplemente por existir, ser como son y formar parte de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al ICML-UNAM, Unidad Académica Mazatlán por haberme permitido formar parte y desarrollarme dentro de su posgrado. Así como también a todo su personal quienes directa o indirectamente hicieron posible la realización de este trabajo.

Al CIAD Unidad Mazatlán por permitirme hacer uso de las instalaciones y Laboratorio de Ecotoxicología para el análisis de las muestras.

A la CODIMAR y CIBNOR por el invaluable apoyo al proporcionarme la cepa de *Cochlodinium polykrikoides* (CPPV-1) y capacitarme para su mantenimiento en el Laboratorio de Ecología de Fitoplancton.

Al ACUARIO MAZATLÁN por facilitar el uso de las instalaciones para el mantenimiento de los peces, cultivo del dinoflagelado y realización de los bioensayos.

A CONACYT y DGEP por el apoyo financiero para realizar mi maestría.

A la Dra. Rosalba Alonso Rodríguez por su asesoría, por compartir su experiencia profesional, su confianza, apoyo y ánimo para la realización de este trabajo.

A la Dra. Luz Ma. García de la Parra por su enseñanza, apoyo e instrucción durante el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Lourdes Morquecho Escamilla por hacer posible la aportación de la cepa de *Cochlodinium polykrikoides* (CPPV-1) y sus conocimientos en el mantenimiento de la misma. Por sus consejos y sugerencias tan acertadas para la mejora de la tesis.

Al Dr. Martín Frías Espericueta y al Dr. Domenico Voltolina L. por sus consejos, sugerencias y asesoría en mi trabajo.

Al MC. Eliézer Zúñiga G. por abrir las puertas del Acuario Mazatlán para desarrollar esta investigación.

A la Ing. Pesq. Elizabeth Frausto Sotelo por su invaluable, incondicional y entera colaboración desde el inicio y final de esta tesis. Por ayudar en el conteo de células, uso del microscopio, toma de

fotografías y disección de peces; gracias también por su compañerismo, amistad y buenos ratos de risas.

A la Biol. Ruth Rocha V. por facilitar el uso del Cuarto de Cultivo de Microalgas y Laboratorio de Alimento Vivo del Acuario Mazatlán. Por sus consejos, sugerencias y ánimo desde que conoció este ejercicio.

Al Sr. Jesús Noriega y buzos de Acuario Mazatlán por su colaboración en la captura de los pargos y facilitar el uso de equipo y alimento. Así como también al Biol. Pesq. Jesús Onésimo por su participación en la captura de los peces.

A la Dra. Ana Carolina Ruiz F. y al Dr. Carlos Green R. por su entera disposición para hacer uso de las instalaciones del Laboratorio de Geoquímica Isotópica y Geocronología y del Laboratorio de Geoquímica y Sedimentología, respectivamente.

Al Dr. Federico Páez O. por permitir el uso de las instalaciones y reactivos del Laboratorio de Geoquímica y Contaminación Costera.

Al Dr. Felipe Amezcua M. y equipo por facilitar el uso de la batería de tamices y equipo de disección del Laboratorio de Ictiología.

Al Mat. Germán Ramírez R. por su gran apoyo y asesoría en el tratamiento de datos, así como también al LSCA. Carlos Suárez G. y al Ing. Héctor Campos C. por hacer posible la interacción tutorial a través de las videoconferencias semestrales.

A la MC. María de los Ángeles Herrera por facilitar el uso de la autoclave y reactivos del Laboratorio de Genética.

Al MC. Daniel Benítez por su orientación en la identificación y ubicación del parche de árbol de Mezquite.

A la Lic. Herlinda Rojas V. por su disposición y apoyo en el uso del centro de cómputo para trámites burocráticos.

A la Sra. Clara Ramírez J. por su invaluable y eficaz cooperación en la obtención de bibliografía para el desarrollo de esta tesis.

Al LSCA. Pedro Allende R. por su entera disposición y orientación en el uso y ubicación de libros, sobretiros y revistas de la biblioteca.

A la Sra. Natalia Medina B. y Sra. Margarita Cordero R. por su colaboración y servicio en trámites burocráticos.

A la MC. Amada Reyes S. por compartir sus conocimientos y experiencia en el mantenimiento de la cepa de *C. polykrikoides*.

A la MC. Minerva Cerro Z. por sus consejos y *tips* para el escalamiento y cultivo del dinoflagelado.

Al Biol. Mar. Erick Núñez V. y a la Biol. Mar. Alejandra Heredia T. por su hospitalidad, sugerencias y consejos durante mi estancia en La Paz, B.C.S.

A la QFB. Carmen Bolán M. por tomarme la muestra de sangre, así como también a la MC. Noemí García A. por enseñarme a tomar muestra de sangre en peces, útiles para llevar a cabo el bioensayo hemolítico.

Al pBiol. Gamaliel Aztatzi A. por su colaboración en la medición de la actividad de la enzima catalasa.

A mis amigos y compañeros de maestría: Luis Fernando Vásquez B., Leonardo Camacho C., Eric Bautista G., Febe E. Vargas A., Korynthia López A. y Pablo Zamorano por estos dos años de buenos momentos, risas y ayuda desinteresada.

A mis también amigas y compañeras de maestría Beatriz A. Leal, Karen S. Luna R. y Karina Monzalvo S. por permitirme compartiles y aventarse al mundo de la natación, por estar todos los días a las 6:30 am en la alberca y hacer el entrenamiento sin quejarse. Gracias por los buenos y sinceros momentos de compañía.

Al Dr. Francisco J. Flores V. y familia por sus consejos y hospitalidad a mi llegada a Mazatlán.

A las familias Guerrero Ibarra y Gálvez Salinas por su apoyo, hospitalidad y brindarme un gentil calor de hogar.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. GENERALIDADES	
II. 1. <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	6
II. 2. <i>Lutjanus guttatus</i>	7
II. 3. Biomarcadores	8
II. 4. Estrés oxidativo	9
II. 5. Catalasa	10
II. 6. Peroxidación lipídica	11
II. 7. Hemólisis	11
III. ANTECEDENTES	12
IV. HIPÓTESIS	14
V. JUSTIFICACIÓN	14
VI. OBJETIVOS	15
VII. METODOLOGÍA	
VII. 1. Mantenimiento y escalamiento de <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	16
VII. 1. 1. Medio de cultivo	16
VII. 1. 2. Determinación de la tasa de crecimiento de <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	16
VII. 1. 3. Escalamiento y cultivo masivo del dinoflagelado	17
VII. 2. Captura de <i>Lutjanus guttatus</i>	18
VII. 3. Exposición aguda de <i>Lutjanus guttatus</i> a <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	19
VII. 3. 1. Índices biológicos	19
VII. 4. Análisis de muestras	21
VII. 4. 1. Preparación del homogenizado de hígado	21
VII. 4. 2. Enzima catalasa	21

VII. 4. 3. Peroxidación lipídica	22
VII. 4. 4. Cuantificación de polisacáridos	23
VII. 5. Hemólisis	23
VII. 5. 1. Extracto algal	23
VII. 5. 2. Obtención de eritrocitos	24
VII. 5. 3. Bioensayo hemolítico	25
VII. 6. Análisis de los datos	27
VIII. RESULTADOS	
VIII. 1. Crecimiento y escalamiento de <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	28
VIII. 2. Exposición de <i>Lutjanus guttatus</i> al dinoflagelado ic্তiotóxico <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	30
VIII. 2. 1. Índices biológicos	31
VIII. 2. 1. a. Factor de condición	31
VIII. 2. 1. b. Índice hepatosomático	33
VIII. 2. 2. Enzima catalasa	34
VIII. 2. 3. Peroxidación lipídica	35
VIII. 2. 4. Cuantificación de polisacáridos	36
VIII. 3. Bioensayo hemolítico	38
IX. DISCUSIÓN	
IX. 1. Crecimiento de <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	40
IX. 2. Efecto ic্তiotóxico de <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	41
IX. 2. 1. Índices biológicos	42
IX. 2. 2. Enzima catalasa	45
IX. 2. 3. Peroxidación lipídica	46
IX. 2. 4. Polisacáridos	47
IX. 2. 5. Hemólisis	48
X. CONCLUSIONES	50
XI. RECOMENDACIONES	52
XII. REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Cochlodinium polykrikoides</i> (CPPV-1). Observado en vivo con microscopio de luz (10X).	6
Figura 2. <i>Lutjanus guttatus</i> , pargo lunarejo o flamenco. Tomada en Acuario Mazatlán.	7
Figura 3. Producción de las especies reactivas de oxígeno a través de la reducción del oxígeno molecular. Se requieren cuatro electrones para la reducción completa de oxígeno molecular a agua durante la respiración aeróbica. La reducción por 1 electrón [A] produce el anión superóxido; el peróxido de hidrógeno es formado por la reducción directa de 2 electrones [B] o por otro electrón más siguiendo las reacciones [A] y [C]; el potente radical hidroxilo es generado por la reducción del peróxido de hidrógeno con 1 electrón [D]; finalmente la reducción del radical hidroxilo por 1 electrón produce agua [E] (Winston y Di Giulio, 1991).	9
Figura 4. Transformación de las especies reactivas de oxígeno por enzimas antioxidantes.	10
Figura 5. Fases del escalamiento del cultivo masivo de <i>C. polykrikoides</i> . Los números entre paréntesis indican el volumen de medio de cultivo utilizado en cada fase.	18
Figura 6. Técnica para la obtención de una muestra de sangre de peces anestesiados. Tomada de Strange (1996).	24
Figura 7. Células vivas de <i>Cochlodinium polykrikoides</i> . (i) Célula solitaria y (ii) cadena de dos células. (a) epicono cónico, (b) hipocono dividido en dos lóbulos, (c) cingulum excavado, (d) estigma rojo y (e) sulcus.	28
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>C. polykrikoides</i> . Fase exponencial: día 0 a 8; fase de crecimiento desacelerado: día 8 a 13; fase estacionaria: día 13 a 17; y fase de decaimiento o muerte: día 17 a 22.	29
Figura 9. Factor de condición de <i>L. guttatus</i> expuestos a cuatro concentraciones de <i>C. polykrikoides</i> . Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar.	31

- Figura 10. Relación entre la longitud y el peso de los peces utilizados para los bioensayos de exposición al dinoflagelado. La ecuación indica un ajuste potencial, donde W es el peso total y L la longitud total. 32
- Figura 11. Índice hepatosomático de *L. guttatus* expuestos a cuatro concentraciones de *C. polykrikoides*. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar y las letras indican diferencias significativas entre tratamientos. 33
- Figura 12. Actividad de la enzima catalasa en hígado de *L. guttatus* expuestos a cuatro concentraciones de *C. polykrikoides*. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar y las letras indican diferencias significativas entre tratamientos. 34
- Figura 13. Peroxidación lipídica en hígado de *L. guttatus* expuestos a cuatro concentraciones de *C. polykrikoides*. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar y las letras indican diferencias significativas entre tratamientos. 35
- Figura 14. Concentración de polisacáridos en branquias de *L. guttatus* expuestos a cuatro concentraciones de *C. polykrikoides*. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar y las letras indican diferencias significativas entre tratamientos. 36
- Figura 15. Curva estándar de referencia de hemólisis provocada por la saponina en eritrocitos de *L. guttatus* (a y b) y de humanos (c). Los puntos indican las absorbancias leídas y las líneas sólidas representan el ajuste logístico obtenido para cada curva. Se incluye la ecuación del ajuste para cada caso. SE es la concentración de saponina a la que equivale cada absorbancia leída (A_{SE}). 39

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Principales efectos o daños que ocasionan las microalgas nocivas en la fauna marina.	4
Tabla II. Matriz de correlación entre la concentración de dinoflagelados (cel L^{-1}), índice hepatosomático, actividad de la enzima catalasa en hígado y concentración de polisacáridos en branquias de los pargos. Se señala el coeficiente de correlación y el valor de p entre paréntesis ($p < 0,05$ indica una correlación significativa).	37

RESUMEN

El efecto ictiotóxico del dinoflagelado *Cochlodinium polykrikoides* fue medido en el pargo *Lutjanus guttatus* a través de la estimación de diferentes biomarcadores. Se determinó la tasa de crecimiento del dinoflagelado y se llevó a cabo un cultivo masivo del mismo, hasta lograr concentraciones de 1, 2, 3 y 4 x 10⁶ cel L⁻¹ para los bioensayos de exposición. Una vez que se llevaron a cabo los bioensayos de 24 horas se evaluaron el factor de condición y el índice hepatosomático, los cuales reflejan la condición de salud de los peces. Se midió la actividad de la enzima antioxidante catalasa y la ocurrencia de peroxidación lipídica en el hígado de los pargos. Además, se cuantificó la concentración de polisacáridos en las branquias de los peces y, se midió la actividad hemolítica del extracto metanólico del dinoflagelado en eritrocitos humanos y de pargos. *C. polykrikoides* presentó una tasa de crecimiento de 0.39 divisiones día⁻¹ y mostró cuatro fases de crecimiento: exponencial, crecimiento desacelerado, estacionaria y de muerte. El factor de condición no reflejó ninguna alteración en el estado de salud de los pargos, ya que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, por lo tanto este índice no resultó útil por la corta duración de los bioensayos (24 horas). De este modo, se obtuvo un factor de condición promedio de 1.606. El índice hepatosomático disminuyó de 1.426 a 0.609, en el grupo control (sin dinoflagelado) y en los peces expuestos al dinoflagelado a una concentración de 4 x 10⁶ cel L⁻¹, respectivamente. La catalasa mostró una inhibición a partir de la exposición de los peces a 2 x 10⁶ cel L⁻¹ del dinoflagelado; la actividad enzimática de los pargos del grupo control fue de 69.46 µmol min⁻¹ mg prot⁻¹ y ésta disminuyó significativamente hasta 20.52 µmol min⁻¹ mg prot⁻¹ al exponer a los pargos a la mayor concentración del dinoflagelado. La peroxidación lipídica en el hígado de los pargos fue mínima (0.88 a 1.82 µmoles malondialdehído (MDA) g peso húmedo⁻¹) en las menores concentraciones del dinoflagelado, pero aumentó significativamente a 18.662 µmoles MDA g peso húmedo⁻¹ en los peces expuestos a una concentración mayor del dinoflagelado. Las branquias de los peces presentaron una mayor concentración de polisacáridos al incrementarse la concentración de *C. polykrikoides*; aumentando de 46.81 a 73.63 µg sacarosa mL⁻¹ para el grupo control y la mayor concentración del dinoflagelado, respectivamente. Otro efecto tóxico del dinoflagelado fue la actividad hemolítica, y la concentración a la cual el dinoflagelado provocó hemólisis al 50% (HE₅₀) en eritrocitos humanos y de pargos fue de 5.27 x 10⁶ y 4.88 x 10⁶ cel L⁻¹, respectivamente. El efecto tóxico de *C. polykrikoides* en *L. guttatus* aumentó con la concentración del dinoflagelado; se ha encontrado que las cualidades tóxicas del dinoflagelado son debidas a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, y a la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el mismo.

ABSTRACT

The ichthyotoxic effect of the harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* was measured in the snapper *Lutjanus guttatus* by the quantification of several biomarkers. The growth of the dinoflagellate was studied as a first step and then it was grown in mass culture in order to obtain the concentrations for the bioassays, which were 1, 2, 3 and 4 x 10⁶ cells L⁻¹. Once the 24 hours bioassays were carried out, the fish condition was evaluated calculating the condition factor and the hepatosomatic index; catalase activity and lipid peroxidation were examined in fish liver. Polysaccharide concentrations were measured in gill mucus, finally the hemolytic activity of the methanol extract of the dinoflagellate was analyzed in human and fish erythrocytes. *C. polykrikoides* exhibited a growth rate of 0.39 divisions day⁻¹ and showed four growth phases: exponential, decreased growth, stationary and death. Condition factor did not show any change in the snappers' health, because there weren't significative differences among treatments, so condition factor wasn't useful because of the acute exposition (24 hours) of the fishes to the dinoflagellate. The average condition factor of the snappers was 1.606. The hepatosomatic index decreased from 1.426 to 0.609 for the control group (without dinoflagellate) and the highest dinoflagellate concentration (4 x 10⁶ cells L⁻¹), respectively. Catalase activity was inhibited when the fish was challenged with $\geq 2 \times 10^6$ cells L⁻¹ of *C. polykrikoides*; catalase activity of the control group was 69.46 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ and decreased significantly to 20.52 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ when fishes were exposed to a concentration of 4 x 10⁶ cells L⁻¹. Lipid peroxidation was low (0.88 a 1.82 $\mu\text{mol MDA g wet weight}^{-1}$) in those treatments with the lowest dinoflagellate concentration, but it increased remarkably to 18.662 $\mu\text{mol MDA g wet weight}^{-1}$ when exposed to dinoflagellate of 4 x 10⁶ cells L⁻¹. In the other hand, polysaccharide concentration in fish gills increased with *C. polykrikoides* concentration, increasing from 46.81 to 73.63 $\mu\text{g sucrose mL}^{-1}$ for control and the highest dinoflagellate concentration, respectively. The other toxic effect measured in this investigation was the hemolytic activity, the dinoflagellate caused 50% of hemolysis (HE₅₀) at concentrations of 5.27 x 10⁶ y 4.88 x 10⁶ cells L⁻¹, for human and fish erythrocytes, respectively. The ichthyotoxic effect of *C. polykrikoides* in *L. guttatus* increased with the concentration of the dinoflagellate; it has been found that the toxic properties of this species are due to the presence of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and the production of reactive oxygen species (ROS) by this dinoflagellate.

I. INTRODUCCIÓN

El fitoplancton es la base de la red trófica en el ambiente marino, comprende aproximadamente 5000 especies (Sournia *et al.*, 1991; en Hallegraeff, 2003) y está presente en múltiples hábitats; alrededor de 300 especies son formadoras de mareas rojas¹ (Hallegraeff, 2003), incluyendo diatomeas, dinoflagelados, haptofitas y rafidofitas, y de éstas 98 especies son nocivas o tóxicas, siendo los dinoflagelados la clase predominante (<http://ioc.unesco.org/hab/data.htm>).

Las Proliferaciones Algales Nocivas (PANs) pueden producir gran variedad de compuestos bioactivos tóxicos o nocivos, frecuentemente llamados biotoxinas, los cuales pueden afectar a otros organismos a través de la cadena alimenticia (Wright y Cembella, 1998). La producción de toxinas en dinoflagelados marinos está influenciada por la temperatura, salinidad, pH, luz, nitrógeno, fósforo y fase de crecimiento (Steidinger, 1993). Las microalgas tóxicas pueden producir tanto endotoxinas como exotoxinas, las primeras permanecen dentro de la célula, mientras que las segundas son liberadas al medio, generalmente con propiedades ictiotóxicas (provocan efectos letales y subletales en peces y otros organismos) (Reguera, 2002; Landsberg, 2002). Al menos 60 especies de fitoplancton producen toxicidad en peces, y se considera que 30 más son nocivas ya que han provocando mortandades de peces por disminuir la concentración de oxígeno y la calidad del agua, o bien, por dañar a los peces mecánicamente por las estructuras que poseen las microalgas (Landsberg, 2002).

Según el modo de acción, algunas toxinas o sustancias producidas por las microalgas pueden afectar a organismos vertebrados e invertebrados, mientras que otras sólo pueden influir sobre ciertos grupos; como es el caso de algunas rafidofitas del género *Chattonella*, que producen las especies reactivas de oxígeno (ROS) y que afectan principalmente a peces. En algunos casos, durante un largo período de exposición, los organismos pueden acumular toxinas hasta que exceden las concentraciones tolerables, resultando en efectos adversos crónicos, como crecimiento lento, reproducción retardada y alteración en su comportamiento, entre otros. Otras afecciones se desarrollan con el simple contacto directo con las microalgas, a través de la exposición a las toxinas presentes en la superficie celular. Los factores que determinan la velocidad de acumulación de las toxinas en los organismos, así como también la tolerancia a

¹ Marea roja.- incremento en la abundancia numérica de algún microorganismo fitoplanctónico pudiendo estar asociado a una discoloración del agua (Suárez y Guzmán, 1998). Recientemente se emplea el término de Proliferaciones Algales Nocivas para referirse a este fenómeno.

nivel fisiológico de las especies afectadas está dada por la solubilidad (hidro o liposolubilidad), estabilidad y cinética de las mismas (Landsberg, 2002).

Durante un período de crecimiento activo o de una reproducción acelerada, algunas microalgas producen exudados tóxicos y otros organismos pueden ser afectados aún sin tener contacto con la microalga tóxica (Landsberg, 2002). Tal es el caso de la primnesiofita *Prymnesium parvum* que produce exotoxinas potentes con cualidades ictiotóxicas, hemolíticas, neurotóxicas y hepatotóxicas (Granéli y Johansson, 2003). Las endotoxinas se transfieren a través de la trama alimenticia y pueden llegar a afectar diferentes niveles tróficos y biocumularse en ciertos tejidos (Landsberg, 2002). Por esto, los bivalvos son ampliamente utilizados para el biomonitoreo de aguas marinas, debido a su capacidad de bioacumulación, abundancia y amplia distribución (Frías-Espericueta *et al.*, 1999; 2005). El consumo de moluscos contaminados por biotoxinas, puede ocasionar diferentes envenenamientos en humanos (diarreicos, neurotóxicos, paralizantes, amnésicos y ciguatera) y que han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, las ictiotoxinas aún no son del todo conocidas, particularmente los efectos metabólicos del envenenamiento y la tolerancia a las toxinas (Tabla I). Hasta ahora, se ha logrado conocer algunos de los efectos que ocasionan las microalgas nocivas en la fauna (Bruslé, 1995).

Tabla I. Principales efectos o daños que ocasionan las microalgas nocivas en la fauna marina.

Efecto o daño	Ejemplos de especies causantes	Referencias
<p>Disminución de O₂</p> <p>Tasas altas de respiración nocturna provocada por las PANs y la degradación de los florecimientos senescentes, favorecen el desarrollo de condiciones hipóxicas o anóxicas.</p>	<p><i>Gonyaulax polygramma</i> <i>Noctiluca scintillans</i> <i>Scrippsiella trochoidea</i> <i>Trichodesmium erythraeum</i></p>	<p>Hallegraeff (1993)</p>
<p>Daños mecánicos</p> <p>Las estructuras anatómicas de las microalgas dañan u obstruyen las branquias de los peces, estimulando la producción de mucus que puede ocasionar asfixia.</p>	<p><i>Chaetoceros</i> sp.</p>	<p>Treasurer <i>et al.</i> (2003)</p>
<p>Ictiotoxicidad</p> <p>La producción de sustancias hemolíticas, neurotóxicas y las especies reactivas de oxígeno dañan las membranas celulares, estimulando la producción de mucus en branquias, afectando la actividad enzimática.</p>	<p><i>Chattonella marina</i> <i>Prymnesium parvum</i> <i>Chrysochromulina polylepis</i> <i>Gyrodinium aureolum</i> <i>Alexandrium taylori</i> <i>Karenia</i> sp.</p>	<p>Marshall <i>et al.</i> (2003) Kobayashi (1989) Hagström y Granéli (2005) Simonsen y Moestrup (1997) Yasumoto <i>et al.</i> (1990) Emura <i>et al.</i> (2004) Neely y Campbell (2005)</p>

Cochlodinium polykrikoides (Margalef, 1961) ocasiona mortandades de peces, es decir, presenta propiedades ictiotóxicas (Kim *et al.*, 2000). Este dinoflagelado frecuentemente produce mareas rojas en Japón y Corea, causando problemas serios en la piscicultura (Onoue y Nozawa, 1989).

C. polykrikoides produce sustancias ictiotóxicas con tres propiedades: neurotóxicas, hemolíticas y hemoaglutinantes (Onoue y Nozawa, 1989; Lee, 1996). También produce el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que al reaccionar en presencia de hierro y cobre, producen el radical hidroxilo ($OH\bullet$), que es aún más tóxico. Éstas son las denominadas especies de oxígeno reactivas (ROS) y son responsables de daños oxidativos, como es la peroxidación lipídica, que ha sido asociada al aumento de la permeabilidad de solutos en las membranas vesiculares, que controlan la hinchazón y la lisis celular, provocando edema en las branquias (Kim *et al.*, 1999); además de estimular la secreción de mucus que provoca el taponamiento de las branquias y muerte por asfixia (LaMont, 1989; en Kim *et al.*, 1999).

Las ROS también inducen la pérdida de la integridad funcional y estructural de las membranas celulares en branquias, lo que reduce la capacidad de transferencia de oxígeno (Kim *et al.*, 1999) y de ciertos iones, afectando la actividad de enzimas transportadoras como la anhidrasa carbónica y la Na^+/K^+ -ATPasa (Kim *et al.*, 2000). Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) funcionan como biomarcadores para medir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Ambas enzimas trabajan juntas como mecanismo de inactivación del radical O_2^- y del H_2O_2 , previendo la formación de $OH\bullet$ y $O_2\bullet$ y un consecuente daño celular (Matta, 1995).

Este trabajo tiene como objetivo conocer el efecto ictiotóxico de una cepa de *C. polykrikoides* aislada de Bahía de La Paz, B.C.S. y que desarrolló una marea roja nociva en septiembre del 2000 (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2000). Mediante la aplicación de diferentes pruebas biológicas, se describirá el efecto que ocasiona el dinoflagelado tóxico en peces pertenecientes a un especie de importancia comercial, el pargo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869).

II. GENERALIDADES

II. 1. *Cochlodinium polykrikoides*

Cochlodinium polykrikoides es un dinoflagelado atecado o desnudo, fotosintético con cloroplastos de color amarillo-verdoso a café (Fig. 1). El núcleo está ubicado en la zona anterior del epiceno, y en posición dorsal a éste se presenta un estigma rojo. Su sinónimo es *C. heterlobatum* Silva (1967) y *Cochlodinium* tipo '78 Yatsushiro (Fukuyo *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 2003).

C. polykrikoides es cosmopolita y se distribuye a lo largo de regiones templadas y tropicales (Steidinger y Tangen, 1997). Fue reportado por primera vez en las costas de Puerto Rico (Margalef, 1961; en Faust y Gullede, 2002), también ha sido reportado como formador de mareas rojas en el Atlántico Norte a lo largo de la costa Este de Estados Unidos, Japón y Corea; en el Pacífico mexicano se ha registrado en Manzanillo, Colima y en Bahía de La Paz, B.C.S. (Silva, 1967; en Faust y Gullede, 2002; Onoue y Nozawa, 1989; Kim, 1998; Morales-Blake y Hernández-Becerril, 2000; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2000; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2003).

Esta especie ha mostrado efectos tóxicos en peces, pero la composición y caracterización de las sustancias activas aún no son del todo conocidas (Taylor *et al.*, 2003). Ha ocasionado mortandades masivas de peces de importancia comercial que han resultado en grandes pérdidas económicas.



Figura 1. *Cochlodinium polykrikoides* (CPPV-1).
Observado en vivo con microscopio de luz (10X).

II. 2. *Lutjanus guttatus*

El pargo *Lutjanus guttatus* es conocido comúnmente como pargo lunarejo o pez flamenco (Fig. 2). Los pargos pertenecen a los grupos de alto interés comercial y son un recurso muy importante entre las pesquerías ribereñas de las costas del Pacífico, desde Chiapas hasta la boca del Golfo de California. Las especies *Lutjanus guttatus* y *L. peru* son las de mayor valor comercial y son destinadas al consumo humano (Madrid-Vera, 1990; Saucedo-Lozano, 2000).

La captura de los pargos aumenta en la época de lluvias, durante los desoves. En esta época se desplaza de zonas profundas a la desembocadura de ríos, en donde las condiciones ambientales son variables y la temperatura del agua oscila entre los 24 y 30°C. Otra época de alta abundancia es a finales del invierno y principios de la primavera, periodos en que se lleva a cabo el reclutamiento. Los lutjánidos son carnívoros con un espectro trófico amplio que incluye a crustáceos, peces y moluscos (Madrid-Vera, 1990). Se ha encontrado que su mayor tasa de crecimiento ocurre en el intervalo de temperatura de 21.5 a 26°C. No hay diferencias significativas en el crecimiento entre sexos en los pargos lunarejos, y se ha encontrado que en la Bahía de Mazatlán alcanzan una longitud máxima de 85.81 cm (Soto-Ávila, 2004).



Figura 2. *Lutjanus guttatus*, pargo lunarejo o flamenco.
Tomada en Acuario Mazatlán.

II. 3. Biomarcadores

Un biomarcador es una respuesta celular o bioquímica que puede ser expresada cuantitativamente como resultado de la exposición a un xenobiótico, y puede ser usado en un bioensayo por la presencia y efectos de contaminantes (Widdows, 1994) o sustancias que provoquen daños en los seres vivos. De acuerdo a la *National Research Council* (1987), los biomarcadores han sido clasificados en tres tipos (en Schlenk, 1999):

- 1) De exposición. Estiman la dosis interna o biodisponibilidad de un xenobiótico (o sus metabolitos) en un organismo. Los experimentos en laboratorio para examinar los biomarcadores de exposición generalmente manejan un intervalo de concentraciones del xenobiótico a las cuales se exponen los organismos para establecer una relación de dosis-respuesta, tomando en cuenta que el biomarcador analizado es altamente sensible y específico para el xenobiótico empleado (Schlenk, 1999).
- 2) De efecto. Se asume que los efectos adversos o daños provocados a una comunidad o a un ecosistema entero, se manifiestan desde niveles inferiores (molecular o celular) en donde las defensas fueron abatidas y se presentó un daño histológico o fisiológico, el cual no es necesariamente irreversible, pero si esto ocurre se afecta el desarrollo, reproducción y/o sobrevivencia del organismo afectando la dinámica poblacional o del ecosistema. Los biomarcadores de efecto pretenden predecir los aspectos cualitativos que pueden presentarse en los niveles superiores a partir de la identificación de daños provocados a nivel molecular o celular, conociendo los probables mecanismos de acción del xenobiótico. En estos biomarcadores ocurre una alteración funcional y/o estructural del organismo, y se refleja a través de un daño o enfermedad (Schlenk, 1999).
- 3) De susceptibilidad. Son indicadores de los procesos, adaptaciones o diferencias interindividuales que pueden desarrollar los organismos expuestos e ir cambiando a través de las distintas fases de los daños provocados en ellos, desde la exposición al xenobiótico hasta los posibles daños o enfermedades provocadas por el mismo y que hace que un individuo sea más susceptible o responda de manera diferente con un mayor riesgo para su salud. Este tipo de biomarcadores pretenden identificar, clasificar y finalmente cuantificar la susceptibilidad de los organismos y poblaciones a los xenobióticos, a través de la exposición y efectos provocados por éstos (Schlenk, 1999; Pastor-Benito, 2002).

II. 4. Estrés oxidativo

La vida aeróbica es dependiente de una transferencia directa de electrones a través de una serie de moléculas especialmente adaptadas al O_2 como parte de los procesos de producción de energía. El oxígeno molecular (O_2) requiere de cuatro electrones para que se reduzca completamente a agua. Debido a que esta reducción ocurre en secuencia, uno, dos y tres electrones son los intermediarios posibles, produciendo de esta forma las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fig. 3), las cuales tienen un papel importante en la carcinogénesis y también funcionan como intermediarios citotóxicos. Es por esto que es importante conocer la generación de estos radicales libres y el consecuente estrés oxidativo en los sistemas biológicos (Zelikoff *et al.*, 1996).

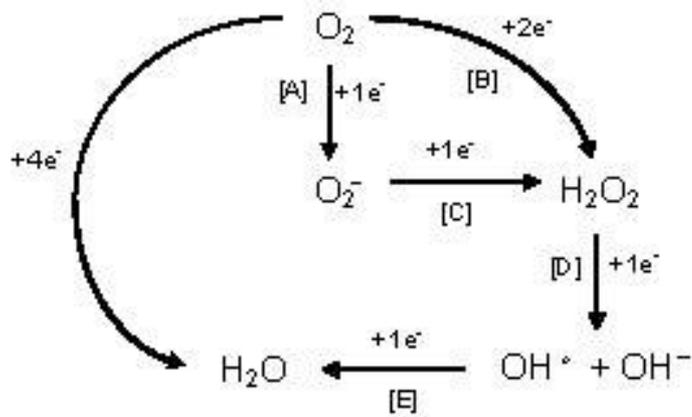


Figura 3. Producción de las especies reactivas de oxígeno a través de la reducción del oxígeno molecular. Se requieren cuatro electrones para la reducción completa de oxígeno molecular a agua durante la respiración aeróbica. La reducción por 1 electrón [A] produce el anión superóxido; el peróxido de hidrógeno es formado por la reducción directa de 2 electrones [B] o por otro electrón más siguiendo las reacciones [A] y [C]; el potente radical hidroxilo es generado por la reducción del peróxido de hidrógeno con 1 electrón [D]; finalmente la reducción del radical hidroxilo por 1 electrón produce agua [E] (Winston y Di Giulio, 1991).

Las ROS normalmente existen en todas las células aeróbicas en equilibrio con los antioxidantes bioquímicos, sin embargo, cuando este equilibrio se rompe ocurre un estrés oxidativo como consecuencia de un exceso de las ROS, una disminución de antioxidantes o la combinación de ambos casos (Scandalios, 2002). *Cochlodinium polykrikoides* produce las ROS (Kim *et al.*, 1999), y pueden ocasionar estrés oxidativo en peces.

El daño oxidativo que puedan provocar las ROS depende de la eficiencia de las defensas antioxidantes que tengan los organismos (Diguiseppi y Fridovich, 1984; en Winston y Di Giulio, 1991). Éstas son utilizadas como biomarcadores en los organismos, las cuales a través de su cuantificación pueden reflejar el grado de estrés oxidativo; de esta forma, las defensas antioxidantes de los organismos pueden ser divididas en: a) antioxidantes enzimáticos, entre los que se incluyen la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, y b) antioxidantes no enzimáticos, como las vitaminas C y E, glutatión y urato (De Zwart *et al.*, 1999).

Los biomarcadores que se evaluaron en esta investigación fueron: a) De exposición, con la determinación de la peroxidación lipídica y la cuantificación de la actividad de la enzima catalasa en el hígado de los pargos; y b) De efecto, contemplando la cuantificación de polisacáridos en branquias y el efecto hemolítico provocado por los dinoflagelados en eritrocitos.

II. 5. Catalasa

La catalasa es una enzima antioxidante que se localiza en los peroxisomas citoplasmáticos, y se encarga de catalizar directamente la descomposición de H_2O_2 , de modo que protege contra los daños citotóxicos que éste puede provocar. La primer fase de la defensa antioxidante está comprendida por la enzima superóxido dismutasa (SOD), ya que cataliza la transformación del anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual puede ser transformado a su vez por la catalasa (CAT) o glutatión peroxidasa (GPx) en agua y oxígeno o en agua, respectivamente (Fig. 4). La técnica para la cuantificación de esta enzima se basa en la habilidad de la misma para metabolizar el H_2O_2 a O_2 y agua. La disminución de la absorbancia en función del tiempo se traduce a la actividad enzimática (Zelikoff *et al.*, 1996).

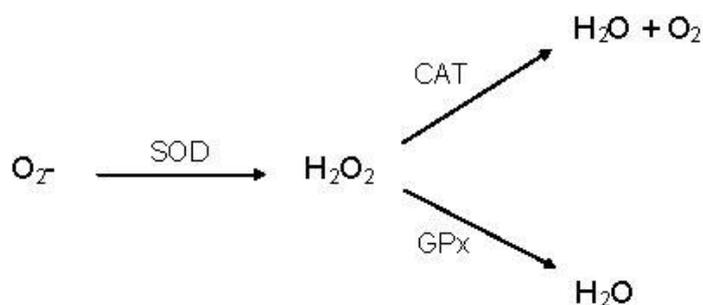


Figura 4. Transformación de las especies reactivas de oxígeno por enzimas antioxidantes.

II. 6. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es una reacción en cadena que ocurre en la mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que éstos son muy sensibles a la oxidación por las ROS debido a la presencia de las dobles ligaduras. La peroxidación lipídica inicia al reaccionar el lípido poliinsaturado (LH) con el radical hidroxilo (OH•) (Valavanidis *et al.*, 2006):

- (1) $LH + OH\bullet \rightarrow L\bullet \text{ (radical lipídico)} + H_2O$
- (2) $L\bullet + O_2 \rightarrow LOO\bullet \text{ (radical peroxil lipídico)}$
- (3) $LH + LOO\bullet \rightarrow L\bullet + LOOH \text{ (hidroperóxido lipídico)}$

Las últimas reacciones de la peroxidación lipídica son el resultado de la interacción de radicales lipídicos y/o formación de especies no-radicales a partir de radicales peroxil lipídicos (Valavanidis *et al.*, 2006). El hidroperóxido lipídico (LOOH) puede ser descompuesto fácilmente a varias especies reactivas, entre las que se incluyen los radicales alcoxil lipídicos (LO•), aldehídos, alcanos, epóxidos lipídicos, y alcoholes; la mayoría de estos productos son tóxicos y provocan daños en los organismos. Algunos de estos productos primarios y secundarios son utilizados como biomarcadores del estrés oxidativo (De Zwart *et al.*, 1999).

II. 7. Hemólisis

La hemólisis ha sido utilizada generalmente como parte del conjunto de pruebas útiles para la detección y cuantificación de sustancias tóxicas, ya que en algunos casos la actividad hemolítica es parte del mecanismo de toxicidad. Esto ha sido observado en sustancias ictiotóxicas producidas por diferentes especies de microalgas (Simonsen y Moestrup, 1997; Deeds *et al.*, 2002; Emura *et al.*, 2004; Neely y Campbell, 2005), sin embargo, la naturaleza química de algunas de estas sustancias aún no es conocida (Eschbach *et al.*, 2001) aunque se asume que esta actividad es provocada por ácidos grasos poliinsaturados (Yasumoto *et al.*, 1990; Lee, 1996) y por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Chiu *et al.*, 1982; en Santamaría *et al.*, 2002).

III. ANTECEDENTES

Onoue y Nozawa (1989) observaron que los pargos japoneses al ser expuestos a un 0.02% de la fracción neurotóxica de *Cochlodinium* tipo '78, mostraron un efecto anestésico, cambio de color, dificultad para respirar, muerte entre los 8 y 10 minutos y edema branquial en un 40%. Al ser expuestos al 0.02% de la fracción hemolítica, los peces presentaron convulsiones violentas, pérdida en el balance, dificultad para respirar, edema, hemorragias y una producción excesiva de mucus en branquias, muriendo entre los 20 y 30 min. La HD_{50} fue de 0.5 HU mg^{-1} (HU=unidad hemolítica) en eritrocitos de borrego.

Matta (1995) encontró que cuando se les inyecta a ratones extracto del dinoflagelado tóxico *Ostreopsis lenticularis*, se presenta un aumento significativo en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, debido al incremento intracelular del anión superóxido y peróxido de hidrógeno producidos por el dinoflagelado bajo condiciones de cultivo hiperóxicas.

Lee (1996) identificó ácidos grasos poliinsaturados como agentes hemolíticos en *C. polykrikoides* siendo éstos el ácido docosahexaenoico (C22:6n3) y el ácido eicosapentaenoico (C20:5n3), los cuales representaron un 23.5 y 15.3%, respectivamente, del total de los ácidos grasos poliinsaturados.

C. polykrikoides provocó mortandades masivas de peces y bivalvos en Corea en 1995, sufriendo pérdidas de hasta US \$95.5 millones (Kim, 1998). Durante 1999 en la costa oeste de Canadá, se registró por primera vez un florecimiento producido por *Cochlodinium* sp. provocando mortandad de salmón cultivado y una pérdida de CAN \$2 millones (Whyte *et al.*, 2001).

Kim *et al.* (2000) encontraron que los peces expuestos a concentraciones mayores a $5 \times 10^6 \text{ cel L}^{-1}$ de *C. polykrikoides*, presentan una disminución significativa en la actividad de las enzimas anhidrasa carbónica y Na^+/K^+ -ATPasa, además de una secreción anormal de mucus en las branquias, y una disminución en el pH y presión parcial de O_2 en la sangre, pudiendo ser estas las principales causas que provocan la muerte en los peces.

Gárate-Lizárraga *et al.* (2000, 2003) registran proliferaciones masivas de *C. polykrikoides* en La Ensenada de La Paz, Golfo de California, que ocasionaron la muerte de peces. No encontraron toxinas de tipo paralizantes o PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) en las muestras de fitoplancton, pero sí observaron daño en las branquias de los peces muertos.

Cortés-Lara *et al.* (2004) registraron la presencia del dinoflagelado ictiotóxico *Cochlodinium catenatum* en Bahía de Banderas durante el 2000, que ocasionó una mortandad masiva de peces. Los peces murieron por sofocación, debido a la obstrucción de branquias por los dinoflagelados y a una producción excesiva de mucus.

De acuerdo a las observaciones de Alonso-Rodríguez, una importante mortalidad de peces y pulpos ocurrió durante una marea roja en la bahía de Mazatlán en el 2000, dominada por el dinoflagelado *Cochlodinium polykrikoides* (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2004).

IV. HIPÓTESIS

Si el dinoflagelado *Cochlodinium polykrikoides* posee propiedades ictiotóxicas podría afectar al pargo *Lutjanus guttatus* alterando sus funciones biológicas, como consecuencia del estrés oxidativo el cual puede ser evaluado a través de la medición de la lipoperoxidación y la actividad de enzimas antioxidantes como la catalasa. Los peces también podrían ser afectados en su condición biológica, al ocurrir hemólisis y producción de polisacáridos en las branquias. Los daños tóxicos producidos por el dinoflagelado en los peces aumentarán en función de la densidad celular.

V. JUSTIFICACIÓN

Las proliferaciones algales nocivas se están volviendo más frecuentes y peligrosas alrededor del mundo, y como consecuencia muchos organismos marinos están siendo afectados, como es el caso de moluscos bivalvos, peces, aves y mamíferos (Sierra-Beltrán *et al.*, 1997; Shumway *et al.*, 2003). En algunos casos ocurren mortandades masivas o una alteración en la red trófica marina. De este modo, se crean problemas económicos por pérdidas de organismos cultivables o capturados, así como de estética, puesto que las mortandades masivas de peces afectan las playas, llegando a crear malos olores y una imagen inapropiada. El hombre no está exento de la influencia de las PANs, y puede ser afectado por exposición directa, provocándole irritación en la piel y ojos al nadar durante una marea roja, o bien, padecer problemas respiratorios por las toxinas contenidas en la brisa marina. Las personas también pueden verse seriamente afectadas al consumir bivalvos o peces contaminados con biotoxinas, provocando problemas serios de salud, que en algunos casos pueden ser fatales.

VI. OBJETIVOS

VI. 1. General

Evaluar el efecto ictiotóxico del dinoflagelado *Cochlodinium polykrikoides* en el pargo *Lutjanus guttatus* mediante la medición de respuestas biológicas.

VI. 2. Particulares

- * Determinar la tasa de crecimiento del dinoflagelado *C. polykrikoides* (CPPV-1), cepa utilizada en este trabajo.
- * Desarrollar un cultivo masivo de *C. polykrikoides*.
- * Evaluar la condición de salud de los peces, por medio de índices biológicos, después de la exposición a *C. polykrikoides*.
- * Determinar, a partir de la medición de la actividad de la enzima catalasa hepática de *L. guttatus*, la presencia de especies reactivas de oxígeno al exponer a los pargos a diferentes concentraciones de células vivas de *C. polykrikoides*.
- * Determinar la peroxidación lipídica en el hígado de *L. guttatus* al ser expuesto a células vivas de *C. polykrikoides*.
- * Determinar el aumento de la secreción de mucus en las branquias de *L. guttatus* a partir de la cuantificación de polisacáridos.
- * Medir la actividad hemolítica de *C. polykrikoides* en eritrocitos humanos y de *L. guttatus*

VII. METODOLOGÍA

VII. 1. Mantenimiento y escalamiento de *Cochlodinium polykrikoides*

La cepa de *Cochlodinium polykrikoides* (CPPV-1) con la que se trabajó en esta tesis se adquirió a través de la Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR)² del CIBNOR, S.C. La cepa fue aislada en el año 2000 en la Bahía de la Paz, B.C.S. (24° 08' 6.7" N y 110° 25' 25.7" O) por Lourdes Morquecho Escamilla.

VII. 1. 1. Medio de cultivo

El medio utilizado para el cultivo de los dinoflagelados fue el GSe (Doblin *et al.*, 1999). Este medio se preparó con agua de mar cuya salinidad inicial fue de 36‰ pero fue ajustada a 34‰ con agua Milli-Q (Kim *et al.*, 2004), stock de nutrientes a una concentración de 20 mL L⁻¹ y extracto de suelo de mezquite *Prosopis* sp. (5 mL L⁻¹). El agua de mar se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb pulg⁻² durante 20 minutos. El suelo de Mezquite se obtuvo en el poblado de "El Walamo" a 25 km al sur de Mazatlán, Sinaloa. La preparación del medio de cultivo se realizó bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar.

VII. 1. 2. Determinación de la tasa de crecimiento de *Cochlodinium polykrikoides*

Se inocularon tres matraces de 250 mL con 90 mL de medio GSe recién preparado y 10 mL de un cultivo de *C. polykrikoides* que se encontraba en la fase exponencial tardía (día 9). La concentración inicial fue de 6.8×10^5 cel L⁻¹. Los matraces se agitaron antes de tomar la sub-muestra para asegurar una distribución homogénea de las células. Se tomaron por triplicado 3 sub-muestras (1 mL) diariamente en tubos de ensaye y se fijaron con lugol para realizar el recuento celular con una cámara Sedgwick-Rafter y microscopio de luz (10X). Los cultivos se mantuvieron sin aireación, a temperatura controlada de 25 °C y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, de acuerdo a Kim *et al.* (2004). La iluminación se realizó con lámparas de luz blanca de 75 watts.

² <http://www.cibnor.mx/colecciones/codimar/ecodimar.php>

La tasa y curva de crecimiento se determinó mediante la ecuación propuesta por Guillard (1973):

$$\mu = \frac{\log_2(N_2/N_1)}{t_2 - t_1}$$

donde:

μ = Tasa de crecimiento (divisiones día⁻¹)

N_1 = Concentración de células en el tiempo t_1

N_2 = Concentración de células en el tiempo t_2

VII. 1. 3. Escalamiento y cultivo masivo de *Cochlodinium polykrikoides*

La cepa inicialmente se inoculó en recipientes de cultivo desechables estériles de 50 mL. Una vez que se obtuvo un inóculo denso, el contenido de dos recipientes fue transferido a un matraz de 125 mL, y se le agregó un volumen equivalente de medio de cultivo, dejando dos tercios del volumen del matraz con aire. Cuando se observó el medio colorido éste se transfirió a un matraz de 250 mL y se agregó medio nuevo, siguiendo la proporción 50-50% y dos tercios de volumen con aire. Una vez que se conoció la curva de crecimiento del dinoflagelado, el escalamiento se llevó a cabo cada 9 días (fase exponencial), cuando la concentración era de aproximadamente 6.7×10^6 cel L⁻¹ (Fig. 5). El escalamiento se mantuvo hasta lograr los volúmenes suficientes para los bioensayos.

La concentración celular de los cultivos de *C. polykrikoides* fue estimada a través de recuentos con submuestras de 1 mL, en microscopio de luz con cámara Sedgwick-Rafter. La manipulación de los dinoflagelados también se realizó bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar. Los cultivos se mantuvieron en el cuarto de cultivo del Acuario de Mazatlán, bajo las condiciones descritas anteriormente.

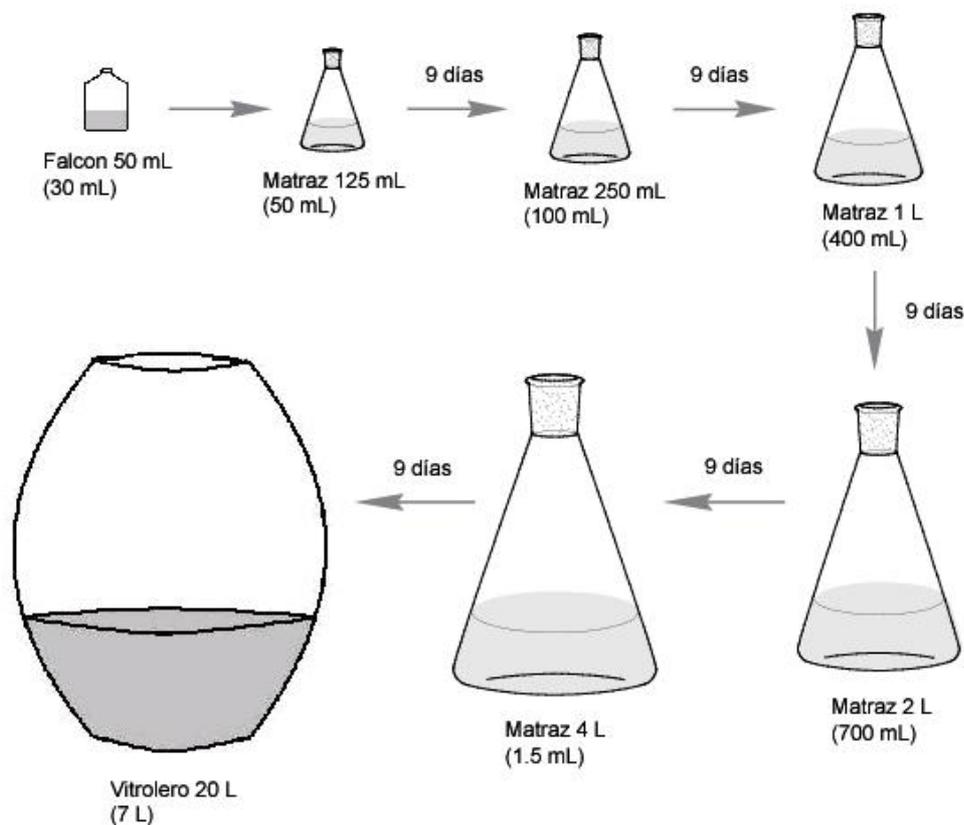


Figura 5. Fases del escalamiento del cultivo masivo de *C. polykrikoides*. Los números entre paréntesis indican el volumen de medio de cultivo utilizado en cada fase.

VII. 2. Captura de *Lutjanus guttatus*

Se capturaron 50 pargos juveniles (31.26 ± 12.340 g; 12.27 ± 1.584 cm) en la entrada al puerto de Mazatlán, Sinaloa con una red manual y un chinchorro. Inmediatamente después de la captura, los peces se mantuvieron en una hielera de 70 L llena con agua de mar y fueron trasladados al Acuario de Mazatlán, en donde fueron mantenidos en un estanque con flujo continuo, cuya temperatura del agua fue de 23°C y una salinidad de 36‰. La alimentación se realizó diariamente con carne de mantarraya. Los peces utilizados para cada tratamiento se tomaron aleatoriamente lanzando una red al estanque, y fueron transferidos a las peceras para someterlos a un periodo de aclimatación, previo a la realización de los bioensayos.

VII. 3. Exposición aguda de *Lutjanus guttatus* a *Cochlodinium polykrikoides*

Los pargos fueron aclimatados durante 7 días y alimentados hasta el sexto día. Se expusieron los peces a cuatro concentraciones de *C. polykrikoides*: 1 (n=6), 2 (n=6), 3 (n=7) y 4 (n=4) $\times 10^6$ cel L⁻¹, durante un período de 24 horas. Se mantuvieron otros peces en medio de cultivo GSe, representando al grupo control (n=6). Los bioensayos se llevaron a cabo en peceras de 50 L, con aireación continua y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Para mantener la concentración del dinoflagelado, se agregó un volumen conocido de inóculo a las 12 horas de haberse iniciado el bioensayo.

Los experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones del Acuario de Mazatlán en el mismo cuarto donde se cultivaron los dinoflagelados a 25°C; la concentración de oxígeno durante los bioensayos fue de 6.77 (± 1.65) mg L⁻¹.

Debido al gran volumen del cultivo de *C. polykrikoides* que se necesitó para cada bioensayo y al tiempo que se requirió para escalarlo y cultivarlo, los bioensayos se realizaron a intervalos de una semana, tiempo necesario para el crecimiento del dinoflagelado. Durante este lapso de tiempo se llevó a cabo paralelamente la aclimatación de los peces utilizados para el próximo bioensayo, cuyo cultivo del dinoflagelado estaba en marcha. El orden en que se llevaron a cabo los bioensayos y la selección de los peces para cada experimento fueron aleatorios y la realización de los bioensayos resultó de la siguiente manera: 1) 3×10^6 cel L⁻¹, 2) 1×10^6 cel L⁻¹, 3) 2×10^6 cel L⁻¹, 4) grupo control, y 5) 4×10^6 cel L⁻¹, realizados del 8 de febrero al 8 de marzo del 2006.

VII. 3. 1. Índices biológicos

Conforme se iba sacando cada pez de las peceras de cada tratamiento, se secó y se registró el peso en una balanza electrónica. Posteriormente, se midió el largo, ancho y alto con un ictiómetro. Una vez realizada la biometría se procedió a realizar la disección, extirpando el hígado y las branquias. El manejo y disección de los peces se realizó sobre hielo para retardar las actividades biológicas *post-mortem*.

Tanto el hígado como las branquias de cada pez fueron pesados. El hígado fue mantenido en hielo seco para ser transportado y almacenado en el ultracongelador a -80°C hasta su análisis, mientras que las branquias fueron inmersas en agua destilada inmediatamente para la preparación de la solución mucosa y posteriormente realizar el análisis de polisacáridos.

Se calculó el factor de condición de Fulton e índice hepatosomático, de acuerdo a las siguientes fórmulas:

- Factor de condición (FC) (Anderson y Neumann, 1996)

$$\text{FC} = \frac{W_t}{L^3} \times 100$$

donde:

W_t = Peso del organismo (g)

L = Longitud del organismo (cm)

- Índice hepatosomático (IHS) (Slooff *et al.*, 1983)

$$\text{IHS} = \frac{W_h}{W_t} \times 100$$

donde:

W_h = Peso del hígado

W_t = Peso del organismo

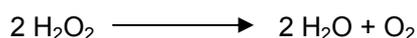
VII. 4. Análisis de muestras

VII. 4. 1. Preparación del homogenizado de hígado

Una vez conocido el peso del hígado, se procedió a mezclarlo y homogenizarlo en frío con solución tampón fosfato 100 mM (con KCl 150 mM, DTT 1 mM, PMFS 0.1 mM y EDTA 1 mM) pH 7.4 a una relación 1:4 (p/v) por aproximadamente 1 minuto en un homogenizador (Polytron PT 1300 D) (modificado de Förlin y Andersson, 1985; en García de la Parra *et al.*, 2000). Posteriormente el homogenizado se centrifugó (centrífuga Beckman GS-15R) a 10000 x g durante 20 minutos a 4°C, según Ferreira *et al.* (2005) y se obtuvo la fracción mitocondrial (sobrenadante), la cual se separó cuidadosamente con una jeringa para no mezclarla con la capa de lípidos en el borde del tubo. El sobrenadante se repartió por partes iguales en dos microtubos Eppendorf tanto para el análisis de la enzima catalasa como para la peroxidación lipídica. Estas fracciones se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

VII. 4. 2. Enzima Catalasa

La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente midiendo la transformación del sustrato (H₂O₂) en agua y oxígeno, leyendo la absorbancia cada 6 segundos durante aproximadamente 3 minutos (debido a la rapidez de la reacción) a $\lambda = 240 \text{ nm}$ ($\epsilon=40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) de acuerdo a Aebi (1974). La reacción que tiene lugar es:



La reacción ocurre a temperatura ambiente al agregar la muestra al buffer y sustrato como sigue:

- 1900 μL de buffer de fosfato 100 mM pH 7.4
- 1000 μL de H₂O₂ 30%
- 100 μL de muestra

La actividad enzimática es expresada como:

$$\left(\frac{\Delta A \text{ min}^{-1}}{\epsilon(40\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})} \right) \left(\frac{\text{Vol(cubeta)} \mu\text{L}}{\text{Vol(muestra)} \mu\text{L}} \right) \left(\frac{1}{\text{prot}(\text{mg mL}^{-1})} \right) = \text{mmol min}^{-1} \text{ mg prot}^{-1}$$

donde:

$\Delta A \text{ min}^{-1}$ = Pendiente de la ecuación de ajuste lineal al graficar el decaimiento de la absorbancia (A) en función del tiempo.

ϵ = Coeficiente de extinción molar a 240 nm = $40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Vol (cubeta) = Volumen total de los reactivos agregados a la cubeta (3000 μL).

Vol (muestra) = Volumen de muestra agregado a la cubeta (100 μL).

prot (mg mL^{-1}) = Concentración de proteínas en el hígado.

Debido a que la catalasa se expresó en función de la cantidad de proteína fue necesario estimar el contenido proteico en el hígado. La concentración de proteínas se determinó a partir del método espectrofotométrico propuesto por Bradford (1976). El homogenizado se diluyó en buffer de fosfato 100 mM pH 7.4 (1:40); posteriormente se tomaron 10 μL , se aplicaron en una microplaca de 96 pozos y se agregaron 250 μL de solución Bradford diluida en agua destilada (1:4). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Labsystems, Multiskan Ascent). La curva estándar se realizó con solución BSA (Álbumina de Suero Bovino) y solución Bradford. El análisis se realizó por cuadruplicado.

VII. 4. 3. Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se determinó espectrofotométricamente con la medición de malondialdehído (MDA) en hígado. El MDA se forma como resultado de la peroxidación lipídica cuando los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana son convertidos a hidroperoxidasas lipídicas y éstas se rompen en los sistemas biológicos. Éste y otros aldehídos son altamente reactivos y pueden ser considerados como mensajeros tóxicos secundarios, los cuales diseminan y aumentan el efecto inicial de los radicales libres (Esterbauer *et al.*, 1991). La curva estándar se llevó a cabo con 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Y la reacción ocurre al incubar a 45°C durante 40 min la siguiente mezcla:

- 650 μL de 1-metil-2-fenilindol 10.3 mM
- 100 μL de muestra
- 100 μL de H_2O
- 150 μL de HCl 37%

Después de la incubación la mezcla se colocó en hielo y se centrifugó a 15000 x g durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante para ser leído a $\lambda = 586$ nm en un lector de placa.

VII. 4. 4. Cuantificación de polisacáridos

Las branquias extirpadas de los peces fueron inmediatamente sumergidas por 1 hora en agua destilada, posteriormente la solución obtenida se filtró a través de papel Whatman GF/C y se almacenó a -80°C hasta el análisis (Kobayashi, 1989; modificado por Kim *et al.*, 2000). Los polisacáridos fueron analizados por el método fenolsulfúrico, al detectar la reducción de sus grupos libres al ser tratados con fenol y ácido sulfúrico concentrado (Dubois *et al.*, 1956). La reacción es sensible y rápida dando un color amarillo-naranja estable por varias horas. La curva estándar se realizó con sacarosa con concentraciones de 10 a 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

La reacción tiene lugar al incubar a 30°C durante 20 minutos la siguiente mezcla:

- 2 mL de muestra
- 0.05 mL de fenol 80%
- 5 mL de ácido sulfúrico

Posteriormente se leyó la absorbancia a $\lambda = 490$ nm en un lector de placa.

VII. 5. Hemólisis

VII. 5. 1. Extracto algal

Un inóculo de 400 mL de *C. polykrioides* cosechado al final de la fase exponencial (día 8 = 11×10^6 cel L^{-1}) se filtró a través de una membrana de fibra de vidrio (Whatman GF/C) estéril. Los filtros fueron mantenidos hasta su extracción a -80°C .

La extracción se realizó en un baño ultrasónico durante 1 minuto agregando 4 mL de metanol al 70% en tubos de centrifuga de 10 mL, que previamente contenían el filtro cortado en trozos pequeños. Posteriormente, se decantó el metanol. Este procedimiento se repitió dos veces

más para lavar el filtro. Los sobrenadantes de los tres sonicados se mezclaron (12 mL en total) para posteriormente llevar a cabo el bioensayo hemolítico (Deeds *et al.*, 2002).

VII. 5. 2. Obtención de eritrocitos

Se tomó 1 mL de sangre de dos pargos (24.95 ± 0.64 cm, 249.5 ± 12 g) y otra muestra de sangre humana. Se utilizaron peces de estas tallas por la facilidad para la toma de la muestra, así como también por la cantidad de sangre necesaria para el análisis.

Los peces fueron anestesiados con 2, fenoxi-etanol (0.5 mL L^{-1}), cuando los peces ya estaban anestesiados se eliminó la humedad de la región ventral con papel secante y la muestra de sangre fue tomada de la vena caudal, insertando la aguja entre el pedúnculo caudal y la aleta anal (Fig. 6) (Strange, 1996). Una vez que se tomó la muestra, los peces fueron regresados al estanque y se recuperaron satisfactoriamente.

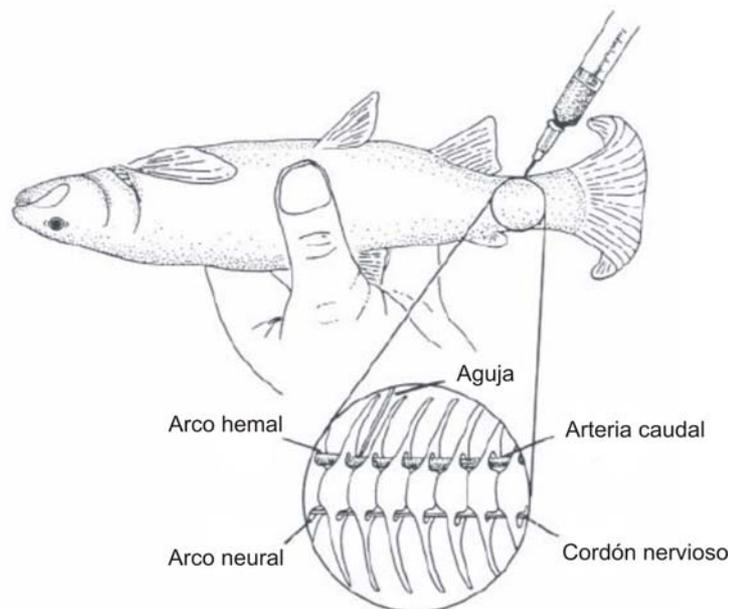


Figura 6. Técnica para la obtención de una muestra de sangre de peces anestesiados. Tomada de Strange (1996).

La muestra de sangre fue inmediatamente transferida a un tubo de ensaye mantenido en hielo que contenía 4 mL de solución Alsever para prevenir la coagulación. Enseguida se centrifugó (centrífuga Beckman GS-15R) a 1500 x g durante 5 minutos a 4°C; se eliminó el suero sobrenadante y se repitió el lavado dos veces más con 4 mL de solución Alsever en cada ocasión (Santamaría *et al.*, 2002). Posteriormente el paquete celular precipitado (eritrocitos) se resuspendió en 10 mL de solución Alsever, se cubrió para protegerla de la luz y se mantuvo a 4°C hasta realizar la prueba de hemólisis.

VII. 5. 3. Bioensayo hemolítico

La actividad hemolítica se realizó siguiendo el método propuesto por Simonsen y Moestrup (1997), modificado por Hagström y Granéli (2005). Se preparó un gradiente de concentración del extracto algal del 4, 15, 25, 35 y 50 %. Se transfirieron 1160 µL de cada concentración del extracto algal a microtubos Eppendorf y se agregaron 40 µL de eritrocitos; se incubaron a 25°C durante 10 horas en oscuridad. Posteriormente se centrifugaron a 1500 x g durante 5 minutos a 4°C, se recuperaron 300 µL del sobrenadante y se transfirieron a una microplaca para leer la absorbancia a $\lambda = 414 \text{ nm}$.

Se realizó una curva estándar de referencia con saponina (extraída de *Quillaja bark*, SIGMA). Se llevó a cabo un ensayo previo, para constatar la actividad hemolítica de la saponina, y se encontró que una concentración de saponina de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ provoca hemólisis al 100%.

Para la curva estándar se realizó un ajuste con el modelo logístico, basado en la premisa de que existe una absorbancia máxima (k) y una tasa instantánea de cambio (r), en donde la tasa de cambio de la absorbancia (dA/dSE) es proporcional a la concentración de saponina (SE) y a la saturación de la misma (k-SE), de acuerdo con Daniel y Wood (1980).

$$\frac{dA}{dSE} \propto (SE)(k - SE) \quad \Rightarrow \quad \frac{dA}{dSE} = (rSE)(k - SE)$$

es decir

$$A_{SE} = \frac{k}{1 + Be^{-rSE}}$$

donde:

A_{SE} = Absorbancia leída después de la exposición de los eritrocitos al extracto del dinoflagelado.

k = Absorbancia máxima

$$B = (k - A_0)/A_0$$

A_0 = Absorbancia en ausencia de saponina

r = Tasa instantánea de cambio

SE = Concentración de saponina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Debido a que la variable desconocida y deseada es la concentración de saponina (SE), ésta es despejada obteniendo la siguiente fórmula:

$$SE = \left(\frac{1}{r}\right) \left\{ \ln \left[(B) \left(\frac{A_{SE}}{k - A_{SE}} \right) \right] \right\}$$

VII. 6. Análisis de los datos

La normalidad de los datos se probó con el estadístico de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) fue calculada con las pruebas C de Cochran y F_{\max} de Hartley. Las diferencias significativas del factor de condición, índice hepatosomático y actividad de la enzima catalasa se determinaron por análisis de varianza de una vía, y en caso necesario, se realizaron pruebas *a posteriori* de comparaciones múltiples entre los tratamientos aplicando la prueba de Newman-Keuls. Para determinar la existencia de diferencias significativas en la concentración de polisacáridos y la peroxidación lipídica se aplicó el estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis, y se realizaron las comparaciones múltiples no paramétricas entre los otros tratamientos. Se aplicó un análisis de correlación de Pearson entre la concentración de los dinoflagelados, el índice hepatosomático, la actividad de la enzima catalasa y la concentración de polisacáridos (Zar, 1984). Estos análisis se llevaron a cabo utilizando el software STATISTICA 5.0.

Los resultados de hemólisis se expresaron en la concentración de *C. polykrikoides* que provocan un 50% de hemólisis (HE_{50}) y fue calculado de acuerdo a Simonsen y Moestrup (1997):

$$HE_{50} = \frac{CS}{SE}$$

donde:

C = Concentración de células (cel L^{-1}) a la que correspondió cada porcentaje del extracto algal probado.

S = Concentración de saponina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) que provoca un 50% de hemólisis en los eritrocitos, calculada a partir de la curva estándar de referencia.

SE = Equivalentes de saponina, o concentración de saponina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) a la que equivale cada absorbancia leída (A_{SE}) de los porcentajes del extracto del dinoflagelado una vez provocada la hemólisis. SE se calculó a partir de la ecuación obtenida con el ajuste logístico.

VIII. RESULTADOS

VIII. 1. Crecimiento y escalamiento de *Cochlodinium polykrikoides*

Para obtener un buen crecimiento de la cepa de *Cochlodinium polykrikoides* y coincidir con las condiciones en que se realizaron los bioensayos, fue necesario aclimatarla a una temperatura de 25°C (la temperatura en el cepario de la CODIMAR era de $20 \pm 3^\circ\text{C}$ y se aclimató 5 días antes de su traslado), así como al agua de mar y extracto de suelo que se utilizaron para el medio de cultivo GSe que se preparó para los bioensayos. Se utilizó agua de mar de la Bahía de Mazatlán, Sin.; el extracto de suelo se preparó con suelo de Mezquite que fue colectado en el poblado de El Walamo, Sin. La solución stock de nutrientes se preparó con reactivos grado analítico.

Las células de *C. polykrikoides* generalmente se encontraron como células solitarias o en cadenas de dos células y raramente en cadenas de cuatro células. El tamaño de cada célula fue de 30-40 μm de longitud y 20-30 μm de ancho, y fueron evidentes algunas de las partes del dinoflagelado, como el epicono cónico, el hipocono dividido en dos lóbulos, el cingulum excavado descendiendo en espiral, el sulcus alrededor de la célula y el estigma rojizo (Fig. 7).

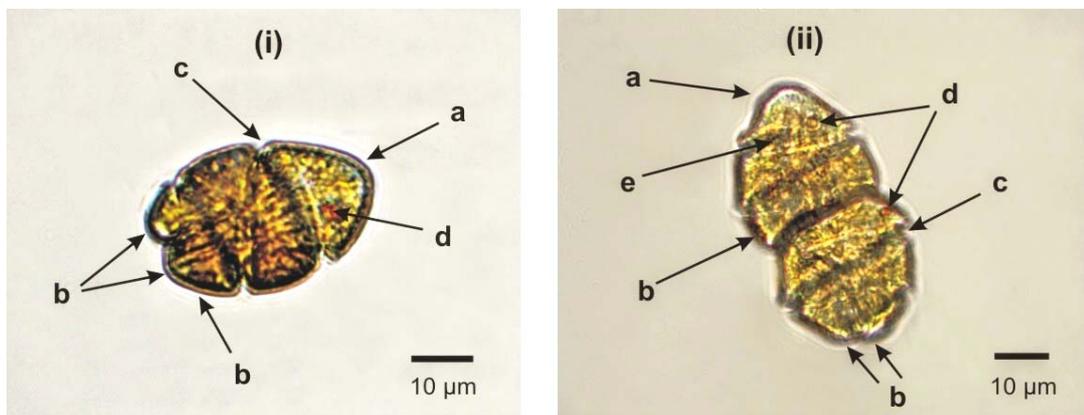


Figura 7. Células vivas de *Cochlodinium polykrikoides*. (i) Célula solitaria y (ii) cadena de dos células. (a) epicono cónico, (b) hipocono dividido en dos lóbulos, (c) cingulum excavado, (d) estigma rojo y (e) sulcus.

La curva de crecimiento del dinoflagelado *C. polykrikoides* (CPPV-1) en medio GSe mostró cuatro fases, las cuales fueron delimitadas a partir del cálculo de las derivadas, por lo que el límite entre las fases estuvo dado por los puntos de inflexión. La primer fase de crecimiento comprendió a la fase exponencial, la cual se mantuvo desde el inicio de la inoculación hasta el día 8 alcanzando una concentración de 5.8×10^6 ($\pm 0.63 \times 10^6$) cel L⁻¹. Posteriormente ocurrió un crecimiento desacelerado del día 8 al 13, llegando a la máxima concentración con 9.4×10^6 ($\pm 0.29 \times 10^6$) cel L⁻¹. La tercera fase comprendió un período estacionario, el cual tuvo lugar del día 13 al 17 en donde ya se observó una ligera disminución en la concentración de células, pero no fue sino hasta después del día 17 cuando ocurrió la última fase, observando un decaimiento considerable en la concentración celular del cultivo (Fig. 8).

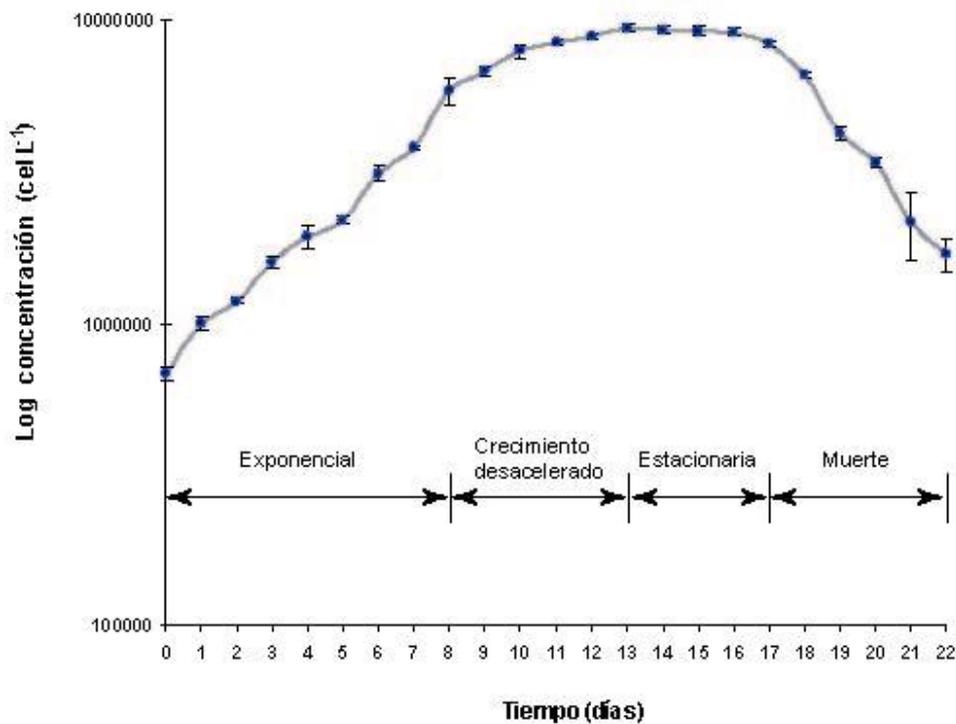


Figura 8. Curva de crecimiento de *C. polykrikoides*. Fase exponencial: día 0 a 8; fase de crecimiento desacelerado: día 8 a 13; fase estacionaria: día 13 a 17; y fase de decaimiento o muerte: día 17 a 22.

La tasa de crecimiento del dinoflagelado se calculó considerando la fase exponencial (día 0 a 8) de la curva de crecimiento ya descrita, y aplicando la fórmula matemática propuesta por Guillard (1973) se obtuvo una tasa de crecimiento de 0.39 (± 0.16) divisiones día⁻¹.

El escalamiento del dinoflagelado se inició en recipientes de plástico desechables y estériles (50 mL) y los últimos recipientes de cultivo hasta donde se realizó el escalamiento, fueron frascos de vidrio tipo vitrolero de 20 L. Para la realización de todos los bioensayos se prepararon 230 L de medio GSe; 15 L fueron utilizados para el cultivo del dinoflagelado a una concentración de 8×10^6 cel L⁻¹, 75 L para un cultivo con 4×10^6 cel L⁻¹ y 140 L se mantuvieron solo como medio GSe estéril, ya que fueron utilizados para diluir cada uno de estos cultivos y así ajustar las concentraciones utilizadas para los experimentos de exposición y para el grupo control.

VIII. 2. Exposición de *Lutjanus guttatus* al dinoflagelado ictiotóxico *Cochlodinium polykrikoides*

Los pargos expuestos a medio GSe (grupo control) y a las menores concentraciones del dinoflagelado (1 y 2×10^6 cel L⁻¹) no mostraron cambios evidentes en el comportamiento, ya que se observó que éstos nadaban normalmente y sin ningún tipo de estrés. Además de que todos los peces sobrevivieron las 24 horas que duró la exposición.

Los efectos del dinoflagelado en el comportamiento de los pargos fueron detectables a partir de una concentración del dinoflagelado de 3×10^6 cel L⁻¹, mostrando natación errática y respiración agitada (hiperventilación). A las 6 horas de iniciado el bioensayo, uno de los peces mostró signos de estrés nadando de manera errática de arriba hacia abajo de la pecera y permanecía estático por lapsos de tiempo cortos. Este pez murió 17 horas después, es decir, 23 horas desde que inició el bioensayo. A las 22 horas de iniciado el experimento otros dos peces mostraron signos de estrés muy similares al pez que murió.

La exposición de los peces a 4×10^6 cel L⁻¹ de *C. polykrikoides* mostró un efecto letal. El comportamiento de los peces fue muy similar a los del tratamiento descrito anteriormente. Presentaron un nado errático y permanecían estáticos en períodos breves, hasta convulsionarse (ataxia). Justo antes de morir los peces nadaban rápida y erráticamente, este comportamiento duraba aproximadamente 10 segundos. La muerte del primer pez ocurrió a las 3 horas y media de haber iniciado el bioensayo, mientras que el último de los peces murió a las 4 horas y media.

A pesar de que sólo uno de los peces del tratamiento con 3×10^6 cel L⁻¹, y todos los del tratamiento con 4×10^6 cel L⁻¹ de *C. polykrikoides* murieron durante la exposición, todos

fueron considerados para los análisis, ya que se estuvieron observando durante todo el tiempo de la exposición y justo antes de la muerte se capturaron para practicarles la disección.

VIII. 2. 1. Índices biológicos

VIII. 2. 1. a. Factor de condición

El factor de condición de los pargos *L. guttatus* después de ser expuestos a cuatro concentraciones de *C. polykrikoides*, osciló entre 1.556 (± 0.122) y 1.69 (± 0.083) (Fig. 9); y de acuerdo al análisis de varianza no existieron diferencias significativas entre el grupo control y los tratamientos (Anova: $F_{4,24} = 2.78$; $p > 0.05$). Considerando a los peces de todos los tratamientos se obtuvo un factor de condición promedio de 1.606 (± 0.116).

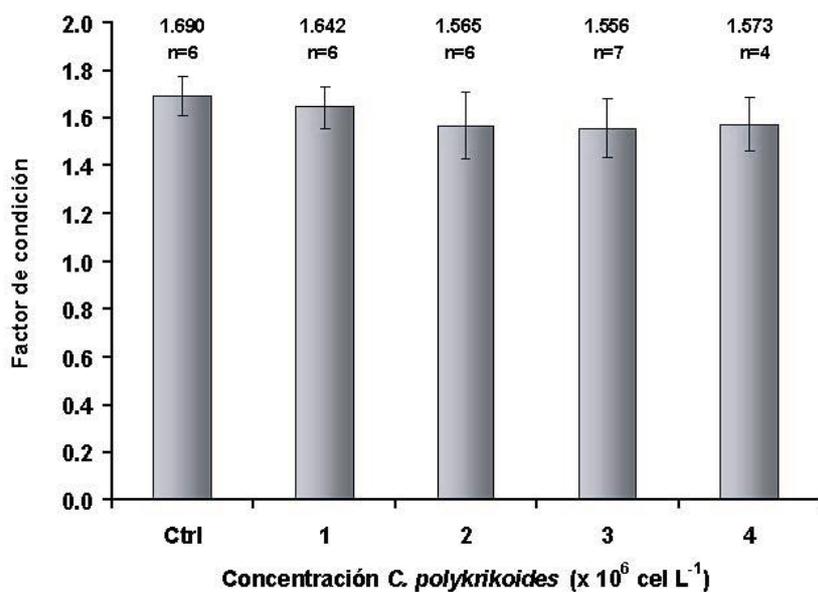


Figura 9. Factor de condición de *L. guttatus* expuestos a cuatro concentraciones de *C. polykrikoides*. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar.

El factor de condición (1.597 ± 0.059) de los pargos utilizados para la extracción de sangre y bioensayo hemolítico fue similar al de los organismos expuestos al dinoflagelado, a

pesar de la diferencia en talla, ya que los peces a los que se les extrajo sangre tuvieron un peso y longitud promedio de 249.50 (± 12.021) g y 25 (± 0.707) cm, respectivamente, mientras que los peces utilizados en los bioensayos de exposición al dinoflagelado pesaron 31.26 (± 12.340) g y midieron 12.27 (± 1.584) cm.

La longitud y el peso de los pargos utilizados para los bioensayos presentaron una relación isométrica de acuerdo al análisis de regresión del modelo potencial, ya que con el ajuste obtenido el exponente de la longitud (L) es igual a 3 ($t_{0.05(2),28} > 0.93$; $p=0.05$), indicando que el ritmo de crecimiento en peso (W) se incrementa con el cubo de sus longitudes (Santos *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2003). Esta relación isométrica coincide con lo encontrado por otros autores para esta misma especie (Rojas-Herrera, 2001; Soto-Ávila, 2004), así como también para *L. argentiventris* (Ocampo-Gómez, 1992).

Se observó cierta heterogeneidad en talla entre los peces de los distintos tratamientos, a excepción del tratamiento con *C. polykrikoides* a 3×10^6 cel L⁻¹ ya que fueron los de menor talla, presentándose una mayor homogeneidad entre ellos (Fig. 10). Es así como los peces de este tratamiento presentaron diferencias significativas, tanto en longitud como en peso, con el resto de los tratamientos ($p < 0.05$); sin embargo, el tratamiento con la mayor concentración del dinoflagelado no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) con el grupo control ni con los tratamientos con 1 y 2×10^6 cel L⁻¹. Este tratamiento con la mayor concentración del dinoflagelado fue el que presentó el efecto más fuerte provocado por *C. polykrikoides*, por lo que la talla no influyó en la toxicidad producida por el dinoflagelado en cada uno de los tratamientos.

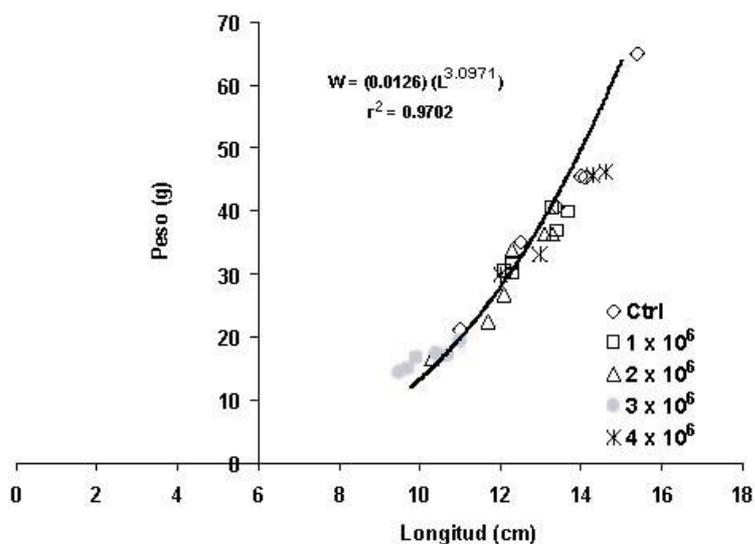


Figura 10. Relación entre la longitud y el peso de los peces utilizados para los bioensayos de exposición al dinoflagelado. La ecuación indica un ajuste potencial, donde W es el peso total y L la longitud total.

VIII. 2. 1. b. Índice hepatosomático

El índice hepatosomático de los pargos disminuyó al aumentar la concentración de *C. polykrikoides*. Los pargos del grupo control tuvieron un índice hepatosomático de 1.426 (± 0.443), mientras que los que estuvieron expuestos al dinoflagelado a una concentración de 1×10^6 cel L⁻¹ disminuyó ligeramente a 1.396 (± 0.295), y a una concentración de 2×10^6 cel L⁻¹ disminuyó a 1.090 (± 0.418). No se encontraron diferencias significativas entre estos tratamientos y el grupo control ($p > 0.05$)

Los tratamientos en los que sí se encontró una disminución significativa del índice hepatosomático fueron aquellos con las mayores concentraciones de *C. polykrikoides*. De acuerdo a las comparaciones múltiples, solo existieron diferencias significativas entre el grupo control y los tratamientos con las mayores concentraciones del dinoflagelado de 3 y 4×10^6 cel L⁻¹ ($p < 0.05$), cuyos índices hepatosomáticos fueron de 0.630 (± 0.174) y 0.609 (± 0.101), respectivamente. Estos índices hepatosomáticos correspondientes a los tratamientos con las mayores concentraciones del dinoflagelado no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0.05$); sin embargo, sí presentaron diferencias con los tratamientos de 1 y 2×10^6 cel L⁻¹ ($p < 0.05$) (Fig. 11).

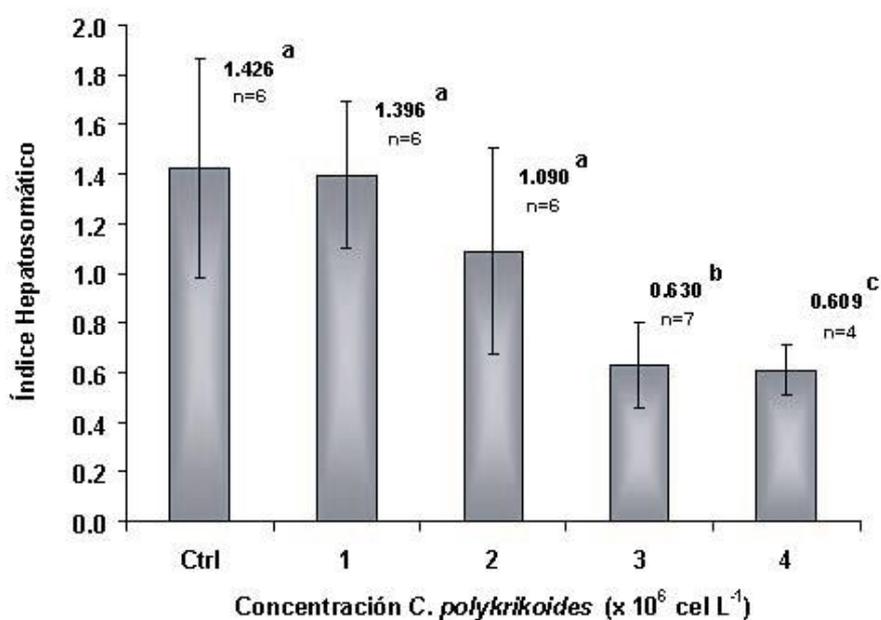


Figura 11. Índice hepatosomático de *L. guttatus* expuestos a cuatro concentraciones de *C. polykrikoides*. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar y las letras indican diferencias significativas entre tratamientos.

VIII. 2. 2. Enzima catalasa

La actividad de la enzima catalasa en el hígado de los pargos del grupo control y de los peces correspondientes al tratamiento con concentraciones del dinoflagelado de 1×10^6 cel L^{-1} no resultó significativamente diferente ($p > 0.05$). Sin embargo, a partir de la exposición a 2×10^6 cel L^{-1} se encontró una inhibición de la enzima en forma progresiva y significativamente diferente. El grupo control presentó una actividad enzimática de $69.46 (\pm 17.65) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$, y ésta disminuyó a $40.02 (\pm 11.07) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ($p = 0.0135$) y $20.52 (\pm 6.11) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ ($p = 0.0003$) al exponer a los pargos a 3×10^6 y 4×10^6 cel L^{-1} , respectivamente. También se encontraron diferencias significativas entre la actividad enzimática de estos dos últimos tratamientos ($p < 0.05$) (Fig. 12).

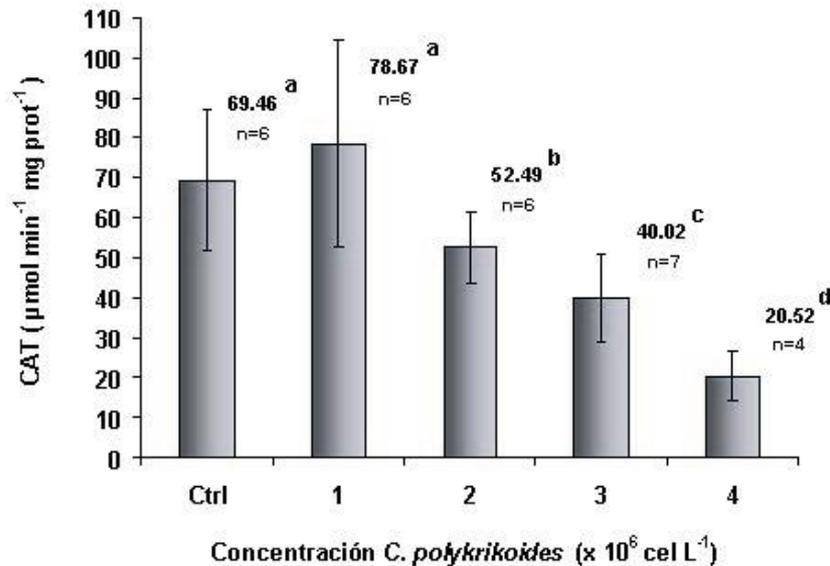


Figura 12. Actividad de la enzima catalasa en hígado de *L. guttatus* expuestos a cuatro concentraciones de *C. polykrikoides*. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar y las letras indican diferencias significativas entre tratamientos.

VIII. 2. 3. Peroxidación lipídica

La ocurrencia de peroxidación lipídica en el hígado de los pargos fue mínima en el grupo control y en los tratamientos con 1, 2 y 3 x 10⁶ cel L⁻¹, comparándola con la del tratamiento con la mayor concentración. Los primeros cuatro tratamientos tuvieron una peroxidación lipídica de entre 0.88 y 1.82 μmoles MDA g peso húmedo⁻¹ y no existió diferencia significativa entre estos tratamientos (p>0.05); sin embargo, los peces del tratamiento con una concentración del dinoflagelado de 4 x 10⁶ cel L⁻¹ mostraron una peroxidación lipídica de 18.662 (±2.779) μmoles MDA g peso húmedo⁻¹, la cual fue significativamente diferente al resto de los tratamientos (p<0.05) (Fig. 13).

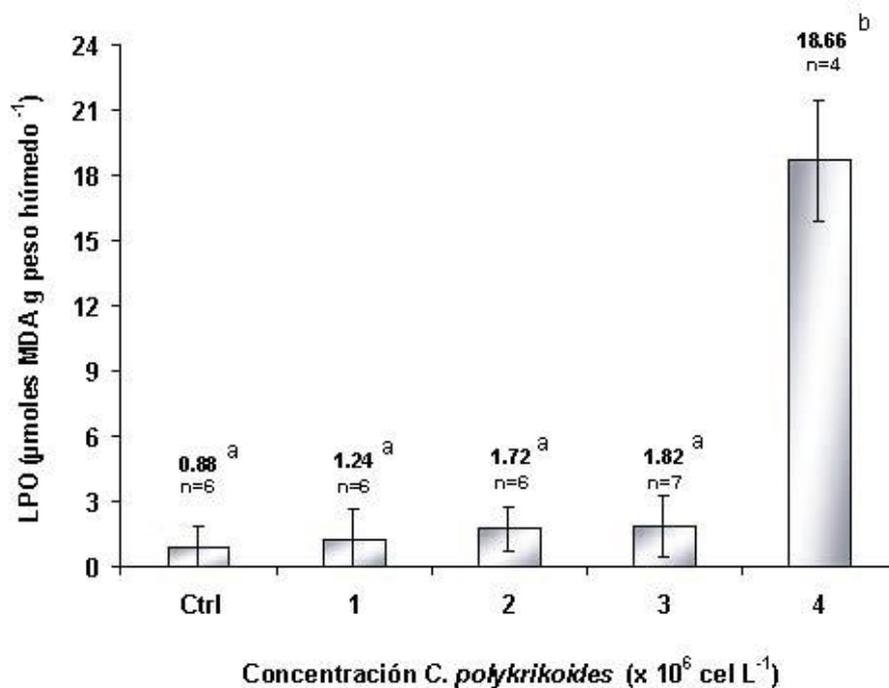


Figura 13. Peroxidación lipídica en hígado de *L. guttatus* expuestos a cuatro concentraciones de *C. polykrikoides*. Los valores representan el promedio ± la desviación estándar y las letras indican diferencias significativas entre tratamientos.

VIII. 2. 4. Cuantificación de polisacáridos

Los polisacáridos representaron una prueba más para confirmar las propiedades ictiotóxicas de *C. polykrikoides*, ya que se midió un aumento en la concentración de sacarosa presente en las branquias de los pargos después de ser expuestos al dinoflagelado durante 24 horas. Los peces del grupo control tuvieron una concentración de polisacáridos de 46.81 (± 1.95) μg sacarosa mL^{-1} , y ésta mostró un aumento a 52.23 (± 6.01) μg sacarosa mL^{-1} al exponer los peces a partir de una concentración del dinoflagelado de 2×10^6 cel L^{-1} ($p=0.0119$), ya que no existieron diferencias significativas entre la concentración de polisacáridos del grupo control y del tratamiento con 1×10^6 cel L^{-1} ($p=0.7133$). Los polisacáridos aumentaron aún más al incrementar la concentración del dinoflagelado, alcanzando concentraciones de hasta 67.67 (± 2.89) y 73.63 (± 3.81) μg sacarosa mL^{-1} para concentraciones del dinoflagelado de 3 y 4×10^6 cel L^{-1} , respectivamente (Fig. 14). Tales concentraciones de polisacáridos fueron significativamente diferentes al compararlas tanto con el grupo control ($p=0.0002$) como entre sí ($p<0.05$).

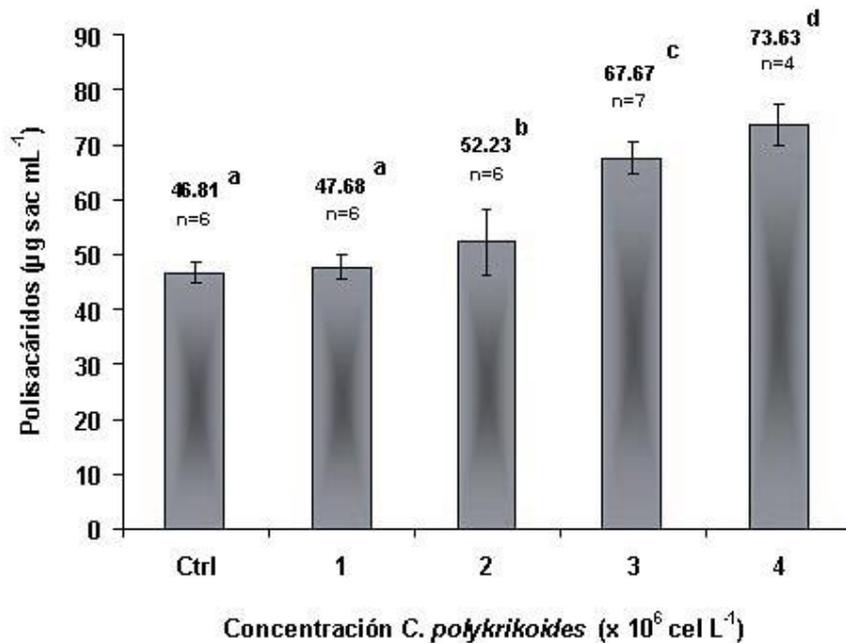


Figura 14. Concentración de polisacáridos en branquias de *L. guttatus* expuestos a cuatro concentraciones de *C. polykrikoides*. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar y las letras indican diferencias significativas entre tratamientos.

Los peces resultaron fuertemente afectados al ser expuestos a las concentraciones más altas del dinoflagelado de 3 y 4×10^6 cel L⁻¹, como pudo notarse al cuantificar un alto aumento en la producción de polisacáridos, este análisis apoya y contribuye a la explicación sobre la capacidad ictiotóxica del dinoflagelado.

Se realizó una correlación entre la concentración de células correspondiente a cada tratamiento, el índice hepatosomático, la actividad de la enzima catalasa y la concentración de polisacáridos. La matriz resultante indicó una correlación alta y significativa entre cada factor. Existió una correlación negativa para los siguientes pares de factores correlacionados: cel L⁻¹ – índice hepatosomático, cel L⁻¹ – catalasa, índice hepatosomático – polisacáridos y catalasa – polisacáridos. El hecho de haber resultado una correlación negativa indica que la relación entre los factores es inversa, es decir, cuando se aumenta la concentración de dinoflagelados (cel L⁻¹) la actividad de la enzima catalasa disminuye. Por otro lado, existió una correlación positiva para el índice hepatosomático y la catalasa, así como también para la concentración de dinoflagelados (cel L⁻¹) y de polisacáridos, ya que tienen una relación directa y fue así como al aumentar la concentración de dinoflagelados aumentó también la concentración de polisacáridos en las branquias de los pargos (Tabla II).

Tabla II. Matriz de correlación entre la concentración de dinoflagelados (cel L⁻¹), índice hepatosomático, actividad de la enzima catalasa en hígado y concentración de polisacáridos en branquias de los pargos. Se señala el coeficiente de correlación y el valor de p entre paréntesis (p<0,05 indica una correlación significativa).

	cel L ⁻¹	Índice hepatosomático	Catalasa	Polisacáridos
cel L ⁻¹	1			
Índice hepatosomático	-0,955 (0,011)	1		
Catalasa	-0,931 (0,022)	0,943 (0,016)	1	
Polisacáridos	0,949 (0,014)	-0,975 (0,005)	-0,950 (0,013)	1

VIII. 3. Bioensayo hemolítico

La curva estándar de referencia del efecto de la saponina en los eritrocitos mostró un comportamiento sigmoide. Por esto, fue necesario realizar un ajuste de tipo logístico. Las ecuaciones obtenidas a partir de dicho ajuste fueron similares para el bioensayo hemolítico en ambos peces, mientras que la ecuación del ajuste para el bioensayo con eritrocitos humanos fue diferente; esto pudo observarse al obtener absorbancias mayores en esta última prueba (Fig. 15). De acuerdo a la curva estándar de referencia, la saponina provocó hemólisis al 50% a una concentración de $4.88 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de $5.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ para los eritrocitos de peces y humanos, respectivamente.

Cochlodinium polykrikoides presentó propiedades hemolíticas en eritrocitos de *Lutjanus guttatus* y humanos. La HE_{50} (concentración del dinoflagelado que provoca hemólisis al 50% de los eritrocitos) calculada para los peces fue de $4.88 \times 10^6 (\pm 1.21 \times 10^6)$ cel L^{-1} , mientras que para los eritrocitos humanos fue de $5.27 \times 10^6 (\pm 1.41 \times 10^6)$ cel L^{-1} .

Con base al cálculo de la HE_{50} se observó que existe una relación entre la concentración de saponina y del dinoflagelado, de modo que $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ equivale a aproximadamente 1×10^6 cel L^{-1} , respectivamente.

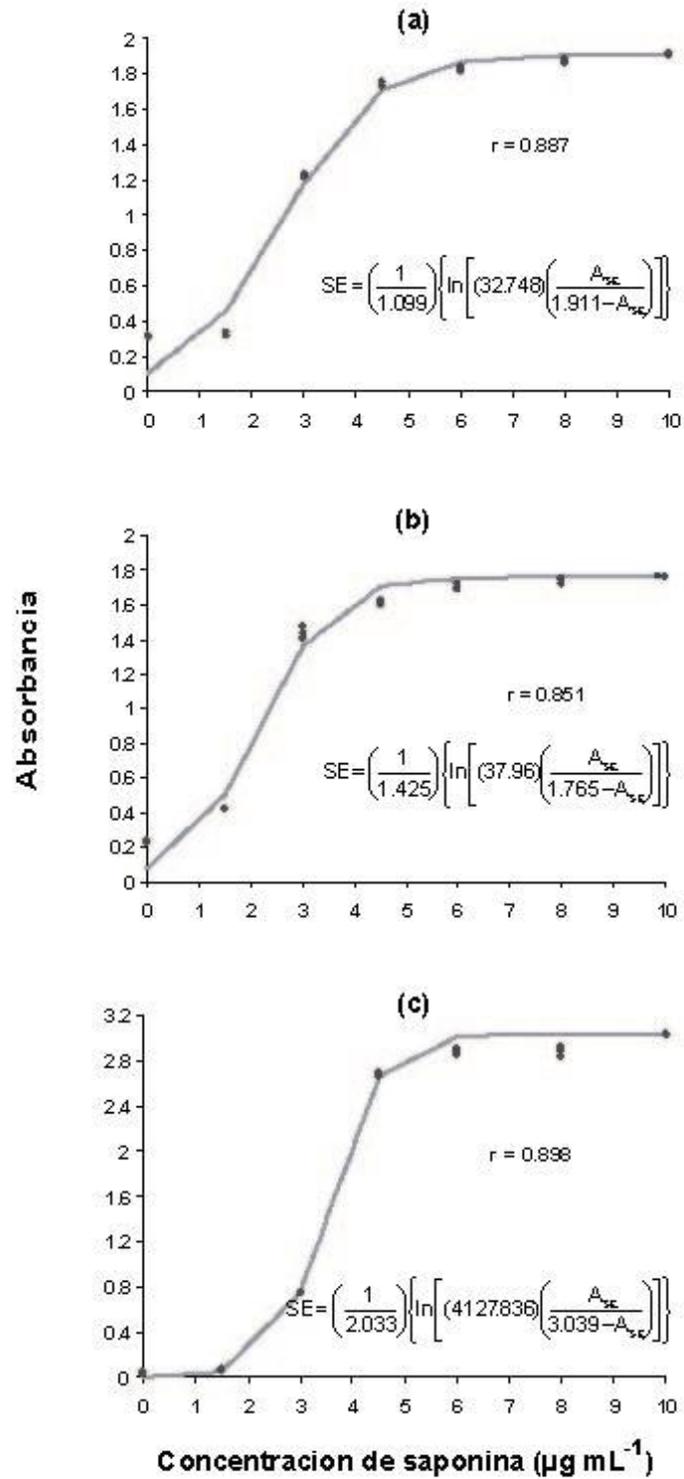


Figura 15. Curva estándar de referencia de hemólisis provocada por la saponina en eritrocitos de *L. guttatus* (a y b) y de humanos (c). Los puntos indican las absorbancias leídas y las líneas sólidas representan el ajuste logístico obtenido para cada curva. Se incluye la ecuación del ajuste para cada caso. SE es la concentración de saponina a la que equivale cada absorbancia leída (A_{SE}).

IX. DISCUSIÓN

IX. 1. Crecimiento de *Cochlodinium polykrikoides*

El medio de cultivo GSe preparado para el crecimiento del dinoflagelado mostró resultados positivos, de modo que el agua de mar proveniente de la Bahía de Mazatlán y el extracto de suelo de mezquite proveniente de El Walamo, Sin., poseen propiedades adecuadas que permitieron al dinoflagelado tener una buena aclimatación y un crecimiento satisfactorio bajo las condiciones de cultivo establecidas. La aclimatación es un paso importante para el crecimiento de las microalgas, ya que ha permitido obtener buenos resultados de crecimiento a corto plazo, aunque en otros casos la aclimatación puede tomar más tiempo pero finalmente se obtiene buen crecimiento (Voltolina *et al.*, 1998).

Las condiciones de cultivo del dinoflagelado se siguieron de acuerdo a Kim *et al.* (2004), (cuarto de cultivo a 25°C, agua de mar a 34‰, intensidad de luz de 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas) quienes obtuvieron una tasa máxima de crecimiento de *C. polykrikoides* (aislado de la Bahía Furue, Japón) de 0.41 divisiones día⁻¹ durante la fase exponencial y cultivado en medio f/2 sin sílice. También se ha reportado una tasa de crecimiento de *C. polykrikoides* (aislado de Tongyoung, Corea) de 0.32 divisiones día⁻¹ al ser alimentado con una criptofita en medio f/2 e incubados a 20°C, mientras que sin alimento la tasa de crecimiento decrece a 0.166 divisiones día⁻¹ (Jeong *et al.*, 2004). A pesar de que la tasa obtenida en el presente trabajo fue de 0.39 divisiones día⁻¹ e inferior a la máxima tasa reportada (0.41 divisiones día⁻¹), se logró el crecimiento suficiente para la realización de los bioensayos en el período programado.

La fase exponencial del crecimiento de *C. polykrikoides* tuvo una duración de ocho días, durante la cual el cultivo aumentó 5.8×10^6 cel L⁻¹ a una tasa de 0.39 divisiones día⁻¹. Seguido de ésta, tuvo lugar la fase de crecimiento desacelerado, que a pesar de que duró cinco días, el cultivo pudo aumentar 3.6×10^6 cel L⁻¹, sin embargo, la tasa de crecimiento disminuyó a 0.14 divisiones día⁻¹. Al término de la fase de crecimiento desacelerado (día 13), se alcanzó la mayor concentración del cultivo con 9.4×10^6 cel L⁻¹.

En el medio natural *C. polykrikoides* ha formado mareas rojas con concentraciones de 7.05×10^6 cel L⁻¹ a 29-31°C y salinidades de 28.9-32.5‰ (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2003), aunque también se han registrado eventos a menores temperaturas (21.2°C) y una mayor salinidad

(34.6‰) (Morales-Blake y Hernández-Becerril, 2000). De modo que este dinoflagelado presenta un buen crecimiento y alcanza alta abundancia, tanto en laboratorio como en el medio natural, a temperaturas que oscilan entre los 21 y 31°C y salinidades de 29 y 34.6‰. En laboratorio se han medido tasas de crecimiento mayores a 0.30 divisiones día⁻¹ en combinaciones de temperatura y salinidad de 21°C a 26°C y de 30 a 36‰ (Kim *et al.*, 2004), como es el caso del cultivo que fue realizado para los bioensayos de exposición de esta tesis.

El crecimiento del dinoflagelado mostró buenos resultados en los matraces, alcanzando concentraciones de 8 x 10⁶ cel L⁻¹ al final de la fase exponencial, mientras que en los frascos tipo vitrolero las concentraciones máximas logradas fueron de 4 x 10⁶ cel L⁻¹. Esto pudo deberse a que dichos frascos tenían un ligero color azul y eran mucho más gruesos que los matraces, de modo que el paso de la luz era menor.

IX. 2. Efecto ictiotóxico de *Cochlodinium polykrikoides*

Cochlodinium polykrikoides es uno de los dinoflagelados más nocivos y responsable de muertes masivas de peces que se han registrado en Japón, Corea y otros países (Kim, 1998; Whyte *et al.*, 2001). Estas proliferaciones son cada vez más frecuentes y parecen estar correlacionadas con el grado de contaminación de las costas, e inclusive con la utilización de la zona costera para fines acuaculturales. A pesar de que se ha propuesto que *C. polykrikoides* produce ciertos agentes ictiotóxicos, el mecanismo tóxico aún es desconocido (Lee, 1996; Kim *et al.*, 2002). Estudios recientes han reportado que *C. polykrikoides* produce especies reactivas de oxígeno, como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno, los cuales pueden ser responsables de daño oxidativo en branquias y que ocasionan la muerte de peces (Kim *et al.*, 1999).

En el presente estudio, la exposición de los pargos *Lutjanus guttatus* al dinoflagelado *Cochlodinium polykrikoides* mostró efectos letales a partir de concentraciones de 3 x 10⁶ cel L⁻¹, sin embargo, no todos los peces murieron en este tratamiento, solamente el 14%. A esta misma concentración, Kim *et al.* (2000) encontraron mortalidades del 20 al 30% en peces como el pájaro loro del Japón *Oplegnathus fasciatus*, besugo o pargo japonés *Pagrus major* y en *Thamnaconus septentrionalis*, los cuales oscilaban entre los 20 y 25 cm de longitud. Por otro lado, Núñez-Vázquez *et al.* (2003) también encontraron una mortalidad del 30% en *Mugil* sp. pero a una concentración del dinoflagelado de 4.125 x 10⁶ cel L⁻¹; Yuki y Yoshimatsu (1989) encontraron mortalidades en el pez *Leiognathus nuchalis* de 20-40% a concentraciones del dinoflagelado de 2.1 y 4.8 x 10⁶ cel L⁻¹, respectivamente. En el medio natural se han observado mortandades de

peces asociadas a *C. polykrikoides* con concentraciones de 0.36 a 7.05×10^6 cel L⁻¹ (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2003), y tan altas como de 1 a 30×10^6 cel L⁻¹ como ocurre en Corea (Ahn *et al.*, 2006). Entre las causas de muerte reportadas se encuentran la inactivación de enzimas transportadores de iones, las cuales participan en el intercambio de gases, secreción anormal de mucus en branquias, disminución del pH y de la presión parcial de oxígeno (pO₂) en la sangre de los peces (Kim *et al.* 2000).

La concentración que presentó un mayor efecto letal fue la de 4×10^6 cel L⁻¹, ya que en ésta todos los peces murieron a las tres horas y media de haber iniciado el bioensayo. En ambos tratamientos (3 y 4×10^6 cel L⁻¹) los peces mostraron un comportamiento similar que correspondió a signos de estrés. Estas observaciones coinciden con las descritas por Kim *et al.* (2000) quienes mencionan que los peces expuestos a *C. polykrikoides* con concentraciones mayores a 3×10^6 cel L⁻¹ mostraron un nado violento durante la primer hora de exposición. Asimismo, se ha descrito que los peces expuestos al sobrenadante, después de centrifugar células de *Cochlodinium* tipo '78 Yatsushiro, y a las sustancias hemolíticas extraídas del mismo dinoflagelado mostraron convulsiones violentas con saltos ocasionales seguidos de pérdida de balance y dificultad para respirar y un tiempo de sobrevivencia de 20 a 30 minutos; de forma similar los ratones inyectados con extracto de este mismo dinoflagelado mostraron signos paralizantes como ataxia, convulsiones y parálisis respiratoria (Onoue y Nozawa 1988, 1989).

Por todo lo anterior, la causa de la mortalidad de *L. guttatus* expuesto a las mayores concentraciones de *C. polykrikoides* (CPPV-1), pudo deberse por la producción de ROS por parte del dinoflagelado y un consecuente daño oxidativo en los peces, además de la secreción de mucus en branquias y finalmente la muerte por asfixia.

IX. 2. 1. Índices biológicos

En general, el factor de condición es un indicador del bienestar en los organismos (Gutreuter y Childress, 1990) y ha sido ampliamente utilizado como indicador de la salud de peces para detectar efectos de la contaminación (Couillard *et al.*, 1999). En este estudio, el factor de condición obtenido en los pargos no reflejó ningún efecto como resultado de la exposición al dinoflagelado ya que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, es decir, los peces se encontraron en una condición de salud aparentemente similar en todos los tratamientos. Sin embargo, de acuerdo a las comparaciones múltiples únicamente existieron diferencias significativas de la longitud y peso de los pargos del tratamiento con 3×10^6 cel L⁻¹

con el resto de los tratamientos, mientras que los peces del tratamiento con 4×10^6 cel L⁻¹ no presentaron diferencias significativas, de tal modo que la talla de los peces no influyó en las diferencias de los efectos y la mortandad producidos por el dinoflagelado.

El factor de condición calculado para los juveniles de *Lutjanus guttatus* utilizados en el presente trabajo parece no indicar cambio alguno en el estado de salud durante la exposición al dinoflagelado, probablemente debido a que el bioensayo fue agudo, es decir, tuvo una duración de 24 horas y dado que el factor de condición toma en cuenta la longitud y peso del pez no se registró algún cambio en estas 24 horas, por lo que este índice biológico resulta más útil en bioensayos crónicos en donde el tiempo de exposición es más prolongado (desde semanas a todo un ciclo de vida) (Rowe, 2003).

El factor de condición medido en este estudio (1.606) ha resultado ser similar al reportado por otros autores. Utilizando los parámetros reportados por Rojas-Herrera (2001) para *L. guttatus* y *L. peru* se obtiene un factor de condición de 1.514 y 1.635, respectivamente; mientras que de acuerdo a Soto-Ávila (2004) para *L. guttatus* es de 1.659. Y según Emata y Borlongan (2003) *L. argentimaculatus* tiene un factor de condición de 1.605; con base a lo anterior se puede asumir que el factor de condición encontrado en este trabajo está dentro de lo reportado para algunas especies del género *Lutjanus*.

El índice biológico de los pargos que sí resultó alterado durante la exposición al dinoflagelado fue el índice hepatosomático. Este índice disminuyó al exponer los peces al dinoflagelado con concentraciones de 3 y 4×10^6 cel L⁻¹; de modo que el hígado presentó una disminución en peso en estos tratamientos comparado al grupo control, sin embargo, esta disminución no se vio reflejada en el peso del organismo porque el hígado de los peces teleósteos comprende una pequeña fracción del peso total del organismo (Webb y Wood, 2000). La afección en hígado fue tal que a partir de esas concentraciones se encontraron efectos letales en los peces, como pudo corroborarse con el resto de los análisis realizados en este órgano. Comparado al factor de condición, el índice hepatosomático sí resultó útil para evidenciar el efecto de exposición al dinoflagelado, porque este índice indica la condición del pez a corto plazo (Anderson y Gutreuter, 1983; en Amezcua-Martínez, 2000). Esto puede deberse a la función desintoxicante del hígado, que posee un sistema de oxidasas de función mixta que funciona inactivando o desintoxicando algunos xenobióticos, además de que la bilis de los hepatocitos acarrea los metabolitos de los tóxicos hacia el intestino para excretarlos. Debido al importante papel de este órgano, se han medido y observado efectos hepatotóxicos por varios xenobióticos,

utilizando al hígado como un sitio para la cuantificación de diversos biomarcadores incluyendo mamíferos y peces (Hinton, 1994).

El índice hepatosomático es una razón entre el peso del hígado y del organismo completo, de modo que dicho órgano perdió peso al exponer al organismo a concentraciones altas del dinoflagelado. Este resultado difiere de lo encontrado comúnmente, ya que el hígado suele aumentar en peso después de la exposición a ciertos xenobióticos (Cooke y Hinton, 1999); esto también ha sido encontrado en ratones después de suministrarles extracto de la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, productora de hepatotoxinas (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2006). Se ha observado una reducción de masa del hígado debido a la disminución de su actividad funcional al cesar la producción de lípidos como suele ocurrir durante la reproducción de los peces (Rojas-Herrera, 2001). En algunos estudios se han reportado una disminución en peso de hígado después de una exposición crónica, como ha sido el caso de la exposición de conejos a sulfúrico fluoruro, un plaguicida dañino (Cox, 1997) y ratones expuestos a cloruro de cadmio (Health Council of the Netherlands, 2000). También se encontró una ligera disminución en peso del hígado de ratones después de inyectarles extracto de *Microcystis* sp., sin presentar daños visibles en la superficie, pero vistos al microscopio mostraron degradación de hepatocitos y hemorragia, explicando que esto pudo ser la causa de la disminución en peso (García-Rodríguez *et al.*, 2002). Además, se ha mencionado que valores pequeños del índice hepatosomático en peces está relacionado a efectos de estrés, como se ha encontrado en peces expuestos a cadmio (Hutchinson y Manning, 1996), lo cual indicaría daño hepático ligado a muerte celular; mientras que valores altos del mismo índice están relacionados al efecto de contaminantes. Se ha encontrado un índice hepatosomático mayor en peces de aguas contaminadas que en peces de áreas menos contaminadas, como resultado de una hipertrofia acompañada de alta actividad enzimática en hígado (Slooff *et al.*, 1983; Shailaja y Rodrigues, 2003).

El hígado de los pargos pudo dañarse considerablemente por acción de las especies reactivas de oxígeno producidas por *C. polykrikoides*, como ocurre en las branquias (Taylor y Harrison, 2002), ya que se ha encontrado que este órgano es más sensible que otros a la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. De tal forma, que los tejidos han respondido, al estrés oxidativo, en un orden de hígado > músculo esquelético > músculo cardiaco (Baker *et al.*, 1997). Una respuesta similar se ha encontrado en la acumulación de xenobióticos lipofílicos (hígado >> branquias ≈ tracto digestivo > músculo) y se han asociado a la cantidad de lípidos en los órganos siguiendo la misma relación (García de la Parra *et al.* 2000).

IX. 2. 2. Enzima catalasa

La catalasa es una de las enzimas que contrarresta las especies reactivas de oxígeno (ROS) directamente, removiendo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es metabolizado a oxígeno molecular y agua. Por lo tanto esta enzima se sitúa dentro de la línea principal de lo que representa la defensa antioxidante enzimática de los organismos aeróbicos protegiéndolos de los daños que estas ROS puedan provocarles (Winston y Di Giulio, 1991; Bagnyukova *et al.*, 2005). En algunos experimentos, los peces expuestos a ciertos contaminantes orgánicos (PCBs, BKME o PAHs) han mostrado aumentos en la actividad de la catalasa hepática, sin embargo, también se han observado disminuciones de la actividad. En general, la catalasa puede presentar tanto inhibiciones como inducciones, las cuales dependen tanto de la especie de pez estudiada como del tipo de tóxico; por lo que es necesario hacer más investigaciones para elucidar el mecanismo de acción (van der Oost *et al.*, 2003).

Como ya se mencionó, *C. polykrikoides* produce especies reactivas de oxígeno y es uno de los factores que inducen la muerte de peces (Kim *et al.*, 1999). En este caso, la enzima catalasa de los pargos disminuyó al aumentar la concentración de células probablemente por la formación de ROS, ya que se ha encontrado que éstas provocan daños oxidativos en tejidos (Kappus y Sies, 1981; Halliwell y Gutteridge, 1984; en Winston y Di Giulio, 1991). Se ha reportado que *C. polykrikoides* produce ROS en concentraciones considerables ($\approx 1.2 \text{ nmol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} 10^4 \text{ cel}^{-1}$ y $\approx 0.55 \text{ nmol } O_2^- \text{ min}^{-1} 10^4 \text{ cel}^{-1}$) durante la fase exponencial de su crecimiento, resultado de los procesos metabólicos activos (Kim *et al.*, 1999). En este estudio, los bioensayos se realizaron al noveno día del cultivo durante el ciclo de luz, de modo que el dinoflagelado recién había pasado por su fase exponencial de crecimiento (día 0 a 8) y estaba iniciando un crecimiento desacelerado, condiciones adecuadas para su actividad, quienes contribuyeron considerablemente al efecto ictiotóxico del dinoflagelado observado por Kim *et al.* (1999), ya que encontraron que durante el ciclo de luz de un cultivo de *C. polykrikoides* (aislado de Corea) aumentó rápidamente la producción del anión superóxido (O_2^-).

Kim *et al.* (2002) encontraron concentraciones menores de H_2O_2 ($0.05 \text{ nmol min}^{-1} 10^4 \text{ cel}^{-1}$) y del anión superóxido en *C. polykrikoides* (aislado en Japón) comparadas a las reportadas por otros autores; sin embargo, una posible explicación puede ser el origen de las cepas, ya que una fue aislada en Corea y otra en Japón. A pesar de esto en ambos lugares ocurren fuertes eventos de marea roja provocados por este dinoflagelado teniendo como consecuencia un fuerte impacto económico por la gran mortandad de peces de cultivo (Onoue y Nozawa, 1989). En la presente

investigación no se cuantificó la producción de las ROS en *C. polykrikoides*, sin embargo, se encontró una disminución considerable en la actividad de la enzima catalasa en el hígado de los peces expuestos a 4×10^6 cel L⁻¹ (de 69.5 a 20.5 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$), por lo que es muy probable que el estrés oxidativo provocado por el dinoflagelado y reflejado a través de esta enzima, haya contribuido a la muerte de los peces.

La actividad de la catalasa en hígado de peces expuestos a contaminantes también ha resultado ser menor, como ha sido el caso del pez *Catostomus commersoni*, cuya actividad enzimática disminuyó de aproximadamente 240 a 150 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$ al estar expuesto a agroquímicos (Dorval *et al.*, 2005). En otros estudios se ha visto que la inhibición de la catalasa ha ocurrido como una respuesta para compensar el efecto de otras enzimas, ya que se ha observado que al aumentar la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa ocurre una disminución de la catalasa (Bagnyukova *et al.*, 2005).

IX. 2. 3. Peroxidación lipídica

Otro biomarcador que resulta efectivo para tratar de explicar la mortandad de los peces por exposición a *C. polykrikoides* es la peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica es una respuesta al estrés oxidativo, es decir, también es un daño que puede ser provocado por las ROS en las membranas biológicas y su presencia indica que ocurren cambios significativos en la función, estructura y organización enzimática de las membranas (Nebert y Gonzalez, 1987; Cecchini *et al.*, 1990; en Tagliari *et al.*, 2004).

Las ROS atacan fuertemente a los lípidos poliinsaturados de las membranas celulares, provocando una reacción en cadena que aumenta la producción de metabolitos secundarios incluyendo al malondialdehído (MDA), lo cual indica ocurrencia de peroxidación lipídica *in vivo* e *in vitro* (Halliwell y Gutteridge, 1999; en Tagliari *et al.*, 2004). Este MDA fue detectado en los pargos expuestos a la mayor concentración del dinoflagelado (4×10^6 cel L⁻¹); el mismo hígado de los peces en los que se midió la enzima catalasa fue útil para llevar a cabo la peroxidación lipídica, la cual resultó significativa solo en la mayor concentración del dinoflagelado, resultando en 18.662 (± 2.779) $\mu\text{moles MDA g peso húmedo}^{-1}$, mientras que en el resto de los tratamientos osciló entre 0.88 y 1.82 $\mu\text{moles MDA g peso húmedo}^{-1}$.

La peroxidación lipídica también se ha encontrado en las branquias de peces expuestos a *C. polykrikoides* (Kim *et al.*, 1999), y ha sido ligada a un aumento en la permeabilidad de solutos

de las membranas branquiales y esto a su vez está conectado a la hinchazón y lisis de las vesículas de dichas membranas; además, también ocurre una pérdida en la fluidez de la membrana, lo que puede contribuir a una disminución de actividades enzimáticas (Girotti, 1990; en Kim *et al.*, 1999).

Los biomarcadores como enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica generalmente son utilizados para detectar el estrés oxidativo provocado por contaminantes como plaguicidas, fertilizantes y metales, entre otros (Gravato *et al.*, 2006); sin embargo, en esta investigación se detectó que el estrés oxidativo en los pargos es provocado por los dinoflagelados, como ha sido propuesto por Kim *et al.* (1999).

IX. 2. 4. Polisacáridos

Uno de los mecanismos ictiotóxicos, propuestos por Kim *et al.* (2000) es la secreción de mucus de las branquias en peces expuestos a *C. polykrikoides*. Las células de las branquias son atacadas por las ROS, principalmente por el radical hidroxilo (OH•), produciendo daño oxidativo y estimulando la producción de mucus. Consecuentemente, esta secreción anormal impide un intercambio de agua y oxígeno a través de las branquias, provocando la muerte de los peces por asfixia (Marshall *et al.*, 2002).

En este estudio, el daño en las branquias de los pargos fue estimado por la cuantificación de polisacáridos en una solución de mucus, encontrando una relación proporcional a la concentración de *C. polykrikoides*, pero solo a partir de 2×10^6 cel L⁻¹. Se cree que el daño oxidativo ocurre cuando *C. polykrikoides* pasa a través de la lamela y las células branquiales son atacadas por las ROS que son producidas por el dinoflagelado (LaMont, 1989; en Kim *et al.*, 1999).

La producción de mucus también se ha observado en otras especies de peces cuando fueron expuestos a *C. polykrikoides*. Kim *et al.* (2001) encontraron que los peces expuestos durante 24 horas a este dinoflagelado con concentraciones mayores a 3×10^6 cel L⁻¹ mostraron una separación epitelial severa en las branquias, resultado de un edema en el epitelio secundario e interespacios en la primer lamela. Atribuyen este daño a las ROS producidas por el dinoflagelado, hecho que influyó en la mortandad de los peces. Kim *et al.* (2000) también encontraron un aumento en la secreción de polisacáridos en las branquias de peces expuestos a *C. polykrikoides*, mientras que Kobayashi (1989) encontró un aumento en la secreción de mucus

al exponer peces a la rafidofita *Chattonella* sp. Esta rafidofita también es productora de las ROS y en altas concentraciones provoca mortandad de peces por asfixia (Marshall *et al.*, 2002; Marshall *et al.*, 2003).

IX. 2. 5. Hemólisis

La detección y cuantificación de las sustancias ictiotóxicas producidas por algunas microalgas es un aspecto importante en el monitoreo marino. La hemólisis ha resultado ser una causa de ictiotoxicidad, sin embargo, la naturaleza química de las sustancias que la provocan y el consecuentemente mecanismo de acción, que es distinto entre las diversas especies, aún es desconocido (Eschbach *et al.*, 2001). Mediante un bioensayo que implica la lisis de eritrocitos y considerando la determinación fotométrica de la liberación de hemoglobina, es posible detectar y cuantificar la actividad hemolítica de extractos de organismos tóxicos.

C. polykrikoides (CPPV-1) puede provocar mortandad de peces a través de sustancias hemolíticas como ocurrió en este estudio, ya que la extracción en metanol presentó efectos hemolíticos en eritrocitos de *L. guttatus*; la concentración a la que este dinoflagelado provocó un 50% de hemólisis (HE_{50}) en dichos eritrocitos fue de 4.88×10^6 cel L^{-1} . Comparando esta actividad con otras especies de fitoplancton, *C. polykrikoides* parecer tener un mayor efecto hemolítico, ya que las primnesiofitas ictiotóxicas *Prymnesium parvum* y *Chrysochromulina polylepis* tuvieron una HE_{50} de 6.4×10^8 cel L^{-1} (Hagström y Granéli, 2005) y 5.4×10^{10} cel L^{-1} (Simonsen y Moestrup, 1997), respectivamente. Onoue y Nozawa (1989) también encontraron efectos hemolíticos en eritrocitos de borrego al ser expuestos al extracto de *Cochlodinium* tipo '78, y constataron la muerte de peces y daños en branquias al exponerlos a extractos hemolíticos de este dinoflagelado.

Las propiedades hemolíticas de *C. polykrikoides* se presume que son debidas a la presencia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), como el ácido docosahexaenoico (DHA = 22:6 n-3) y eicosapentaenoico (EPA = 20:5 n-3) según lo reportado por Lee (1996) quien encontró que este dinoflagelado está compuesto de estos ácidos en un 25.3 y 15.3%, respectivamente. Los ácidos grasos poliinsaturados también han sido identificados como agentes hemolíticos en el dinoflagelado *Gyrodinium aureolum*, compuesto por el ácido octadecapentaenoico (OPA) (Yasumoto *et al.*, 1990); así como también en la rafidofita *Chattonella marina*, compuesta por el ácido eicosapentaenoico (EPA) (Marshall *et al.*, 2003). Esta rafidofita produce ROS, como se ha encontrado también en *C. polykrikoides*; y se ha descrito, a

través de un modelo, que el EPA en presencia del superóxido (O_2^-) ocasiona la muerte del 50% en peces (LT_{50}) en 83 minutos, o lo que es equivalente a 1×10^6 cel L^{-1} de *Chattonella*, esto sugiere un efecto sinérgico entre las ROS y los ácidos grasos (Marshall *et al.*, 2003).

Los ácidos grasos poliinsaturados también se han encontrado en grandes cantidades en otras microalgas tóxicas; como en las rafidofitas *Heterosigma akashiwo* y *Chattonella antiqua*, quienes contienen al ácido eicosapentaenoico (EPA) en un 11-16% y 14%, respectivamente (Nichols *et al.*, 1987). El dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum* contiene a los ácidos eicosapentaenoico (12-14%) y docosahexaenoico (19-25%), los cuales aumentan entre la fase exponencial y la estacionaria, y están dentro de los ácidos grasos con una mayor proporción en el dinoflagelado (Hallegraeff *et al.*, 1991).

De forma natural los PUFA aumentan en cantidad en las membranas celulares como resultado de la disminución de la temperatura, es decir, actúan como un anticongelante de los lípidos de la membrana, de manera que si se aumenta la proporción de PUFA de manera no natural, se provocan daños a nivel de membrana (Brett y Müller-Navarra, 1997). También se cree que la actividad tóxica de los PUFA se debe a los productos de oxidación derivados de la fotooxidación o procesos metabólicos, como los hidroperóxidos y aldehídos (Rontani, 1998), los cuales han mostrado inhibición y mortalidad en invertebrados como *Artemia salina* (Caldwell *et al.*, 2003).

Se ha encontrado que las ROS también tienen cierto papel en la actividad hemolítica, ya que los eritrocitos son vulnerables al ataque de éstos debido a su alto contenido de lípidos insaturados y de hierro en la hemoglobina (Chiu *et al.*, 1982; en Santamaría *et al.*, 2002), por lo que experimentan hemólisis a través del estrés oxidativo. Apoyando lo anterior, Santamaría *et al.* (2002) encontraron actividad hemolítica y peroxidación lipídica en eritrocitos de ratón al exponerlos al extracto de una anémona productora de ROS, además la hemólisis fue menor en los tratamientos que contenían antioxidantes como GSH (glutación reducido) y DFA (desferrioxamina), los cuales inhibieron el efecto de las ROS.

Con base a los resultados obtenidos se comprobó el efecto ictiotóxico de la cepa *Cochlodinium polykrikoides* (CPPV-1) aislada de Bahía de La Paz, B.C.S.. El dinoflagelado mostró un efecto ictiotóxico en el pargo *Lutjanus guttatus*, al aumentar la concentración de exposición. *C. polykrikoides* inhibió la actividad de la enzima catalasa y provocó peroxidación lipídica en el hígado de los peces. También aumentó la producción de polisacáridos en las branquias y mostró propiedades hemolíticas.

X. CONCLUSIONES

- ⇒ La curva de crecimiento del dinoflagelado icctiotóxico *Cochlodinium polykrikoides* se conformó por cuatro fases: 1) Exponencial, 2) Crecimiento desacelerado, 3) Estacionaria y 4) Muerte. Durante la fase exponencial, con duración de ocho días, se presentó el mayor crecimiento del cultivo a una tasa de 0.39 divisiones día⁻¹, mientras que al término de la fase de crecimiento desacelerado (día trece) se alcanzó la máxima concentración con 9.4×10^6 cel L⁻¹.
- ⇒ El factor de condición de los pargos no reflejó algún efecto provocado por la exposición al dinoflagelado, mientras que el índice hepatosomático sí mostró respuesta al exponer los peces a partir de una concentración de 3×10^6 cel L⁻¹. Los pargos expuestos a 4×10^6 cel L⁻¹ reflejaron una disminución del índice hepatosomático del 57.3% respecto al grupo control.
- ⇒ La enzima antioxidante catalasa del hígado de los pargos resultó afectada a partir de una concentración de exposición al dinoflagelado de 2×10^6 cel L⁻¹, y fue fuertemente inhibida en un 70.5% al disminuir de 69.46 a 20.52 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$, de acuerdo a las comparaciones del grupo control y el tratamiento con 4×10^6 cel L⁻¹, respectivamente.
- ⇒ Además de la enzima catalasa, la peroxidación lipídica fue otro biomarcador que reflejó el estrés oxidativo provocado por los dinoflagelados en los pargos expuestos a una concentración del dinoflagelado de 4×10^6 cel L⁻¹.
- ⇒ La producción de polisacáridos en las branquias de los pargos aumentó a partir de una exposición al dinoflagelado de 2×10^6 cel L⁻¹, y se incrementó en un 57.3% al exponerlos a una concentración máxima de 4×10^6 cel L⁻¹.
- ⇒ *C. polykrikoides* mostró propiedades hemolíticas en eritrocitos de *L. guttatus* y de humanos, y las concentraciones con las que provocó un 50% de hemólisis (HE₅₀) fueron de 4.88 y 5.27×10^6 cel L⁻¹, respectivamente. Se encontró que una concentración del dinoflagelado de 1×10^6 cel L⁻¹ equivale a 1 μg saponina mL⁻¹.

⇒ El efecto letal provocado por *C. polykrikoides* en *L. guttatus* puede deberse al conjunto de daños, por efectos sinérgicos, que el dinoflagelado ocasiona en el pargo, como ocurrió al inhibir la actividad de la enzima catalasa y una peroxidación lipídica, así como también aumentar la producción de polisacáridos en branquias y poseer propiedades hemolíticas.

XI. RECOMENDACIONES

- ➔ En el presente trabajo se comprobó que a una concentración de 3×10^6 cel L⁻¹ *Cochlodinium polykrikoides* provoca la muerte de peces. Este resultado es de gran utilidad para aquellos desarrollos costeros como son los cultivos de peces. Por lo que es recomendable llevar a cabo un monitoreo del fitoplancton y estar alerta para tomar medidas de prevención cuando se encuentra presente este dinoflagelado, ya sea a estas o más altas concentraciones.
- ➔ La calidad de los reactivos para la preparación del medio de cultivo es clave para obtener buenos resultados en el cultivo del dinoflagelado *C. polykrikoides*. Se recomienda probar nuevamente con medio f/2 que en este caso no dio buenos resultados para el crecimiento del dinoflagelado debido probablemente al tiempo de almacenamiento de los reactivos. Cuando se procedió a preparar medio GSe con reactivos grado analítico y recientes, además de extracto de suelo no perturbado de mezquite, se logró producir mayores volúmenes del dinoflagelado.
- ➔ Para la toma de muestra de sangre de pez es indispensable que esté vivo pero suficientemente anestesiado con el fin de evitar los movimientos bruscos que éste pueda presentar y así facilitar el manejo de la jeringa y la toma de sangre. No fue posible obtener una muestra de sangre en peces pequeños, de aproximadamente 11 cm de longitud, por lo que se optó por obtenerla de pargos de mayor talla, aproximadamente de 25 cm de longitud.
- ➔ Los eritrocitos deben ser almacenados a 4°C por un tiempo máximo de una semana para evitar hemólisis, también deben ser agitados suavemente al menos cada dos días para evitar que se precipiten o coagulen.
- ➔ Se recomienda profundizar en el posible estrés oxidativo que *C. polykrikoides* provoca analizando, además de la catalasa, otras enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx), las cuales actúan sobre el anión superóxido y peróxido de hidrógeno, respectivamente. También se aconseja determinar la peroxidación lipídica en branquias de peces expuestos a este dinoflagelado.

- Es recomendable analizar el efecto que *C. polykrikoides* puede presentar sobre las enzimas transportadoras de iones en branquias, como la Na^+/K^+ -ATPasa y anhidrasa carbónica, las cuales forman parte del mecanismo de osmoregulación de los peces y que al verse afectadas pueden provocar daños fisiológicos que ocasionarán asfixia en los peces.
- Para apoyar y comprobar que la producción de mucus en los peces surge a partir de daños en el tejido branquial, se recomienda llevar a cabo cortes histológicos después de la exposición al dinoflagelado. Además, también sería de gran utilidad realizar cortes de tejido hepático para determinar el tipo de daño que provoca *C. polykrikoides* y probar el alto grado de afectación, como resultó en el presente estudio.
- También es recomendable aumentar el tamaño de muestra de peces a utilizar en cada bioensayo, de tal forma que se obtengan valores con desviaciones menores. Así como también se aconseja estudiar el efecto ictiotóxico de distintas cepas de *C. polykrikoides* sobre diferentes estadios de los peces.

XII. REFERENCIAS

- Aebi, H., 1974. Catalase. 673–677. En: Bregmeyer, H.U. (Ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York.
- Ahn, Y., Shanmugan, P., Ryu, J. y J. Jeong, 2006. Satellite detection of harmful algal bloom occurrences in Korean waters. *Harmful Algae*. 5(2) : 213-231
- Alonso-Rodríguez, R., Páez-Osuna, F. e I. Gárate-Lizárraga, 2004. El fitoplancton en la camaronicultura y larvicultura: Importancia de un buen manejo. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México y Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Sinaloa. México 147 pp.
- Alonso-Rodríguez, R., Núñez-Vázquez, E.J., Cordero-Tapia, A., Gárate-Lizárraga, I., Hiller, S. y J.L. Ochoa, 2006. Proliferación de *Microcystis aeruginosa* y la presencia de microcistinas en un lago artificial, Sinaloa, México. En: Resúmenes XIV Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Planctología, A. C. SOMPAC, Morelia, Michoacán del 31 de mayo al 3 de junio del 2006. Versión electrónica CD. 2 pp.
- Amezcu-Martínez, F., 2000. Distribution and biology of the order Pleuronectiformes in the North Irish Sea in relation to the sediment type. Tesis de doctorado. University of Liverpool, Liverpool. 294 pp.
- Anderson, R. O. y S. J. Gutreuter, 1983. Length, weight, and associated structural indices. 283-300. En: *Fisheries Techniques*. Nielsen L. A. y D. L. Johnson (Eds.). American Fisheries Society. Bethesda.
- Anderson, R.O. y R.M. Neumann, 1996. Length, Weight and Associated Structural Indices. 447-482. En: *Fisheries Techniques*. Segunda edición. Murphy, B.R. y D.W. Willis (Eds.). American Fisheries Society. USA. 732 pp.
- Baker, R.T.M., Martin, P. y S.J. Davies, 1997. Ingestion of sub-lethal levels of iron sulphate by African catfish affects growth and tissue lipid peroxidation. *Aquatic Toxicology*. 40 : 51-61.

- Bagnyukova, T.V., Vasykiv, O.Y., Storey, K.B., y V.I. Lushchak, 2005. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. *Brain Research*. 1052 : 180-186.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 : 248-254.
- Brett, M.T. y D.C. Müller-Navarra, 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. *Freshwater Biology*. 38 : 483-499.
- Bruslé, J., 1995. The Impact of Harmful Algal Blooms on Finfish: Mortality, Pathology and Toxicology. *Reperes Ocean*. No. 10. Ifremer publishing. 75 pp.
- Caldwell, G.S., Bentley, M.G. y P.J.W. Olive, 2003. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. *Toxicon*. 42 : 301-306.
- Cecchini, R., Aruoma, O.I. y B. Halliwell, 1990. Liposomes or from DNA damage by bleomycin or phenanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. *Free Radical Research Comms*. 10 : 245-258.
- Chiu, D., Lubin, B. y S.B. Shohet, 1982. Peroxidative reactions in red cell biology. En: *Free Radicals in Biology*. Vol. V. Pryor, W.A. (Ed.). Academic Press, New York.
- Cooke, J.B. y D.E. Hinton, 1999. Promotion by 17 β -estradiol and β -hexachlorocyclohexane of hepatocellular tumors in medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology*. 45(2-3) : 127-145.
- Cortés-Lara, M.C., Cortés-Altamirano, R. y A.P. Sierra Beltrán, 2004. Presencia de *Cochlodinium catenatum* (Gymnodiniales: Gymnodiniaceae) en mareas rojas de Bahía de Banderas, Pacífico mexicano. *Revista de Biología Tropical*. 52(2) : 11-13.
- Couillard, C.M., Williams, P.J., Courtenay, S.C. y G.P. Rawn, 1999. Histopathological evaluation of Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent. *Aquatic Toxicology*. 44(4) : 263-278.
- Cox, C., 1997. Sulfuryl fluoride. *Journal of pesticide reform*. 17(2) : 17-20.

- Daniel C. y F.S. Wood, 1980. Fitting equations to data. Second edition. John Wiley and Sons Publishing. USA. 458 pp.
- Deeds, J.R., Terlizzi, D.E., Adolf, J.E., Stoecker, D.K. y A.R. Place, 2002. Toxic activity from cultures of *Karlodinium micrum* (= *Gyrodinium galatheanum*) (Dinophyceae) – a dinoflagellate associated with fish mortalities in an estuarine aquaculture facility. *Harmful Algae*. 1 : 169-189.
- De Zwart, L.L., Merman, J.H.N., Commandeur, J.N.M. y N.P.E. Vermeulen, 1999. Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine*. 26(1/2) : 202-226.
- Diguseppi, J. e I. Fridovich, 1984. The toxicology of molecular oxygen. *CRC Critical Reviews in Toxicology*. 12 : 1103-1123.
- Doblin, M.A., Blackburn, S.I. y G.M. Hallegraeff, 1999. Comparative study of selenium requirements of three phytoplankton species: *Gymnodinium catenatum*, *Alexandrium minutum* (Dinophyta) and *Chaetoceros cf. tenuissimus* (Bacillariophyta). *Journal of Plankton Research*. 21(6) : 1153-1169.
- Dorval, J., Leblond, V., Deblois, C. y A. Hontela, 2005. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24(5) : 1273-1280.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y F. Smith, 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. 28(3) : 350-356.
- Emata, A.C. e I.G. Borlongan, 2003. A practical broodstock diet for the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture*. 225 (1-4) : 83-88.
- Emura, A., Matsuyama Y. y T. Oda, 2004. Evidence for the production of a novel proteinaceous hemolytic exotoxin by dinoflagellate *Alexandrium taylori*. *Harmful Algae*. 3(1) : 29-37.
- Eschbach, E., Scharsack, J.P., John, U. y L. K. Medlin, 2001. Improved erythrocyte lysis assay in microtitre plates for sensitive detection and efficient measurement of haemolytic compounds from ichthyotoxic algae. *Journal of applied toxicology*. 21 : 513-519.

- Esterbauer, H., Schaur, R.J. y H. Zollner, 1991. Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*. 11 : 81-128.
- Faust, M.A. y R.A. Gullede, 2002. Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. Smithsonian Institution. Contributions from the United States National Herbarium. Volume 42. Washington, DC. 144 pp.
- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P. y M.A. Reis-Henriques, 2005. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology*.71(1) : 39-48 .
- Förlin, L. y T. Andersson, 1985. Storage conditions of rainbow trout liver cytochrome P450 and conjugating enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 80B : 569-572.
- Frías-Espericueta, M.G., Osuna-López, J.I. y F. Páez-Osuna, 1999. Gonadal maturation and trace metals in the mangrove oyster *Crassostrea corteziensis*: seasonal variation. *The Science of the Total Environment*. 231 : 115-123.
- Frías-Espericueta, M.G., Osuna-López, J.I., Flores-Reyes, S., López-López, G. y G. Izaguirre-Fierro, 2005. Heavy metals in oyster *Crassostrea corteziensis* from Urias Lagoon, Mazatlán, México, associated to different anthropogenic discharges. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 74(5) : 996-1002.
- Fukuyo, Y., Takano, H., Chihara, M. y K. Matsuoka, 1990. Red Tide Organisms in Japan – An Illustrated Taxonomic Guide–. Uchida Rokakuho, Co. Ltd. Tokyo. 407 pp.
- Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J.J., Morquecho-Escamilla, L. y C. Lechuga-Déveze, 2000. First outbreak of *Cochlodinium polykrikoides* in the Gulf of California. The Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO In: Harmful Algae News. An IOC newsletter on toxic algae and algal blooms No. 21.
- Gárate-Lizárraga, I., López-Cortés, D.J., Bustillos-Guzmán, J.J. y F. Hernández-Sandoval, 2003. Blooms of *Cochlodinium polykrikoides* (Gymnodiniaceae) occurring in the Gulf of California, México. *Revista de Biología Tropical*. Floraciones Algales Nocivas en IOCARIBE. 51(6) : 1-7.

- García-de la Parra L.M., Porte C. y J. Albaigés, 2000. Organochlorinated Pollutants and Xenobiotic Metabolizing Enzymes in W. Mediterranean Mesopelagic Fish. *Marine Pollution Bulletin*. 40(9) : 764-768.
- García-Rodríguez, A., Isecke-Caetano, G.G., Bernardes-Borges, M. y C. de Ávila-Santos, 2002. First report of *Microcystis* toxicity in Goiás (Central Brazil). Evidence of hepatic damage in mice. The Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO In: Harmful Algae News. An IOC newsletter on toxic algae and algal blooms No. 23.
- Girotti, A.W., 1990. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. *Photochemistry and Photobiology*. 51 : 497-509.
- Granéli, E. y N. Johansson, 2003. Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P- deficient conditions. *Harmful Algae*. 2(2) : 135-145.
- Gravato, C., Teles, M., Oliveira, M. y M.A. Santos, 2006. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. –the influence of pre-exposure to β -naphthoflavone. *Chemosphere*. Article in press.
- Guillard, R.R.L., 1973. Division rates. 289-311. En: *Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements*. J. Stein (Ed). Cambridge University Press. Cambridge.
- Gutreuter, S. y W.M. Childress, 1990. Evaluation of Condition Indices for Estimation of Growth of Largemouth Bass and White Crappie. *North American Journal of Fisheries Management*. 10 : 434-441.
- Hagström, J.A., y E. Granéli, 2005. Removal of *Prymnesium parvum* (Haptophyceae) cells under different nutrient conditions by clay. *Harmful Algae*. 4 : 249-260.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*. 32(2) : 79-99.

- Hallegraeff, G.M., 2003. Harmful algal blooms: a global review. 25-49. En: Manual on harmful marine microalgae. Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. y A.D. Cembella (Eds.). UNESCO Publishing. France. 793 pp.
- Hallegraeff, G.M., Nichols, P.D, Volkman, J.K., Blackburn, S.I. y D.A. Everitt, 1991. Pigments, fatty acids and sterols of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. Journal of Phycology. 27 : 591-599.
- Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge, 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemical Journal. 219 : 1-14.
- Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge, 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Third edition. Oxford, New York.
- Health Council of the Netherlands: Committee for Compounds toxic to reproduction. Cadmium and its compounds; Evaluation of the effects in reproduction, recommendations for classification. The Hague: Health Council of the Netherlands, 2000. publication no. 2000/04OSH.
- Hinton, D.E., 1994. Cells, cellular responses, and their markers in chronic toxicity of fishes. 207-239. En: Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives. Malins, D.C. y G.K. Ostrander (Eds.). Lewis Publishers. 539 pp.
- Hutchinson, T.H. y M.J. Manning, 1996. Effect of *in vivo* cadmium exposure on the respiratory burst of marine fish (*Limanda limanda* L.) phagocytes. Marine Environmental Research. 41(4) : 327-342.
- Jeong, H.J., Yoo, Y.D., Kim, J.S., Kim, T.H., Kim, J.H., Kang, N.M. y W. Yih, 2004. Mixotrophy in the Phototrophic Harmful Alga *Cochlodinium polykrikoides* (Dinophyceae): Prey Species, the Effects of Prey Concentration, and Grazing Impact. Journal of Eukaryotic Microbiology. 51(5) : 563-569.
- Kappus, H. y H. Sies, 1981. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. Experientia. 37 : 1223-1241.

- Kim, H.G., 1998. *Cochlodinium polykrikoides* blooms in Korean coastal waters and their mitigation. 227-228. En: VIII International Conference on Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. y T Wyatt (Eds.). España. 635 pp.
- Kim, C. S., Lee, S.G., Lee, C.K., Kim, H.G. y J. Jung, 1999. Reactive oxygen species as causative agents in the ichthyotoxicity of the red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. Journal of Plankton Research. 21(11) : 2105-2115.
- Kim, C.S., Lee, S.G. y H.A. Kim, 2000. Biochemical responses of fish exposed to a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 254 : 131-141.
- Kim, C.S., Lee, S.G. y H.A. Kim, 2001. Ichthyotoxicity of a Harmful Dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. HAMM 2001 Abstracts.
- Kim, D., Oda, T., Muramatsu, T., Kim, D., Matsuyama, Y., Honjo, T., 2002. Possible factors responsible for the toxicity of *Cochlodinium polykrikoides*, a red tide phytoplankton. Comparative Biochemistry and Physiology (Part C). 132 : 415-423.
- Kim, D., Matsuyama, Y., Nagasoe, S., Yamaguchi, M., Ion., Y., Oshima, Y., Imada, N. y T. Honjo, 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). Journal of Plankton Research. 26(1) : 61-66.
- Kobayashi, H., 1989. Some aspects on the secretion of gill mucus in red sea bream *Pagrus major* exposed to the red tide. Nippon Suisan Gakkaishi. 55 : 553-557.
- LaMont, J.T., 1989. Oxygen radicals stimulate gallbladder glycoprotein secretion. 273-278. En: Mucus and Related Topics. Chantler, E., y N.A., Ratcliffe (Eds.). The Company of Biologists Ltd. Cambridge.
- Landsberg, J. H., 2002. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. Reviews in Fisheries Science. 10(2) : 113-390.

- Lee, J.S., 1996. Bioactive components from Red Tide Plankton, *Cochlodinium polykrikoides*. Journal of the Korean Fisheries Society. 29(2) : 165-173.
- Madrid-Vera, J., 1990. Ecología de algunas especies de peces de importancia comercial. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. 179 pp.
- Margalef, R., 1961. Hidrografía y fitoplancton de un área marina de la costa meridional de Puerto Rico. Investigación Pesquera 18: 76-78.
- Marshall, J. A., Nichols, P. D. y G. M. Hallegraeff, 2002. Chemotaxonomic survey of sterols and fatty acids in six marine raphidophyte algae. Journal of Applied Phycology. 14: 255–265.
- Marshall, J.A., Nichols, P.D., Hamilton, B., Lewis, R.J. y G.M. Hallegraeff, 2003. Ichthyotoxicity of *Chattonella marina* (Raphidophyceae) to damselfish (*Acanthochromis polycanthus*): the synergistic role of reactive oxygen species and free fatty acids. Harmful Algae. 2(4) : 273-281.
- Matta, J.L., 1995. Oxygen-derived free radicals as regulators of toxicity in the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. 469-474. En: Harmful Marine Algal Blooms. Lassus, P. Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P. y C. Marcaillou-Le Baut (Eds.). Lavoisier Publishing. France. 878 pp.
- Moestrup, O. (Ed.): IOC Taxonomic Reference List of Toxic Algae, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO; <http://ioc.unesco.org/hab/data.htm>. 2004.
- Morales-Blake, A. y D. Hernández-Becerril, 2000. Unusual HABs in Manzanillo Bay, Colima, México. The Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. En: Harmful Algal News. An IOC newsletter on toxic algae and algal blooms No. 22.
- Morquecho, L., A. Reyes-Salinas, D. T. Góngora-González y C. J. Band-Schmidt. 2004. Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, B. C. S. México.
(<http://www.cibnor.mx/colecciones/codimar/ecodimar.php>).
- National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. Environmental Health Perspective. 74 : 3-9.

- Nebert, D.W. y F.J. Gonzalez, 1987. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annual Review of Biochemistry*. 56, 945–993.
- Neely, T. y L. Campbell, 2005. A modified assay to determine hemolytic toxin variability among *Karenia* clones isolated from the Gulf of México. *Harmful Algae*. Article in press.
- Nichols, P.D., Volkman, J.K, Hallegraeff, G.M., y S. Blackburn, 1987. Sterols and fatty acids of the red tide flagellates *Heterosigma akashiwo* and *Chattonella antiqua* (Raphidophyceae). *Phytochemistry*. 26(9) : 2537-2541.
- Núñez-Vázquez, E.J., Heredia-Tapia, A., Pérez-Urbiola, J.C., Alonso-Rodríguez, R., Arellano-Blanco, J., Cordero-Tapia, A., Pérez-Linares, J. y Ochoa, J.L. 2003. Evaluation of dinoflagellate toxicity implicated in recent HAB events in the Gulf of California, México. En: *Proceedings HABTECH 2003 Workshop, 26th-30th Novembre, 2003*. Nelson, New Zealand. Cawthron Report No. 906. ISBN 0-476-00622-8. 90 pp.
- Ocampo-Gómez, G.L., 1992. Edad y crecimiento del pargo coyotillo *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869) en Caleta de Campos, Mich. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 40 pp.
- Onoue, Y. y K. Nozawa, 1988. Zinc-bound PSP toxins separated from *Cochlodinium* red tide. 359-366. En: *Mycotoxins and Phycotoxins. A Collection of Invited Papers Presented at the Seventh International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Tokyo, Japan*.
- Onoue, Y. y K. Nozawa, 1989. Separation of toxins from harmful red tides occurring along the coast of Kagoshima prefecture. 371-374. En: *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Okaichi, T., Anderson, D.M., Nemoto, T. (Eds). Elsevier, New.York. 489 pp.
- Pastor-Benito, S., 2002. Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Tesis de doctorado. Universitat Autònoma de Barcelona. Facultat de Ciències. Departament de Genètica i de Microbiologia. Grup de Mutagènesi. España. 211 pp.
http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1113103-151308//spb1de5.pdf

- Reguera, B., 2002. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. 19-54.
En: Sar, E.A., Ferrario, M.E. y B. Reguera (Eds). Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía. España. 311 pp.
- Rontani, F.F., 1998. Photodegradation of unsaturated fatty acids in senescent cells of phytoplankton: photoproduct structural identification and mechanistic aspects. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 114 : 37-44.
- Rojas-Herrera, A.A., 2001. Aspectos de dinámica de poblaciones del huachinango *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922) y del flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) (Pisces: Lutjanidae) del litoral de Guerrero, México. Tesis de doctorado. Universidad de Colima. México. 194 pp.
- Rowe, C.L., 2003. Growth responses of an estuarine fish exposed to mixed trace elements in sediments over a full life cycle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54 : 229-239.
- Ruiz, L.J., Torres, A., Méndez, E., Prieto, A.A. y S. Sant, 2003. Aspectos biométricos de *Sparisoma aurofrenatum* (Pisces: Scaridae) de un parche arrecifal del Parque Nacional Mochima, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, Venezuela*. 37(3).
- Santamaría, A., Sánchez-Rodríguez, J., Zugasti, A., Martínez, A., Galván-Arzate, S. y L. Segura-Puertas, 2002. A venom extract from the sea anemone *Bartholomea annulata* produces haemolysis and lipid peroxidation in mouse erythrocytes. *Toxicology*. 173 : 221-228.
- Santos, M.N., Gaspar, M.B. Vasconcelos P. y C.C. Monteiro, 2002. Weight-length relationships for 50 selected fish species of the Algarve coast (southern Portugal). *Fisheries Research*. 59 : 289-295.
- Saucedo-Lozano, M., 2000. Alimentación natural de juveniles de *Lutjanus peru* (Nichols y Murphy, 1922) y *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) (Lutjanidae: perciformes) en la costa de Jalisco y Colima, México. Tesis de maestría. Universidad de Colima. Colima. 68 pp.
- Scandalios, J.G., 2002. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*. 27(9) : 483-486.

- Shailaja, M.S. y A. Rodrigues, 2003. Nitrite-induced enhancement of toxicity of phenanthrene in fish and its implications for coastal waters. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 56(5-6) : 1107-1110.
- Schlenk, D., 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*. 39(1-12) : 48-53.
- Shumway, S. E., Allen, S. M. y P. D. Boersma, 2003. Marine birds and harmful algal blooms: sporadic victims or under-reported events? *Harmful Algae*. 2 : 1-17.
- Sierra-Beltrán, A., Palafox-Urbe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A. y J.L. Ochoa, 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, México: evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon*. 35(3) : 447-453.
- Silva, E.S., 1967. *Cochlodinium heterolobatum* n. sp.: Structure and some cytophysiological aspects. *Journal of Protozoology*. 14(4) : 745-754.
- Simonsen, S., y O. Moestrup, 1997. Toxicity tests in eight species of *Chrysochromulina* (Haptophyta). *Canadian Journal of Botany*. 75 : 129-136.
- Slooff, W., Kreijl, C.F. y A.J. Baars, 1983. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology*. 4(1) : 1-14.
- Soto-Ávila, C., 2004. Determinación de la edad y el crecimiento del pargo lunarejo *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) en la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa. 51 pp.
- Sournia, A., Chretiennot-Dinet, M.J. y M. Ricard, 1991. Marine phytoplankton: how many species in the world ocean? *Journal of Plankton Research*. 13 : 1093-1099.
- Steidinger, K. A., 1993. Some Taxonomic and Biologic Aspects of Toxic Dinoflagellates. 1-28. In: *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Ian R. Falconer (Ed). Academic Press. Great Britain. 224 pp.

- Steidinger, K.A. y K. Tangen, 1997. Dinoflagellates. 387-584. En: Identifying Marine Phytoplankton. Tomas, C.R. (Ed.). Academic Press. USA. 858 pp.
- Strange, R.J., 1996. Field examination of fishes. 433-446. En: Fisheries Techniques. Second edition. Murphy, B.R. y D.W. Willis (Eds.). American Fisheries Society. USA. 732 pp.
- Suárez, B. y L. Guzmán, 1998. Mareas rojas y toxinas marinas. Editorial Universitaria. Chile 77 pp.
- Tagliari, K.C., Ferrao, V.V.M., Zimiani, K. y R. Cecchini, 2004. Oxidative stress damage in the liver of fish and rats receiving an intraperitoneal injection of hexavalent chromium as evaluated by chemiluminescence. Environmental Toxicology and Pharmacology. 17 : 149-157.
- Taylor, F.J.R. y P.J. Harrison, 2002. Harmful algal blooms in western Canadian coastal waters. 77-88. En: Harmful algal blooms in the PICES region of the North Pacific. Taylor, F.J.R. y V.L. Trainer (Eds.). Secretariat Publisher. Canada. 152 pp.
- Taylor, F.J.R., Fukuyo, Y., Larsen, J. y G.M. Hallegraeff, 2003. Taxonomy of harmful dinoflagellates. 389-432. En: Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. y A.D. Cembella (Eds.). UNESCO Publishing. Francia. 793 pp.
- Treasurer, J.W., Hannah, F. y D. Cox, 2003. Impact of a phytoplankton bloom on mortalities and feeding response of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*, in west Scotland. Aquaculture. 218 : 103-113.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M y M. Scoullou, 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety 64 : 178-189.
- van der Oost, R., Beyer, J. y N.P.E. Vermeulen, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology. 13 : 57-149.

- Voltolina, D., Nieves, M., Navarro, G., Oliva, T. y D. Peraza, 1998. The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth. *Aquacultural Engineering*. 19 : 7-15.
- Webb, N.A. y C.M. Wood, 2000. Bioaccumulation and distribution of silver in four marine teleosts and two marine elasmobranchs: influence of exposure duration, concentration, and salinity. *Aquatic Toxicology*. 49(1-2) : 111-129.
- Whyte, J.N.C., Haigh, N., Ginther, N.G. y L.J. Keddy, 2001. First record of blooms of *Cochlodinium* sp. (Gymnodiales, Dinophyceae) causing mortality to aquacultured salmon on the west coast of Canada. *Phycologia*. 40(3) : 298-304.
- Widdows, J., 1994. Marine and Estuarine Invertebrate Toxicity tests. 145-166. En: *Handbook of Ecotoxicology*. Calow, P. (Ed.). Blackwell Science Editorial. Gran Bretaña. 885 pp.
- Winston, G.W. y R.T. Di Giulio, 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*. 19 : 137-161.
- Wright, J. L. C. y A.D. Cembella, 1998. Ecophysiology and Biosynthesis of Polyether Marine Biotoxins. 427-451 En: *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Anderson, D.M., A. D. Cembella, y G. M. Hallegraeff, (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. 662 pp.
- Yasumoto, T., Underdal, B., Aune, T., Hormazabal, V., Skulberg, O.M. y Y. Oshima, 1990. Screening for hemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polyepsis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters. 436-440. En: *Toxic Marine Phytoplankton*. Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L. y D.M. Anderson (Eds.). Elsevier. USA. 553 pp.
- Yuki, K. y S. Yoshimatsu, 1989. Two fish-killing species of *Cochlodinium* from Harima Nada, Seto Inland Sea, Japan. 451-454. En: *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Okaichi, T., Anderson, D.M., Nemoto, T. (Eds). Elsevier, New.York. 489 pp.
- Zar, J.H., 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall. USA. 718 pp.

Zelikoff, J.T., Wang, W., Islam, N., Twerdok, L.E., Curry, M., Beaman, J. y E. Flescher, 1996. Assays of reactive oxygen intermediates and antioxidant enzymes: potential biomarkers for predicting the effects of environmental pollution. 287-306. En: Techniques in Aquatic Toxicology. Ostrander, G.K. (Ed.). CRC Press. USA. 686 pp.