



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**Alteraciones en tejidos y concentración de toxinas producidas por**  
***Gymnodinium catenatum* en juveniles de camarón (*Litopenaeus vannamei*)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**B. A. ANA MARÍA GUADALUPE FLORES CHAVARRÍA**

**TUTORES PRINCIPALES:**

DR. JOSÉ JESÚS BUSTILLOS GUZMÁN  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

DRA. CARMEN RODRÍGUEZ JARAMILLO  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

**COMITÉ TUTOR:**

DRA. CHRISTINE J. BAND SCHMIDT  
IPN-CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
DR. DAVID J. LÓPEZ CORTÉS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.  
DR. ROBERTO RICO MARTÍNEZ  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

.. **CD. MX., ENERO, 2018**



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.



**Alteraciones en tejidos y concentración de toxinas producidas por  
*Gymnodinium catenatum* en juveniles de camarón (*Litopenaeus vannamei*)**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**B. A. ANA MARÍA GUADALUPE FLORES CHAVARRÍA**

**TUTORES PRINCIPALES:**

DR. JOSÉ JESÚS BUSTILLOS GUZMÁN  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

DRA. CARMEN RODRÍGUEZ JARAMILLO  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

**COMITÉ TUTOR:**

DRA. CHRISTINE J. BAND SCHMIDT  
IPN-CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
DR. DAVID J. LÓPEZ CORTÉS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.  
DR. ROBERTO RICO MARTÍNEZ  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

**MÉXICO, CD. MX., ENERO 2018**

## **DEDICATORIA**

A Dios por su Amor y compañía

y

A la memoria de mis padres

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, que me abrió las puertas para crecer profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo de la beca # 748032 que me permitió desarrollar el presente trabajo.

A la Red temática sobre Florecimientos Algales Nocivos (RedFAN), por el apoyo recibido.

Al proyecto Institucional PPAC del programa de planeación ambiental y conservación del CIBNOR y al Fordecyt 260040 de CONACyT.

A mi director de tesis el Dr. José Jesús Bustillos Guzmán por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo bajo su dirección, por su confianza y apoyo en lo personal y académico. Gracias por recibirme, por creer y confiar en mí sin conocerme, por todas sus enseñanzas.

Agradezco también de manera especial a mi Codirectora la Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo, muchísimas gracias por su confianza, apoyo, por darme ánimo, pero sobre todo por su amistad.

A la Dra. Christine J. Band Schmidt por su apoyo en todo momento, por su ayuda en el cultivo del dinoflagelado y en la parte experimental de este trabajo, muchas gracias por enseñarme a trabajar en equipo.

Al Dr. Francisco E. Hernández Sandoval por recibirme en su laboratorio, por su ayuda en el procesamiento y análisis de muestras, por su siempre disponibilidad para ayudarme en el desarrollo de este trabajo.

A los doctores David J. López Cortés y Roberto Rico Martínez por sus sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, S.C.), por permitirme realizar parte del presente trabajo en sus instalaciones.

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), por permitirme realizar la parte experimental en sus instalaciones.

Agradecimiento al M.C. Tanos Grayeb Del Álamo, por permitirme utilizar la sala de bioensayos y por su apoyo en la parte experimental de este trabajo.

A la Técnico Profesional en Acuicultura María Eulalia Meza Chávez por su valioso apoyo en la elaboración de los cortes histológicos.

A la empresa Blue Genetic México por la donación de los camarones utilizados en este trabajo.

A Margarita Cordero Ruíz por su asesoría, tiempo y dedicación en la gestión de documentos y también por su apoyo personal durante mi estancia en el ICMYL, UNAM, al personal del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología (Ciudad de México) y a Daniel Oviedo Juárez por las facilidades otorgadas en la biblioteca del ICMYL, UNAM.

A la M.C. Norma Ochoa, M.C. Manuel Legorreta, por el préstamo de material y equipo de trabajo, al Técnico Francisco E. Ramírez, Susana Luna García, Lic. Ana María Talamantes Cota y al Ing. Edgar Yuen Sánchez por su apoyo técnico.

A la Sra. Lucina Cárdenas y al Sr. Enrique Ortiz por su hospitalidad, confianza y apoyo. Muchas gracias.

Agradezco muy en especial a la familia Bustillos Moreno por su hospitalidad, por su apoyo, aprecio, confianza y sobre todo por hacerme sentir en familia.

Gracias a Ismael Torres Posada por su apoyo, tiempo y cariño. Muchas gracias por todo.

Agradezco a mi mejor amigo Daniel José Díaz Hernández, quien con su amistad, apoyo y cariño me ha acompañado en los momentos más difíciles y maravillosos de mi vida. Gracias por permitirme estar en tu vida y por estar siempre junto a mí.

Gracias por estar siempre, por tu cariño, apoyo, por creer y confiar en mí. Gracias por enseñarme a tener fe y esperanza. Este trabajo y el estar aquí no hubieran sido posibles sin ti.

# Índice General

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes .....	7
2.1 Morfología.....	8
2.2 Defensa ante agentes dañinos .....	8
2.3 Sistema nervioso central (SNC).....	13
2.4 Hepatopáncreas (HP) .....	13
2.4.1 Células B .....	14
2.4.2 Células F.....	14
2.5 Músculo.....	14
2.6 Branquias.....	15
2.7 Corazón .....	15
2.8 Intestino .....	16
2.9 Órgano linfoide.....	16
2.10 Glándula antenal.....	16
2.11 Microalgas.....	17
2.12 Toxinas paralizantes .....	19
2.13 Canales de sodio y toxinas PSP .....	21
2.14 Mecanismos de acción.....	24
2.15 <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	25
3. Justificación e importancia .....	28

<b>4. Preguntas de investigación e hipótesis .....</b>	<b>29</b>
<b>5. Objetivo General .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Objetivos particulares.....</b>	<b>29</b>
<b>6. Materiales y métodos .....</b>	<b>29</b>
<b>6.1 Cultivo de microalgas.....</b>	<b>29</b>
<b>6.2 Aclimatación de los camarones juveniles.....</b>	<b>30</b>
<b>6.3 Experimento .....</b>	<b>31</b>
<b>6.4 Análisis.....</b>	<b>32</b>
<b>6.4.1 Comportamiento .....</b>	<b>32</b>
<b>6.4.2 Tasa de ingesta de los dinoflagelados.....</b>	<b>32</b>
<b>6.4.3 Toxinas paralizantes .....</b>	<b>33</b>
<b>6.4.3.1 Extracción de toxinas de la cepa 62L de <i>G. catenatum</i> .....</b>	<b>33</b>
<b>6.4.3.2 Extracción de toxinas de tejidos de camarón.....</b>	<b>34</b>
<b>6.4.3.3 Análisis de toxinas paralizantes por HPLC-FLD.....</b>	<b>34</b>
<b>6.4.3.4 Análisis estadísticos de toxinas.....</b>	<b>36</b>
<b>6.5 Lesiones histopatológicas .....</b>	<b>37</b>
<b>6.5.1 Evaluación descriptiva, semi-cuantitativa y cuantitativa de leisones.....</b>	<b>38</b>
<b>6.5.1.1 Descriptiva .....</b>	<b>38</b>
<b>6.5.1.2 Semi-cuantitativa.....</b>	<b>38</b>
<b>6.5.1.3 Cuantitativa .....</b>	<b>39</b>

<b>6.5.2</b> Análisis estadísticos de variables histológicas cualitativas y cuantitativas .....	40
<b>7.</b> Resultados .....	41
<b>7.1</b> Supervivencia.....	41
<b>7.2</b> Comportamiento.....	41
<b>7.3</b> Perfil de toxinas de la cepa 62L de <i>G. catenatum</i> .....	42
<b>7.4</b> Toxinas en tejidos de camarón .....	43
<b>7.4.1</b> Tratamiento $10^4$ cél/L de <i>G. catenatum</i> .....	43
<b>7.4.1.1</b> Concentración de toxinas .....	43
<b>7.4.1.2</b> Concentración molar de toxinas.....	45
<b>7.4.2</b> Tratamiento $10^5$ cél/L de <i>G. catenatum</i> .....	47
<b>7.4.3</b> Tratamiento $10^6$ cél/L de <i>G. catenatum</i> .....	47
<b>7.4.3.1</b> Concentración de toxina .....	47
<b>7.4.3.2</b> Concentración molar.....	49
<b>7.5</b> Resultados histopatológicos.....	68
<b>7.5.1</b> Sistema nervioso .....	68
<b>7.5.2</b> Hepatopáncreas.....	56
<b>7.5.3</b> Músculo .....	60
<b>7.5.4</b> Branquias.....	63
<b>7.5.5</b> Órgano linfoide.....	65
<b>7.5.6</b> Glándula antenal.....	67

7.5.7 Corazón .....	68
7.6 Relación entre toxicidad y daños celulares .....	70
8. Discusión.....	71
8.1 Sobrevivencia.....	71
8.2 Ingesta del dinoflagelado tóxico .....	71
8.3 Efecto de la exposición a <i>G. catenatum</i> en el comportamiento de los camarones.....	72
8.4 Perfil de toxinas PSP en <i>G. catenatum</i> .....	74
8.5 Toxinas en tejidos de camarón.....	79
8.6 Daños histopatológicos producidos por toxinas PSP en tejidos .....	81
8.7 Posible efecto de PSP en el camarón .....	88
9. Conclusión.....	89
10. Bibliografía.....	92

## Indice de figuras

<b>Figura 1.</b> Vista lateral de la anatomía externa de ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	7
<b>Figura 2.</b> Representación de la apoptosis de una célula, con la formación de cuerpos apoptóticos endocitados por una célula saludable (tomado de Barraco, 2014).....	11
<b>Figura 3.</b> Proceso de autofagia en células humanas (tomado de Larsson y MasSucci, 2016).....	12
<b>Figura 4.</b> Necrosis (tomado y modificado de Monteiro <i>et al.</i> , 2016).....	13
<b>Figura 5.</b> Vista lateral de la anatomía interna de <i>Litopenaeus vannamei</i> . ....	
(*Posición aproximada del órgano).....	17
<b>Figura 6.</b> Estructura química de la Saxitoxina y análogos más comunes. En círculo rojo el grupo purina y en azul los grupos guanidina. Estos últimos grupos son fundamentales en la interacción con los canales de sodio. *Abreviaciones: STX saxitoxina; GTX gonyautoxina (tomado de Curick y Saylor, 2013).....	20
<b>Figura 7.</b> Esquematación de los procesos de transformación de las toxinas paralizantes en bivalvos marinos (A) 1. epimerización, 2. reducción, (B) 3. hidrólisis ácida, 4. hidrólisis enzimática por dinoflagelados. Cis, cisteína; GLH, glutatión; NeoSTX, neosaxitoxina; STX, saxitoxina; GTX, gonyautoxina; dc, decarbamoil. Cembella <i>et al.</i> , 1993, 1994; Oshima <i>et al.</i> , 1995a; Bricelj y Shumway, 1998 y Wiese <i>et al.</i> , 2010). ....	21
<b>Figura 8.</b> Estructura a nivel de subunidades del canal de sodio. Se muestran el arreglo de las subunidades alfa y beta 1 (peso molecular de 36 kD) y 2 (peso molecular de 33 kD) como una estructura transmembrana. Dado que la tetrodotoxina (TTX) y la toxina de los escorpiones (ScTX) se unen a la unidad alfa, estos se muestran en la figura y sirvieron como marcas moleculares para identificar y purificar los canales de sodio (Beneski y Catteral, 1980; Hartshorne <i>et al.</i> , 1982; Hartshorne	

y Catterall, 1984). A la izquierda se muestra la señal eléctrica de un canal purificado y estabilizado en una bicapa (Hartshorne *et al.*, 1985). S-S, enlace disulfónico. Los símbolos en anaranjado con una P, son las posibles zonas de fosforilación por quinasas (tomado de Caterall, 2014)... 22

**Figura 9.** Estructura primaria de la subunidad alfa del canal de sodio insertado en la membrana celular. Los cilindros representan los segmentos elípticos alfa y cada 6 de estos conforman un dominio (DI al DIV). Las P en círculos en rojo son sitios fosforilación (modulación). En verde se muestra la zona del poro y los círculos blancos son la parte externa (cuatro aminoácidos de ácido glutámicos) e interna (ácido aspártico-ácido glutámico-lisina-alanina) del filtro de selección de iones. Esta zona del canal es donde actúa la saxitoxina y la tetrodotoxina mientras que la toxina de escorpiones beta y alfa) actúan en el lazo 3 y 4 (tomado de Caterall, 2014) ... 23

**Figura 10.** Mecanismos de acción de toxinas PSP donde se muestra el bloqueo de los canales de sodio a nivel de membrana celular por las toxinas A) carbamatos y B) N-sulfocarbamatos (tomado de Hummert *et al.*, 2010). .... 24

**Figura 11.** Distribución de *G. catenatum* (tomado de Anderson *et al.*, 2012). ..... 26

**Figura 12.** Diagrama del bioensayo de la exposición de camarones juveniles a las toxinas PSP producidas por *G. catenatum*. .... 32

**Figura 13.** Esquema del equipo de HPLC-FLD Infinity 1260 II (se compone de una fase estacionaria y una fase móvil). .... 36

**Figura 14.** Peso (ng/g) de los análogos en la cepa 62L de *G. catenatum*. .... 43

**Figura 15.** Porcentaje molar de los análogos de la cepa 62L de *G. catenatum*. .... 43

**Figura 16.** Variación en el porcentaje molar de los diversos análogos de toxinas paralizantes en hepatopáncreas del tratamiento de  $10^4$  cél/L de *G. catenatum*. decarbamoil saxitoxina (dcSTX), decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO), gonyautoxina 2 y 3 (GTX 2 y 3), toxina tipo B1 (B1), toxina tipo B2 (B2), toxina tipo C2 (C2). La línea vertical en cada columna representa la desviación estándar... 46

**Figura 17.** (a, b, c y d). Concentración molar (%) de los diversos análogos agrupados de toxinas paralizantes hepatopáncreas (A), músculo (B), branquias (C) e intestino (D), en el tratamiento de  $10^4$  cél/L de *G. catenatum*. Los análogos agrupados son: GTX2 + 3 (GTX), decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO) + decarbamoil neosaxitoxina (dc), y toxina tipos B + C (B y C). La línea vertical representa la desviación estándar..... 47

**Figura 18.** Variación en el porcentaje molar de los diversos análogos de toxinas paralizantes en hepatopáncreas del tratamiento de  $10^6$  cél/L de *G. catenatum*. decarbamoil neosaxitoxina (dcSTX), decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO), gonyautoxina 2 y 3 (GTX 2 y 3), toxina tipo B 1 (B1), toxina tipo B2 (B2), toxina tipo C2 (C2). La línea vertical en cada columna representa la desviación estándar.... 50

**Figura 19.** (a, b, c y d). Concentración molar (%) de los diversos análogos agrupados de toxinas paralizantes en hepatopáncreas (A), músculo (B), branquias (C) e intestino (D) en el tratamiento de  $10^6$  cél/L de *G. catenatum*. Los análogos agrupados son: GTX2 + 3 (GTX), decarbamoil neosaxitoxina + decarbamoil neosaxitoxina (dc), y toxina tipos B + C (B y C). La línea vertical representa la desviación estándar. .... 51

**Figura 20.** Variación de la concentración molar de los diversos análogos agrupados de toxinas paralizantes en hepatopáncreas (A), músculo (B), branquias (C) e intestino (D) en las concentraciones  $10^4$  cél/L y  $10^6$  cél/L. Los análogos agrupados son: GTX2 + 3 (GTX), decarbamoil neosaxitoxina (dc), y toxina tipos B + C (ByC). ..... 52

**Figura 21.** Corte histológico transversal del ganglio supraesofágico de *L. vannamei* expuesto a células de *G. catenatum* A) Control, tejido del neuropilo normal; B) Concentración  $10^4$  cél/L, infiltración hemocítica (h); C) Concentración  $10^5$  cél/L, infiltración hemocítica (h); D) Concentración  $10^6$  cél/L, infiltración hemocítica (h). Tinción H&E (100×). ..... 54

**Figura 22.** Corte histológico transversal del cordón nervioso central compuesto por fibras sensoriales de *L. vannamei* expuesto a células de *G. catenatum* A) Control, fibras del tejido conectivo circumesofágico normales; B) Concentración  $10^4$  cél/L; edema (e); C) Concentración  $10^5$  cél/L; edema (e); D) Concentración  $10^6$  cél/L; edema (e). Tinción H&E (100×)..... 55

**Figura 23.** Corte histológico de ganglios supraesofágicos de *L. vannamei* expuesto a células de *G. catenatum*. A) Control, ganglio segmental normal, las células y cordón nervioso central que interconecta a los ganglios normales; B) Concentración  $10^4$  cél/L, normal; C) Concentración  $10^5$  cél/L, ruptura de conexión entre las células gigantes y el cordón nervioso ventral (r); D) Concentración  $10^6$  cél/L, edema (e), ruptura de conexión entre las células gigantes y el cordón nervioso central (r). Tinción H&E (100×)..... 56

**Figura 24.** Variación de los grados de necrosis (media  $\pm$  error estándar). Los datos fueron analizados usando la concentración de *G. catenatum* como factor, ( $p=0.000391$ ) y los grados de necrosis como variables dependientes en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ )..... 57

**Figura 25.** Variación de la altura celular para evaluar atrofia en células B (media  $\pm$  error estándar). Los datos fueron analizados usando la concentración de *G. catenatum* como factor, ( $p=0.000018$ ) y la altura de las células B como variables dependientes en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ )..... **¡Error! Marcador no definido.**

**Figura 26.** Variación de la altura celular para evaluar atrofia en células F (media  $\pm$  error estándar). Los datos fueron analizados usando la concentración de *G. catenatum* como factor, ( $p=0.000860$ ) y la altura de las células F como variables dependientes en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ )..... 58

**Figura 27.** Corte histológico de hepatopáncreas de *L. vannamei* A) Control, las células B que presentan una gran vacuola y las células F con su apariencia fibrosa; B) Concentración  $10^4$  cél/L; delaminación de túbulos (d), necrosis (n); C) Concentración  $10^5$  cél/L; atrofia (a), desprendimiento celular (dc), necrosis (n); D)

Concentración  $10^6$  cél/L; desprendimiento celular (dc), atrofia (a), necrosis (n).  
Tinción H&E (100×). ..... 59

**Figura 28.** Corte histológico de hepatopáncreas de *L. vannamei* A) Control, túbulos normales en forma de estrella; B) Concentración  $10^4$  cél/L; atrofia (a), desprendimiento celular (dc); C) Concentración  $10^5$  cél/L, atrofia (a), necrosis (n); D) Concentración  $10^6$  cél/L, atrofia (a), desprendimiento celular (dc), necrosis (n). Tinción H&E (100×). ..... 60

**Figura 29.** Variación del área de cobertura muscular (media  $\pm$  error estándar) usando la concentración de *G. catenatum* como factor, ( $p=0.000004$ ) y el área de cobertura como variable dependiente en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ ). ..... 61

**Figura 30.** Corte histológico transversal del músculo de *L. vannamei* A) Control, fibras organizadas dentro de los fascículos musculares; B) Concentración  $10^4$  cél/L, ligera atrofia de fascículos musculares (a); C) Concentración  $10^5$  cél/L, atrofia (a); D) Concentración  $10^6$  cél/L, grandes alteraciones al citoplasma, edema en los fascículos musculares (e), atrofia (a). Tinción H&E (100×). ..... 62

**Figura 31.** Corte histológico longitudinal del músculo de juveniles de *L. vannamei* A) Control, fascículos musculares normales; B) Concentración  $10^4$  cél/L, ruptura de los fascículos musculares (r); C) Concentración  $10^5$  cél/L, ruptura de los fascículos musculares (r); D) Concentración  $10^6$  cél/L, ruptura de los fascículos musculares (r) e infiltración hemocítica (h). Tinción H&E (100×).. ..... 63

**Figura 32.** Variación del área de cobertura de los filamentos branquiales (atrofia) (media  $\pm$  error estándar) utilizando la concentración de *G. catenatum* como factor, ( $p=0.005398$ ) y el área de cobertura como variable dependiente en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ ). ..... 64

**Figura 33.** Variación del número de filamentos branquiales fusionados (media  $\pm$  error estándar). Los datos fueron analizados usando la concentración de *G. catenatum* como factor, ( $p=0.000000$ ) y el número de filamentos como variables dependientes en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ ). ..... 64

**Figura 34.** Corte histológico de branquias de juveniles de *L. vannamei* A) Control, lamelas branquiales normales; B) Concentración  $10^4$  cél/L; fusión de lamelas (lf); C) Concentración  $10^5$  cél/L lamelas fusionadas (lf); D) Concentración  $10^6$  cél/L, mayor presencia de lamelas fusionadas (lf). Tinción H&E (100×)..... 65

**Figura 35.** Corte histológico del órgano linfoide de *L. vannamei* A) Control túbulos normales con lumen simple, una matriz estromal de senos intersticiales y de tejido conectivo fibroso; B) Concentración  $10^4$  cél/L, sin alteraciones; C) Concentración  $10^5$  cél/L; sin alteraciones; D) Concentración  $10^6$  cél/L. edema, pérdida del tejido (pt), perdida en la estructura de las células (pe). Tinción H&E (40×). ..... 66

**Figura 36.** Corte histológico de glándula antenal de juveniles de *L. vannamei* A) Control, células epiteliales normales; B) Concentración  $10^4$  cél/L, atrofia (a) y desprendimiento celular (dc); C) Concentración  $10^5$  cél/L, infiltración de hemocitos (ih); D) Concentración  $10^6$  cél/L, infiltración de hemocitos (ih) y descamación del epitelio (de). Tinción H&E (60×). ..... 68

**Figura 37.** Corte histológico del corazón de *L. vannamei* A) Control, órgano normal; B) Concentración  $10^4$  cél/L, pérdida de hemolinfa (ph), pérdida de masa muscular (pm); C) Concentración  $10^5$  cél/L, pérdida de hemolinfa (ph), pérdida de masa muscular (pm); D) Concentración  $10^6$  cél/L, pérdida de hemolinfa (ph), pérdida de masa muscular (pm). Tinción H&E (4×). ..... 69

**Figura 38.** Estructura de las toxinas paralizantes tipo benzoato y derivados de su hidrólisis por la actividad de enzimas carbamoilasas (Vale, 2008a). 78

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>L. vannamei</i> . .....	7
<b>Tabla 2.</b> Síndromes tóxicos en humanos y toxinas asociadas. Se presenta el límite máximo permitido establecido en la legislación sanitaria y especies productoras de estos metabolitos. Tomada y modificada de García-Mendoza <i>et al.</i> (2016). UR= Unidades ratón, dosis que mata a un ratón de 20 g en 15 min (Kodama <i>et al.</i> , 1990).. .....	18
<b>Tabla 3.</b> Guía general para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad al daño considerado para cada órgano (tomado de Lightner, 1996 y adaptado para el presente trabajo)... ..	38
<b>Tabla 4.</b> Supervivencia de los camarones expuestos a las concentraciones $10^4$ , $10^5$ y $10^6$ cél/L de <i>G. catenatum</i> . .....	41
<b>Tabla 5.</b> Concentración (ng/g) de los análogos de toxinas paralizantes en los diferentes tejidos analizados en el tratamiento de $10^4$ cél/L de <i>G. catenatum</i> . Decarbamoil saxitoxina (dcSTX), decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO), gonyautoxina 2 y 3 (GTX 2 y 3), toxina tipo B1 (B1), toxina tipo B2 (B2), toxina tipo C2 (C2). Desviación estándar en itálicas. ....	44
<b>Tabla 6.</b> Concentración total (ng/g) de toxinas paralizantes en los diferentes tejidos analizados en el tratamiento de $10^4$ cél/L de <i>G. catenatum</i> . Desviación estándar (Ds) .....	44
<b>Tabla 7.</b> Toxicidad total en nanogramos de saxitoxina equivalente por gramo (ng STXeq/g) en los diferentes tejidos analizados en el tratamiento de $10^4$ cél/L de <i>G. catenatum</i> . Desviación estándar (Ds).. ..	45
<b>Tabla 8.</b> Concentración (ng/g) de análogos de toxinas paralizantes en tejidos de camarón expuestos a $10^6$ cél/L de <i>G. catenatum</i> . decarbamoil saxitoxina (dcSTX),	

decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO), gonyautoxina 2 y 3 (GTX 2 y 3), toxina tipo B 1 (B1), toxina tipo B 2 (B2), toxina tipo C2 (C2). Desviación estándar en itálicas . 48

**Tabla 9.** Concentración total de toxinas paralizantes (ng/g) en tejidos de camarón expuestos a  $10^6$  cél/L de *G. catenatum*. Desviación estándar (Ds). ..... 48

**Tabla 10.** Toxicidad total en nanogramos de saxitoxina equivalente por gramo (ng STXeq/g) en los diferentes tejidos analizados en el tratamiento de  $10^6$  cél/L. de *G. catenatum*. Desviación estándar (Ds). ..... 49

**Tabla 11.** Grados de edema en el órgano linfoide en juveniles de camarón expuestos a *G. catenatum* ..... 66

**Tabla 12.** Grados de atrofia y de vacuolización en la glándula antenal... ..... 67

## Resumen

La industria de la camaronicultura se ha visto afectada por diversos agentes nocivos, dentro de los que se encuentran las toxinas paralizantes (PSP, por sus siglas en inglés) por consumo de mariscos asociadas a florecimientos algales nocivos, que actúan a nivel de la comunicación celular, bloqueando las señales de transmisión nerviosa. La información de las alteraciones que las PSP producen en los crustáceos es escasa, por lo que el presente trabajo se enfocó en determinar en qué tejidos se acumulan y cuáles son los daños que causan en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*). Para ello se expusieron camarones ( $2.6 \pm 0.1$  g) a concentraciones de  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  cél/L de *Gymnodinium catenatum*. A las 12 h los camarones fueron fijados con solución Davidson para análisis histopatológicos (54) y diseccionados para análisis de toxinas (126) separando el hepatopáncreas, el músculo, las branquias y el intestino. Las toxinas fueron determinadas por cromatografía líquida de alta precisión y detección por fluorescencia. El perfil de toxinas de *G. catenatum* (cepa 62L) estuvo integrado por los análogos GTX2, GTX3, dcSTX, dcNEO, dcGTX2, dcGTX3, B1 y C1 y C2. En los cortes histológicos se identificó la presencia de ruptura en la conexión entre las células gigantes y el cordón nervioso central y edema en el sistema nervioso central, en el corazón pérdida de miofibras cardíacas, en el músculo y en las branquias se observó atrofia, el hepatopáncreas presentó necrosis y fue el órgano que más acumuló toxinas PSP.

**Palabras claves:** Análisis histopatológicos, bioensayos, camaronicultura, *Gymnodinium catenatum*, toxinas paralizantes.

## **Abstract**

The industry of shrimp farming has been affected by various harmful agents, among which are the paralyzing toxins (PSP) for consumption of shellfish associated with harmful algal blooms, which act at the level of cellular communication blocking nerve transmission signals. The information of the alterations that the PSP produce in the crustaceans is scarce, reason why the present work focused in determining in which tissues they accumulate and the damages that are caused in juveniles of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), the shrimp ( $2.6 \pm 0.1$  g) were exposed to concentrations of  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  cell/L of *Gymnodinium catenatum*. At 12 h the shrimp were fixed with Davidson's solution for histopathological analysis (54) and the rest were dissected for analysis of toxins (126) separating the hepatopancreas, muscle, gills and intestines. The toxins were determined by high performance liquid chromatography and fluorescence detection (HPLC-FLD). The toxin profile of *G. catenatum* (strain 62L) was composed of the analogues GTX2, GTX3, dcSTX, dcNEO, dcGTX2, dcGTX3, B1 and C1 y C2. In the histological sections, the presence of rupture in the connection between the giant cells and the central nervous cord and edema in the central nervous system was identified, in the heart there was a loss of cardiac myofibers, atrophy was observed in the muscle and gills, the hepatopancreas presented necrosis and was the organ that accumulated the highest concentration of PSP toxins.

**Key words:** Histopathological analysis, bioassays, shrimp culture, *Gymnodinium catenatum*, paralyzing toxin.

## 1. Introducción

La producción camaronera mundial, tanto de captura como de cultivo, es de aproximadamente 6 millones de toneladas anuales, de las cuales entran en el mercado mundial alrededor del 60%, por lo que es el producto pesquero comercializado internacionalmente más importante (FAO, 2010), Es una industria que aporta considerables ingresos económicos a países en desarrollo o de bajos recursos (Rosenberry, 1998).

Dentro de los cinco productores a nivel mundial de camarón se encuentran China, Tailandia, Vietnam, Indonesia e India, en cuanto al continente americano los mayores productores son: Ecuador, México y Brasil (FAO, 2010) ubicándose nuestro país en el séptimo lugar de producción (SAGARPA, 2017).

En México para el año 2016, se registró una producción de 211,096 toneladas, siendo la segunda especie de importancia entre los productos pesqueros. Los líderes de la industria camaronícola son los estados de Sonora, Sinaloa, Baja California Sur, Nayarit y Tamaulipas (SAGARPA, 2017), en Baja California Sur por ejemplo se logró en el 2016 una producción de 6,278 toneladas (SAGARPA, 2017). Siendo las especies de camarón *Litopenaeus vannamei*, *Litopenaeus stylirostris* y *Farfantepenaeus californiensis* las que representan el mayor número de capturas en las costas mexicanas (FAO, 2015).

De acuerdo con SAGARPA (2017) en México hay 56 mil acuicultores operando 9 mil 230 granjas existentes en las 32 entidades del país, de las cuales mil 447 son utilizadas para el cultivo de camarón.

La camaronicultura tiene una relevancia económica en nuestro país, en el 2016 tuvo una producción de más de 317, 208 millones de dólares de captura y cultivo del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) (CONAPESCA, 2018), sin embargo, una de las limitantes del desarrollo de esta industria es la afectación de las zonas de captura y de los cultivos por parte de diversos agentes dañinos como virus,

bacterias, hongos y microalgas nocivas (Gómez-Gil *et al.*, 2001; Barraza-Guardado *et al.*, 2004).

Diversas especies de microalgas pueden llegar a ser nocivas debido a que producen toxinas y/o un crecimiento exponencial que puede dar lugar a un fenómeno conocido como Floraciones Algales Nocivas (FAN). Según el panel de expertos de la GEOHAB (Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms) un FAN es una proliferación de algas que puede causar mortalidad masiva de peces, contaminación de los mariscos con toxinas, y/o causar daño ecológico por anoxia o alteración del hábitat (GEOHAB, 2003). De acuerdo con Songhui y Hodgkiss (2004) y Lewitus *et al.* (2012), los FAN han incrementado su prevalencia, distribución geográfica y los impactos negativos que estos eventos provocan en los recursos acuáticos, en los últimos años al parecer están vinculados al cambio climático, la eutrofización y al comercio internacional interoceánico (Hallegraeff, 2015).

Los FAN además de causar impacto durante los florecimientos pueden provocar efectos negativos posteriores, como la alteración en la sucesión de especies del medio natural, depósito de materia orgánica en el fondo marino, alteración en la comunidad bentónica y acumulación de toxinas en organismos filtradores (Band-Schmidt *et al.*, 2011).

En diversas partes del mundo se han reportado FAN, causando daños en peces, aves, mamíferos marinos, tortugas, en la acuicultura, así como también afectaciones en la salud humana (Shumway, 1990; Gessner *et al.*, 1997; Landsberg, 2002; Barraza-Guardado *et al.*, 2004; Lehane, 2000; Van-Dolah, 2000; Leanne *et al.*, 2005; Pierce *et al.*, 2005; Pierce y Henry, 2008; Callejas *et al.*, 2015; Núñez-Vázquez *et al.*, 2016).

Richlen *et al.* (2010) reportaron los daños provocados por un FAN del *Margalefidinium polikrikoides* (= *Cochlodinium polikrikoides*) en el Golfo Pérsico y el Golfo de Omán que provocó mortandad de miles de toneladas de peces, afectaciones a los arrecifes de coral, afectaciones al turismo y pérdidas económicas debido al cierre de las plantas de desalinización en la región.

En el trabajo de Whyte (2001) se reportaron pérdidas aproximadamente de 2 millones de dólares debido a un FAN de *Cochlodinium* sp. provocando mortandades de peces en las costas de Vancouver de agosto a octubre de 1999.

Guo *et al.* (2014) señalan pérdidas por 364 millones de dólares provocados por afectaciones en las pesquerías y en seres humanos en China de 2008 a 2012, debido a floraciones nocivas de las especies: *Karenia mikimotoi*, *Cochlodinium geminatum* *Aureococcus anophagefferen* y *Prorocentrum donghaiense*.

En nuestro país se han reportado FAN en aguas interiores y en todas las costas como los trabajos de Aké-Castillo *et al.* 2012; Aké-Castillo *et al.* (2014) y Poot-Delgado (2016) quien realizó un análisis de las floraciones algales que se han presentado desde 1965 a 2014 en las aguas costeras de Campeche, México indicando como potencialmente tóxicas las especies: *Karenia brevis*, *Pyrodinium bahamense* var. *bahamense*, *Prorocentrum mexicanum*, *P. mínimum* y *Cylindrospermopsis cuspidis*.

Aké-Castillo y Poot-Delgado, 2016 indican a *Cylindrotheca closterium*, *Karenia brevis*, *Peridinium quadridentatum* var. *quadridentatum*, *Prorocentrum minimum*, *Pseudo-nitzschia* spp. y *Pyrodinium bahamense* var. *bahamense* como las especies que han formado FAN en el Golfo de México. De acuerdo con Magaña *et al.* (2003) esta especie ha provocado en la región mortandad de peces, problemas respiratorios en humanos y daños económicos en la zona.

Merino-Virgilio *et al.* (2014), reportaron las especies causantes de FAN en el periodo entre 2001-2003, que afectaron al ambiente y a la economía de los pescadores causando mortandad de peces, crustáceos y moluscos en la península de Yucatán. En el trabajo de Núñez-Vázquez *et al.*, 2016 se describen los FAN y las afectaciones que han provocado de 1996 a 2015 en el Golfo de México, señalando a la especie *K. Brevis* como la principal especie nociva en la región.

En cuanto al Pacífico mexicano los FAN también han provocado afectaciones que se han reportado en diversos trabajos como el realizado por Gárate-Lizárraga *et al.*

(2011) en el que se reporta la intoxicación de doce personas por consumir almeja cruda y cocida, la cual tuvo una toxicidad de 2541µg STXe<sub>q</sub> 100 g, ~30 veces superior al valor permitido para el consumo humano. Estos autores señalan que la toxicidad en estos moluscos fue asociada a *P. bahamense* var. *compressum* especie productora de toxinas paralizantes.

Las especies formadoras de FAN que se han reportado recurrentes en las costas del océano Pacífico mexicano son: *Margalefidinium* spp., *Pseudo-nitzschia* spp., *G. catenatum*, *Mesodinium rubrum*, *Lingulodinium polyedra*, *Ceratium divaricatum*, *Dinophysis* spp., *Alexandrium catenella*, *Ceratium teres*, *Prorocentrum micans* y *Noctiluca scintillans*; Cortés-Lara *et al.*, 2004; Cortés-Altamirano y Sierra-Beltrán, 2008; Quijano-Sheggia *et al.*, 2012; Gárate-Lizárraga, 2014; García-Mendoza *et al.*, 2016).

Las FAN han provocado daños a organismos en cultivo. Cortés-Altamirano y Licea-Duran (1999), señalan crecimiento lento, susceptibilidad a enfermedades virales y mortandad en cultivos de camarón expuestos a *Prorocentrum minimum* microalga productora de hepatotoxinas y toxinas diarreicas (Shimizu, 1987).

De acuerdo con Gárate-Lizárraga *et al.* (2016), *G. catenatum* y *P. bahamense* var. *compressum* han causado la mayoría de los FAN en la zona y han sido responsables de intoxicaciones y decesos humanos.

En cuanto al Golfo de California se han registrado más de 90 especies de diferentes grupos causantes de floraciones algales, de las cuales 36 especies son consideradas potencialmente nocivas (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2016). Siendo las especies que han provocado efectos nocivos: *Prorocentrum minimum*, *Akashiwo sanguinea*, *Chattonella subsalsa*, *Chattonella* sp., *Heterosigma akashiwo*, *Thalassiosira* sp., *Chaetoceros* spp., *Pseudo-nitzschia* spp. y *Schizotrix calcicola* (Gárate-Lizárraga y González-Armas, 2014; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2016).

Dentro de las especies formadoras de FAN se encuentra el dinoflagelado productor de toxinas paralizantes *G. catenatum* que han sido relacionado con diversas afectaciones en el ambiente, mortandades de organismos silvestres y en cultivo,

intoxicaciones en personas y pérdidas económicas (Mee *et al.*, 1986; Pérez-Camacho, 1989; Cortés-Altamirano *et al.*, 1997; Band-Schmidt *et al.*, 2010; Núñez-Vázquez *et al.*, 2011; García-Mendoza *et al.*, 2015).

Este dinoflagelado provocó en el alto Golfo de California en enero del 2015 el FAN considerado como el más impactante ocurrido en México, que provocó la muerte de más de 5,000 aves y 56 delfines que se alimentaron de sardinas que habían consumido el dinoflagelado toxico, cabe señalar que ese evento ocasionó veda en los cultivos de almeja generosa (importante industria de la región), disminuyendo drásticamente la comercialización del molusco y pérdidas de empleos (Cruz Aguirre, 2015; PROFEPA, 2015; García-Mendoza *et al.*, 2015).

En organismos en cultivo *G. catenatum* ha provocado el 100% de mortandades en larvas de camarón en los años 1997, 2001 y 2003(Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003), estos autores señalan que a pesar de la ausencia del dinoflagelado en las muestras analizadas del agua que se bombea al interior de los estanques las toxinas hidrosolubles puede ser las responsables de los daños ocurridos en los organismos en cultivo.

Por otra parte, también se ha probado la toxicidad de este dinoflagelado en condiciones de laboratorio exponiendo a postlarvas y juveniles de camarón donde se observó una mortalidad en tiempos relativamente cortos (horas) (Pérez-Linares, 2008; Pazos-Mandujano, 2012).

En la actualidad, no existe un análisis detallado de la presencia del dinoflagelado y su efecto cuantitativo de los daños en tejidos, ni de la acumulación diferencial de las toxinas en los tejidos de los organismos afectados. Debido a ello ha surgido el interés por conocer los efectos y daños que provoca *G. catenatum* en diferentes organismos: almejas (Estrada-Muñoz, 2005), copépodos (Palomares-García *et al.*, 2006), ostiones (Hernández-Sandoval *et al.*, 2009; Estrada-Muñoz *et al.*, 2010; López-Cuevas 2013) y camarones (Pérez-Linares *et al.*, 2009; Pazos-Mandujano, 2012).

Por lo cual el presente estudio está enfocado en determinar el efecto de diversas concentraciones de *G. catenatum* en la mortalidad de camarones juveniles, así como los daños y la acumulación diferencial de las toxinas paralizantes en diversos tejidos. Esperamos que estos resultados ayuden a entender los efectos de las toxinas paralizantes en el camarón y poder proponer un diagnóstico patológico a nivel tisular, que será de gran utilidad para los productores, ya que ayudará a determinar las causas de las mortalidades en el cultivo de camarón en presencia de un florecimiento algal de *G. catenatum* y con ello iniciar procesos para un mejor manejo ante esta problemática.

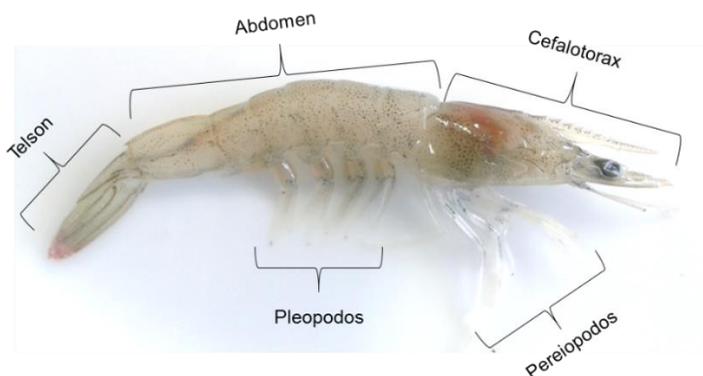
## 2. Antecedentes

De acuerdo con Pérez-Farfante y Kensley (1997), el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es un invertebrado marino que posee la clasificación taxonómica presentada en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *L. vannamei*.

Phylum	Arthropoda
Clase	Malacostraca
Orden	Decapoda
Suborden	Dendobranchiata
Superfamilia	Penacoidea
Familia	Penacidae
Género	<i>Litopenaeus</i>
Especie	<i>vannamei</i>

Este invertebrado es nativo de la costa oriental del océano Pacífico, con una distribución natural que abarca desde la costa este del océano Pacífico y el norte de México, hasta el norte de Perú (Jiang *et al.*, 2000; FAO, 2006).



**Figura 1.** Vista lateral de la anatomía externa de *Litopenaeus vannamei*.

## 2.1 Morfología

El cuerpo del camarón *Litopenaeus vannamei* pasa por varias etapas de desarrollo siendo su última metamorfosis en la fase de postlarva, su cuerpo a partir de esa fase es cilíndrico o comprimido lateralmente. El cuerpo del camarón se divide de manera general en tres partes. La primera parte es el cefalotórax que es la fusión de la cabeza y el tórax que se encuentra protegido por un caparazón y está formado de las siguientes secciones: rostrum, un par de ojos compuestos, una boca con mandíbulas, un par de anténulas, maxilas, maxilípedos y cinco pares de pereopodos (los tres primeros son quelados) que utiliza para desplazarse en el fondo, en esta parte del organismo se encuentran la mayoría de los órganos como estómago, molino gástrico, corazón, glándula antenal, hepatopáncreas. En la segunda parte se encuentran los segmentos abdominales, intestino, parte del sistema nervioso central, cinco pares de pleópodos de forma plana que utiliza para nadar (Nguyen Thi, 2012) y en la tercera parte se encuentra el telson y los uropodos (Figura 1).

## 2.2 Defensa ante agentes dañinos

La primera barrera protectora ante agentes nocivos es el exoesqueleto, compuesto principalmente de quitina (Söderhäll y Cerenius, 1992; Barracco *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando esta barrera se traspasa, se desencadenan una serie de reacciones inmunológicas con la finalidad de neutralizar y eliminar a los agentes invasores (Barracco *et al.*, 2014). La defensa ante agentes dañinos se inicia al reconocimiento del patógeno mediante proteínas de reconocimiento patrón que se producen en el camarón y son secretadas hacia el plasma o localizadas en la superficie de las células, esto a partir del contacto con el patógeno, a través de sus componentes y de antígenos ambientales que le indican al organismo la presencia de los agentes invasores (Barracco *et al.*, 2014). Al ser reconocidos estos agentes extraños los hemocitos migran al sitio de infección iniciando la fagocitosis del patógeno y/o la formación de nódulos y/o capsulas con la finalidad de neutralizarlos y eliminarlos (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Otro de los mecanismos de defensa en

los camarones ante agentes nocivos se encuentra en el tracto digestivo el cual está cubierto por una capa quitinosa que posee un ambiente ácido y lleno de enzimas y efectores antimicrobianos que son capaces de inactivar y digerir la mayoría de los microorganismos que no son parte de su microbiota natural (Soonthornchai *et al.*, 2010).

Los camarones poseen un sistema inmune innato, que a diferencia de los vertebrados no cuentan con una respuesta inmune específica (Zhen-Ming *et al.*, 2010), por lo tanto, al no tener un sistema inmunológico específico no se pueden emplear vacunas para la prevención de enfermedades (Berger, 2000).

Los principales sistemas de defensa reconocidos actualmente en los crustáceos son:

1.- Reconocimiento de lo no propio por proteínas de reconocimiento patrón y Dscam (immunoglobulinas que pueden ser expresadas por un patógeno) (Barracco *et al.*, 2014).

2.- Señalización y activación de los hemocitos (Iwanaga y Lee, 2005; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Söderhäll *et al.*, 2011).

3.- Respuestas inmunocelulares (fagocitosis, formación de capsulas y nódulos, infiltración y trampas extracelulares de ácidos nucleicos que son formadas por DNA, histonas y proteínas antimicrobianas) (Söderhäll *et al.*, 2011).

4.- Producción de moléculas antimicrobianas (especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y péptidos antimicrobianos) (Iwanaga y Lee, 2005; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006; Lemaitre y Hoffmann, 2007; Söderhäll *et al.*, 2011; Barracco *et al.*, 2014).

5.- Melanización mediada por el sistema de activación de la pro-fenoloxidasas (proPo) (Iwanaga y Lee, 2005; Söderhäll *et al.*, 2011; Barracco *et al.*, 2014).

6.- Defensas antivirales (citoxinas análogas e interferones, sistema RNA de interferencia, apoptosis y autofagia) (Iwanaga y Lee, 2005).

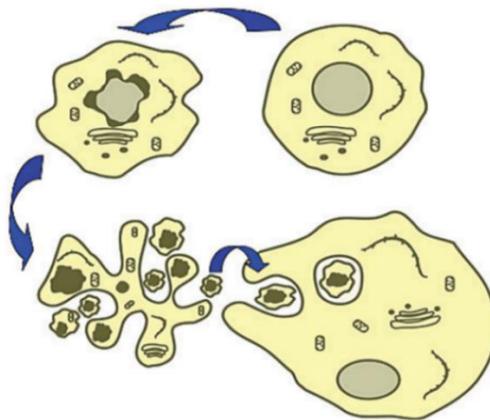
Es importante señalar que el sistema circulatorio en los camarones es abierto, lo que le permite a la hemolinfa (análogo de la sangre en los vertebrados) llegar directamente a todos los tejidos del organismo (Ruppert y Barner, 1996). La hemolinfa está constituida por una fracción celular representada por los hemocitos y por una líquida integrada por el plasma (Barracco *et al.*, 2014), a través de ella se transportan nutrientes, excretas, oxígeno, hormonas y todos los componentes del sistema inmunológico. Este líquido circulatorio contiene hemocianina, la proteína respiratoria en los crustáceos, que tiene un rol importante en la defensa ante patógenos, ya que al romperse puede generar fragmentos proteicos con actividad antimicrobiana, antifúngica y también participan en la melanización (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2001; Coates y Nairn, 2014). La melanización se activa después de una lesión o infección en los organismos y en la superficie de los agentes dañinos (Söderhäll *et al.*, 2011), liberando compuestos intermedios de fenol tóxico o melanina provocando la inmovilización y la muerte de agentes nocivos (Söderhäll y Cerenius, 1998).

En la hemolinfa se encuentran los hemocitos que son células sanguíneas que se producen y parcialmente se diferencian en el tejido hematopoyético antes de ser liberadas a la hemolinfa (Söderhäll *et al.*, 2011). Los hemocitos se rompen liberando una variedad de efectores inmunológicos en el plasma (Barracco *et al.*, 2014), participando en la reparación de heridas, esclerotización de la cutícula (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006), también actúan como inmunoefectores ante agentes nocivos, implicando la fagocitosis. De acuerdo con Barracco *et al.* (2014), es la primera línea de defensa celular contra la invasión de microorganismos en la formación de nódulos, encapsulación del patógeno y coagulación (Johansson y Söderhäll, 1989; Aguirre-Guzmán *et al.*, 2009).

La apoptosis es otro de los mecanismos que tiene implicaciones en la respuesta inmunológica en los camarones, ocurre en células alteradas y/o infectadas por patógenos intracelulares y/o por la toxicidad ambiental causada por diferentes contaminantes y tóxicos en vertebrados, así como en otros invertebrados (Franco *et al.*, 2009). Los cambios morfológicos que se presentan en las células durante la

apoptosis se presentan en la figura 2. La apoptosis se inicia como respuesta a diversos estímulos e incluye varias alteraciones morfológicas celulares, como el encogimiento celular, la condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo y del ADN, daño en la membrana, reducción en el tamaño de la célula y su fraccionamiento en pequeñas vesículas revestidas por membranas, llamados cuerpos apoptóticos que contienen material celular degradado y son fagocitados por endocitosis y fagocitosis por las células vecinas o por macrófagos (Barracco *et al.*, 2014). Este proceso fisiológico le permite al organismo eliminar células indeseables sin provocar una respuesta inflamatoria (Cristofolini *et al.*, 2010).

Uno de los métodos más utilizados para de detección de la apoptosis celular en los tejidos es la técnica de TUNEL (en inglés: Terminal dUTP Nick End-Labeling) (Rodríguez-Jaramillo, 2014). Con esta técnica se logra determinar la fragmentación de ADN en células individuales, lo cual nos permite conocer la proporción de las células que están muriendo por apoptosis en un momento dado (Alfaro-Moreno *et al.*, 2000).

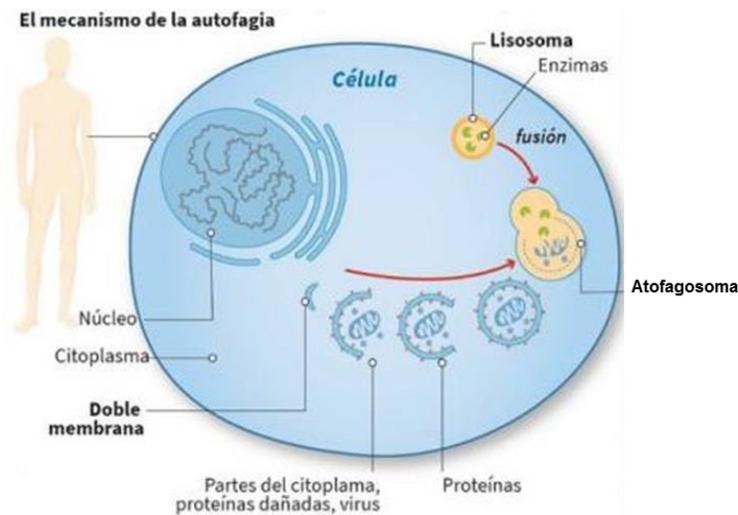


**Figura 2.** Representación de la apoptosis de una célula, con la formación de cuerpos apoptóticos endocitados por una célula saludable (tomado de Barracco, 2014).

Otro tipo de muerte celular es la autofagia que es un proceso de degradación intracelular, que además de mantener la homeostasis celular (Cuervo 2004), se presenta cuando hay carencia de nutrientes o factores estresantes en las células (Moore *et al.*, 2007). Permitiéndole a la célula eliminar componentes que han sido

dañados o que no sean necesarios y reutilizarlos para otras funciones. De acuerdo a Moore y colaboradores (2007), por medio de la autofagia se ayuda a mantener la integridad el organismo. En la autofagia los componentes citoplasmáticos de la célula se encapsulan dentro de los autofagosomas, los cuales pasan a los lisosomas fusionándose y liberando los componentes para su degradación y posteriormente ser liberados al citoplasma para su reutilización (Figura 3).

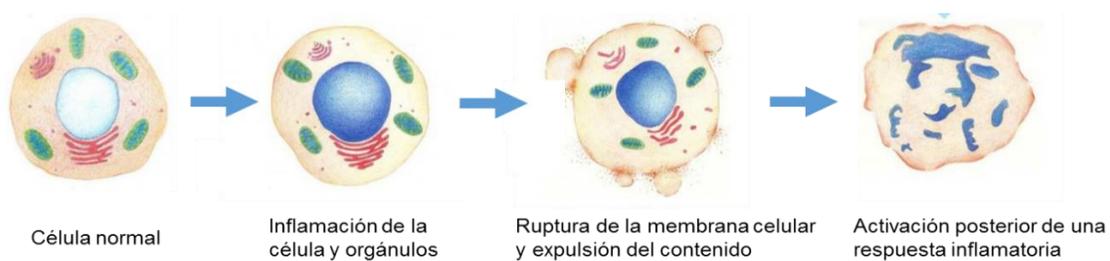
De acuerdo con Larsson y Massucci (2016), hay diversas formas de autofagia: la macrofagia que degrada grandes porciones del citoplasma y organelos celulares; la autofagia no selectiva que ocurre continuamente y se induce eficientemente en periodos de estrés; y la autofagia selectiva que se lleva a cabo en sustratos específicos, como agregados de proteínas y organelos citoplásmicos o virus invasores y bacterias.



**Figura 3.** Proceso de autofagia en células humanas (tomado de Larsson y Massucci, 2016).

Otra forma de muerte celular es la necrosis, que es el resultado de una lesión celular irreversible, este proceso inicia con el daño a la membrana celular (Buja *et al.*, 1993), de acuerdo con estos autores las alteraciones iniciales del metabolismo y de la homeostasis electrolítica son inducidas por un agente nocivo en la célula que pueden activar al menos cuatro vías principales que provocan la pérdida de la integridad de la membrana, la degradación de fosfolípidos, producción de lípidos

anfipáticos, daño al citoesqueleto y la generación de especies reactivas de oxígeno. De acuerdo con Buja y colaboradores (1993), los daños que se producen por la necrosis en el núcleo son inflamación (edema), picnosis (ligera condensación del ADN), cariorrexis (fragmentación, cuando presenta estructura cromatínica) y cariólisis (difuminación de la estructura cromatínica) (Figura 4).



**Figura 4.** Necrosis (tomado y modificado de Monteiro *et al.*, 2016).

### 2.3 Sistema nervioso central (SNC)

Se localiza en la parte posterior de la base de los apéndices anteriores de la cabeza, consiste de tres regiones, normalmente adyacentes unas de otras: un protocerebrum anterior, un deutocerebrum medio y un tritocerebrum posterior. Está formado por ganglios que se encuentran interconectados por un cordón nervioso central compuesto por fibras sensoriales y motoras, así como por interneuronas (Bell y Lightner, 1988).

### 2.4 Hepatopáncreas (HP)

Se encuentra en el cefalotórax, es una glándula conspicua y bilobulada, rodeada por tejido conectivo, la cual desemboca en el estómago pilórico está compuesto por túbulos simples, poseen un extremo ciego, limitados externamente por tejido conectivo (Cuartas *et al.*, 2002). Dentro de sus funciones se encuentra la asimilación de alimento que se realiza a través de una serie integrada de procesos, entre los que incluyen la secreción de enzimas digestivas, digestión y absorción de nutrientes, almacenamiento y disposición de productos de desecho (Cuartas *et al.*, 2002). De acuerdo con Vogt y colaboradores (1985), el hepatopáncreas es uno de los principales órganos que se pueden emplear para determinar el estado de salud

de organismos en cultivo. El análisis histopatológico del hepatopáncreas ha sido muy utilizado para el diagnóstico de enfermedades ayudando a la prevención y el tratamiento en condiciones controladas (Brock y LeaMaster, 1992; Lightner, 1993).

En el hepatopáncreas existen cuatro tipos de células: las células E (están relacionadas con actividad mitótica Franceschini-Vicentini, 2009, células R que absorben nutrientes del lumen, almacenan lípidos y glucógeno Souza y Petriella, 2000 y las células B y F que se describen a continuación.

#### 2.4.1 Células B

Se encuentran localizadas mayormente en la porción media y distal con menor frecuencia en la parte proximal de los túbulos. Son las células más grandes en el órgano, poseen una gran vacuola y un complejo apical de pequeñas vacuolas (Cuartas *et al.*, 2002; Franceschini-Vicentini, 2009). Estas células son responsables de la digestión intracelular (Franceschini-Vicentini *et al.*, 2009; Al-Mohanna y Nott, 1986).

#### 2.4.2 Células F

Son células fusiformes basófilas con citoplasma fibrilar. Están implicadas en la absorción de nutrientes en el proceso digestivo, concentran los materiales absorbidos en las vacuolas (Al-Mohanna y Nott, 1986, 1987), y secretan el contenido vacuolar al final del proceso digestivo (Souza y Petriella, 2000; Cuartas *et al.*, 2002).

De acuerdo con Gibson y Barker (1979) el hepatopáncreas es fundamental para la secreción y síntesis de enzimas digestivas, retención temporal de reservas y la absorción de nutrientes, así como su importante función en la desintoxicación y excreción de compuestos xenobióticos (Frías-Espéricueta *et al.*, 2008).

### 2.5 Músculo

El músculo abdominal esta formado por seis segmentos de masa muscular es la responsable del escape de los organismos ante depredadores al contraer los

músculos oblicuos causando flexión en el abdomen, la parte dorsal del abdomen extiende el telson y la parte transversal mantiene la forma del abdomen en la locomoción del camarón (Brock y Main, 1992; Alday-Sanz, 2010). De acuerdo con Buckup y colaboradores (2008) el músculo es el tejido donde principalmente se almacenan las proteínas, las cuales son la fuente primaria de energía en estos organismos (New, 1976).

## 2.6 Branquias

El aparato respiratorio de los camarones se encuentra formado por dendobranquias que se encuentran dentro de las cámaras branquiales localizadas en los lados laterales del cefalotórax. Por medio del movimiento de los pereopodos el agua es conducida hacia las dendobranquias donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso del bióxido de carbono que contiene la hemolinfa por el oxígeno que se encuentra en el agua y de ahí es conducido hacia el corazón para su distribución al resto del organismo. Otras de las funciones que se llevan a cabo en las branquias son la excreción, la osmoregulación y la fagocitosis (Brock y Main, 1992).

La estructura de las branquias consta de un eje central que se adhiere a la pared del cefalotórax a través de una estructura tubular, que a su vez se adhiere cerca de la terminación ventral del eje central. Las ramificaciones que salen del eje central son los filamentos primarios que se subdividen a su vez en filamentos secundarios. En cada división de la branquia se tienen los vasos adyacentes eferentes y aferentes (Bell y Lightner, 1988).

## 2.7 Corazón

El corazón está localizado en posición ventral a la cutícula cefalotorácica dorsal y la epidermis cuticular asociada, y en la parte dorso-posterior del hepatopáncreas. Se encuentra suspendido dentro del pericardio o cámara pericárdica, por varios ligamentos suspensorios que lo sujetan en varios puntos. El pericardio protector rodea al corazón, compuesto por tejido conectivo esponjoso especializado (Bell y Lightner, 1988). El corazón está formado por células miocárdicas dispuestas en

bandas, las cuales están organizadas en haces distintivos tales como el muscularis frontalis. El arreglo en haces del miocardio da como resultado que el lumen del corazón esté subdividido en subcámaras (Alday-Sanz, 2010). Los ostiolos que penetran el epicardio y el miocardio permiten que la hemolinfa pase del pericardio al lumen de las subcámaras del corazón.

## 2.8 Intestino

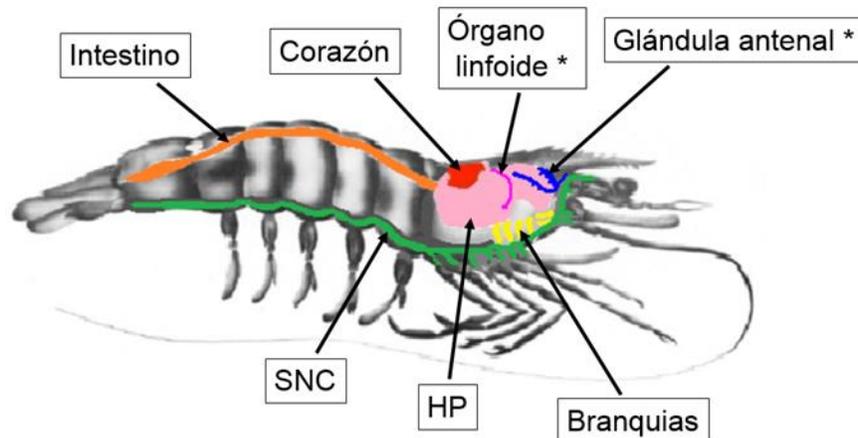
Se considera como un tubo interno que se divide en tres partes: intestino anterior, que es una estructura con funciones digestivas mecánicas y extracelulares; el intestino medio que regula los movimientos de lo ingerido dentro del hepatopáncreas donde se lleva a cabo la digestión; y el intestino posterior donde se realizan los movimientos peristálticos que sirven para expulsar las heces (Morales-Covarrubias, 2014).

## 2.9 Órgano linfoide

El órgano linfoide forma parte integral del sistema circulatorio. Este órgano está formado de dos lóbulos distintos cada uno localizado justo en posición ventro-lateral al empalme entre la cámara anterior y posterior del estómago. Los lóbulos consisten de una masa basofílica de túbulos anastomórficos, conectándose todos a través de un solo vaso, la arteria subgástrica, hacia la aorta anterior (Bell y Lightner, 1988). La función de este órgano es filtrar la hemolinfa y eliminar partículas patógenas circundantes (Alday-Sanz, 2010).

## 2.10 Glándula antenal

La glándula antenal es el sistema excretor de los camarones, su función es similar a los riñones en los vertebrados. Esta glándula elimina hacia el medio exterior sustancias de desecho, también participa en la regulación iónica y osmoreguladora del organismo. Está ubicada en la parte anterior al cefalotórax (Bell y Lightner, 1988), formada por un saco que recoge los compuestos a desechar que se abre al exterior a través de un orificio o nefridioporo situado junto a la base de las antenas del organismo.



**Figura 5.** Vista lateral de la anatomía interna de *Litopenaeus vannamei* (\*Posición aproximada del órgano).

## 2.11 Microalgas

Las microalgas constituyen la base de la cadena alimenticia, estos microorganismos son el principal alimento de especies como ostiones, almejas, también peces y crustáceos en sus primeras fases de desarrollo. Sin embargo, hay especies de microalgas que pueden causar daño a diversos organismos y al ambiente (Hallegraeff, 1993; Sar *et al.*, 2002; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2008; Belardi-Haftallaoni, 2008).

Dentro de las especies que provocan alteraciones se encuentran las que producen biotoxinas, que de acuerdo con Moestrup y colaboradores (2009), existen 154 especies de microalgas que las producen. Estas biotoxinas son utilizadas por las microalgas como mecanismos para combatir a depredadores, estrategia para obtener más espacio para su desarrollo o contra el crecimiento excesivo de otras especies (Botana *et al.*, 1996). Las biotoxinas pueden llegar a diversos organismos por diferentes vías:

- 1.- Al consumir a las microalgas que las producen.
- 2.- Cuando se encuentran disueltas en el medio acuático e ingresan vía epitelial.
- 3.- Por transferencia a través de la cadena alimenticia.

Estas toxinas se han clasificado de acuerdo a la especie que las origina y por los efectos o signos clínicos producidos en seres humanos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Síndromes tóxicos en humanos y toxinas asociadas. Se presenta el límite máximo permitido establecido en la legislación sanitaria y especies productoras de estos metabolitos. Tomada y modificada de García-Mendoza *et al.* (2016). UR=Unidades ratón, dosis que mata a un ratón de 20 g en 15 min (Kodama *et al.*, 1990).

Síndrome	Especie	Toxina	Límite máximo permitido	Efectos en el ser humano
Intoxicación paralizante por consumo de mariscos	<i>Alexandrium</i> spp., <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i>	Saxitoxina y análogos	800 µg STX eq/kg	Entumecimiento de cara, cuello, manos, náuseas y muerte por paro respiratorio.
Intoxicación amnésica por consumo de mariscos	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Ácido domoico	20 mg/kg	Vómito, diarrea y calambres, desorientación, vértigo, confusión y pérdida temporal de la memoria.
Intoxicación diarreica por consumo de mariscos	<i>Dinophysis</i> spp. y <i>Prorocentrum</i> spp.	Ácido okadaico y dinofisistoxinas	160 µg AOeq/kg	Diarrea, náuseas, vómito, la exposición crónica promueve la formación de tumores en el sistema digestivo.
Intoxicación neurotóxica por consumo de mariscos	<i>Karenia brevis</i>	Brevetoxinas	20 UR/100 g	Escalofríos, dolor de cabeza, debilidad muscular y muerte por paro respiratorio.
Intoxicación con azaspirácidos por consumo de mariscos	<i>Azadinium</i> spp.	Azaspirácidos	160 µg/kg	
Ciguatera	<i>Gambierdiscus</i> spp.	Ciguatoxinas	25 UR/100 g	Entumecimiento y temblor de las manos y pies, vómito y en casos extremos, muerte por fallas respiratorias.
No identificado	<i>Gonyaulax spinifera</i> , <i>Proceratium reticulatum</i> , <i>Lingulodinium polyedrum</i>	Yesotoxinas	1 mg/kg	

Cada uno de los tipos de toxina incluye varios análogos y el límite máximo permitido de acuerdo con el Código Estándar para el Manejo de Moluscos Bivalvos Vivos y Congelados (CODEX STAND 292-2008, rev. 2015), se expresa como un nivel de referencia para cada una de ellas (JOINTFAO/WHOO, 2016).

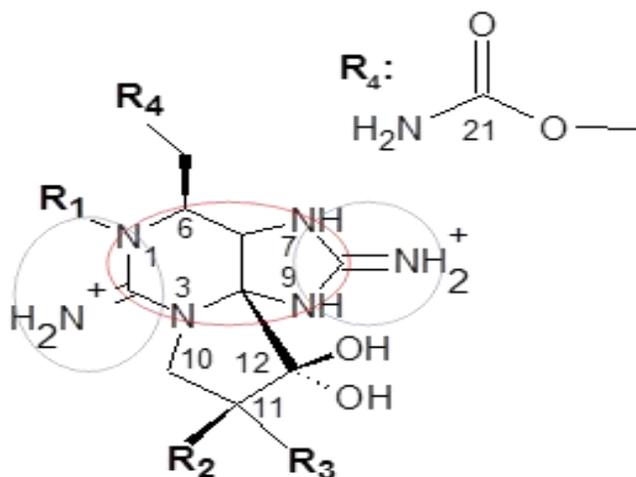
## 2.12 Toxinas paralizantes

Las toxinas paralizantes (PSP), son un grupo de alcaloides neurotóxicos naturales conformadas por la saxitoxina (STX) y 57 análogos (Wiese *et al.*, 2010). Son producidas en el medio marino por dinoflagelados del género *Alexandrium*, *P. bahamense* y *G. catenatum*; y en aguas dulces por las cianobacterias de los géneros *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Aphanozymenon*, *Planktothrix* y *Lyngbia* (Wiese *et al.*, 2010; Cusick y Sayler, 2013). Estas toxinas son solubles en agua y termoestables en pH ácido (Komada y Ogata, 2008). Pueden clasificarse estructuralmente en: análogos hidrofóbicos no sulfatados, mono-sulfatados, disulfatados, decarbamioilados y cada uno presenta diferentes niveles de toxicidad (Wiese *et al.*, 2010). En la figura 6 se muestra la estructura de la saxitoxina y los análogos producidos por dinoflagelados marinos de acuerdo con Curick y Sayler (2013).

La cinética y biotransformación de toxinas paralizantes por moluscos se resumen en las revisiones hechas por Cembella *et al.* (1993 y 1994), Oshima (1995a) y Bricelj y Shumway (1998). Dentro de los procesos de biotransformación de las toxinas paralizantes en bivalvos se pueden destacar principalmente los siguientes cuatro procesos:

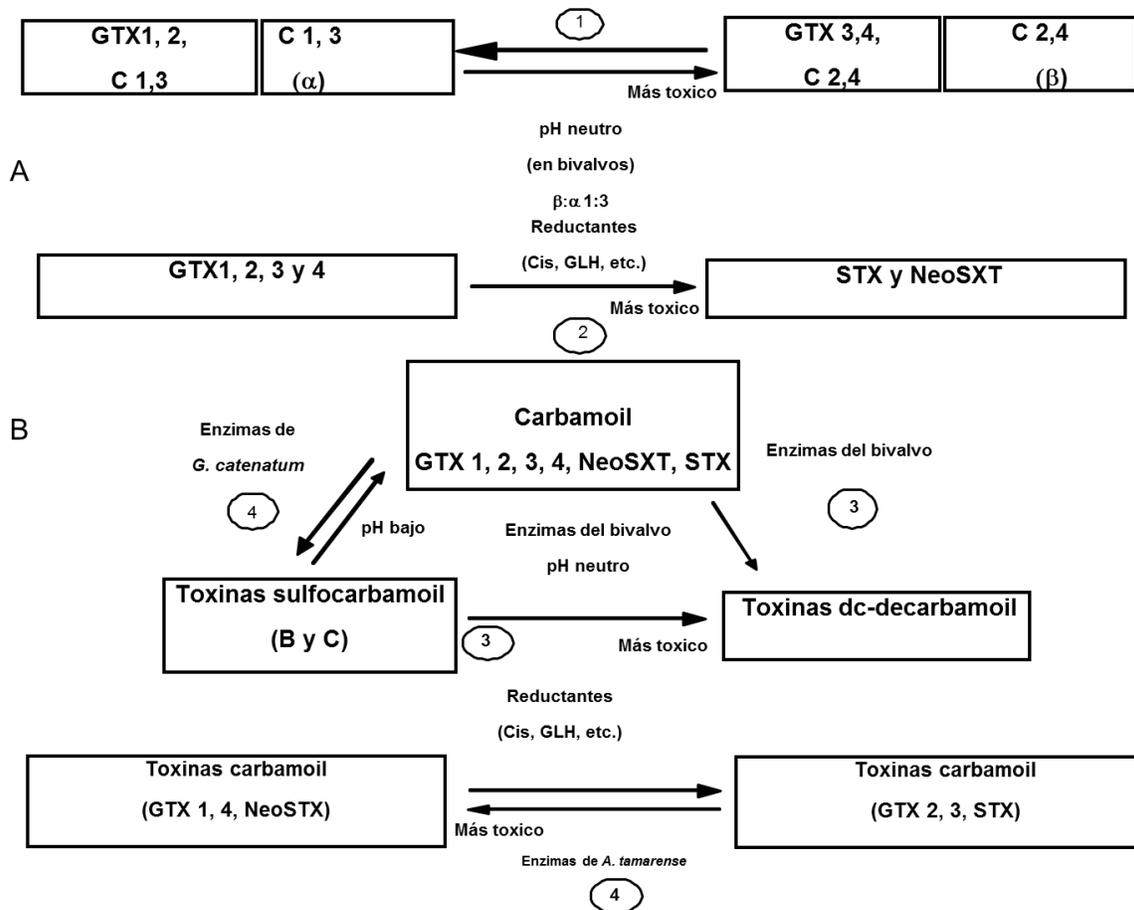
- 1) Epimerización de toxinas sulfocarbamoil (cambio de posición de los grupos R3 y 4), resultando en un equilibrio del grupo  $\alpha$  (toxinas C1 y C3) y  $\beta$  (toxinas C2 y C4) en una proporción de 1:3 en moluscos.
- 2) Proceso de reducción por reductantes dentro del sistema digestivo como la cisteína y el glutatión, donde se transforman las gonyautoxinas a STX y neoSTX.

- 3) Pérdida del grupo carbamato y sulfocarbamato por acción de enzimas del molusco ó,
- 4) Pérdida del dinoflagelado resultando en un incremento de toxinas decarbamatadas (Figura 7).



Division	Name <sup>a</sup>	R1	R2	R3	R4
Carbamate	STX	H	H	H	OCONH <sub>2</sub>
	NeoSTX	OH	H	H	OCONH <sub>2</sub>
	GTX1	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OCONH <sub>2</sub>
	GTX2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OCONH <sub>2</sub>
	GTX3	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCONH <sub>2</sub>
	GTX4	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCONH <sub>2</sub>
	GTX5 (B1)	H	H	H	OCONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	GTX6 (B2)	OH	H	H	OCONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<i>N</i> -sulfocarbamoyl	C1	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OCONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	C2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	C3	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OCONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	C4	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OCONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Decarbamoyl	dcSTX	H	H	H	OH
	dcNeoSTX	OH	H	H	OH
	dcGTX1	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OH
	dcGTX2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OH
	dcGTX3	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH
	dcGTX4	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH
Deoxydecarbamoyl	doSTX	H	H	H	H
	doGTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H
	doGTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H

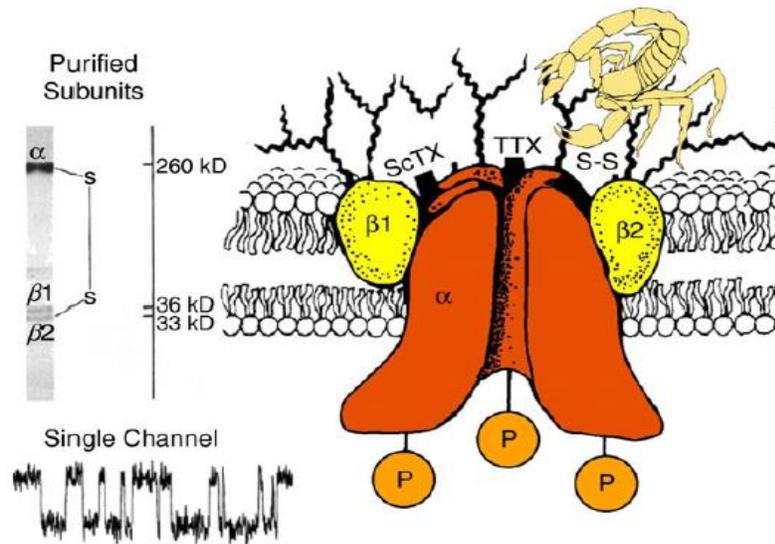
**Figura 6.** Estructura química de la saxitoxina y análogos más comunes. En el círculo rojo se encuentra el grupo purina y en el círculo azul los grupos guanidina. Estos últimos grupos son fundamentales en la interacción con los canales de sodio. <sup>a</sup>Abreviaciones: STX saxitoxina; GTX gonyautoxina (tomado de Curick y Sayler, 2013).



**Figura 7.** Esquematación de los procesos de transformación de las toxinas paralizantes en moluscos bivalvos marinos (A) 1. epimerización, 2. reducción, (B) 3. hidrólisis ácida, 4. hidrólisis enzimática por dinoflagelados. Cis, cisteína; GLH, glutatión; NeoSTX, neosaxitoxina; STX, saxitoxina; GTX, gonyauotoxina; dc, decarbamoil (Cembella *et al.*, 1993, 1994; Oshima *et al.*, 1995a; Bricelj y Shumway, 1998 y Wiese *et al.*, 2010).

## 2.13 Canales de sodio y toxinas PSP

El canal de sodio tiene una estructura compuesta por tres subunidades denominadas alfa, beta 1 y beta 2 (Figura 8). La estructura funcional corresponde

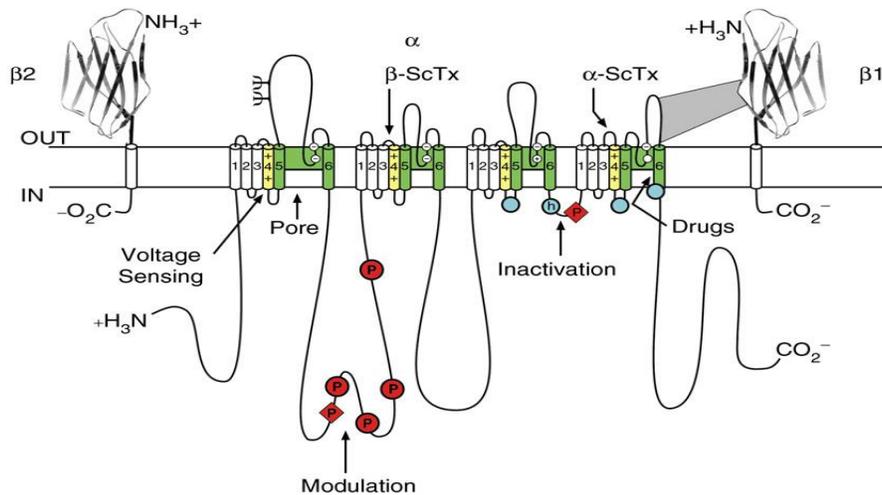


**Figura 8.** Estructura a nivel de subunidades del canal de sodio. Se muestran el arreglo de las subunidades alfa y beta 1 (peso molecular de 36 kD) y 2 (peso molecular de 33 kD) como una estructura transmembrana. Dado que la tetrodotoxina (TTX) y la toxina de los escorpiones (ScTX) se unen a la unidad alfa, estos se muestran en la figura y sirvieron como marcas moleculares para identificar y purificar los canales de sodio (Beneski y Catteral, 1980; Hartshorne *et al.*, 1982; Hartshorne y Catteral, 1984). A la izquierda se muestra la señal eléctrica de un canal purificado y estabilizado en una bicapa (Hartshorne *et al.*, 1985). S-S, enlace disulfónico. Los símbolos en anaranjado con una P, son las posibles zonas de fosforilación por quinasas (tomado de Caterall, 2014).

a la subunidad alfa mientras que las betas sirven como estructuras de adhesión a la membrana y como moduladores de la cinética y los procesos voltaje-dependientes de activación y desactivación (Isom *et al.*, 1992, 1995; Srinivasan *et al.*, 1998; Malhotra *et al.*, 2000; Ratcliffe *et al.*, 2000, 2001; Kazarinova-Noyes *et al.*, 2001; Brackenbury e Isom, 2011).

Para el caso de la estructura primaria, la subunidad alfa, está se compone de aproximadamente unos 2000 aminoácidos organizados en 4 dominios homólogos y cada uno contienen seis segmentos transmembránicos (Figura 9). Los dominios están conectados por "lazos" (loops en inglés), de aminoácidos siendo los lazos que unen los segmentos 5 y 6 de cada dominio los que son responsables de la selectividad del ion y por lo tanto de permitir u obstruir su ingreso al citoplasma. El

segmento de inactivación ("cerrado del canal"), en contraparte, está ubicado entre el dominio III - segmento 6 y el dominio V segmento 1.

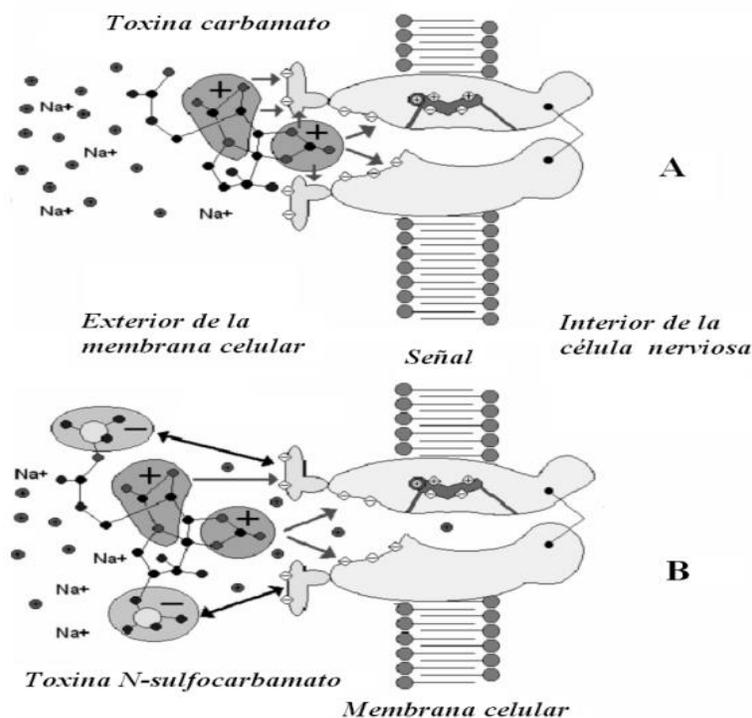


**Figura 9.** Estructura primaria de la subunidad alfa del canal de sodio insertado en la membrana celular. Los cilindros representan los segmentos elípticos alfa y cada 6 de estos conforman un dominio (DI al DIV). Las P en círculos en rojo son sitios fosforilación (modulación). En verde se muestra la zona del poro y los círculos blancos son la parte externa (4 aminoácidos de ácido glutámicos) e interna (ácido aspártico-ácido glutámico-lisina-alanina) del filtro de selección de iones. Esta zona del canal es donde actúa la saxitoxina y la tetrodotoxina mientras que la toxina de escorpiones beta y alfa) actúan en el lazo 3 y 4 (tomado de Caterall, 2014).

La estructura química base de las toxinas paralizantes presenta un par de guanidinas que son muy importantes en su electro funcionalidad y por lo tanto en su afinidad por los canales de sodio (Figura 10). Este par de guanidinas le dan un carácter eléctrico positivo y por lo tanto de mayor afinidad hacia los canales (caso de la saxitoxina). Sin embargo, la presencia de uno (caso de las gonyautoxinas) o dos grupos sulfatados (caso de las toxinas tipo B y C), de carácter negativo, pueden provocar una tendencia a eléctricamente neutralizar la molécula y con esto una disminución importante de la afinidad a los canales de sodio y por lo tanto del posible efecto en el organismo. Esto se ve reflejado claramente en los factores de toxicidad relativos (FTR) ya que considerando a la molécula madre como un FTR de la unidad, las gonyautoxinas y las de tipo B y C tienen un FTR de aproximadamente un 50% y 1% menor, respectivamente (Oshima, 1995a,b).

## 2.14 Mecanismos de acción

El mecanismo principal de acción de las toxinas PSP es alterar específicamente el transporte del ion sodio debido a su capacidad de unirse a la proteína de la membrana denominada canal de sodio. Los canales de sodio están regulados por voltaje y la interacción de los grupos guanidino de la STX cargados positivamente con los grupos cargados negativamente en el sitio 1 del canal de sodio inhibe la conductancia del canal y la transmisión de potenciales de acción eléctrica generados por la influencia de iones de sodio en la célula. De esta manera bloquean el poro del canal e inhiben las señales eléctricas, llevando a la muerte por parálisis respiratoria (Wiese *et al.*, 2010; Cusick y Sayler, 2013; Botana *et al.*, 2017) (figura 10). Además de bloquear a los canales de sodio, la saxitoxina también interactúa con los canales de calcio y potasio controlados por voltaje (Cusick y Sayler, 2013).



**Figura 10.** Mecanismos de acción de toxinas PSP donde se muestra el bloqueo de los canales de sodio a nivel de membrana celular por las toxinas A) carbamatos y B) N-sulfocarbamatos (tomado de Hernández-Orozco y Gárate-Lizárraga, 2006).

## 2.15 *Gymnodinium catenatum*

De acuerdo con Moestrup *et al.* (2009), el grupo de los dinoflagelados posee 87 especies dañinas y dentro de este grupo se encuentra el dinoflagelado desnudo *G. catenatum* descrito a partir de una muestra colectada en un florecimiento algal en el norte del Golfo de California por H. W. Graham en 1943.

Este dinoflagelado posee un surco que se describe como una espiral en descenso, la cual es desfasada 1/5 del largo de la célula, el sulcus se extiende desde el punto antapical hasta el ápice, la cual está rodeada por un anillo semicircular apical. Las células contienen numerosos cloroplastos pirenoides conspicuos, los núcleos están situados en la parte central de la célula. Las células individuales miden de 34 a 65 µm de largo y de 27 a 43 µm de ancho; las células en cadenas miden de 23 a 60 µm de largo y de 27 a 43 µm de ancho, y el tamaño de las células terminales es similar a las células individuales (Taylor *et al.*, 2003).

*G. catenatum* se ha reportado en Tasmania (McMinn *et al.*, 1997); en el Atlántico (Fraga *et al.*, 1988); Corea (Park *et al.*, 2004); Mar Caribe (Barbera-Sánchez *et al.*, 2004); Hong Kong (Songhui y Hodgkiss 2004); sureste del Océano Índico (Rahardjo-Sidharta y Ahyadi, 2007); Pacífico suroriental (Vargas-Montero *et al.*, 2008) y Pacífico Norte (Band-Schmidt *et al.*, 2010), entre otras zonas.

Este dinoflagelado es productor de toxinas PSP, del que actualmente se conocen más de 50 análogos de saxitoxina (JOINT FAO/WHO, 2016). En México *G. catenatum* se ha reportado desde el Golfo de California hasta las costas del estado de Oaxaca (Cortés-Altamirano *et al.*, 1995; Ronsón-Paulín, 1999; López-Cortés *et al.*, 2011) en el Golfo de México (Licea *et al.*, 2013; Zamudio *et al.*, 2013; Poot-Delgado, 2016). Es abundante en los meses de marzo y abril, usualmente cuando hay un aumento de nutrientes y en aguas con temperaturas entre 18 y 25°C y salinidades entre 26 y 30 ups (Band-Schmidt *et al.*, 2004, 2010), ha presentado un aumento en las costas del Pacífico mexicano y ha formado florecimientos algales en el Golfo de California (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004; 2006; Band-Schmidt *et al.*, 2005).



**Figura 11.** Distribución de *G. catenatum* (tomada de Anderson *et al.*, 2012)

En diversas partes del mundo, así como en nuestro país se han registrado afectaciones relacionadas con la presencia de toxinas PSP como el trabajo realizado por Mee *et al.* (1986), en el que reportan casos de intoxicación, el deceso de tres personas por consumo de mariscos contaminados con *G. catenatum* y la muerte de más de 400 peces en Sinaloa. En el trabajo de Saldate-Castañeda y colaboradores (1991), reportan 99 intoxicados y la muerte de tres de ellas por el consumo de moluscos en las costas de Oaxaca, siendo las especies *Gonyaulax catenella* y *G. catenatum* las de mayor presencia.

En el trabajo realizado por Martin *et al.* (2006) determinaron la presencia de las toxinas PSP en salmones, en langostas y moluscos (*Mytilus edulis*) de la bahía de Fundy en Canadá durante un florecimiento de *Alexandrium fundyense* (dinoflagelado productor de toxinas paralizantes, encontrando en el tejido de moluscos concentraciones de 180,000 µg STXeq/kg de tejido cantidad por encima del máximo permisible), para consumo humano (800 µg de STXeq/kg de tejido), por encima del máximo permisible para consumo humano (Sobrino-Figueroa y Mudespacher-Ziehl, 2009; Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-005-SSA 1-2001, de Salud Ambiental).

En un estudio realizado por Sephton y colaboradores (2007) en la bahía de Fundy, Canadá, determinaron la presencia de una floración algal del dinoflagelado productor de toxinas PSP (*Alexandrium fundyense*) con una densidad mayor a  $3 \times 10^5$  cél/L, la cual se relacionó con la mortandad de salmones (*Salmo salar*) en cultivo, los cuales presentaron niveles menores de  $4 \mu\text{gSXTeq}/100 \text{ g}$  en peso húmedo, estos autores señalan que las toxinas PSP son letales para estos organismos.

En el trabajo realizado por Fuentes y colaboradores (2008) en los fiordos del norte de la Región de Aysén en Chile reportaron siete intoxicaciones humanas y un deceso. Además de comportamiento inusual en salmones en cultivos, daño en las branquias y mortandad causadas por un florecimiento de *Alexandrium catenella* especie productora de toxinas PSP.

Pérez-Linares y colaboradores (2009), realizaron exposiciones agudas (48 h) y crónicas (45 días) en camarones determinando que todas las postlarvas expuestas a una densidad de  $10^6$  cél/L de *G. catenatum* murieron a las 6 horas de exposición y al exponer a los camarones a una concentración de  $10^4$  cél/L se presentó el 100% de mortalidad a las 17 h. En la exposición crónica de postlarvas y adultos de camarón hubo una mortalidad del 42%, además de que se detectaron toxinas paralizantes en todos los tejidos comestibles del camarón y se reportaron daños como: lisis en las células del hepatopáncreas, disminución de la densidad en las fibras cardíacas y células gliales deterioradas.

Pazos-Mandujano en el 2012, realizó un trabajo con postlarvas de camarón exponiéndolas a siete concentraciones de *G. catenatum* que variaron de  $5 \times 10^5$  a  $2 \times 10^6$  cél/L, encontrando una mortalidad del 100% en los camarones expuestos a la concentración más alta del dinoflagelado después de 24 h de exposición a las toxinas PSP.

Núñez-Vázquez y colaboradores en el 2013, evaluaron la toxicidad de cinco especies de botetes de los géneros *Sporoides* y *Lagocephalus* del litoral de Campeche. Determinando la presencia de toxinas PSP (decarbomoil gonyautoxina-

2, 3, gonyautoxina-2 y 3, neosaxitoxina y saxitoxina: dcGTX2, dcGTX3, GTX2, GTX3, NeoSTX y STX) en los botetes *L. laevigatus* y *S. maculatus*.

En un florecimiento en el 2015 en la zona sur de San Felipe a Puertecitos en el Golfo de California, se identificó a *G. catenatum* en concentraciones de 20,000 células/L que ha sido considerado como el florecimiento más intenso y perjudicial de la historia en nuestro país. Durante este evento se reportó la muerte de más de 17 mil aves y 300 delfines después de consumir sardinias que a su vez se alimentaron de *G. catenatum* (Cruz-Aguirre, 2015).

### 3. Justificación e importancia

Las toxinas PSP han ocasionado daños a diversos organismos en el medio natural como en organismos en cultivo, en seres humanos y en la economía de la región en diferentes partes del mundo Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna 2003; Sephton *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2008; Núñez-Vázquez *et al.*, 2011, reportándose pérdidas totales en la producción camaronícola debido a la falta de personal capacitado para la identificación de las especies que las producen y por el desconocimiento de que las toxinas paralizantes son hidrosolubles, y pueden encontrarse de manera disuelta en el medio acuático e intoxicar a los organismos.

Debido a lo anterior el presente estudio está enfocado en la determinación de las alteraciones y la concentración de las toxinas producidas por *G. catenatum* en diversos tejidos de camarones juveniles.

Este trabajo ayudará a entender los efectos de las PSP en el camarón y ayudará a proponer un diagnóstico patológico a nivel tisular, que será de gran utilidad para los acuicultores, ya que podrán conocer las causas de las mortalidades en el cultivo de camarón en presencia de un florecimiento algal de *G. catenatum* y con ello iniciar procesos para un mejor manejo ante esta problemática.

## 4. Preguntas de investigación e hipótesis

¿En qué órganos y tejidos del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) se acumulan las toxinas PSP?

¿Qué lesiones histopatológicas, en los diferentes órganos y tejidos, se producen en los camarones juveniles cuando son expuestos a toxinas PSP?

## 5 Objetivo General

Determinar la acumulación de las toxinas PSP e identificar las lesiones histopatológicas provocadas en varios tejidos de camarones juveniles.

### 5.1 Objetivos particulares

- 1.- Determinar el perfil de toxinas PSP de la cepa 62L de *G. catenatum*.
- 2.- Identificar y cuantificar las toxinas acumuladas en los órganos y tejidos (hepatopáncreas, músculo, branquias e intestino) de los camarones.
- 3.- Describir y cuantificar las lesiones histopatológicas, posiblemente asociadas a las toxinas PSP, en diferentes órganos y tejidos de los camarones.
- 4.- Asociar las concentraciones de las toxinas acumuladas en los diferentes órganos con las lesiones histopatológicas presentadas.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Cultivos de microalgas

Se utilizó la cepa 62L de *Gymnodinium catenatum* aislada de las costas de Michoacán en el 2005. La cepa se mantuvo en medio de cultivo GSe (Blackburn *et al.*, 2001) modificado con la adición de extracto de lombricompostaje (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015). Durante todas las condiciones experimentales los cultivos se mantuvieron a una temperatura de  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , salinidad de 34, con una iluminación de  $150 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  y en un ciclo de luz: oscuridad 12:12.

Se realizaron escalamientos progresivos en la fase exponencial del cultivo desde tubos de ensayo de 50 mL con 20 mL de medio GSe hasta matraces de 2 L con 1

L de medio de cultivo. También se utilizó *Chaetoceros calcitrans* (microalga no tóxica), fue cultivada en medio f/2 (Guillard, 1973), manteniéndose en las mismas condiciones que el dinoflagelado tóxico. Ambas especies se utilizaron en la fase exponencial de crecimiento.

Para determinar el volumen necesario de las microalgas para la realización del presente trabajo se realizaron conteos celulares de las dos especies utilizando una cámara Sedgewick-Rafter para *G. catenatum* (1mL) y una cámara Neubauer para *C. calcitrans* (10µl).

Las dimensiones celulares de ambas especies de microalgas se determinaron con un micrómetro óptico a 400X (n= 50 cél), y el volumen celular medio de *C. calcitrans* (84 µm<sup>3</sup>) y *G. catenatum* (41,029 µm<sup>3</sup>) se calculó de acuerdo con las fórmulas de forma para un cilindro ovalado ( $V = \pi / 4 \times d_1 d_2 h$ ) y un elipsoide rotacional ( $V = \pi / 6 \times d_1 d_2 h$ ), respectivamente (Olenina *et al.*, 2006).

## 6.2 Aclimatación de los camarones juveniles

Los organismos fueron donados por la empresa Blue Genetic México. Los camarones fueron puestos en una bolsa de plástico con aireación en una hielera para su traslado a las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (IPN-CICIMAR), donde se llevó a cabo el experimento, con el cuidado requerido para evitar en lo posible condiciones de estrés para los camarones.

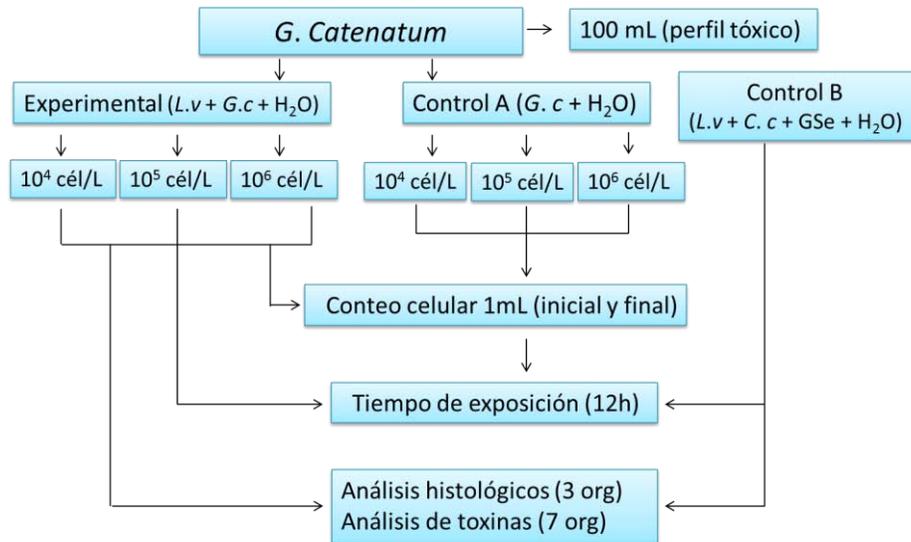
En las instalaciones del laboratorio los juveniles fueron aclimatados previamente a las condiciones requeridas para el experimento a una temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , salinidad de 34, pH 7.5 y fotoperiodo de 12:12 h. Se alimentaron dos veces al día, con alimento comercial balanceado con 35% de proteína (Camaronina), la cantidad de alimento que se suministró a los organismos fue tomando como referencia el 4.8% del peso total de los organismos.

### 6.3 Experimento

Se utilizaron juveniles de camarón con un peso promedio de  $2.6 \pm 0.5$  g, previo al experimento se mantuvieron en ayuno por 24 h.

Las condiciones en que se llevó a cabo el experimento fueron: Aireación constante por medio de difusores, se mantuvieron a una temperatura de  $24 \pm 1$  °C, salinidad 34 ups y fotoperiodo de 12:12 h.

Se expusieron 10 camarones juveniles (3 organismos/L), a  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  cél/L de *G. catenatum* en contenedores de plástico de 5 L de capacidad, para los experimentales se colocó para la concentración  $10^4$  cél/L 0.0111 L de cultivo de *G. catenatum* y 3.321 L de agua de mar filtrada, para la concentración  $10^5$  cél/L se colocó 0.111 L de cultivo de *G. catenatum* y 3.331 L de agua de mar filtrada y para la concentración  $10^6$  cél/L se utilizó 1.11 L de *G. catenatum* y 2.22 L de agua de mar filtrada. En el control A sólo se incubó al dinoflagelado en las mismas condiciones que los experimentales sin los camarones, para determinar la variación en la densidad celular. En el control B se colocaron los camarones con *Chaetoceros calcitrans* (microalga no tóxica) en una concentración en bio-volumen similar al del dinoflagelado. En la concentración de  $10^4$  cél/L se colocó 0.00433 L de cultivo de *C. calcitrans*, 0.00678 L de medio de cultivo GSe (esto con la finalidad de completar el mismo volumen que el utilizado de *G. catenatum* en el experimental) y 3.322 L de agua de mar filtrada. En la concentración de  $10^5$  cél/L se colocó 0.0433 L de *C. calcitrans*, 0.0678 L de medio de cultivo GSe y 3.222 L de agua de mar filtrada y finalmente para la concentración  $10^6$  cél/L se utilizó 0.434 L de *C. calcitrans* 0.677 L de medio de cultivo GSe y 2.22 L de agua de mar filtrada (Figura 12). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.



**Figura 12.** Diagrama del bioensayo de la exposición de camarones juveniles a las toxinas PSP producidas por *G. catenatum*.

## 6.4 Análisis

### 6.4.1 Comportamiento

Durante el experimento se realizó un monitoreo visual para determinar si los organismos presentan comportamiento anormal como: Cambio en la coloración, nado errático, nado superficial (barbeo), pérdida en el reflejo de huida (permiten ser capturados sin ejercer resistencia) y letargia o debilidad (Cuéllar-Anjel 2008a, 2014).

### 6.4.2 Tasa de ingesta de los dinoflagelados

Para determinar la tasa de ingesta de los camarones sobre los dinoflagelados, se tomaron alícuotas de 2 mL de cada uno de los tratamientos y de los controles A al inicio y final del experimento y se fijaron con solución lugol.

La tasa de ingesta de acuerdo con Bautista, 1994 y Wetzel y Likens. 2000, es definida como el número de células consumidas por un organismo en un tiempo definido y para su cálculo se consideró el conteo inicial y final de los tratamientos, así como de los controles utilizando la fórmula propuesta por Paffenhöfer (1971).

$$T1= V (C_0-C_t)/t*n$$

Dónde: T1: Tasa de ingestión (cél/ind/h)

V: Volumen del contenedor (mL)

C<sub>0</sub>: Concentración inicial de los dinoflagelados

C<sub>t</sub>: Concentración final de los dinoflagelados (cél/mL)

t: Tiempo (h)

n: Número de organismos en el contenedor

cél= Células

ind=individuos (camarones)

h= horas

### 6.4.3 Toxinas paralizantes

#### 6.4.3.1 Extracción de toxinas de muestras de *G. catenatum*

Para determinar el perfil de toxinas de *G. catenatum*, se tomaron tres alícuotas del cultivo al iniciar los bioensayos, posteriormente se filtraron 50 mL de forma manual, utilizando filtros Whatman GF/F de 0.7  $\mu\text{m}$ , cada uno de los filtros se colocó en un tubo eppendorf y se congelaron a  $-4^{\circ}\text{C}$  para su análisis posterior.

Los filtros se maceraron y homogenizaron individualmente en 1 mL de ácido acético 0.03 N con ayuda de un homogenizador de vidrio manual, enseguida las muestras fueron filtradas por acrodiscos de fibra de vidrio (25 mm de diámetro) para jeringas colocándose en tubos de centrifuga de 15 mL y se les agregó 3 mL de ácido acético 0.03 N. Posteriormente las muestras fueron colocadas en baño María por 12 h.

75  $\mu\text{L}$  de cada muestra de derivatizaron agregando 18.5  $\mu\text{L}$  de ácido hidrociorhídrico al 1.0 N. Las muestras se calentaron por 15 min a  $90^{\circ}\text{C}$  con la finalidad de convertir las toxinas N-sulfocarbamatadas a sus toxinas carbamatadas correspondientes. Se enfriaron las muestras a temperatura ambiente y se neutralizaron con 37.5  $\mu\text{L}$  de acetato de sodio 1 N. Las muestras hidrolizadas así como los no hidrolizadas fueron congeladas  $20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### 6.4.3.2 Extracción de toxinas de tejidos de camarón

Siete organismos de cada condición experimental (camarones expuestos a las diversas concentraciones y los controles) se disectaron separando las branquias, intestino, músculo y hepatopáncreas. Cada lote de tejidos de cada condición experimental se colocó en un tubo eppendorf previamente pesado. Después de poner el tejido se volvieron a pesar con la finalidad de obtener el peso de los tejidos, por la diferencia de peso, posteriormente los viales se congelaron a -40 °C hasta la extracción de toxinas.

Para la extracción, en el caso de los tejidos de hepatopáncreas, branquias e intestino, a cada muestra se le agregó 2 mL de ácido acético (0.03 N), se maceró en un homogenizador eléctrico Fast-Prep 24 5G por 2 min. Se recuperó el extracto y nuevamente se le adicionó 2 mL de ácido acético para asegurar una mayor recuperación de toxinas. El extracto se filtró a través de acrodiscos de fibra de vidrio (25 mm de diámetro) para jeringas. El extracto se liofilizó y se congeló hasta su inyección en el HPLC-FLD. En el caso de las muestras de músculo, se procesaron de igual manera que el resto de los tejidos a excepción de que fueron maceradas manualmente. Todas las muestras liofilizadas fueron guardadas en el congelador hasta su re-suspensión para análisis en HPLC-FLD.

Para el análisis de las toxinas en el cromatógrafo cada muestra se re-suspendió en 400 µL de ácido acético 0.03 N y se derivatizaron como se hizo con las muestras de los filtros.

#### 6.4.3.3 Análisis de toxinas paralizantes por HPLC-FLD

Las muestras de cultivos de *G. catenatum* y de los diversos tejidos de camarón se inyectaron a un cromatógrafo de líquidos (Infinity 1260 II) en corridas independientes para la identificación y cuantificación de las toxinas PSP (Hummer *et al.*, 1997, modificado por Yu *et al.*, 1998). En todos los casos se inyectaron 100 µL de muestra. Las toxinas PSP se detectaron utilizando una longitud de onda de excitación de 333 nm y una emisión de 390 nm.

El procesamiento en el HPLC-FLD se compone de dos fases. La primera es la fase estacionaria que consiste en una columna Luna 5 $\mu$ m RP-C18 (250 mm x 4.6 mm), Phenomenex y la segunda es la fase móvil que consistió en formar un gradiente de solventes consistente en:

Solución A: 98.5% de 11 mM ácido octanesulfónico (sal sódica) + 40 mM ácido fosfórico, ajustado a un pH de 6.9 con NH<sub>3</sub> + 1.5% tetrahidrofurano.

Solución B: 83.5% de 11 mM ácido octanesulfónico (sal sódica) + 40 mM ácido fosfórico, ajustado a un pH de 6.9 con NH<sub>3</sub> + 15.0% acetonitrilo + 1.5% tetrahidrofurano.

Solución C: 98.5% de 40 mM ácido fosfórico, ajustado a un pH de 6.9 con NH<sub>3</sub> + 1.5% tetrahidrofurano.

Con el siguiente gradiente (tiempo en minutos):

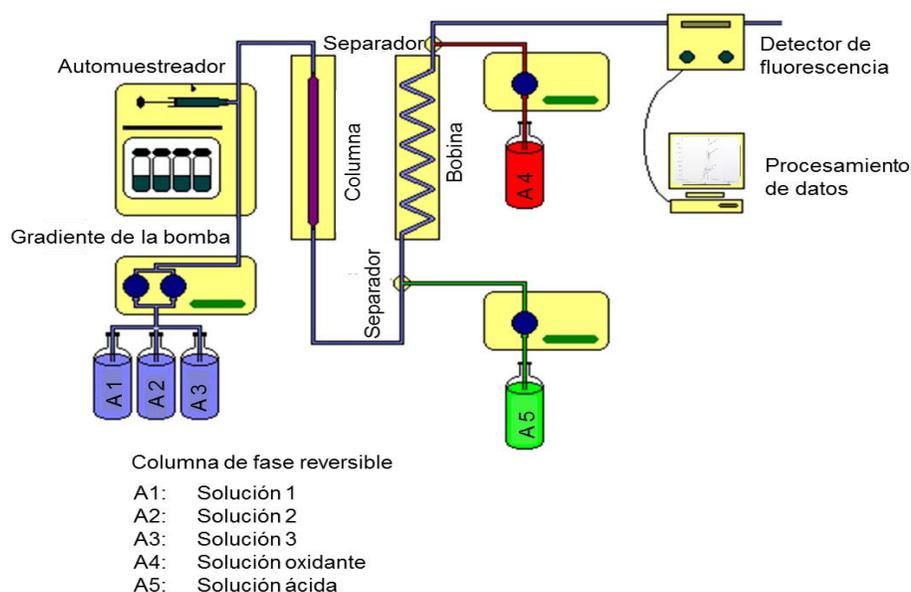
<b>Tiempo</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>	<b>C (%)</b>	<b>Flujo (mL/min)</b>
0.0	50	0	50	1.0
10.0	50	0	50	1.0
12.0	0	100	0	1.0
35.0	0	100	0	1.0
36.0	100	0	0	1.0
47.0	100	0	0	1.0
48.0	50	0	50	1.0
57.0	50	0	50	1.0

Para incrementar la fluorescencia de los análogos se utilizó una bobina de reacción y una solución de oxidación (10.0 mM de ácido periódico con 550 mM de NH<sub>3</sub>) a un flujo de 0.3 mL/min y una solución de acidificación (ácido nítrico 1.0 M) a un flujo de 0.4 mL/min.

La identificación y cuantificación de cada análogo se hizo considerando los tiempos de elución y los factores de respuesta de acuerdo a Hernández-Sandoval (2009), comparando los tiempos de retención de las muestras y por co-elución con estándares comerciales de saxitoxina (STX), Neosaxitoxina (neoSTX), gonyautoxinas-1, 4 (GTX 1, 4), decarbamoilsaxitoxina (dcSTX), decarbamoilgonyautoxinas-2, 3 (dc GTX 2, 3) y N-sulfocarbamoil-11-hidrosulfato (C1 y C2) obtenidas del National Research Council Canadá, Halifax, NS, Canadá.

#### 6.4.3.4 Análisis estadísticos de toxinas

Los análisis estadísticos que se aplicaron fueron: Estadística descriptiva en la toxicidad de *G. catenatum*. Se realizó un análisis de varianza de una vía en el programa Statistica 8.0, para determinar el perfil de toxinas de *G. catenatum* y determinar las diferencias entre los tratamiento y los tejidos de los camarones juveniles. Se realizó una prueba T-Student para determinar diferencia significativa de los conteos celulares entre las concentraciones y los controles.



**Figura 13.** Esquema del equipo de HPLC-FLD (Infinity 1260 II), se compone de una fase estacionaria y una fase móvil.

## 6.5 Lesiones histopatológicas

Tres organismos de cada contenedor (9 organismos de cada condición experimental y 9 del control A) a las 12 h, fueron inyectados con la solución de Davidson (Bell y Lightner, 1988) en el hepatopáncreas, cefalotórax, músculo y se colocaron en la misma solución Davidson por 24 h (Hwang *et al.*, 1989). Considerando que la autólisis inicia rápidamente en los camarones provocando pérdida de las estructuras tisulares y destrucción de los órganos es de gran importancia que los organismos mueran por el efecto de la inyección del fijador. De acuerdo con Cuéllar-Anjel (2014) el hepatopáncreas es el órgano más susceptible a este proceso post-mortem por la acción de las enzimas digestivas.

Posteriormente los tejidos de los camarones fueron deshidratados en una serie ascendente de etanol (70% a 100%), aclarados con xileno, e infiltrados en parafina en un procesador automático de tejidos LEICA ASP200S. Enseguida se incluyeron en parafina líquida a 62°C enfriado a -5°C en un centro de inclusión LEICA EG1150H y EG1150C. Se realizaron cortes histológicos de 4 µm de espesor en un micrótopo de rotación LEICA RM2155, colocados en portaobjetos. Se hicieron 5 cortes en serie de cada muestra. Los tejidos fueron teñidos con Hematoxilina de Harris-eosina en un teñidor automático LEICA ST5020 y montados en resina sintética con cubreobjetos (Lightner, 1996). Finalmente, las preparaciones histológicas fueron observadas bajo el microscopio óptico compuesto OLYMPUS BX41 con objetivos 4, 10, 20, 40 y 100×.

### 6.5.1 Evaluación descriptiva, semi-cuantitativa y cuantitativa de lesiones:

La evaluación de los daños y/o alteraciones estructurales en los órganos y tejidos de los camarones juveniles provocados por las toxinas PSP se realizó de la siguiente manera:

### 6.5.1.1 Descriptiva

En base a la descripción histológica de camarones sanos por Bell y Lightner (1988), se describieron las lesiones histopatológicas observadas en hepatopáncreas músculo, glándula antenal y corazón de los camarones juveniles expuestos a las toxinas PSP producidas por *G. catenatum*, con imágenes digitalizadas de 4, 10, 20, 40 y 100×.

### 6.5.1.2 Semi-cuantitativa

La evaluación semi-cuantitativa se llevó a cabo utilizando imágenes de los tejidos, obtenidas mediante un sistema de análisis digital de imágenes (Image Pro Premier v.9.0), registraron los daños en el sistema nervioso como el edema, infiltración de hemocitos y ruptura en fibras del cordón nervioso central que une los ganglios.

En el hepatopáncreas se registró la atrofia y la necrosis, en el órgano linfóide se evaluó el edema y pérdida de la estructura del órgano, la atrofia de la glándula antenal y vacuolización. Esto se llevó a cabo considerando diversas áreas de cada órgano, en base a la siguiente tabla que consiste en darle un valor numérico al nivel de daños y/o alteraciones en los órganos y tejidos de los camarones juveniles de acuerdo al grado de afectación provocado por las toxinas PSP.

**Tabla 3.** Guía general para dar un valor numérico cualitativo del grado de severidad al daño considerado para cada órgano (tomado de Lightner, 1996 y adaptado para el presente trabajo).

<b>Grado</b>	<b>Daños y/o alteraciones</b>
0	No presenta alteraciones en los tejidos
1	Presencia mínima de alteraciones en los tejidos
2	Presencia media de alteraciones en los tejidos
3	Presencia alta de alteraciones en los tejidos

La prevalencia de los daños y/o alteraciones fue determinada de acuerdo a lo propuesto y modificado de Bush *et al.* (1997) por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{No de campos con presencia de daño}}{\text{No de campos observados}} \times 100$$

### 6.5.1.3 Cuantitativa

El tamaño de las células B y F del hepatopáncreas se determinó usando un sistema de análisis digital de imágenes que consta de un microscopio óptico compuesto de campo claro y contraste de fases OLYMPUS BX45 y una cámara clara Nikon Digital Sight DS-Ri1, utilizando el Sistema Image Pro Premier (v. 9.0). Las mediciones se hicieron en imágenes a 40× a partir de tres secciones diferentes de cada muestra, midiendo la altura desde la región basal (en contacto con la membrana basal) hasta la región apical (borde libre) donde se localiza el lumen, expresándose el tamaño de las células epiteliales en micras lineales.

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

El área de cobertura del músculo (ACM) se calculó como:

$$\text{ACM} = (\text{SAC}) (\text{AT}) \times 100.$$

Donde ACM es el área de cobertura del músculo, SAC es la suma de áreas de cobertura del color específico del tejido muscular con tinción Hematoxilina-eosina en 5 imágenes a 40×, expresado en número de píxeles normalizados por área ( $\mu\text{m}^2$ ), AT es la suma del área total de las 5 imágenes, expresada en  $\mu\text{m}^2$  (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008).

El área de cobertura de los filamentos branquiales (ACB), se determinó de la siguiente manera:

$$ACB = (SAC) (AT) \times 100$$

Donde ACB es el área de cobertura de los filamentos branquiales, SAC es la suma de áreas de cobertura del color específico del tejido branquial con tinción Hematoxilina-eosina en 5 imágenes a 40×, expresado en número de píxeles normalizados por área ( $\mu\text{m}^2$ ), AT es la suma del área total de las 5 imágenes, expresada en número de píxeles normalizados por área ( $\mu\text{m}^2$ ) (Rodríguez-Jaramillo *et al.*, 2008). La cuantificación de los filamentos branquiales fusionados se realizó analizando tres áreas de cada muestra en imágenes de 20×.

### 6.5.2 Análisis estadísticos de variables histológicas cualitativas y cuantitativas

La normalidad de los datos de histología se verificó con la prueba Shapiro Wilk, y la homogeneidad de varianza se determinó utilizando la prueba Levene. Los datos se compararon por análisis de varianza (ANOVA) unifactorial considerando como factores las concentraciones  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  cél/L de toxinas PSP, donde las variables de respuesta fueron la necrosis en el hepatopáncreas, la altura de las células B y F del hepatopáncreas, el área de cobertura del músculo y el área de cobertura de los filamentos branquiales. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo. En los casos donde se encontraron diferencias significativas se realizó un análisis *a posteriori* de comparación de medias, utilizando la prueba de Tukey HSD. Todos los análisis se realizaron con el software Statistica 8.0 (StatSoft inc., Tulsa, UK).

## 7. Resultados

### 7.1 Sobrevivencia

En los organismos en el tratamiento control, así como en los organismos expuestos a las concentraciones  $10^4$  y  $10^5$  cél/L de *G. catenatum* hubo una sobrevivencia del 100% sin embargo, en los juveniles expuestos a la densidad mayor de  $10^6$  cél/L la sobrevivencia fue del 83.33%, presentándose muerte de los juveniles después de las 8 h de iniciada la exposición a las toxinas PSP, como se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4.** Sobrevivencia de los camarones expuestos a las concentraciones  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  cél/L de *G. catenatum*.

Tiempo h	Concentraciones		
	$10^4$ cél/L	$10^5$ cél/L	$10^6$ cél/L
0-2	100	100	100
2-4	100	100	100
4-6	100	100	100
6-8	100	100	93
8-10	100	100	86
10-12	100	100	83

### 7.2 Comportamiento

Los organismos de los controles al igual que los juveniles expuestos a la concentración más baja de *G. catenatum*, presentaron un comportamiento normal en todo el experimento, mostrando respuesta inmediata a los cambios de luz y de movimiento. Sin embargo, los camarones que se encontraban en la concentración  $10^6$  cél/L de *G. catenatum*, a la primera hora de exposición mostraron un

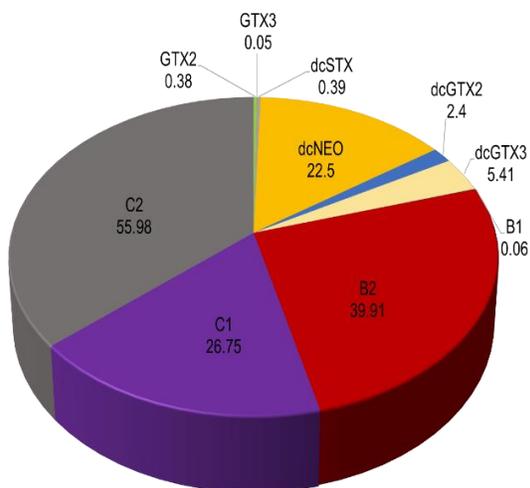
comportamiento normal, posteriormente a las dos horas de exposición a las toxinas PSP los organismos presentaron mayor actividad (signo clínico posiblemente asociados a daños por toxicidad), posteriormente algunos camarones mostraron comportamiento anormal como nado errático y pérdida del equilibrio como se describe en la tabla 4. Es importante mencionar que en las últimas dos horas todos los organismos de la concentración más alta permanecían muy cerca de los aireadores, sin movimiento.

Los resultados de la concentración de dinoflagelados entre los tratamientos y los controles no fueron diferentes ya que en el caso de las concentraciones de  $10^4$  y  $10^5$  cél/L no se encontraron células al final del experimento. Para el caso de la concentración del tratamiento de  $10^6$  se encontraron al final del experimento  $283.3 \pm 50.6$  cel/ml y en los controles ( $259.5 \pm 10$  cel/ml). No hubo diferencias significativas entre las concentraciones experimentales y las de control ( $t$  test  $\geq 0.05$ ) por lo tanto asumimos que no hubo ingesta de dinoflagelados por los camarones.

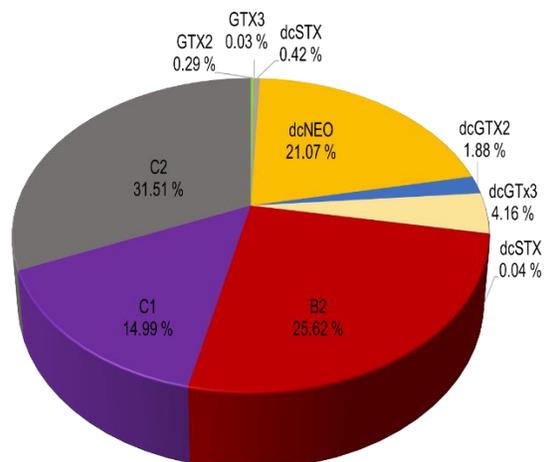
### 7.3 Perfil de toxinas de la cepa 62L de *G. catenatum*

Los análogos presentes en la cepa 62L de *G. catenatum* fueron 10: gonyautoxina 2, gonyautoxina 3, decarbamoil saxitoxina, decarbamoil Neosaxitoxina, decarbamoil gonyautoxina 2, decarbamoil gonyautoxina 3 y del grupo de las toxinas sulfocarbamoil hubo B1, B2, C1 y C2 (Figura 14).

La contribución de cada uno de estos análogos en peso se encuentra en la figura 30 donde se puede observar que los análogos que presentan un mayor peso fueron: C2 con 55.96 ng/g y B2 con 39.91 ng/g. Por otra parte, los análogos C2 con 31.51% y B2 con 25.62% fueron los de mayor porcentaje molar (Figura 15). Considerando la suma del peso y su toxicidad relativa se considera que tienen una toxicidad celular de 0.021 ng de STXeq/g. La cepa 62L presentó una toxicidad de 20.86 pg STXeq/cél y un peso de toxinas de 153.83 pg/cél.



**Figura 14.** Peso (ng/g) de los análogos en la cepa 62L de *G. catenatum*



**Figura 15.** Porcentaje molar de los análogos de la cepa 62L de *G. catenatum*

## 7.4 Toxinas en tejidos de camarón

### 7.4.1 Tratamiento $10^4$ cél/L de *G. catenatum*

#### 7.4.1.1 Concentración de toxinas

Los resultados de los análogos de toxinas paralizantes encontradas en los diversos tejidos del camarón se muestran en la tabla 5. Para el caso del hepatopáncreas, la dcGTX3 con 310.12 ng/g fue la que obtuvo una mayor concentración seguida de la GTX2 (177.51 ng/g), la dcGTX2 también fue un análogo abundante presentando una concentración de 143.85 ng/g. En el músculo las toxinas dcGTX2 y 3 son las más abundantes, alcanzando concentraciones de 29.82 y 23.39 ng/g respectivamente. En las branquias se ve una mayor concentración de los análogos B2 y C2 con concentraciones de 205.64 y 46.43 ng/g de tejido, respectivamente. En el intestino, se registró una mayor concentración de los análogos B2 y dcNEO con una concentración de 418.72 y 142.87 ng/g, respectivamente.

En términos de la concentración total el hepatopáncreas fue el tejido con la mayor concentración de toxinas con 873.50 ng/g, seguido del intestino ( $632.10 \pm 671.85$ ), branquias ( $268.15 \pm 397.27$ ) y el músculo ( $79.02 \pm 5.99$ ). Las variaciones de las

desviaciones estándar (Ds), muestran una gran variación entre muestras en casi todos los análogos (Tabla 6).

En cuanto a la toxicidad total expresada en nanogramos de saxitoxina equivalente por gramo (ng STXeq/g), el hepatopáncreas fue el tejido que presentó la mayor toxicidad (468.39) seguido del intestino (72.25), músculo (46.06), y branquias (12.19) (Tabla 7).

**Tabla 5.** Concentración (ng/g) de los análogos de toxinas paralizantes en los diferentes tejidos analizados en el tratamiento de  $10^4$  cél/L de *G. catenatum*. Decarbamoil saxitoxina (dcSTX), decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO), gonyautoxina 2 y 3 (GTX 2 y 3), toxina tipo B1 (B1), toxina tipo B2 (B2), toxina tipo C2 (C2). Desviación estándar en itálicas.

	GTX 2	GTX 3	dcS TX	dcNEO	dcGTX2	dcGTX3	B1	B2	C2
HP	177.51	91.79	23.65	9.96	143.85	<b>310.12</b>	0.13	80.54	35.95
	<i>48.45</i>	<i>81.75</i>	<i>17.78</i>	<i>9.07</i>	<i>108.15</i>	<i>269.74</i>	<i>0.12</i>	<i>32.79</i>	<i>32.57</i>
Músculo	8.91	3.07	4.9	3.54	<b>29.82</b>	23.39	0	4.92	0.47
	<i>3.8</i>	<i>3.15</i>	<i>1.14</i>	<i>6.14</i>	<i>6.95</i>	<i>22.35</i>	<i>0</i>	<i>4.37</i>	<i>0.81</i>
Branquias	2.31	0.47	0.37	8.13	2.27	1.96	0.56	<b>205.64</b>	46.43
	<i>1.96</i>	<i>0.82</i>	<i>0.14</i>	<i>7.36</i>	<i>0.86</i>	<i>0.74</i>	<i>0.48</i>	<i>356.19</i>	<i>40.16</i>
Intestino	0	4.45	0.91	142.87	5.52	3.61	2.51	<b>418.72</b>	53.52
	<i>0</i>	<i>4.09</i>	<i>0.58</i>	<i>58.2</i>	<i>3.5</i>	<i>1.77</i>	<i>4.35</i>	<i>725.25</i>	<i>49.17</i>

**Tabla 6.** Concentración total (ng/g) de toxinas paralizantes en los diferentes tejidos analizados en el tratamiento de  $10^4$  cél/L de *G. catenatum*. Desviación estándar (SD).

Tejido	ng/g	SD
HP	<b>873.5</b>	428.24
Músculo	79.02	5.99
Branquias	268.2	397.27
Intestino	632.1	671.85

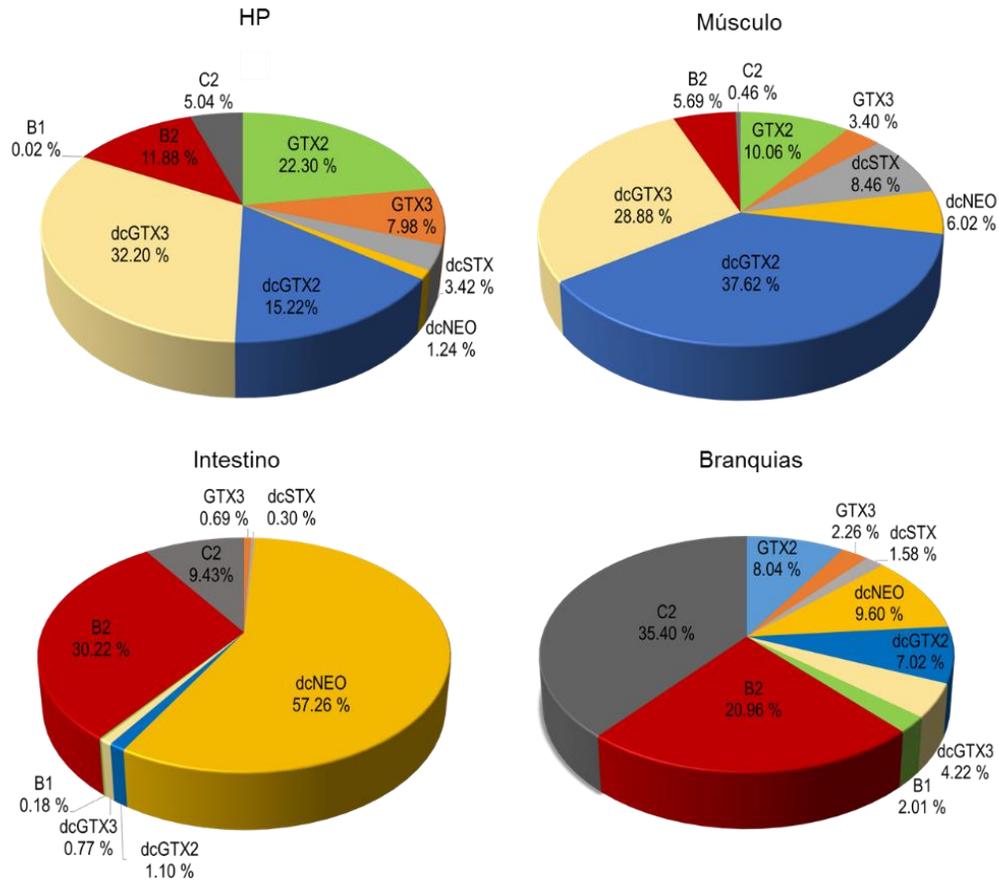
**Tabla 7.** Toxicidad total en (ng STXeq/g) en los diferentes tejidos analizados en el tratamiento de  $10^4$  cél/L de *G. catenatum*. Desviación estándar (SD).

Tejido	ngSTXeq/g	SD
HP	<b>468.39</b>	326.39
Músculo	46.06	11.06
Branquias	12.19	5.75
Intestino	72.25	23.75

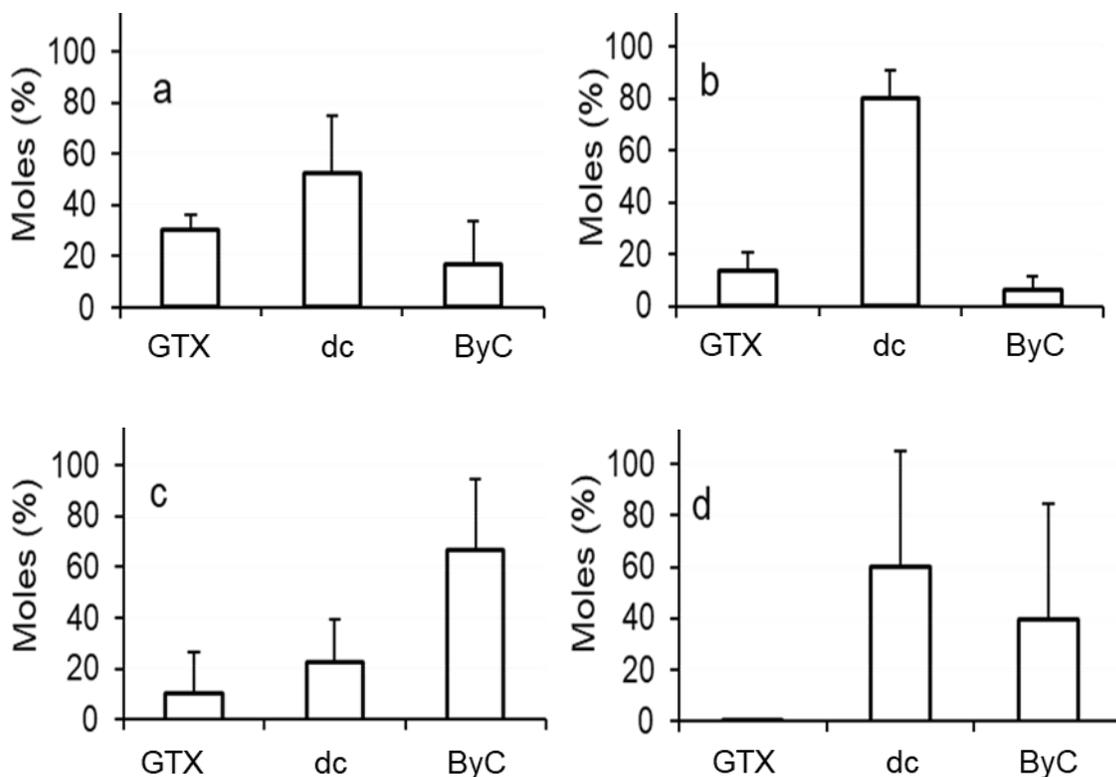
#### 7.4.1.2 Concentración molar de toxinas

En los tejidos del hepatopáncreas y del músculo se ve claramente el predominio de las dcGTX2, 3 y la GTX2 que contribuyeron entre el 60 y 75% del total de las toxinas. También se presentaron las toxinas sulfocarbamoiladas pero en un porcentaje menor. En las branquias las toxinas B2 (28%) y C2 (36%), fueron las que tuvieron un mayor porcentaje molar, seguidas por las decarbamoiladas. En el caso del intestino también se observaron estos análogos, aunque la dcNEO representó más del 50% del total (Figura 16).

Si agrupamos estos análogos por su estructura química, en el hepatopáncreas y músculo la contribución más abundante fue de los análogos carbamoilados y decarbamoilados (Figuras 17a-d) mientras que el grupo sulfocarbamoil representó el mayor porcentaje molar en las branquias e intestino.



**Figura 16.** Variación en el porcentaje molar de los diversos análogos de toxinas paralizantes en hepatopáncreas del tratamiento de  $10^4$  cél/L de *G. catenatum*. decarbamoil saxitoxina (dcSTX), decarbamoil gonyautoxinas (dcGTX2 y 3), decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO), gonyautoxina 2 y 3 (GTX 2 y 3), toxina tipo B 1 (B1), toxina tipo B2 (B2), toxina tipo C2 (C2).



**Figura 17. a, b, c y d.** Concentración molar (%) de los diversos análogos agrupados de toxinas paralizantes hepatopáncreas (A), músculo (B), branquias (C) e intestino (D), en el tratamiento de  $10^4$  cél/L de *G. catenatum*. Los análogos agrupados son: GTX2 + 3 (GTX), decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO) + decarbamoil saxitoxina (dc), y toxina tipos B + C (ByC). La línea vertical representa la desviación estándar.

#### 7.4.2 Tratamiento $10^5$ cél/L de *G. catenatum*

En cuanto a la identificación y cuantificación de toxinas en los tejidos de los organismos expuestos a la concentración  $10^5$  cél/L no fue posible obtener resultados, debido a problemas en el análisis por HPLC-FLD de las muestras.

#### 7.4.3 Tratamiento de $10^6$ cél/L de *G. catenatum*

##### 7.4.3.1 Concentración de toxinas

La concentración de los análogos de las toxinas paralizantes en los diferentes tejidos de los camarones expuestos a *G. catenatum* se encuentran en la tabla 8. En el hepatopáncreas los análogos que presentaron una mayor concentración fueron la dcGTX3 (824.64 ng/g) y la GTX3 (813.65 ng/g). En el músculo la dcGTX2 fue la

de mayor concentración con 83.69 ng/g, seguida de la dcGTX3 con 28.46 ng/g. En las branquias se observa una mayor concentración de las toxinas B2 (32.56 ng/g) y C2 (170.92 ng/g). En cuanto al intestino presentó una mayor concentración de los análogos B2 y C2, con 1453.69 y 1694.17 ng/g, respectivamente.

Considerando la concentración total de toxinas el hepatopáncreas fue el tejido que presentó la mayor concentración de  $3285.33 \pm 1623.20$  ng/g, seguido del intestino con (3159.84 ng/g), en las branquias hubo una concentración de  $222.56 \pm 228.48$  ng/g y en el músculo hubo una concentración de  $147.05 \pm 35.69$  ng/g (tabla 9). De igual manera que en la concentración anterior el hepatopáncreas fue el tejido que presentó la mayor toxicidad total, seguido del intestino, el músculo y las branquias (Tabla 10).

**Tabla 8.** Concentración (ng/g) de análogos de toxinas paralizantes en tejidos de camarón expuestos a  $10^6$  cél/L de *G. catenatum*. decarbamoil saxitoxina (dcSTX), decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO), gonyautoxina 2 y 3 (GTX 2 y 3), toxina tipo B 1 (B1), toxina tipo B 2 (B2), toxina tipo C2 (C2). Desviación estándar en itálicas.

	GTX 2	GTX 3	dcSTX	dcNEO	dcGTX2	dcGTX3	B1	B2	C2
HP	433.07	813.65	97.44	58.44	592.7	<b>824.64</b>	0.69	169.65	0
	<i>319.42</i>	<i>494.59</i>	<i>22.95</i>	<i>40.55</i>	<i>139.58</i>	<i>240.91</i>	<i>0.52</i>	<i>121.31</i>	<i>0</i>
Músculo	5.68	2.34	13.76	3.04	<b>83.69</b>	28.46	0	10.09	0
	<i>4.92</i>	<i>0.58</i>	<i>7.65</i>	<i>2.64</i>	<i>46.5</i>	<i>26.09</i>	<i>0</i>	<i>1.72</i>	<i>0</i>
Branquias	1.76	2.3	0.32	5.14	1.92	3.53	4.11	32.56	<b>170.92</b>
	<i>0.85</i>	<i>1.71</i>	<i>0.28</i>	<i>8.91</i>	<i>1.68</i>	<i>2.4</i>	<i>6.69</i>	<i>56.39</i>	<i>243.88</i>
Intestino	5.79	6.83	1.14	100.5	6.92	5.52	10.8	1453.69	<b>1694.17</b>
	<i>2.83</i>	<i>2.99</i>	<i>0.26</i>	<i>44.74</i>	<i>1.6</i>	<i>2.03</i>	<i>7.04</i>	<i>1583.7</i>	<i>393.75</i>

**Tabla 9.** Concentración total de toxinas paralizantes (ng/g) en tejidos de camarón expuestos a  $10^6$  cél/L de *G. catenatum*. Desviación estándar (SD).

Tejido	ng/g	SD
HP	<b>3285.3</b>	1623.2
Músculo	147.05	35.69
Branquias	222.56	228.48
Intestino	3159.2	1173.5

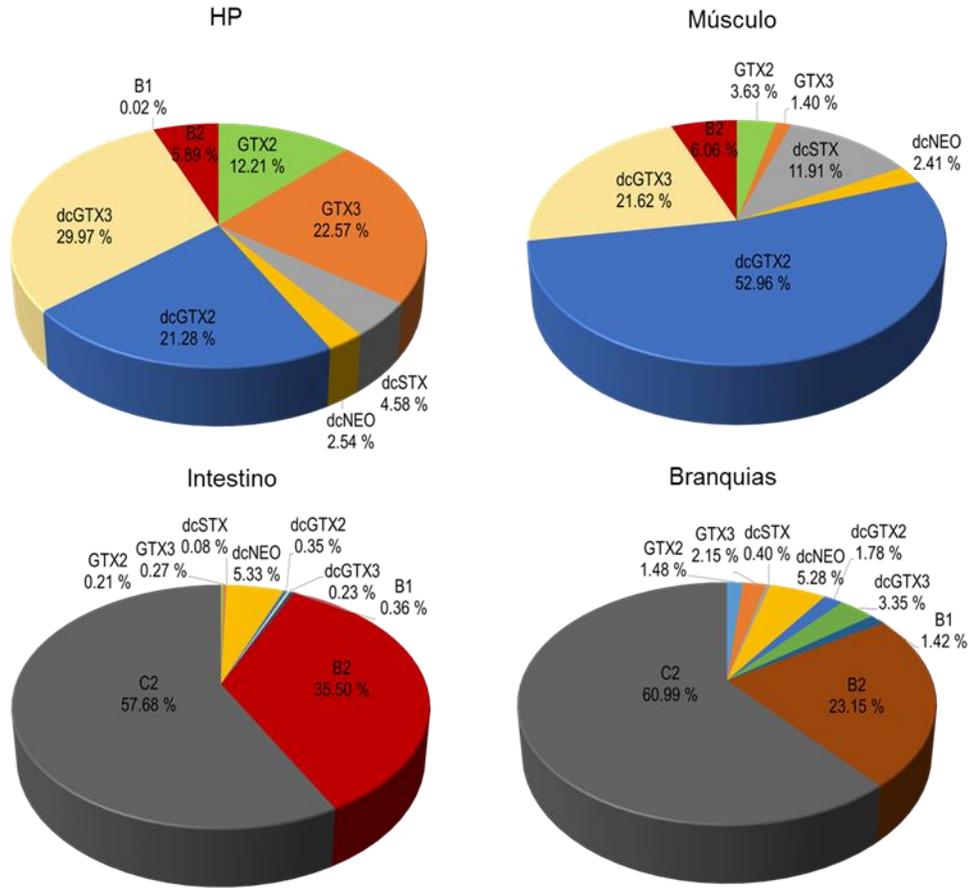
**Tabla 10.** Toxicidad total en nanogramos de saxitoxina equivalente por gramo (ng STXeq/g) en los diferentes tejidos analizados en el tratamiento de 106 cél/L. de *G. catenatum*. Desviación estándar (SD)

Tejido	ng STXeq/g	SD
HP	<b>1755</b>	559.43
Músculo	87.52	19.47
Branquias	25.56	27.22
Intestino	225.9	38.14

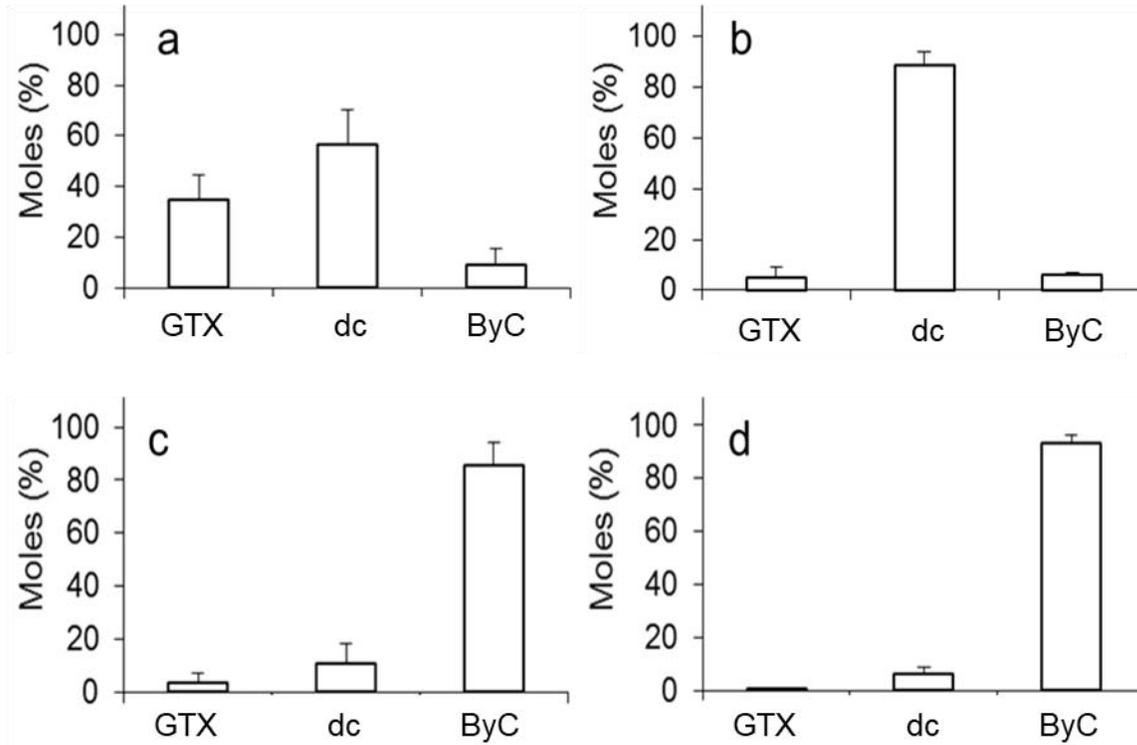
#### 7.4.3.2 Concentración molar

En el hepatopáncreas la toxina dcGTX3 fue la de mayor abundancia con 28.97 y GTX3 con 22.55 del % molar. En el músculo las toxinas dcGTX2 y dcGTX3 con 52.96% y 21.62% fueron las más abundantes, respectivamente. Por otra parte, en las branquias los análogos B2 y C2 tuvieron un mayor porcentaje molar con 23.15 y 60.99% respectivamente. De igual manera en el intestino los análogos B2 y C2 fueron los que mostraron un mayor porcentaje molar de 35.5 y 57.68, respectivamente (Figura 18).

Al agrupar estos análogos por su estructura química, se ve claramente el predominio del grupo de los carbamoilados y sulfocarbamoilados en los tejidos del hepatopáncreas, así como del músculo, sin embargo en las branquias e intestino son los grupos carbamoilados y decarbamoilados los que representan un mayor porcentaje molar (Figuras 19a-d).



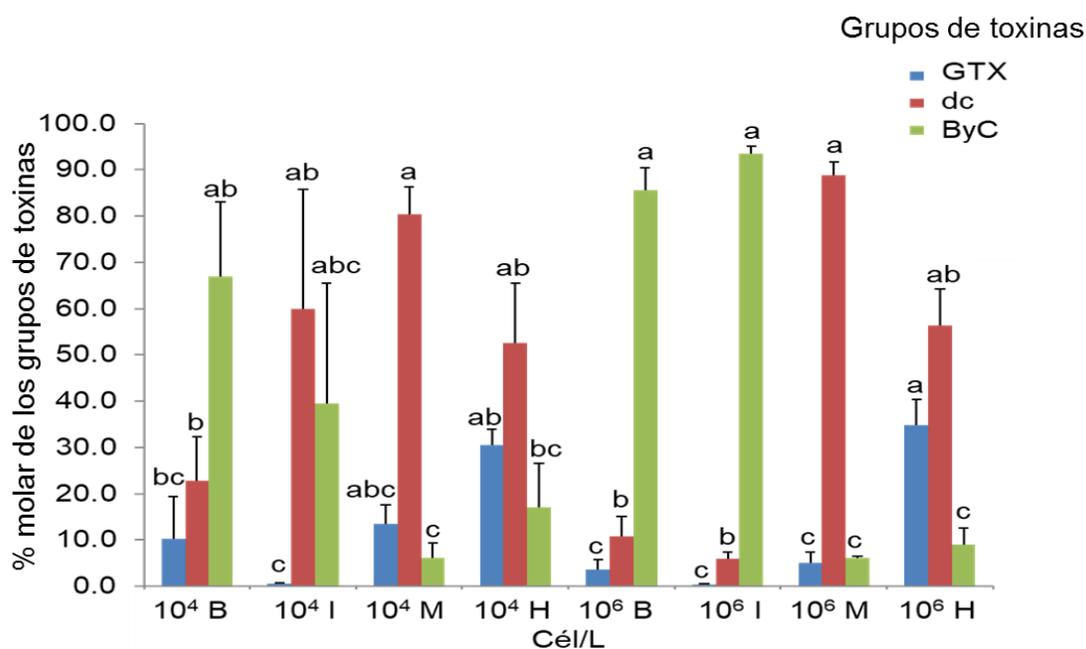
**Figura 18.** Variación en el porcentaje molar de los diversos análogos de toxinas paralizantes en hepatopáncreas del tratamiento de  $10^6$  cél/L de *G. catenatum*. decarbamoil neosaxitoxina (dcSTX), decarbamoil gonyautoxinas (dcGTX2 y 3), decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO), gonyautoxina 2 y 3 (GTX 2 y 3), toxina tipo B 1 (B1), toxina tipo B2 (B2), toxina tipo C2 (C2).



**Figura 19 (a, b, c y d).** Concentración molar (%) de los diversos análogos agrupados de toxinas paralizantes en hepatopáncreas (A), músculo (B), branquias (C) e intestino (D) en el tratamiento de  $10^6$  cél/L de *G. catenatum*. Los análogos agrupados son: GTX2 + 3 (GTX), decarbamoil neosaxitoxina + decarbamoil saxitoxina (dc), y toxina tipos B + C (ByC). La línea vertical representa la desviación estándar.

Al realizar una comparación de los grupos: GTX2 + 3 (GTX), decarbamoil neosaxitoxina + decarbamoil saxitoxina (dc), y toxina tipos B + C (ByC) considerando el porcentaje molar de las concentraciones  $10^4$  y  $10^6$  cél/L en los tejidos hepatopáncreas (H), músculo (M), branquias (B) e intestino (I), se observaron diferencias significativa para GTX  $p=0.000391$ , dc  $p=0.0005$  y ByC  $p=0.0001$ . Las letras minúsculas indican las diferencias entre los grupos de toxinas en los tejidos, siendo significativamente diferentes el grupo homogéneo (a) para **GTX** en hepatopáncreas en  $10^6$  cél/L, con respecto al grupo homogéneo (c) en músculo, intestino, branquias en  $10^6$  cél/L, e intestino  $10^4$  cél/L. No existiendo diferencias significativas en los grupos homogéneos (ab) de hepatopáncreas  $10^4$  cél/L, grupo (abc) de músculo  $10^4$  cél/L, y grupo homogéneo (bc) de branquias  $10^4$  cél/L. Para el grupo de toxinas **dc** se encontraron diferencias significativas entre el grupo

homogéneo (a) de músculo  $10^4$  y  $10^6$  cél/L, con respecto al grupo homogéneo (b) de branquias  $10^4$  y  $10^6$  cél/L e intestino  $10^6$  cél/L. No existiendo diferencias significativas entre los anteriores y el grupo (ab) de intestino  $10^4$  y hepatopáncreas  $10^4$  y  $10^6$  cél/L. En cuanto al grupo de toxinas **ByC** se encontraron diferencias significativas entre el grupo homogéneo (a) de intestino y branquias de  $10^6$  cél/L con respecto al grupo homogéneo (c) representado por hepatopáncreas así como músculo  $10^4$  y  $10^6$  cél/L. No existiendo diferencias significativas de los grupos anteriores con respecto al grupo (ab) de branquias  $10^4$  cél/L y el grupo homogéneo (abc) de intestino  $10^4$  cél/L, así como con respecto al grupo (bc) de hepatopáncreas  $10^4$  cél/L (Figura 20).



**Figura 20.** Variación de la concentración molar de los análogos agrupados de toxinas paralizantes GTX2 + 3 (GTX), decarbamoil neosaxitoxina + decarbamoil saxitoxina (dc), y toxina tipos B + C (ByC) en hepatopáncreas (H), músculo (M), branquias (B) e intestino (I) de las concentraciones  $10^4$  y  $10^6$  cél/L. Los datos fueron analizados usando las concentraciones de *G. catenatum* por tejido como factor y la concentración molar (%) de los grupos de toxinas como variables dependientes en un ANOVA unifactorial (n=24). Las letras individuales indican diferencias significativas entre medias (*post hoc* de Tukey) y las letras en grupo indican que no hubo diferencias significativas.

## 7.5 Resultados histopatológicos

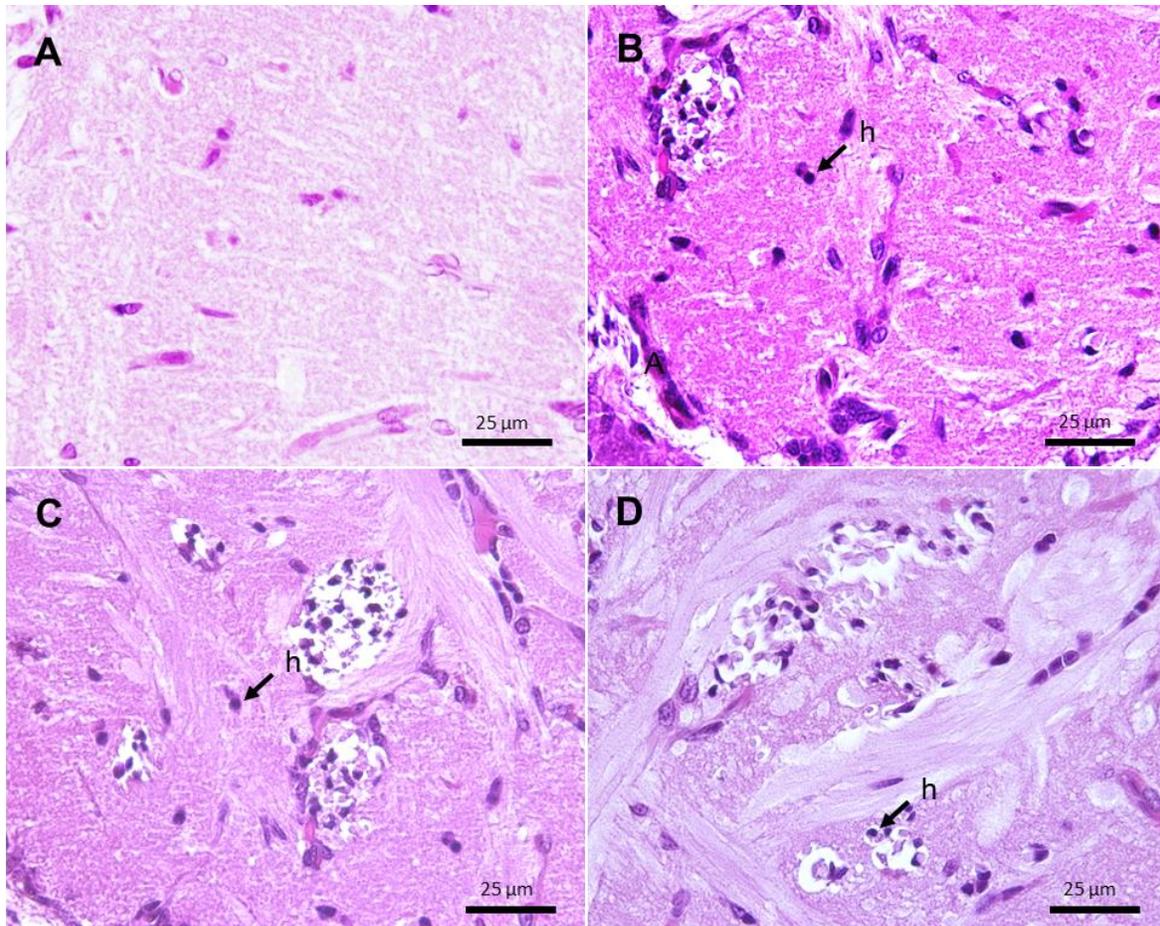
### 7.5.1 Sistema nervioso

En las lesiones histopatológicas observadas en el sistema nervioso de los camarones juveniles se encontró edema grado 1 en el 90% de los tejidos de los camarones expuestos a la concentración de  $10^4$  cél/L, infiltración de hemocitos grado 1 en el 77% de los ganglios, así como separación del cordón nervioso ventral de las células gigantes grado de severidad 1 en algunos organismos, por lo cual al presentar grado 1 de severidad indica que si hubo presencia de daños sin embargo fue mínima.

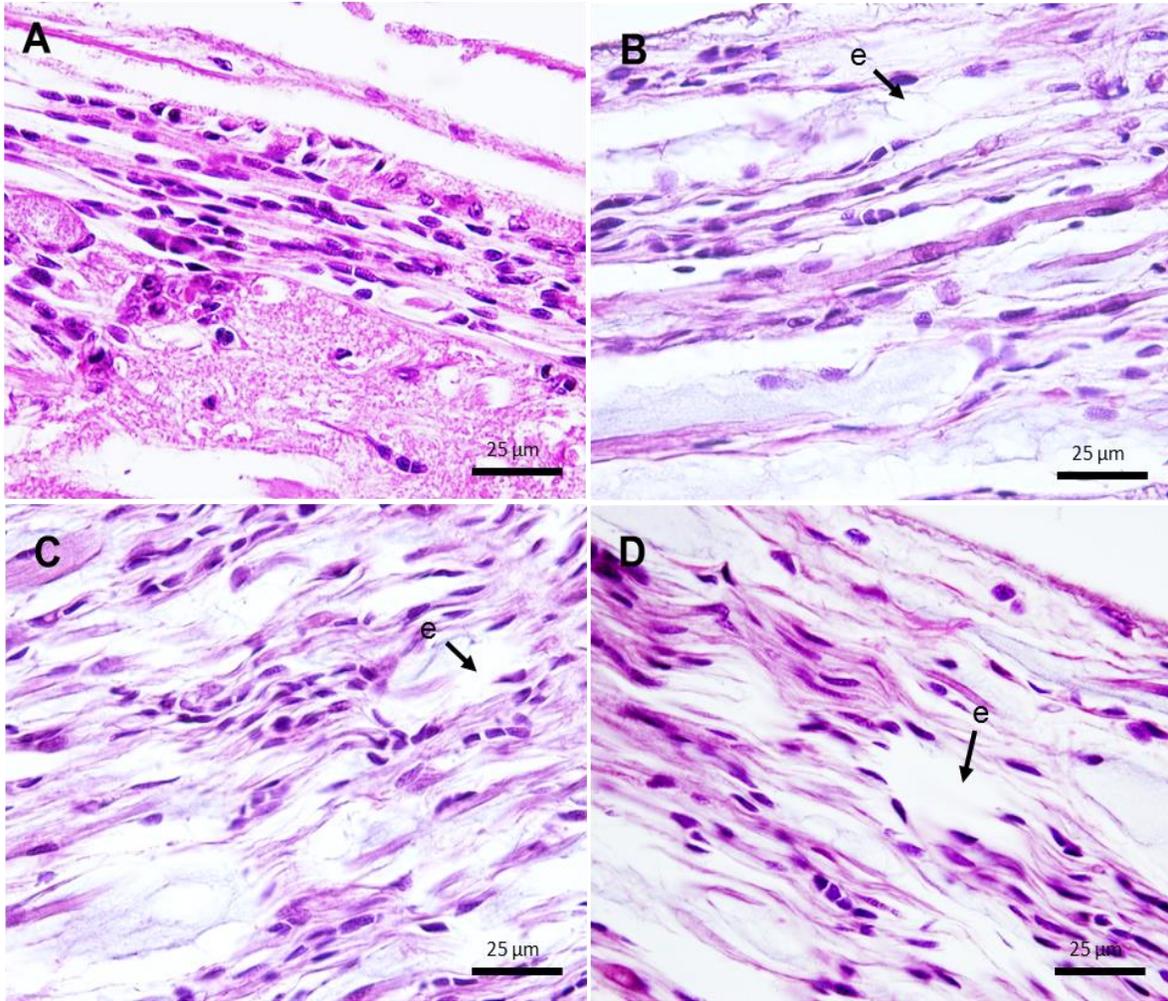
En los tejidos de los camarones expuestos a la concentración de  $10^5$  cél/L se identificó edema grado 1 y 2 en el 100% de los tejidos observados, infiltración hemocítica grado 1 en el 100% de las muestras y separación del cordón nervioso ventral de las células gigantes en el 100% de los organismos con grado 2.

También se determinó edema en el 100% de las muestras de los organismos expuestos a la concentración de  $10^6$  cél/L de *G. catenatum* con grados 2 y 3. La infiltración hemocítica se manifestó en el 100% de los tejidos con grado 1 y separación del cordón nervioso ventral de las células gigantes en el 100% de los organismos con grado 3. En la figura 21 se puede observar que en los organismos expuestos a las tres concentraciones de *G. catenatum* se presentó infiltración hemocítica en el ganglio supraesofágico de los juveniles de camarón. Todos los organismos expuestos al dinoflagelado toxico presentaron edema como se muestra en la figura 22. En cuanto a los daños en el cordón nervioso central se observa ruptura de la conexión entre las células gigantes y el cordón nervioso central como se indica en la figura 23.

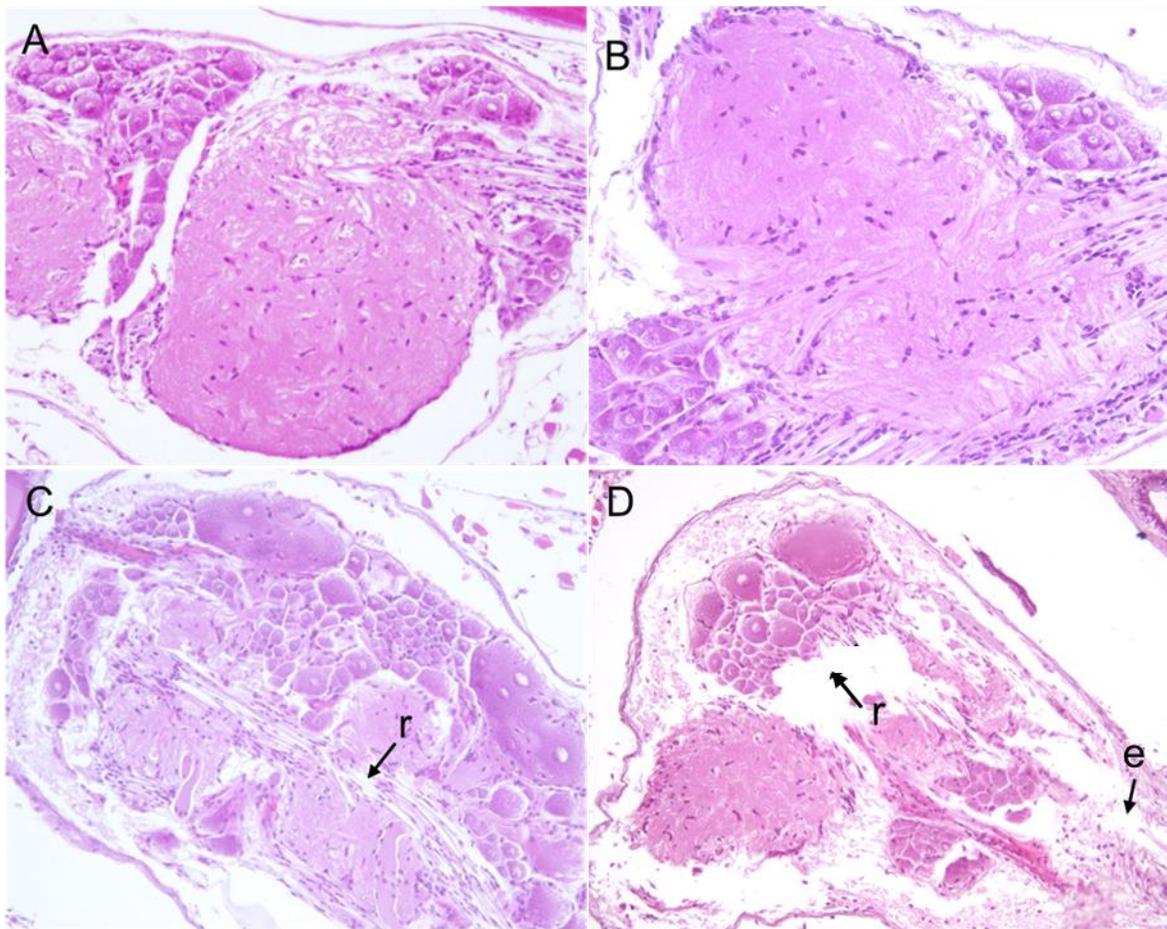
Por otra parte, se observó la presencia de eosinofilia atípica marcada entre las células del cordón nervioso central en el 1% de los tejidos expuestos a la concentración más alta del dinoflagelado tóxico.



**Figura 21.** Corte histológico transversal del ganglio supraesofágico de *L. vannamei* expuesto a células de *G. catenatum* A) Control, tejido del neuropilo normal; B) Concentración  $10^4$  cél/L; C) Concentración  $10^5$  cél/L; D) Concentración  $10^6$  cél/L, infiltración hemocítica (h). Tinción H&E (100×).



**Figura 22.** Corte histológico transversal del cordón nervioso central compuesto por fibras sensoriales de *L. vannamei* expuesto a células de *G. catenatum* A) Control, fibras del tejido conectivo circumesofágico normales; B) Concentración  $10^4$  cél/L; C) Concentración  $10^5$  cél/L; D) Concentración  $10^6$  cél/L, edema (e). Tinción H&E (100×).



**Figura 23.** Corte histológico de ganglios supraesofágicos de *L. vannamei* expuesto a células de *G. catenatum*. A) Control, ganglio segmental normal, las células y cordón nervioso central que interconecta a los ganglios normales; B) Concentración  $10^4$  cél/L, normal; C) Concentración  $10^5$  cél/L; D) Concentración  $10^6$  cél/L, edema (e), ruptura de conexión entre las células gigantes y el cordón nervioso central (r). Tinción H&E (100×).

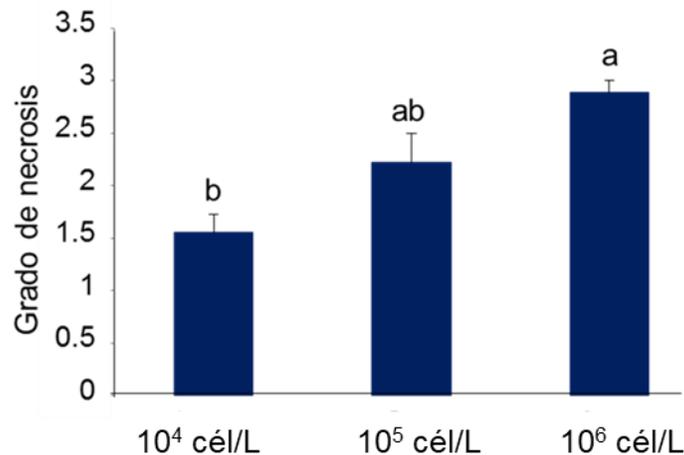
### 7.5.2 Hepatopáncreas

El 100% de los organismos expuestos a las tres concentraciones presentaron alteraciones en los tejidos de este órgano, identificándose la presencia de necrosis (núcleos picnóticos), delaminación de túbulos, atrofia y desprendimiento celular. Se cuantificó la necrosis considerando el área de cobertura de la lesión y la altura de las células b y f como evidencia de daño en el tejido. Los resultados nos indican que hubo una relación directa entre la presencia de necrosis y la concentración de células de *G. catenatum* (Figura 24) se obtuvieron diferencias significativas

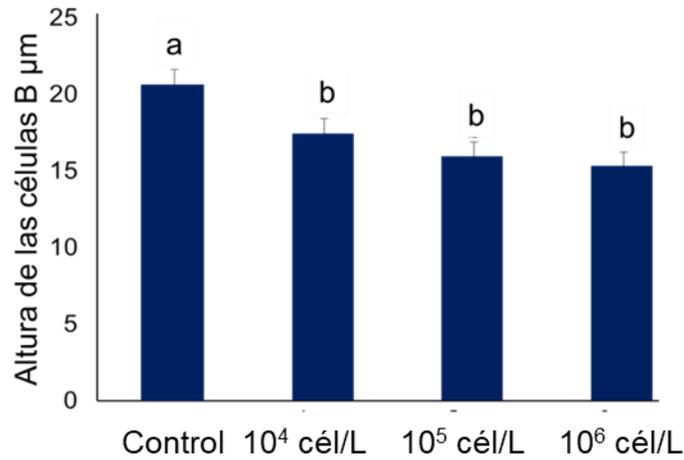
( $P=0.000391$ ) entre dos de las concentraciones, siendo mayor la necrosis en la concentración  $10^6$  que en la menor  $10^4$  cél/L.

Se presentó una disminución del tamaño de las células B comparadas con los controles y los experimentales como se observa en las figuras 25, se obtuvieron diferencias significativas ( $P=0.000018$ ) siendo mayor la altura de las células B del control ( $20.62 \pm 0.42 \mu\text{m}$ ) y menor la altura en las tres concentraciones  $10^4$  cél/L ( $17.44 \pm 0.94 \mu\text{m}$ )  $10^5$  cél/L ( $15.91 \pm 1.21 \mu\text{m}$ ),  $10^6$  cél/L ( $15.23 \pm 1.48 \mu\text{m}$ ). También se presentó una disminución del tamaño o altura de las células F comparadas con los controles y los experimentales como se observa en la figura 26, se obtuvieron diferencias significativas ( $P=0.000860$ ), siendo mayor la altura del control ( $11.42 \pm 0.56 \mu\text{m}$ ) y menor la de la concentración  $10^6$  cél/L ( $7.83 \pm 0.27 \mu\text{m}$ ).

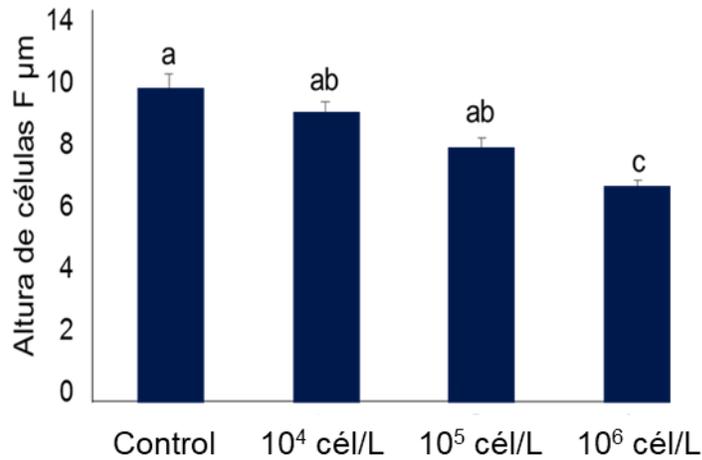
Las alteraciones histopatológicas en el hepatopáncreas de los juveniles como atrofia y necrosis se pueden observar en las figuras 27 y 28 en esta última, se puede observar el daño severo que se presentaron en los organismos expuestos a la concentración más alta.



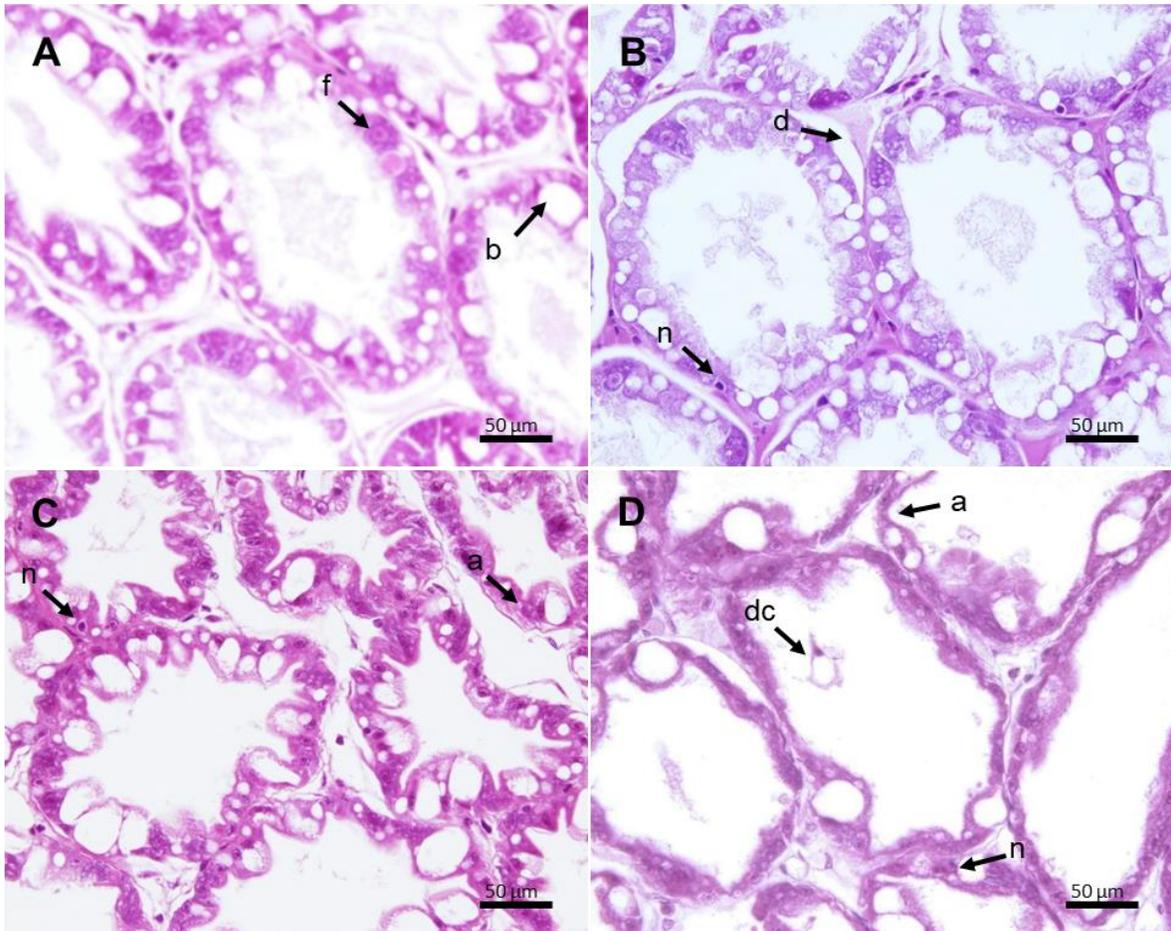
**Figura 24.** Variación de los grados de necrosis (media  $\pm$  error error estándar). Los datos fueron analizados usando la concentración de *G. catenatum* como factor ( $p=0.000391$ ) y los grados de necrosis como variables dependientes en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ ). Las letras distintas indican diferencias significativas entre medias (post hoc de Tukey).



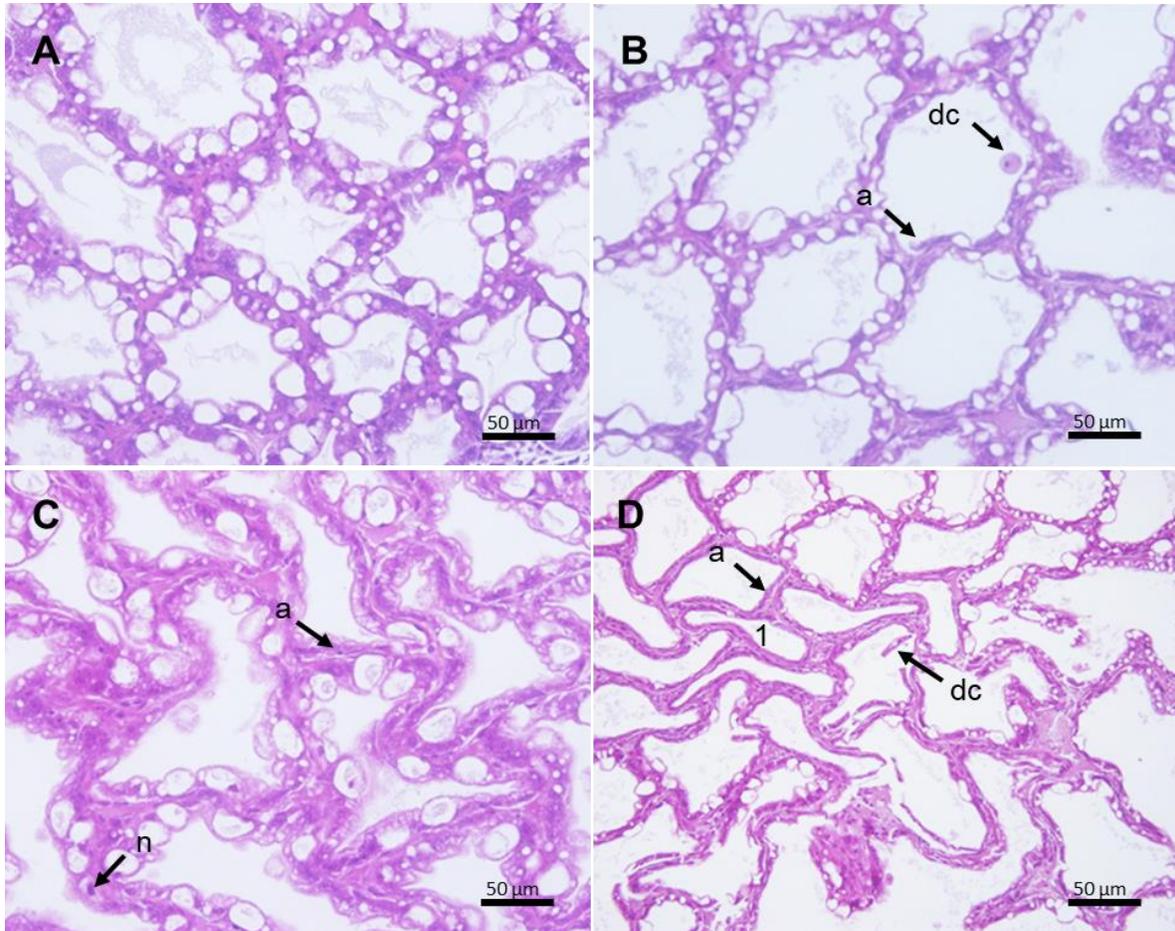
**Figura 25.** Variación de la altura celular para evaluar atrofia en células b (media  $\pm$  error estándar). Los datos fueron analizados usando la concentración de *G. catenatum* como factor ( $p=0.000018$ ) y la altura de las células b como variables dependientes en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ ). Las letras distintas indican diferencias significativas entre medias (*post hoc de Tukey*).



**Figura 26.** Variación de la altura celular para evaluar atrofia en células f (media  $\pm$  error estándar). Los datos fueron analizados usando la concentración de *G. catenatum* como factor ( $p=0.000860$ ) y la altura de las células f como variables dependientes en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ ). Las letras distintas indican diferencias significativas entre medias (*post hoc de Tukey*).



**Figura 27.** Corte histológico de hepatopáncreas de *L. vannamei* A) Control, las células B que presentan una gran vacuola y las células F con su apariencia fibrosa; B) Concentración  $10^4$  cél/L, delaminación de túbulos (d); C) Concentración  $10^5$  cél/L; D) Concentración  $10^6$  cél/L, desprendimiento celular (dc), atrofia (a), necrosis (n). Tinción H&E (100×).

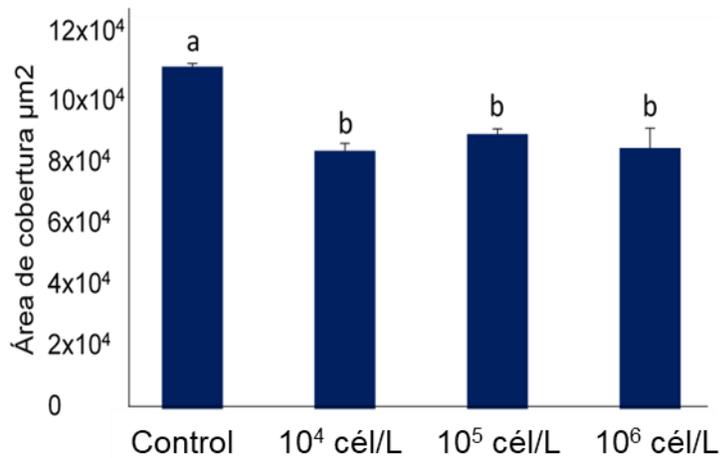


**Figura 28.** Corte histológico de hepatopáncreas de *L. vannamei* A) Control, túbulos normales en forma de estrella; B) Concentración  $10^4$  cél/L; C) Concentración  $10^5$  cél/L; D) Concentración  $10^6$  cél/L, atrofia (a), desprendimiento celular (dc), necrosis (n). Tinción H&E (100×).

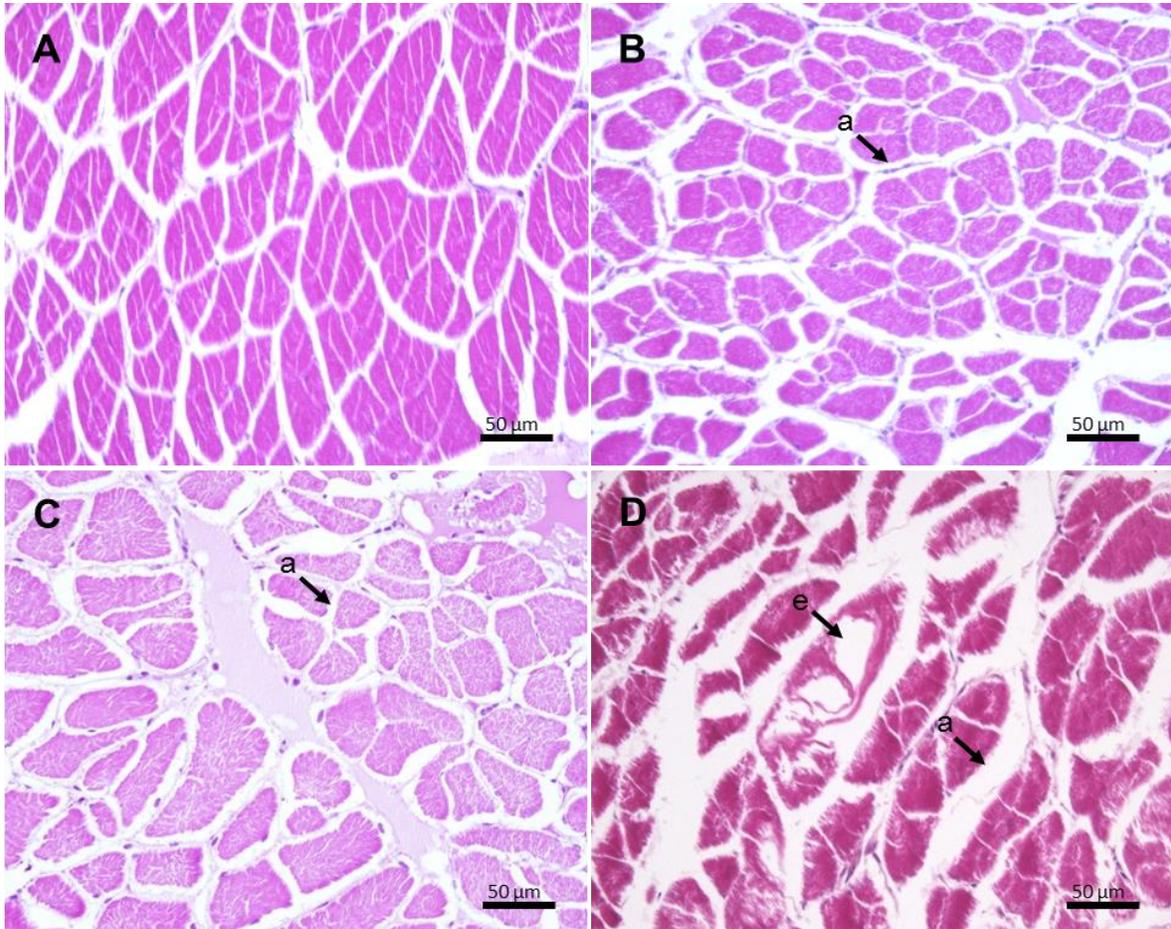
### 7.5.3 Músculo

El 100% de los juveniles presentó atrofia de los fascículos musculares evaluada mediante el área de cobertura muscular, mostrando diferencias significativas ( $P=0.000004$ ) entre el control y las tres concentraciones de *G. catenatum* siendo mayor en el control ( $104,729 \pm 969 \mu\text{m}^2$ ) que en las tres concentraciones  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  cél/L ( $79,009 \pm 2,256 \mu\text{m}^2$ ,  $84,125 \pm 1,534$ ,  $79,859 \pm 5,932$ ) respectivamente (Figura 29). En algunos organismos en las concentraciones de  $10^5$  y  $10^6$  cél/L, se observó infiltración, atrofia, también grandes alteraciones al citoplasma en los organismos expuestos a la concentración más alta como se observa en la figura 30, por otra parte, se presentó ruptura de los fascículos musculares en los organismos

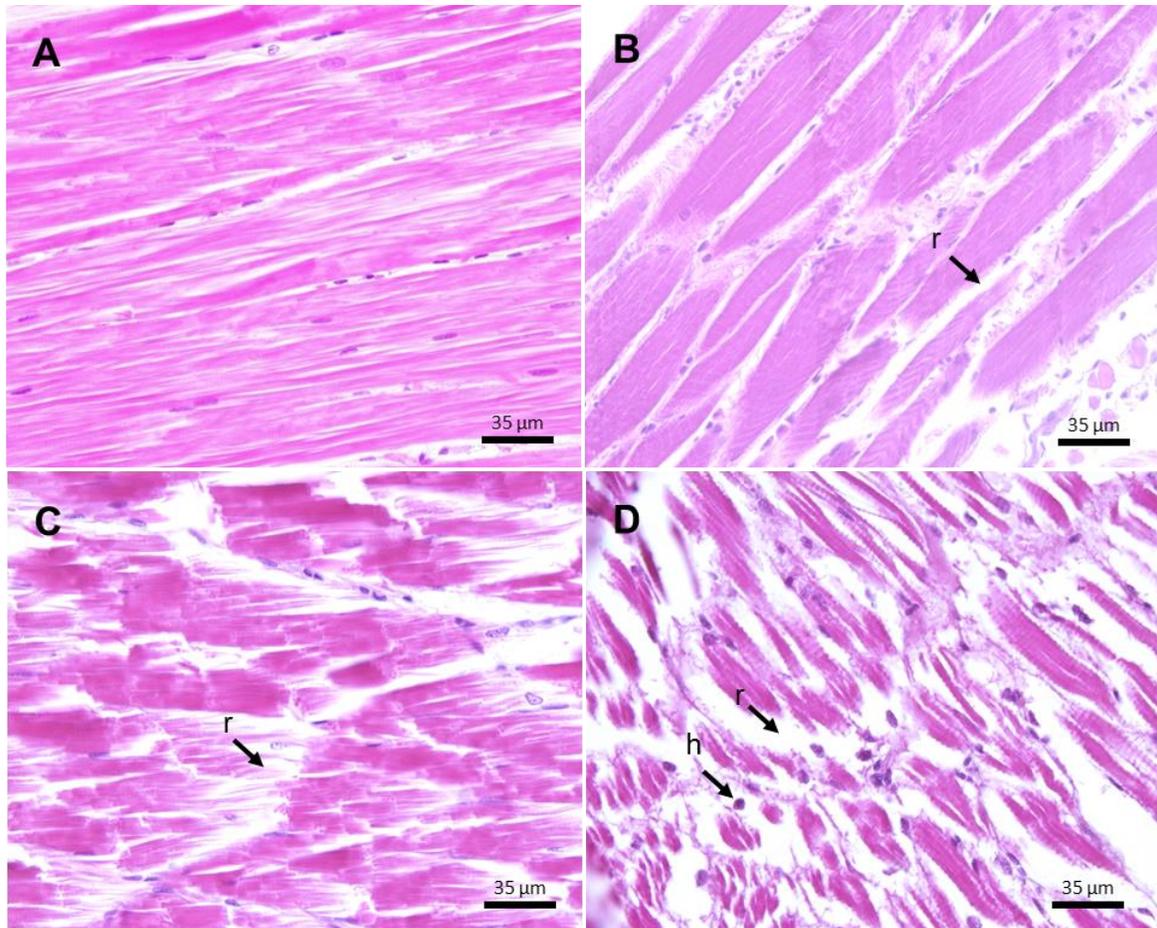
expuestos a las tres concentraciones y en la concentración más alta se observó también infiltración hemocítica (Figura 31). Las letras distintas indican diferencias significativas entre medias (post hoc de Tukey).



**Figura 29.** Variación del área de cobertura muscular (media  $\pm$  error estándar) usando la concentración de *G. catenatum* como factor ( $p=0.000004$ ) y el área de cobertura como variable dependiente en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ ). Las letras distintas indican diferencias significativas entre medias (*post hoc* de Tukey).



**Figura 30.** Corte histológico transversal del músculo de *L. vannamei* A) Control, fibras organizadas dentro de los fascículos musculares; B) Concentración  $10^4$  cél/L; C) Concentración  $10^5$  cél/L; D) Concentración  $10^6$  cél/L, edema en los fascículos musculares (e), atrofia (a). Tinción H&E (100 $\times$ ).

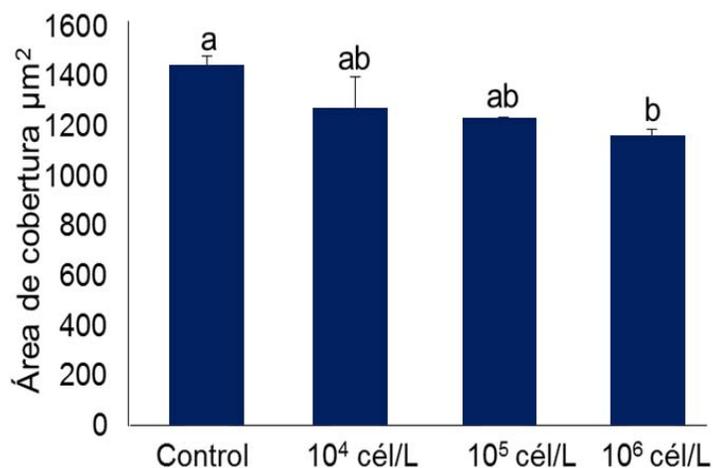


**Figura 31.** Corte histológico longitudinal del músculo de juveniles de *L. vannamei* A) Control, fascículos musculares normales; B) Concentración  $10^4$  cél/L; C) Concentración  $10^5$  cél/L; D) Concentración  $10^6$  cél/L, ruptura de los fascículos musculares (r) e infiltración hemocítica (h). Tinción H&E (100×).

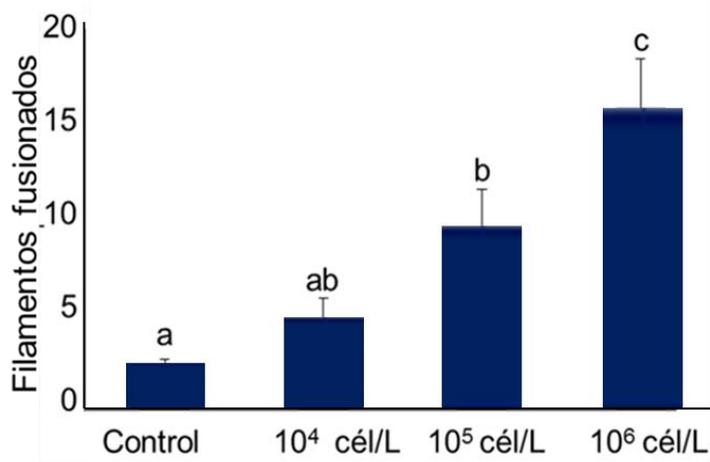
#### 7.5.4 Branquias

Se determinó atrofia (calculada a través de la cobertura de los filamentos branquiales) en las tres condiciones experimentales, se obtuvieron diferencias significativas ( $P=0.005398$ ) entre el control ( $1,436 \pm 44 \mu\text{m}^2$ ) y la concentración  $10^6$  cél/L con el promedio más alto de ( $1149 \pm 37 \mu\text{m}^2$ ) (Figura 32). En cuanto a la cantidad de los filamentos branquiales fusionados, como se puede apreciar en la figura 33, hubo un aumento proporcional de los filamentos fusionados con el incremento de la densidad celular de *G. catenatum*. Se obtuvieron diferencias significativas ( $P=0.0001$ ) entre el control ( $2.51 \pm 0.2$ ) y la concentración  $10^5$  cél/L ( $9.77 \pm 2.1$ ) y  $10^6$  cél/L ( $16.22 \pm 2.63$ ). Lo cual indica que hay una relación directa con las alteraciones en las branquias de los organismos y la concentración de microalgas tóxicas. La comparación de la fusión de los filamentos branquiales de

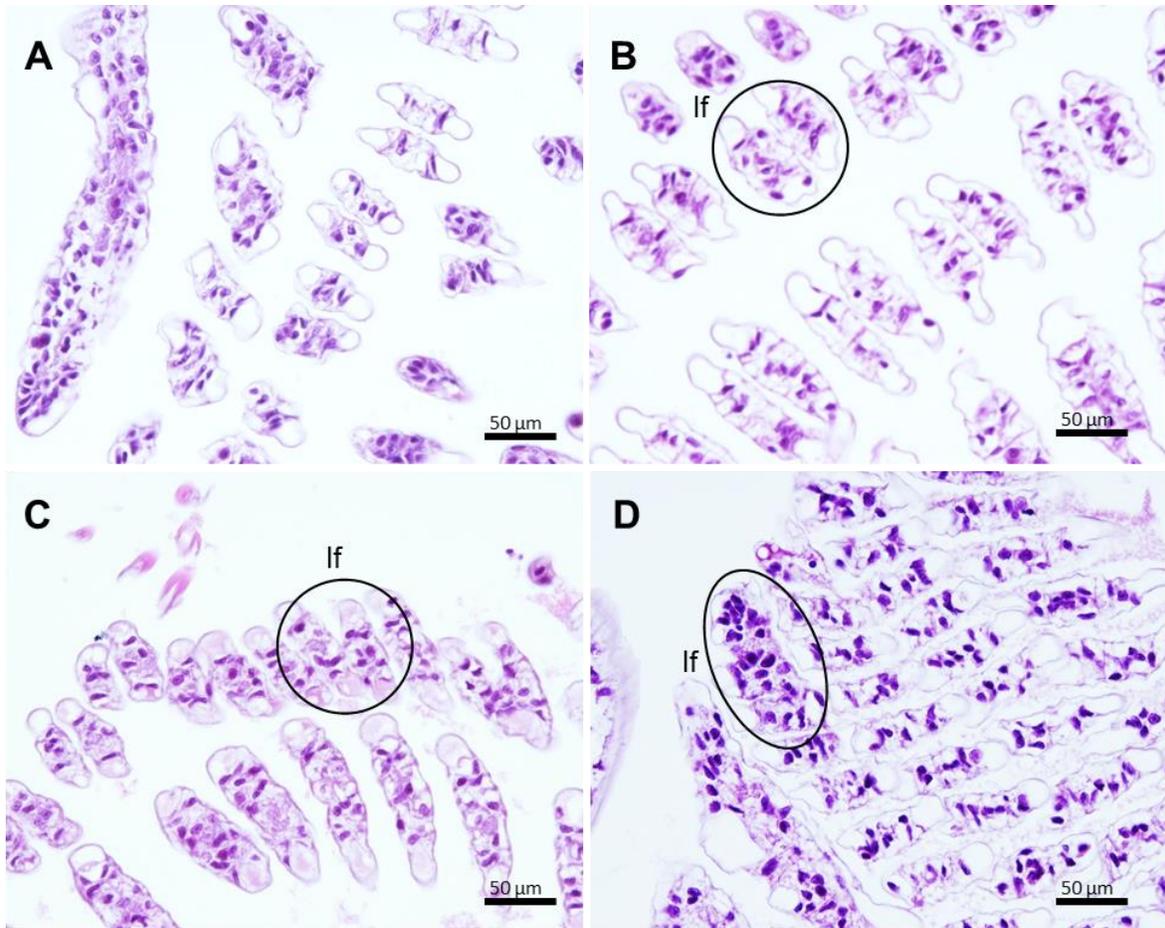
los organismos expuestos a las tres concentraciones del dinoflagelado toxico y del control se muestra en la figura 34, como se observa en los camarones expuestos a la concentración  $10^6$  cél/L tuvieron una mayor presencia de lamelas fusionadas.



**Figura 32.** Variación del área de cobertura de los filamentos branquiales (atrofia) (media  $\pm$  error estándar) utilizando la concentración de *G. catenatum* como factor ( $p=0.005398$ ) y el área de cobertura como variable dependiente en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ ). Las letras distintas indican diferencias significativas entre medias (*post hoc* de Tukey).



**Figura 33.** Variación del número de filamentos branquiales fusionados (media  $\pm$  error estándar). Los datos fueron analizados usando la concentración de *G. catenatum* como factor ( $p=0.0001$ ) y el número de filamentos como variables dependientes en un ANOVA unifactorial ( $n=30$ ). Las letras distintas indican diferencias significativas entre medias (*post hoc* de Tukey).



**Figura 34.** Corte histológico de branquias de juveniles de *L. vannamei* A) Control, lamelas branquiales normales; B) Concentración  $10^4$  cél/L; C) Concentración  $10^5$  cél/L; D) Concentración  $10^6$  cél/L, lamelas fusionadas (lf). Tinción H&E (100×).

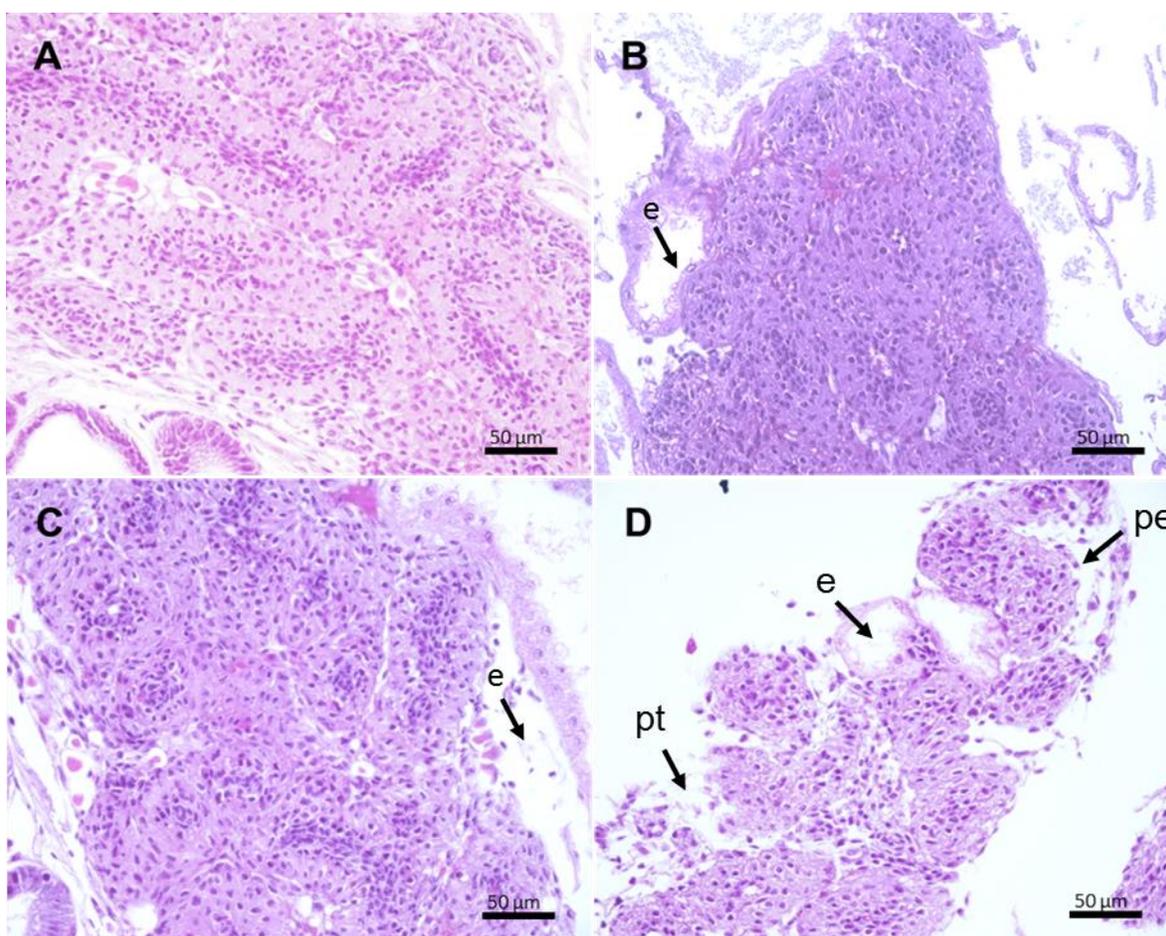
### 7.5.5 Órgano linfoide

El 56% de los organismos expuestos a las toxinas PSP presentaron edema como se observa en la tabla 11 los organismos expuestos al a concentración más alta presentan edema grado 3 lo cual indica daño severo en los tejidos, también se observó en el 2% de los juveniles pérdida de la estructura normal del órgano. En cuanto a los daños relacionados con *G. catenatum* en el órgano linfoide se observó que en el control así como en las concentraciones  $10^4$  cél/L y  $10^5$  cél/L no

presentaron alteraciones y solo en la concentración más alta se observó edema, pérdida de tejido y de la estructura del órgano (Figura 35).

**Tabla 11.** Grados de edema en el órgano linfoide en juveniles de camarón expuestos a *G. catenatum*.

Órgano linfoide	
Concentración cél/L	Grado de edema
$10^4$	0-1
$10^5$	1-2
$10^6$	3



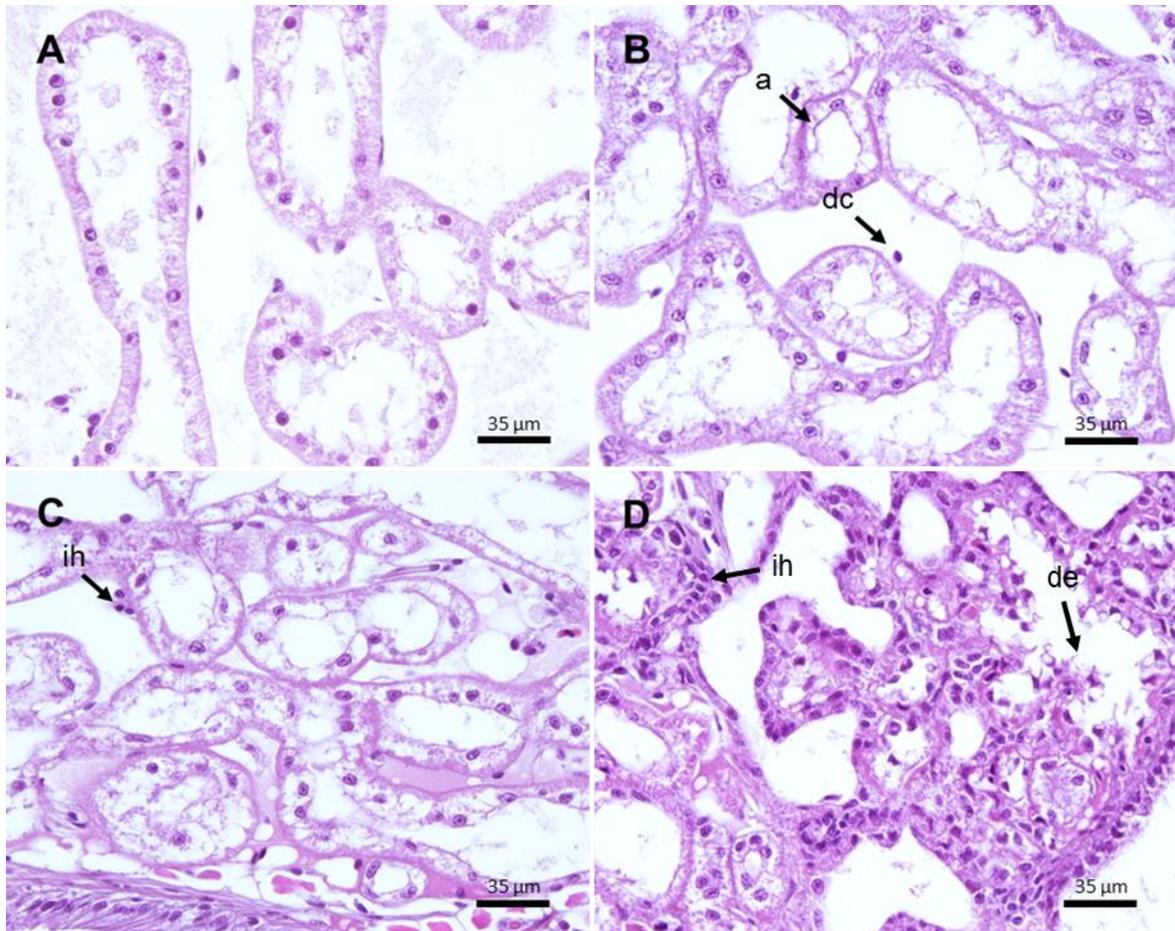
**Figura 35.** Corte histológico del órgano linfoide de *L. vannamei* A) Control, túbulos normales con lumen simple, una matriz estromal de senos intersticiales y de tejido conectivo fibroso; B) Concentración  $10^4$  cél/L; C) Concentración  $10^5$  cél/L; D) Concentración  $10^6$  cél/L, edema (e), pérdida del tejido (pt), pérdida en la estructura de las células (pe). Tinción H&E (40×).

### 7.5.6 Glándula antenal

El 100 % de los organismos expuestos a las toxinas PSP presentaron atrofia y un 45% del total de los organismos presentó vacuolización, como se muestra en la tabla 12 los organismos expuestos a la concentración  $10^6$  cél/L del dinoflagelado presentaron grado de atrofia y de vacuolización más alta lo que indica un grado severo en este órgano y en esta concentración. Dentro de las alteraciones que se presentaron en este tejido fueron: atrofia, infiltración de hemocitos y descamación del epitelio como se indica en la figura 36.

**Tabla 12.** Grados de atrofia y de vacuolización en la glándula antenal.

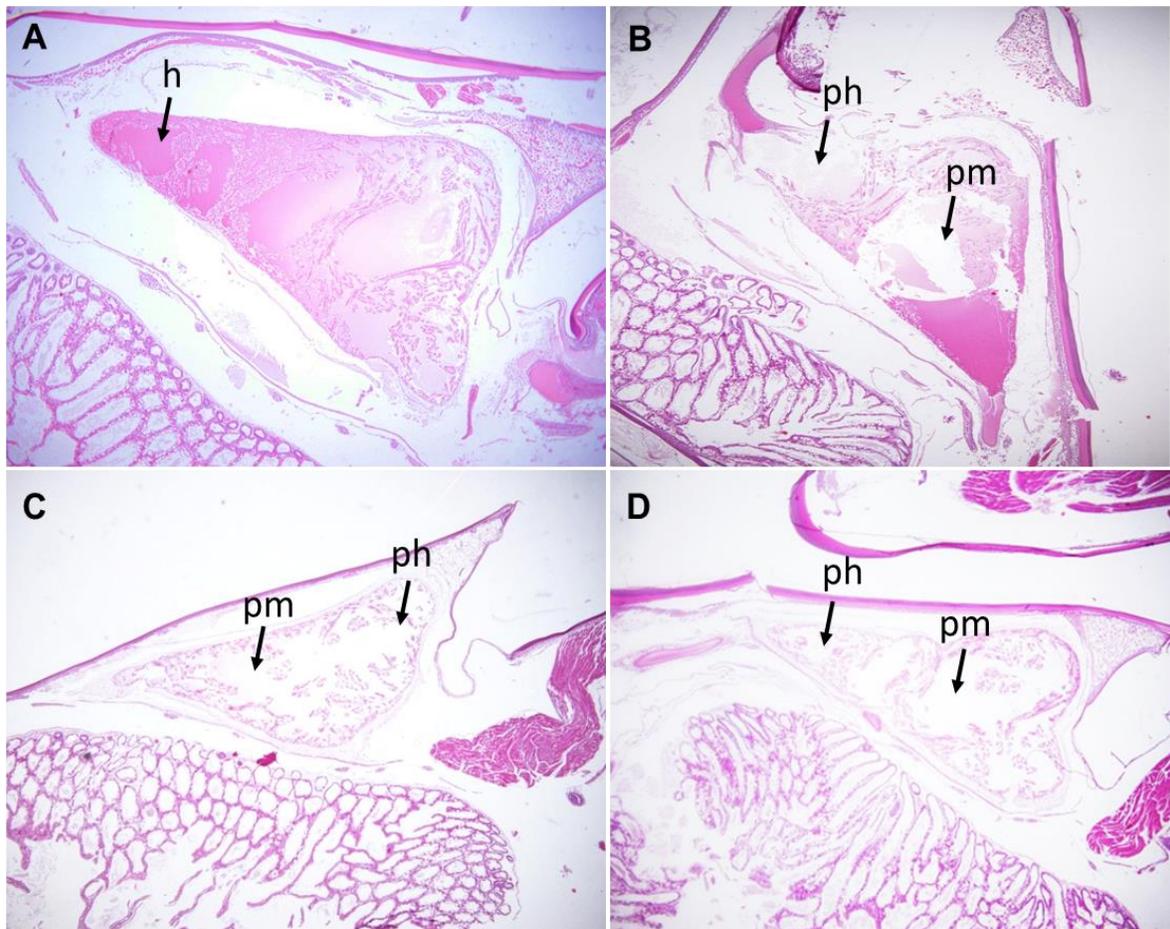
Glándula antenal		
Concentración cél/L	Grado de atrofia	Grado de vacuolización
$10^4$	2-3	0-1
$10^5$	2	0-1
$10^6$	2-3	2-3



**Figura 36.** Corte histológico de glándula antenal de juveniles de *L. vannamei* A) Control, células epiteliales normales; B) Concentración  $10^4$  cél/L, atrofia (a) y desprendimiento celular (dc); C) Concentración  $10^5$  cél/L; D) Concentración  $10^6$  cél/L, infiltración de hemocitos (ih) y descamación del epitelio (de). Tinción H&E (60×)

### 7.5.7 Corazón

Los organismos expuestos a la concentración de  $10^4$  cél/L de *G. catenatum* no presentaron alteraciones, sin embargo expuestos a las dos concentraciones mayores presentaron pérdida de masa muscular (células miocárdicas) y de hemolinfa indicando que en estos organismos el corazón dejó de bombear la hemolinfa hacia el sistema circulatorio (Figura 37).



**Figura 37.** Corte histológico del corazón de *L. vannamei* A) Control, órgano normal; B) Concentración  $10^4$  cél/L; C) Concentración  $10^5$  cél/L; D) Concentración  $10^6$  cél/L, pérdida de hemolinfa (ph), pérdida de masa muscular (pm). Tinción H&E (4×).

## 7.6 Relación entre toxicidad y daños celulares

Los daños más evidentes asociados a la concentración de toxinas y toxicidad se ven claramente en el sistema nervioso central donde se presentó edema severo y ruptura del 100% del cordón nervioso ventral en organismos expuestos a la concentración más alta de toxinas.

Otro órgano que muestra daños importantes en función a la toxicidad es el hepatopáncreas que presentan un aumento de casi el doble en la necrosis de sus tejidos. Además, los resultados indican que la concentración total de toxinas PSP encontradas en este órgano fue más del triple en los organismos expuestos a la concentración más alta de *G. catenatum* en comparación a los que estuvieron expuestos a la menor concentración.

También hubo una reducción significativa del tamaño en las células B del hepatopáncreas. En cuanto a las células F, estas presentaron una reducción hasta de un 20% aproximadamente en los organismos expuestos a la concentración mayor del dinoflagelado tóxico. Estos resultados indican claramente que hay una relación directa entre la concentración y la toxicidad de las toxinas PSP con los daños presentes en este órgano del camarón.

En cuanto al músculo hubo atrofia de los fascículos musculares, y se observó diferencia significativa entre los organismos del control y los expuestos a las células de *G. catenatum*, sin embargo, los daños observados en los tejidos no aumentaron con forme aumentó la concentración del dinoflagelado.

A nivel de branquias se observó diferencia significativa en la atrofia en los filamentos branquiales en comparación con el control sin embargo, entre las tres concentraciones utilizadas el daño fue similar. En cuanto a la fusión de los filamentos branquiales hubo un aumento proporcional de los filamentos fusionados con la densidad de *G. catenatum*, presentándose un aumento del triple de filamentos fusionados en la concentración más alta que tuvo una toxicidad total de 25 ng STXeq/g.

En el órgano linfoide y la glándula antenal mostraron una relación directa entre las afectaciones observadas y la concentración celular de *G. catenatum*.

## 8 Discusión

### 8.1 Sobrevivencia

Se han reportado mortandades de organismos expuestos a toxinas PSP en el medio natural, en cultivo y a nivel experimental como el trabajo de Pazos-Mandujano (2012) quien expuso postlarvas de camarón a siete concentraciones de *G. catenatum*, iniciando mortandad en los organismos a partir de la primera hora de exposición a las concentraciones:  $9.99 \times 10^5$ ,  $1.25 \times 10^6$ ,  $1.58 \times 10^6$  y  $2 \times 10^6$  cél/L del dinoflagelado toxico, con una mortandad del 100% de los camarones expuestos a la concentración  $2 \times 10^6$  cél/L en 24 h.

Por otra parte, en el trabajo realizado por Pérez-Linares, 2008. Reportó mortandad del 100% en postlarvas de camarón expuestas durante 6 horas a la concentración  $10^6$  cél/L de *G. catenatum*. En cuanto a nuestros resultados los juveniles de camarón expuestos a las concentraciones  $10^4$  y  $10^5$  cél/L no presentaron mortandades en las 12 horas de exposición, sin embargo en la concentración más alta ( $10^6$  cél/L) se presentó mortandad a partir de las 8 horas de exposición a *G. catenatum*. La diferencia en el tiempo de mortandad en los camarones posiblemente pudiese estar relacionada con el perfil toxico de la cepa de *G. catenatum* utilizada y el estadio de vida de los camarones.

### 8.2 Ingesta del dinoflagelado tóxico

De acuerdo a nuestros resultados no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de *G. catenatum* en los diversos tratamientos con respecto al control (t test  $\geq 0.05$ ), por lo tanto asumimos que los camarones no ingirieron los dinoflagelados, sin embargo es posible que los camarones pudieran consumir de manera accidental las células. Es importante considerar que estos dinoflagelados excretan al medio las toxinas PSP que son hidrosolubles (CITA) además que si las

células al morir, como lo indican los controles, liberan su contenido celular incluyendo las toxinas y estas podrían ser la causa de los daños observados en los organismos. En un estudio realizado por Fuentes y colaboradores (2008) relacionaron la presencia de toxinas PSP producidas por *A. catenella* con la mortandad de salmones en cultivo indicando que a pesar de que los peces fueron alimentados con alimento artificial los organismos fueron afectados por las células vegetativas y por sus toxinas disueltas, considerando que las células pueden liberar las toxinas (Lefevre *et al.*, 2008).

### 8.3 Efecto de la exposición a *G. catenatum* en el comportamiento de los camarones

En los seres humanos los efectos que provocan las toxinas PSP que se han observado van desde síntomas típicos como entumecimiento de labios y en extremidades superiores, dificultad en el habla, cefalea en casos leves, hasta la incidencia de otros síntomas como, parálisis muscular problemas respiratorios e incluso la muerte (Catterall, 1985; Mee *et al.*, 1986; Rodrigue *et al.*, 1990; Saldate-Castañeda *et al.*, 1991; Kao, 1993; Gessner *et al.*, 1997; Sánchez-Flores, 2011; Callejas *et al.*, 2015). En el caso de animales, el ejemplo claro es en ratones, organismos utilizados en los bioensayos para la determinación de estas toxinas, donde se observa disnea, saltos, respiración agitada, ataxia, convulsiones y muerte. En organismos acuáticos como moluscos bivalvos, se observa falta de retracción del sifón, valvas abiertas, dificultad para enterrarse, inflamación y ruptura en la glándula digestiva, inflamación en el intestino, alteración en los filamentos branquiales, reducción en la tasa de alimentación y fusión en branquias (Estrada-Muñoz, 2005; García-Lagunas, 2014).

En cuanto a los signos clínicos de los moluscos bivalvos expuestos a las toxinas PSP se encuentran: Estrés metabólico, retracción del manto, contracción del músculo abductor, parálisis e incapacidad de cerrar las valvas (Estrada *et al.*, 2010; Escobedo-Lozano *et al.*, 2012). Escobedo-Lozano y colaboradores (2012) expusieron a moluscos bivalvos de *Argopecten ventricosus* a toxinas PSP de *G.*

*catenatum* para determinar la tasa de ingesta, acumulación y la biotransformación de las toxinas. Las almejas de manera inmediata produjeron pseudo-heces, cerraron parcialmente sus valvas, disminuyeron su tasa de ingesta y presentaron parálisis en el músculo abductor.

En el presente trabajo se observó una considerable disminución en la capacidad natatoria de los camarones al grado de quedar postrados al fondo de los contenedores, esta disminución de la capacidad de natación también se ha reportado en otros organismos expuestos a toxinas PSP como el trabajo realizado por Samson *et al.*, 2008, en el que alimentaron con copépodos (*Coullana canadensis*) que contenían toxinas PSP a tres especies de peces (*Pseudopleuronectes americanus*, *Cyprinodon variegatus* y *Fundulus heteroclitus*) reportando que el consumo de seis copépodos fueron letales para los organismos, dentro de los efectos subletales que presentaron aquellos que consumieron menos de seis copépodos fueron: Disminución en la capacidad captura de la presa y en el rendimiento de natación, de acuerdo con estos autores la disminución en la capacidad de capturar su presa y la vulnerabilidad a los depredadores por la disminución de su capacidad natatoria puede reducir la sobrevivencia de los organismos además de que se facilita la transmisión de las toxinas PSP a través de la red trófica.

Existen pocos trabajos sobre el efecto de *G. catenatum* y sus toxinas en crustáceos. Fuentes-Pascacio (2010) expuso de copépodos *Pseudodiaptomus euryhalinus* a dos densidades celulares de *G. catenatum* y a una mezcla del mismo dinoflagelado con *Chaetoceros calcitrans* (microalga no tóxica) con la finalidad de determinar la bioacumulación y los efectos tóxicos del dinoflagelado. Después de seis horas de exposición hubo aletargamiento prolongado permanecieron en el fondo del acuario, comportamiento que coincide con lo que se encontró en este trabajo.

En un estudio realizado por Palomares y colaboradores (2006) se determinó que las toxinas PSP producidas por *G. catenatum* no provocaron efectos adversos en los copépodos de *A. clausi* especie que se encuentra coexistiendo en la misma bahía

que el dinoflagelado tóxico. De acuerdo a estos autores la ingesta y la tasa de producción de huevos fueron mayores en el cultivo alimentado solamente con *G. catenatum*, por lo que concluyen que la especie podría tener un papel importante en el control de la aparición de FAN de este dinoflagelado.

Dentro de los efectos de la exposición a *G. catenatum* en los camarones del presente estudio (Tabla 4) se encuentran la pérdida de equilibrio, nado errático, inmovilización de los organismos en el fondo de los acuarios y problemas respiratorios. Este último síntoma posiblemente este asociado a los daños observados en los tejidos branquiales. Estos signos coinciden con lo reportado por Martin y colaboradores (2006), quienes al exponer a salmones a diversas concentraciones de toxinas PSP observaron nado hiperactivo en el momento de que los peces iniciaron su contacto con las toxinas, reanudando posteriormente su posición al fondo de los acuarios y finalmente la muerte. Este tipo de comportamiento también se observó en postlarvas de camarón expuestas a diversas concentraciones de *G. catenatum*, así como en juveniles y adultos de camarones inyectados vía intramuscular con saxitoxina (Pérez-Linares, 2008).

Otro comportamiento observado en los camarones juveniles al estar expuestos a las diferentes concentraciones de *G. catenatum* en el presente trabajo fue que nadaron inicialmente hacia la superficie y/o posteriormente permanecían cerca de las piedras aireadoras. Talavera *et al.* (1999) observaron que en estanques en condiciones críticas de falta de oxígeno los camarones en cultivo presentaban nado errático en la superficie y con tendencia a permanecer en las orillas de los estanques. El comportamiento de permanecer cerca o encima de los aireadores es un indicativo de la falta de oxígeno producida probablemente por la parálisis parcial del sistema respiratorio del camarón y por lo tanto de la disminución en la obtención y el transporte de oxígeno hacia tejidos produciéndoles condiciones de hipoxia a los organismos.

#### 8.4 Perfil de toxinas paralizantes en *G. catenatum*

El perfil de toxinas de la cepa 62L de *G. catenatum* utilizada en el presente trabajo, muestra un perfil con 10 análogos de saxitoxina: dcNEO, dcSTX, GTX 2, GTX3, dcGTX2, dcGTX3, B1, B2 y C 1/2. Estos análogos coinciden con los reportados por Bustillos-Guzmán *et al.* (2015) quienes analizaron ocho cepas de *G. catenatum* del Pacífico mexicano mediante HPLC-FLD y espectrofotometría de masas. Desde el punto de vista cuantitativo sus resultados indican la presencia en bajas concentraciones de las toxinas decarbamoil neosaxitoxina (dcNEO), decarbamoil gonyautoxina 1,4 (dcGTX 1,4) y decarbamoil saxitoxina (dcSTX) quienes en conjunto y en promedio (en base molar) fueron menores al 6%, mientras que los análogos menos potentes del grupo sulfocarbamoil (tipo B y C) fueron las más abundantes, particularmente las C1 y C2 con un promedio de 85%. Para el caso de las toxinas dcGTX2, 3 y dcGTX1, 4, las cuales no se encontraron en este trabajo, estas pudieran estar presentes, pero en concentraciones por debajo de los límites de detección (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2015). Nuestros resultados confirman una mayor presencia del grupo sulfocarbamoil en las cepas de nuestro país, en este estudio con más del 72% molar, como lo establece el trabajo de revisión de Band-Schmidt *et al.* (2010).

Los resultados del presente trabajo también coinciden parcialmente con lo reportado por Quijano-Sheggia *et al.* (2012) en la Bahía de Santiago y Bahía Manzanillo, Colima (STX, NEO, GTX2, GTX3, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, B1, B2, C1 y C2), perfil similar al del presente trabajo a excepción de STX y NEO que no se encuentran en la cepa que utilizamos y dcNEO que sí estuvo presente en este trabajo.

En Bahía Concepción del Golfo de California Gárate-Lizárraga *et al.* (2004) reportaron siete análogos de toxinas paralizantes, siendo las principales la dcGTX2, la dcGTX3 y el análogo B1, que en el perfil de la cepa utilizada en este trabajo no se identificó. En cuanto a los análogos C1 y C2 se reportaron con bajos porcentajes, contrario a lo determinado en nuestro trabajo teniendo C1 14.99% molar y C2 31.51% molar.

Hernández-Sandoval y colaboradores (2009), determinaron la concentración y el perfil toxico de *G. catenatum* de una proliferación presentada en la Bahía de La Paz, Baja California, en el 2007. Identificando ocho toxinas, siendo los análogos C1 y C2 las que representaron un mayor porcentaje molar, lo cual coincide con nuestros resultados.

En el trabajo realizado por Pérez-Linares (2008) determinaron siete toxinas PSP siendo las dominantes la dcSTX, la GTX2 y 3. En el presente trabajo no se determinó el primer análogo y en cuanto a los dos últimos si están presentes pero en bajo porcentaje molar GTX2 (0.29) y GTX3 (0.03). Band Schmidt y colaboradores (2005) describieron el perfil de 16 cepas de *G. catenatum* aisladas de la Bahía Concepción, los análogos dcSTX, dcGTX 2, GTX 3, C1 y C2 estuvieron presentes en todas las cepas analizadas, lo cual coincide con los análogos de la cepa utilizadas en el presente trabajo.

De acuerdo a las concentraciones de cada uno de los análogos (tabla 8) y considerando los factores de toxicidad relativa de cada análogo, calculamos una toxicidad celular de 21 ng STXeq/cél lo cual se encuentra en los rangos reportados previamente para estas cepas (Band-Schmidt *et al.*, 2005; 2008; 2016).

La diferencia en el perfil y la variación de la toxicidad de diversas cepas del mismo dinoflagelado toxico pudiesen estar relacionado con la cepa utilizada y/o al método para la identificación del perfil y con los cambios fisiológicos de las células durante las diferentes fases de crecimiento y las condiciones de cultivo (Band-Schmidt *et al.*, 2006; Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012). La toxicidad también varía entre muestras que son de campo y de cultivo (Cembella 1998).

En este estudio se utilizó una cepa que tiene predominantemente análogos de tipo B y C (72% molar) y decarbamoiladas (27% molar), lo que implica que en términos de cantidad se está exponiendo al camarón a concentraciones altas de toxinas pero con una baja toxicidad (Tabla 8).

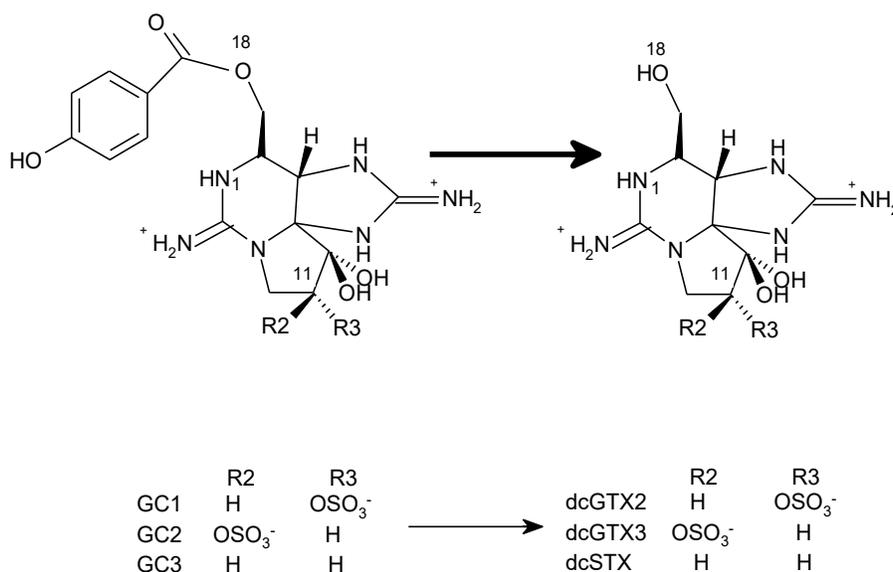
Los resultados muestran claramente que los análogos de mediana y mayor potencia son acumulados tanto en el músculo como en el hepatopáncreas, con un perfil muy diferente al perfil inicial encontrado en el dinoflagelado. Las razones de esta acumulación podrían asociarse a los procesos de biotransformación que pueden ser importantes. Hasta el momento no hay información de los procesos de biotransformación de las toxinas paralizantes en crustáceos, se conoce el proceso de la cinética y la biotransformación en moluscos (Cembella *et al.*, 1993, 1994; Oshima 1995a; Bricelj y Shumway, 1998) destacando principalmente los siguientes tres procesos:

- 1) Epimerización de toxinas sulfocarbamoil (cambio de posición de los grupos R3 y 4) resultando en un equilibrio del grupo (toxinas C1 y C3) y (toxinas C2 y C4) de 1:3 en moluscos.
- 2) Procesos de reducción por reductantes dentro del sistema digestivo como la cisteína y el glutatión, donde se transforman las gonyautoxinas a STX y NeoSTX.
- 3) Pérdida del grupo carbamato y sulfocarbamato por acción de enzimas del molusco resultando en un incremento de toxinas decarbamatadas (Figura 38).

En algunas especies de almejas se observa una rápida decarbamolización enzimática mientras que otras tienen una baja capacidad de biotransformarlas, además los procesos de biotransformación se observan más rápidamente en organismos que son alimentados con toxinas estructuralmente más complejas como las sulfocarbamoil (Bricelj y Shumway, 1998).

La otra fuente de análogos que pudieron ser también una fuente de biotransformación la constituyen los análogos tipo benzoato (Negri *et al.*, 2007, Vale, 2008, Durán-Riveroll *et al.*, 2017). Estas toxinas al perder el grupo benzoato (Vale, 2008; 2015) y en el caso específico de las toxinas GC1, GC2 y GC3, se convierten en dcGTX2, dcGTX3 y dcSTX, respectivamente (Figura 38), de acuerdo a Bustillos-Guzmán y colaboradores (2015) estas tres toxinas son parte del perfil de cepas de *G. catenatum* de Bahía Concepción.

En otro estudio realizado por Durán-Riveroll y colaboradores (2017), detectaron 10 nuevos análogos benzoil, en cultivos concentrados de dos cepas de *G. catenatum* del Golfo de California y del Pacífico Mexicano (cepa utilizada en el presente estudio). Sin duda, estos análogos pudieron ser los sustratos para la biotransformación por los camarones en nuestro estudio y complementaría la explicación de las diferencias encontradas en el perfil de toxinas paralizantes en los camarones con respecto al dinoflagelado. Desafortunadamente, la metodología utilizada en este trabajo no permite la detección de los análogos benzoil, sin embargo es posible que a través de las diferentes rutas metabólicas en el camarón se biotransformaron y como resultado de ello se observan diferencias en los análogos presentes en los diversos órganos analizados.



**Figura 38.** Estructura de las toxinas paralizantes tipo benzoato y derivados de su hidrólisis por la actividad de enzimas carbamoilasas (Vale, 2008a).

El proceso de biotransformación también ha sido descrito de manera parcial para los seres humanos (Rodríguez *et al.*, 2012; García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2009). Estos últimos autores, por ejemplo, realizaron un estudio para determinar *in vitro* la biotransformación enzimática de las toxinas PSP (específicamente la GTX3 y la GTX2) en fracciones microsómicas de hígado de seres humanos. Estos autores señalan que las toxinas se biotransformaron por glucoronización al adherírseles una

molécula de glucosa a la GTX2 y la GTX3, dando como resultado glucorónico-gonyautoxinas 2 y 3. Otra de las alternativas de biotransformación que indican estos autores es por un proceso de oxidación que convierte las toxinas GTX2 y 3 en GTX1 y 4. Estas últimas, y también por glucoronización se transforman en glucorónico-gonyautoxinas 1 y 4 estos productos finales llamados glucoronidos, son compuestos, que constituyen un primer mecanismo de eliminación de las toxinas debido a que la unión de glucosa a la toxina les confiere una mayor hidrosolubilidad, y por lo tanto una mayor probabilidad de poder excretarlos en la orina y la bilis. Sugiriendo que esta es una vía metabólica de desintoxicación y excreción de toxinas PSP en humanos (Rodríguez *et al.*, 2012).

## 8.5 Toxinas en tejidos de camarón

Los resultados del presente trabajo muestran que en el hepatopáncreas y músculo, las formas menos complejas del grupo decarbamoil (GTX2 y 3 y dcGTX2/3 y dcNEO), son las que presentan un mayor porcentaje molar. En contraste, en las branquias e intestino, las toxinas de mayor prevalencia fueron la B2 y la C2. Esto se ve de manera más clara al agrupar los análogos por su estructura química: Se observa que en hepatopáncreas y músculo predominan los análogos del grupo de los decarbamoil y carbamoil (< 80 y 5% respectivamente).

En contraste, en branquias e intestino el grupo de análogos sulfocarbamoil fue el que tuvo mayor dominancia con más del 60 y 40% molar en las concentraciones de *G. catenatum* de  $10^4$  y  $10^6$  cél/L. Estas diferencias sugieren que los procesos de biotransformación o eliminación de las toxinas han sido menores en branquias e intestino. La exposición directa de branquias de los camarones al agua y por lo tanto a los dinoflagelados, pudo provocar que éste se adhiera a las branquias y de ahí que las toxinas detectadas sean parecidas a las del dinoflagelado. En el caso del perfil del intestino, este refleja material poco procesado o digerido por lo que también es similar al perfil de toxinas encontradas en el dinoflagelado. Se considera que en el hepatopáncreas por los procesos enzimáticos realizados por las proteasas, carboxipeptidasa, las aminopeptidasas, lipasas y amilasas, las maltasas y las

quitinas presentes en el hepatopáncreas (Ceccaldi, 1997), las toxinas paralizantes se biotransformaron siendo distribuidas posteriormente a diferentes órganos y tejidos entre ellos el músculo.

las toxinas se biotransformaron pasando posteriormente al músculo, las toxinas pasaron por procesos

Montoya y Carreto (2007) determinaron la presencia de gonyautoxina (GTX) en estómago, riñones, hígado, intestino de aves marinas (*Larus dominicanus* y *Sterna maxima*) además la presencia de STX en el riñón y el hígado de *S. máxima*, estos señalando a *Alexandrium tamarense* como el posible productor de las toxinas. Sus resultados coinciden con nuestro estudio ya que también encontramos gonyautoxinas (GTX) en hepatopáncreas, músculo, branquias e intestino, por otra parte en este trabajo se logró identificar en las postlarvas de camarón daños en la glándula antenal cuya función está relacionada con la excreción de los desechos en los vertebrados y es realizada por los riñones.

Por otra parte, los resultados obtenidos por Smith y colaboradores (2001), indican que las bacterias de diversos moluscos tienen diferentes capacidades para utilizar y transformar análogos de PSP señalando que juegan un rol importante en la transformación y eliminación de las toxinas en los bivalvos. Por lo que seguramente la comunidad bacteriana también influye en la biotransformación de toxinas en los camarones juveniles.

De manera cuantitativa los resultados muestran que en las concentraciones de  $10^4$  y  $10^6$  cél/L de *G. catenatum* en el hepatopáncreas presentó la toxicidad mayor (468.39 y 1755 ngSTXeq/g, respectivamente), seguido del intestino con 72.25 y 225.92 ngSTXeq/g, respectivamente. En cuanto al músculo se determinó una toxicidad de 46.06 y 87.52 ngSTXeq/g y en el caso de las branquias en ambas concentraciones se determinó 12.19 y 25.56 ngSTXeq/g, respectivamente. Estos resultados nos indican que en el hepatopáncreas hubo una mayor concentración de toxinas que en el resto de los órganos del camarón, lo cual coincide con lo reportado por Sephton y colaboradores 2007, quienes encontraron que en la glándula

digestiva (análogo del hepatopáncreas en los camarones) de langostas expuestas en el medio natural a un florecimiento de *Alexandrium fundyense* dinoflagelado productor de toxinas PSP, la toxicidad fue mayor en ese órgano (entre 129 y 646 µg STX eq/100 g) que en músculo y branquias.

En el trabajo reportado por Montoya y Carreto (2006), señalan una mayor acumulación de las toxinas PSP en el intestino de las aves marinas *L. dominicus* con 3.89 pmol de GTX4/100 g de tejido y en *S. maxima* 3.63 pmol de GTX4/100 g de tejido, lo que indica que la entrada de las toxinas hacia los organismos fue vía oral, siendo una de las dos vías de entrada consideradas en los camarones del presente trabajo, donde identificamos una mayor concentración de toxinas PSP en el hepatopáncreas que es parte importante del sistema digestivo de estos organismos.

## 8.6 Daños histopatológicos producidos por toxinas paralizantes en tejidos

De acuerdo con la literatura se han reportado diferentes afectaciones en los camarones por diversos agentes dañinos como: Bacterias (Ibarra-Gómez *et al.*, 2007), metales pesados (Frías-Espericueta *et al.*, 2008), parásitos (Cuéllar-Anjel, 2008), y enfermedades infecciosas (Peña-Navarro y Varela-Mejías, 2016). Sin embargo, en cuanto a las alteraciones que provocan las toxinas o especies fitoplanctónicas nocivas los estudios son escasos (Deng *et al.*, 2017; Morales-Covarrubias *et al.*, 2016; Pérez-Morales, 2016). La mayoría de los trabajos relacionados con toxinas se han realizado en moluscos bivalvos (Bricelj y Shumway, 1998; Estrada *et al.*, 2010).

Para el caso específico de las toxinas PSP y los daños histológicos en camarones, Pérez-Linares y colaboradores (2009) documentaron la desorganización celular del neuropilo de los ganglios, encontrando deterioro en las células gliales. El neuropilo es parte fundamental de los ganglios, es el encargado de procesar la respuesta a estímulos y donde se realiza la sinapsis Pérez-Linares, 2008. En el presente trabajo además de ello, se identificó en los ganglios una pérdida severa del tejido, edema,

ruptura de la conexión entre células gigantes, así como células gliales y el cordón nervioso ventral. Las toxinas paralizantes al afectar el sistema nervioso, bloquean los canales de sodio, provocando una ausencia de la comunicación con el resto de los órganos, particularmente con el sistema neuronal de recepción de estímulos, sistema autónomo y ganglionar, haciendo imposible la realización de funciones motoras básicas (Trainer y Baden, 1999; Oliveira-Soares *et al.*, 2004). Lo cual, en este estudio puede asociarse al comportamiento errático, falta de coordinación, parálisis y tendencia de los camarones a subir a la superficie o permanecer sobre los aireadores.

Pérez-linares (2008) reportó lisis y degradación celular en el hepatopáncreas de camarones expuestos a toxinas PSP, en el presente trabajo se observó atrofia y necrosis, daños que han sido reportado en camarones expuestos a hepatotoxinas (Morales-Covarrubias *et al.*, 2016) y metales pesados (Frías-Espericueta *et al.*, 2008).

Otro efecto importante de las toxinas paralizantes fue una disminución del tamaño de las células B, cuya función es la absorción de partículas mediante pinocitosis, de igual manera se presentó una disminución de la presencia de las células F. Estas últimas sintetizan y secretan enzimas digestivas, además, por medio de pinocitosis, capturan nutrientes y dan origen a las células B (Puello-Cruz, 2013). En algunos estudios se ha considerado la reducción de las células presentes en el hepatopáncreas como indicativo de daño en este órgano (Frías-Espericueta *et al.*, 2008; Morales-Covarrubias *et al.*, 2016), sin embargo en el presente trabajo se utilizó el tamaño de las células como indicativo de afectación. De acuerdo con Al-Mohana *et al.* (1989), una disminución en la cantidad de las células del hepatopáncreas podría ser muestra de la utilización de sus reservas de nutrientes, debido a un aumento en la demanda de energía para la osmoregulación, en cuanto a la reducción en el tamaño de las células, también podría ser indicativo de una mayor demanda de energía en el organismo para su sobrevivencia y por otra parte posiblemente no hay absorción de alimento.

En cuanto al órgano linfoide de acuerdo con nuestros resultados se presentó edema en el 56% de los organismos expuestos a las toxinas PSP y pérdida de la estructura del órgano en camarones expuestos a la concentración más alta de *G. catenatum*, esta deformación del órgano se ha reportado con anterioridad en camarones expuestos a hepatotoxinas producidas por *Microcystis aeruginosa* (Morales Covarrubias *et al.*, 2016).

Las branquias son el primer órgano expuesto a sustancias tóxicas en el ambiente debido a su constante contacto con el medio externo y varios autores han descrito lesiones en los filamentos branquiales de diversos organismos provocadas por los efectos de agentes dañinos (Estrada-Muñoz 2005; Frías-Espericueta *et al.*, 2008; Escobedo-Lozano *et al.*, 2012; Peña-Navarro y Varela-Mejías, 2015; Morales-Covarrubias *et al.*, 2016). Por ejemplo, Frías-Espericueta y colaboradores (2008) observaron dilatación de los filamentos branquiales y pérdida de la estructura regular del epitelio columnar en camarones expuestos a diversos niveles de una mezcla de metales pesados. También, Morales-Covarrubias y colaboradores (2016) encontraron edema severo, núcleos picnóticos, hiperplasia e infiltración de células de hemolinfa. En nuestro estudio los efectos provocados por las toxinas paralizantes en las branquias de los juveniles de camarón, fueron atrofia y fusión de los filamentos, siendo mayores en la concentración más alta, estos daños podrían explicar el comportamiento de asfixia de los camarones (permanecer muy cerca de las piedras aereadoras).

Los factores que provocan estrés en los organismos son cuando se induce a una excesiva actividad, a la presencia de contaminantes a cambios drásticos de temperatura, de salinidad y a bajas concentraciones de oxígeno, los cuales propician cambios fisiológicos y metabólicos en los organismos (Carreño-León, 2000; Puente Carreón, 2009). En nuestro caso, los camarones juveniles al encontrarse expuestos a condiciones no aptas para su desarrollo, como es la exposición a las toxinas que ocasiona lesiones en el sistema respiratorio, provocando una disminución en el ingreso de oxígeno a través de las branquias, induciendo estrés e hipoxia en los camarones.

En la glándula antenal se presentó atrofia en los túbulos, necrosis, infiltración hemocítica y vacuolización, lo que concuerda con los resultados de Morales-Covarrubias y colaboradores (2016) al exponer a postlarvas de camarón a *Microcystis aeruginosa* especie productora de hepatotoxinas. Como se menciona anteriormente, la glándula antenal es parte integral del sistema circulatorio (Bell y Lightner, 1988) y su función es la regulación iónica, osmótica y de fluidos. Por lo que podemos asumir que estas funciones en los camarones fueron disminuidas o inhibidas por las toxinas PSP.

En el corazón, la densidad de las fibras cardíacas está asociada a la distribución de la hemolinfa (irrigación) a través de las arterias a los diferentes órganos, de tal manera que una alta densidad de fibras puede asociarse a una mejor función cardíaca (Martínez, 2007). En nuestro trabajo en el caso de los controles, la densidad de las células miocárdicas fue mayor que en los juveniles expuestos a las toxinas PSP los cuales presentaron una menor densidad de masa muscular en las concentraciones más altas de *G. catenatum*. Lo cual indicaría que el corazón disminuyó o dejó de bombear hemolinfa al sistema circulatorio, provocando un desabasto en las subcámaras del corazón. Estos resultados coinciden con lo reportado por Pérez-Linares (2008) que al exponer a los camarones en diversos estadios de desarrollo a una exposición aguda, crónica y por inyección de toxinas PSP disminuyó la densidad de fibras cardíacas y hubo pérdida de tejido.

Existe evidencia que demuestra que en crustáceos decápodos como *Procambarus clarkii* y *Homarus americanus* el flujo de la hemolinfa y el calibre de las arterias se incrementan por la actividad muscular, aumentando el suplemento de hemolinfa a los músculos abdominales para incrementar la demanda metabólica cuando son sometidos a dicha actividad. De esta manera, la cantidad de hemolinfa se dirige hacia las extremidades como los apéndices, estructuras bucales y músculos, ya que durante la actividad muscular se requiere un alto grado de reoxigenación (Reiber *et al.*, 1997; Reiber y McMahon, 1998). Este hecho aunado a que los crustáceos presentan un sistema vascular donde participa el tejido endotelial (Wilkens *et al.*, 1997) y la distribución de la hemolinfa se lleva a cabo por canales específicos

(McLaughlin, 1983; McMahon, 2001) se asume que en los camarones juveniles disminuyó su función debido al efecto de las toxinas en el músculo, , por lo tanto, el corazón dejó de bombear hemolinfa.

El músculo estriado o esquelético constituye el aparato locomotor de los organismos, responde a estímulos voluntarios siendo capaz de alcanzar gran fuerza en un lapso breve de tiempo, pero también se fatiga rápidamente, posee células alargadas y multinucleadas llamadas fibras musculares (Welsch y Sobotta, 2010).

En el músculo estriado de los somitas los camarones presentaron infiltración hemocítica, necrosis y atrofia en las fibras musculares, los cuales podría ser causados por el efecto de las toxinas y/o por los espasmos bruscos que manifestaron los organismos al estar expuestos a las toxinas provocando rompimiento en las fibras. La atrofia muscular que se presentó en los camarones expuestos a *G. catenatum* es por tanto la expresión morfológica de una deficiencia funcional y estructural de una célula, o de un tejido, lo que implica una preexistencia de normalidad celular e hística. En la atrofia que se observó en el músculo de los camarones expuestos, se presentaron grandes alteraciones al citoplasma, núcleo celular y del tejido. Estas modificaciones van acompañadas de profundas alteraciones citoplasmáticas que pueden conducir a la pérdida de la unión entre el citoesqueleto y el sarcolema, y finalmente, a la necrosis de la fibra muscular. En este caso de atrofia muscular, el citoplasma se vio más afectado, que fue evidente por la reducción cuantitativa de éste, hasta el punto de que, provocó una reducción uniforme del volumen celular. La atrofia muscular se refiere a la reducción de las fibras musculares y consecuentemente de la fuerza muscular, lo que se traduce en una disminución de la actividad contráctil así como la disminución del contenido de proteínas musculares y por lo tanto la reducción en el área del músculo (Ramírez-Ramírez, 2012). Esto lleva a que las células atrofiadas muestren una disminución importante en el área o un cese de la función, como lo registrado en los camarones juveniles.

En el presente trabajo evaluamos el músculo estriado en los somitas del abdomen de los camarones, cuya función es la locomoción y responder a los estímulos y alcanzan el pico máximo de contracción que mantienen durante el estímulo. Sin embargo, el músculo estriado también está presente en órganos como esófago, intestino medio, la aorta posterior y los lóbulos ováricos que están dentro del hemocele, los cuales están totalmente rodeados por el músculo abdominal, cuya función también debió haber sido afectada por las toxinas. Las células musculares no se dividen durante la vida de un organismo, sólo se forman durante el periodo de gestación (miogénesis), debido a que son altamente diferenciadas, por lo tanto, la recuperación de las fibras musculares en los organismos expuestos no podría ser posible, lo cual conlleva a una pérdida de sus funciones, Haciendo a los camarones expuestos a toxinas PSP más vulnerables a los depredadores en el medio natural y al canibalismo en condiciones de cultivo.

Todas las modificaciones de carácter morfológico de las células pueden afectar a células aisladas o grupos de ellas, por consiguiente, la modificación de un tejido completo. Todos los estímulos que pueden actuar sobre una célula son en realidad estímulos funcionales: Cuando éstos exceden los límites fisiológicos, pueden lesionar a la célula hasta anular los procesos vitales, o bien, provocar notables modificaciones regresivas. De lo anterior, es claro que los resultados sugieren que las PSP provocan daños que llevan a la disfunción o cese de las funciones celulares y del tejido muscular.

En las branquias de los moluscos bivalvos se filtran las células planctónicas incluyendo las tóxicas y las transportan al esófago luego al estómago y los divertículos digestivos. Ahí las toxinas se liberan y entran a los tejidos circundantes y luego se transportan, probablemente por la hemolinfa, y se acumulan en otros tejidos haciendo a los bivalvos inadecuados para el consumo humano (Shumway 1989: Bricelj y Shumway, 1998). En el caso de los camarones, las toxinas PSP, pueden ingresar vía sistema alimenticio de forma celular y disuelta por la boca, pasan al esófago y continúan hasta el estómago donde ya las células vivas del dinoflagelado han sido fragmentadas y su contenido celular incluyendo las toxinas

PSP son liberadas. Por su bajo peso molecular, las PSP son rápidamente absorbidas en el estómago y luego es transportada al hepatopáncreas. En este último órgano se mezclan con enzimas digestivas donde se considera son biotransformadas, también se considera que el pH presente en el intestino de los camarones que es de 5.5 a 9, puede ser un factor importante de biotransformación (Ceccaldi, 1989). Las condiciones básicas es un factor que provoca la desnaturalización (Shimizu, 2004) o cambios estructurales en la PSP (Cembella *et al.*, 1993, 1994; Oshima *et al.*, 1995a; Bricelj y Shumway, 1998; Wiese *et al.*, 2010). Las toxinas PSP son estables en medio ácido, pero son inestables en condiciones alcalinas oxidándose fácilmente (COFEPRIS, 2010).

Otra de las posibles vías de entrada de las toxinas es a través de las branquias debido a que se encuentran en contacto directo con el medio acuático. De acuerdo a nuestros resultados no se encontraron células en el tejido branquial de los camarones, por lo que se considera que las toxinas ingresaron en los juveniles de manera disuelta. Al entrar en contacto con las branquias fueron transportadas en la hemolinfa hacia el corazón, en donde todo el contenido de la hemolinfa como oxígeno, nutrientes y en este caso las toxinas PSP fueron dispersadas a todos los órganos del camarón.

La acumulación de toxinas es gradual en los diversos tejidos y es proporcional a la concentración y al tiempo de exposición a los dinoflagelados tóxicos. La persistencia de las toxinas paralizantes en los tejidos depende de los mecanismos de absorción, acumulación, eliminación, localización anatómica y las transformaciones que se presentan en cada tejido. Por lo que en este trabajo se demuestra que la exposición de los camarones a las toxinas PSP afecta de forma importante todas las funciones fisiológicas básicas del camarón, desde la respiración hasta la excreción. Esto se debe considerar durante el manejo de organismos en cultivo, ya que la reducción de sus funciones vitales puede reducir la resistencia de esta especie ante la presión de algún agente patógeno u otro estrés ambiental que provoque la muerte y pérdidas económicas para el acuicultor.

## 8.7 Posible efecto de PSP en el camarón

Aunque el mecanismo de acción de las toxinas PSP que describen en el presente trabajo es especulativo porque no se realizó un estudio patológico como tal, se puede argumentar que los resultados de esta investigación apuntan a que los camarones tienen un contacto principalmente con toxina en forma disuelta y que esta penetra vía branquial hacia el torrente sanguíneo. Una vez en el sistema circulatorio, las toxinas son llevadas a todo el organismo donde bloquea los canales de sodio provocando parálisis parcial. Además, la falta de oxígeno en el organismo provocado por el bloqueo de las terminaciones neuronales cardiacas, lleva al organismo a condiciones de hipoxia con la consecuente disminución del aporte energético e inducción al metabolismo aeróbico. Esto conlleva a la muerte celular de tejidos como el sistema nervioso, de alto requerimientos energéticos, y de otros tejidos y por lo tanto la activación del sistema inmune para deshacerse de las células dañadas o muertas (fagocitosis). A nivel de tejido branquial la barrera paracelular puede ser modificada por la falta de energía (ATP) como lo sugieren Günzel y Yu (2013) y de esta manera permeabilizar más la branquia con el consecuente paso de las moléculas de PSP, además de agua y otros iones. Es plausible entonces pensar que los daños en tejido nervioso y quizás en sistema cardiaco y branquial es cada vez mayor hasta ser irreversible comprometiendo su funcionalidad y por lo tanto mortal. Es importante señalar también que si bien *G. catenatum* es productor de toxinas PSP, también puede ser productor de otro tipo de moléculas tóxicas como el aminoácido no proteico  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (Lage *et al.*, 2014) u otro posible tipo de toxinas no determinadas aun y que estas, en conjunto con las PSP, pueden ejercer una sinergia en el organismo con las consecuencias histopatológicas, etológicas y mortales aquí descritas.

## 9. Conclusión

Los resultados de este trabajo muestran claramente que los camarones presentaron signos de comportamiento anómalos además daños celulares asociados a la presencia de las toxinas. Aunque nuestro objetivo se enmarca en una relación cuantitativa de los cambios respecto a un control (camarones sin exposición a las toxinas paralizantes), también se hizo el esfuerzo de tener algunos parámetros descriptivos y semi-cuantitativos. Si bien este proceso de evaluación es subjetivo, este ha permitido una valoración más objetiva. Por ejemplo, la evaluación de las variables de altura de las células del hepatopáncreas o la valoración del área de cobertura de branquias y de músculo, ha permitido relacionar la concentración de exposición a estas variables observándose una relación directa entre estas. Así mismo, en la exposición con la mayor concentración del dinoflagelado ( $10^6$  cél/L) se tuvo un 20% de disminución del área branquial con respecto al control y un 11% en la concentración menor ( $10^4$  cél/L). Por lo tanto, una primera conclusión es que esta metodología de valoración es adecuada en este tipo de estudio.

La utilización de esta metodología permitió ver que las concentraciones del dinoflagelado tóxico en algunos casos está relacionado directamente con los daños presentados en los organismos (infiltración hemolítica, separación del cordón nervioso ventral, fusión de lamelas, necrosis de células del hepatopáncreas, edemas, entre otros), sin embargo en algunos órganos la afectación (atrofia muscular, área de cobertura de los filamentos branquiales) no depende de la concentración de las toxinas presentes en el medio acuático. Lo anterior es importante en caso de que se requiera diagnosticar la presencia de microorganismos productores de PSP o sus toxinas en baja densidad. También desde el punto de vista ecológico es relevante ya que, en el medio natural, el hecho de que concentraciones tan bajas como  $10^4$  cél/L provoquen daños severos, como en la atrofia muscular, este daño hace más vulnerables a los organismos a sus depredadores y con esto compromete su sobrevivencia.

Por otra parte, las afectaciones presentadas en los organismos expuestos a las toxinas PSP son similares a las causadas por otros agentes dañinos como virus y metales pesados a excepción de los daños observados en el sistema nervioso central en el corazón y en el tejido muscular que también se presentan con otras patologías, pero en menor magnitud, por lo que se podrían considerar como un primer indicativo de daños provocado por toxinas PSP en camarones.

Finalmente, al igual que otros investigadores (Linares *et al.*, 2009) se encontró que las toxinas PSP tienen un efecto importante a nivel de los tejidos y órganos de los camarones así como en su comportamiento. Estos efectos fueron asociados al consumo directo del dinoflagelado por esos autores. Sin embargo, como lo muestra este trabajo, esta forma de ingestión fue prácticamente nula, lo que nos permite sugerir que estos resultados se asocian a los efectos de la toxina disuelta en el agua de mar. Los efectos de las toxinas en disolución han sido poco estudiados por lo que este trabajo es una contribución a este campo y servirá como antecedente en futuros estudios.

Para corroborar lo anterior es importante la utilización de otras herramientas que nos permitan a través de análisis de expresión de genes determinar una condición más puntual de los daños en los camarones con la concentración de las toxinas PSP. La producción de toxinas disueltas en dinoflagelados ha sido objeto de pocos estudios. En el experimento de este trabajo, los datos claramente muestran que la concentración inicial y al tiempo final del experimento las densidades celulares fueron estadísticamente iguales lo que implica una nula ingestión de células de *G. catenatum* por los camarones. Evidentemente que aún con este análisis la posibilidad de que hayan ingerido algunas células es real dado que los métodos de conteos tienen sus límites de confianza. Sin embargo, este consumo debió ser muy bajo por lo que la exposición a las toxinas debió ser mayoritariamente por la liberación de las toxinas al medio al morir las células y por otro a la excreción natural que los dinoflagelados hacen al medio (Hsieh *et al.*, 2000; Lefevre *et al.*, 2008; Reis Costa *et al.*, 2010). Por ejemplo, Hsieh y colaboradores (2000) encuentran cantidades importantes de toxinas PSP ( $\approx 50\mu\text{g}$ ) en el medio de cultivo, indicando

la liberación de estas toxinas por parte del dinoflagelado *Alexandrium tamarense*. Otra evidencia de la producción de toxinas disueltas se refleja en el hecho de que larvas expuestas al medio donde se cultiva *G. catenatum* también mueren luego de unas horas de exposición (Pazos-Mandujano, 2012, Bustillos-Guzmán, com. pers.). De lo anterior, podemos sugerir que los efectos observados en este estudio están asociados particularmente a esta forma de exposición.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguirre-Guzmán, G., Sánchez-Martínez, J.G., Campa-Córdova, A.I., Luna-González, A., Ascencio, F. 2009. Penaeid shrimp immune system: A Mini review. *Thai Journal of Veterinary and Medicine* 39:205-215.
- Aké-Castillo, J.A. y Poot-Delgado, C.A. 2016. FAN en el Golfo de México: panorama general sobre eventos y especies. En: García-Mendoza, E., Quijano-Sheggia, S.I., Olivos-Ortiz, A. y Núñez-Vázquez E.J. (eds.). *Florecimientos Algales Nocivos en México*. CICECE Ensenada, México pp. 438.
- Alday-Sanz, V. 2010. *The shrimp book*. Nottingham: Nottingham University Press pp. 200.
- Al-Mohana, S.Y. y Nott, A. 1989. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea; Decapoda) during the moult cycle. *Marine Biology* 101:535.
- Alonso-Rodríguez, R. y Páez-Osuna, F. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture* 219(1-4):317-336.
- Anderson, D.M. Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. 2012. Progress in understanding Harmful Algal Blooms: Paradigm Shifts and New Technologies for Research, Monitoring, and Management. *The Annual Review of Marine Science. Reviews of Marine* 4:143-176.
- Band-Schmidt, C.J., Morquecho, L., Lechuga-Devéze, C.H. y Anderson, D.M. 2004. Effects of growth medium, temperature, salinity and seawater source on the growth of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from Bahía Concepción, Gulf of California, México. *Journal of Plankton Research* 26(12):1459-1470.
- Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., Gárate-Lizárraga, I., Lechuga-Devéze, C.H., Reinhardt, K. y Luckas, B. 2005. Paralytic shellfish toxin in strains of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten*

*ventricosus* G.B. Sorwerby II from Bahía Concepcion, Gulf of California, México. Harmful Algae 2:21-31.

Band-Schmidt, C.J., Rojas-Posadas, D., Morquecho, L. y Hernández-Saavedra, N. Y. 2008. Heterogeneity of LSU rDNA sequences and morphology of *Gymnodinium catenatum* strains in Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. Journal of Plankton Research 30:755–763.

Band-Schmidt, C.J. Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortes, D.J., Gárate-Lizárraga, I., Núñez-Vázquez, E.J. y Hernández-Sandoval, F.E. 2010. Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific. Marine Drugs 8:1935-1961.

Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D.J., Núñez-Vázquez, E.J. y Hernández-Sandoval, F.E. 2011. El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. Hidrobiológica 21(3):381-413.

Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., Durán-Riveroll, L.M., López-Cortés, D.J., Hernández-Sandoval, F.E. y Núñez-Vázquez, E.J. 2016. Autoecología de microalgas nocivas aisladas del Golfo de California. En: García-Mendoza, E., Quijano-Sheggia, S.I., Olivos-Ortiz, A. y Núñez-Vázquez E.J. (eds.). *Florecimientos Algales Nocivos en México*. CICECE Ensenada, México. pp. 438.

Barbera-Sánchez, A., Soler, J.F., Rojas de Astudillo, L. y Chang-Yen, I. 2004. Paralytic shellfish poisoning (PSP) in Margarita Island, Venezuela. Revista de Biología Tropical 52 (1):89-98.

Barracco, M.A., Perazzolo, L.M. y Rosa, R.D. 2008. Inmunología del camarón pp. 169-211. En: Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. (eds.). *Guía Técnica Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Programa CYTED Red II-D *vannamei*, Panamá, República de Panamá p. 270.

- Barracco, M.A., Perazzolo, L.M. y Rosa, R.D. 2014. Avances en la inmunología del camarón. En: Morales, V. y Cuéllar-Anje, J. (eds.). 2014. *Guía Técnica Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. OIRSA, Panamá, República de Panamá pp. 382.
- Barracco, M.A., Perazzolo, L.M. y Rosa, R.D. 2014. Avances en la inmunología del camarón. En: Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. (eds.). 2014. *Guía Técnica Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. OIRSA, Panamá, República de Panamá pp. 382.
- Barraza–Guardado, R., Cortés–Altamirano, R. y Sierra–Beltrán, A. 2004. Marine diatoms from *Chattonella marina* and *Chattonella* cf. *ovata* in Kun Kaan Bay, Sonora in the Gulf of California. *Harmful Algae News* 25:7–8.
- Belardi-Haftallaoni, E.H. 2008. Floraciones Algales nocivas en el Mar Mediterráneo. Catedra Euroárabe de Medio Oriente. Fundación Euroárabe de Altos Estudios.
- Bell, T.A. y Lightner, D.V. 1988. *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society pp. 144.
- Beneski, D.A. y Catterall, W.A. 1980. Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:639–643.
- Berger, C. 2000. Aportes de la Bio-tecnología a la alimentación y a la Inmunoestimulación de Camarones peneidos. *Asociación Langostina Peruana (ALPE)* 102:110.
- Botana, L.M., Rodríguez-Vieytes, M., Alfonso, A. y Louzao, M.C. 1996. Phycotoxins: paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning. En: *Handbook of food analysis*, Dekker, London pp. 1147-1170.
- Botana, L.M., Hess, P., Munday, R., Nathalie, A., DeGrase, S.L., Feeley, M., Suzuli, T., Van den Berg, M., Fattori, V., Garrido, E., Tritscher, A., Nakagawa, R. y

- Karunasagar, I. 2017. Derivation of toxicity equivalence factors for marine biotoxins associated with bivalve molluscs. *Trends in Food Science & Technology* 59:15-24.
- Blackburn, S.I, Bolch, C.J.S. Haskard, K.A. y Hallegraef, G.M. 2001. Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia* 40(1):78-87.
- Brackenbury, W.J., y Isom, L.L. 2011. Na channel beta subunits: overachievers of the ion channel family. *Frontiers in Pharmacology* 2:53.
- Bricelj, V.M. y Shumway, S.E. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve mollusks: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Reviews in Fisheries Science* 6(4):315-383.
- Brock, J.A. y LeaMaster, B. 1992. A look at the principal bacterial, fungal and parasitic diseases of farmed shrimp. En: Chamberlain, G.W. y Wyban, J. (eds.). *Proc. Special Session on Shrimp Farming*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge 212-226.
- Brock, J.A. y Main, K.L. 1994. A guide to common problems and diseases important to shrimp farms in the Americas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 13:415-418.
- Buckup, L., Dutra, B.K., Ribarcki, F.P., Fernandes, F.A., Noro, C.K., Oliveira, G.T. y Vinagre, A.S. 2008. Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea Decapoda) in its natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 149A pp.59-67.
- Buja L. M., Eigenbrodt, M. L., Eigenbrodt, E. H. 1993. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 117:1208–1214.

- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.*, revisited. *Journal of Parasitology* 83:575-583.
- Bustillos-Guzmán, J.J., Band-Schmidt, C.J., López-Cortés, D.J., Gárate-Lizárraga, I., Nuñez-Vázquez, E.J. y Hernández-Sandoval, F.E. 2012. Variations in growth and toxicity in *Gymnodinium catenatum* from the Gulf of California under different ratios of nitrogen and phosphorus. *Ciencias Marinas* 38:101–117.
- Bustillos-Guzmán, J. J., Band-Schmidt, C.J., Durán-Riveroll, L.M., Hernández-Sandoval, F.E., López-Cortés, D.J., Núñez-Vázquez, E.J., Cembella, A. y Bernard, K. 2015. Paralytic toxin profile on the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham from the Pacific as revealed by LC-MS/MS, *Food Additives & contaminants: Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 32(3):381-394.
- Callejas, L., Meléndez, A.C., Amador, J.J., Conklin, L., Gaffga, N., Schurz-Rogers, H., DeGrasse, S., Hall, S., Earley, M., Mei, J., Rubin, C., Aldighieri, S., Backer, L.C. y Azziz-Baumgartner, E. 2015. Paralytic shellfish poisonings resulting from an algal bloom in Nicaragua. *BMC Research Notes*. (10)8:74.
- Carreño-León, D.P. 2000. Alteraciones metabólicas del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en respuesta a la manipulación rutinaria bajo condiciones de cultivo y a la ablación del tallo ocular. Tesis para la obtención del grado de maestro en ciencias. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias marinas pp. 113.
- Catterall, W.A. 1985. The voltage sensitive sodium channel. A receptor for multiple toxins. En: Anderson, D.M. White, A.W., Baden, D.G. (eds.) *toxin dinoflagellates*. Elsevier, New York pp. 329-242.
- Ceccaldi, H.J. 1989. Anatomy and physiology of digestive tract of crustacean Decapods reared in aquaculture. *Advances in tropical aquaculture. AQUACOP IFREMER Actes de Colloque, Advances in tropical aquaculture* 9:243-259.

- Ceccaldi, H.J. 1997. Anatomy and physiology of the digestive system. En: Crustacean Nutrition. En: D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. y Akiyama, D.M. (eds.) Crustacean Nutrition: Advances in World Aquaculture, 6, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA pp. 261-291.
- Cembella, A.D., Shumway, S.E., Larocque, R. 1994. Sequestering and putative biotransformation of paralytic shellfish toxins by the sea scallops *Placopecten magellanicus*: Seasonal and spational scales in natural populations. Journal of Experimental Marine Biology And Ecology 180:1-22.
- Cembella, A.D., Shumway, S.E., Lewis, N.I. 1993. Anatomical distribution and spacio-temporal in paralytic shellfish toxin in two bivalve species from the Gulf of Main. Journal of Shellfish Research 12:389-403.
- Cembella, A.D. 1998. Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae. En: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (eds.) Physiology and Ecology of Harmful Algal Blooms. NATO-Advanced Study Institute Series 41:381-403.
- Coates, C.J. y Nairn, J. 2014. Diverse immune functions of hemocyanins. Developmental and Comparative immunology 45:43-55.
- COFEPRIS, 2010. Características generales de las biotoxinas marinas. Disponible en línea.  
<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Marea%20Roja/CaracteristicasGeneralesBiotoxinas.aspx>. Ultima fecha de consulta 24/sep/2017.
- Cortés-Altamirano, R., Hernández-Becerril, D.U. y Luna-Soria, R. 1995. Evaluación y prevención de los efectos de las mareas rojas en la Bahía de Mazatlán (1994). Ciencias del Mar, Universidad Autonoma de Sinaloa 14:10-14.
- Cortés-Altamirano, R. y Licea-Duran, S. 1999. Florecimientos de microalgas nocivas en estanques para cultivo semi-intensivo de camarón en México. Revista Latinoamericana Microbiología 41:157-166.

- Cortés-Altamirano, R., Manrique, F.A. y Luna-Soria, R. 1997. Harmful phytoplankton blooms in shrimp farms from Sinaloa, México. En: 7<sup>th</sup> International Conference on Harmful Algae p. 56.
- Cortés-Altamirano, R. y Sierra-Beltrán, A. 2008. Biotoxins from freshwater and marine harmful algal blooms occurring in México. *Toxin Reviews* 27:27-77.
- Cortés-Lara, M del C., Cortés-Altamirano, R. y Sierra-Beltrán, A.P. 2004. Presencia de *Cochlodinium catenatum* (Gymnodiniales: Gymnodiniaceae) en mareas rojas de Bahía de Banderas, Pacífico mexicano. *Revista Biología Tropical* 52:51-58.
- Costa, P.R., Botelho, M.J. y Lefebvre K.A. 2010. Characterization of paralytic shellfish toxins in seawater and sardines (*Sardina pilchardus*) during blooms of *Gymnodinium catenatum*. *Hydrobiologia* 655:89-97.
- Cristofolini, A. 2010. Estudio de la remodelación celular durante la placentación porcina. Tesis Doctoral. Biblioteca Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba Argentina pp. 110.
- Crúz-Aguirre, R.U. 2015. El florecimiento algal nocivo de enero de este año, el más impactante ocurrido en México. Comunicado. Disponible en línea <http://todos.cicese.mx/sitio/noticia.php?n=617#.Wgnq-3Zuncs> Ultima fecha de consulta 21/ene/2018.
- Cuartas, E.I., Díaz, A.C. y Petriella, A.M. 2002. Estudio morfológico e histológico del hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* (BATE) (Crustacea, Penaeoidea). *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero* 15:5-13.
- Cuéllar-Angel, J. 2008. Métodos de diagnósticos de enfermedades en camarones marinos de cultivo pp. 29-92. En: Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. (eds.). *Guía Técnica Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Programa CYTED Red II-D *vannamei*, Panamá, República de Panamá p. 270.

- Cuéllar-Angel, J. 2008. Enfermedades por parásitos. pp. 135-156. En: Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. (eds.). *Guía Técnica Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. Programa CYTED Red II-D *vannamei*, Panamá, República de Panamá p. 270.
- Cuéllar-Angel, J. 2014. Método para el diagnóstico de enfermedades en camarones Penaeidos pp. 21-92. En: Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. (eds.). 2014. *Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. OIRSA, Panamá, República de Panamá p. 382.
- Cuervo, A.M. 2004. Autophagy: in sickness and health. *Trends in cell Biology* 14(2):70-77.
- Cusick, K.D. y Saylor, G.S. 2013. An overview on the marine neurotoxin, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine Drugs* 11:991-1018.
- Deng, Y., Wang, Y., Zhang, X., Sun, L., Wu, C., Shi, Q., Wang, R., Sun, X., Bi, S. y Gooneratne, R. 2017. Effects of T-2 Toxin on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Growth, and antioxidant defenses and capacity and histopathology in the hepatopáncreas. *Journal of aquatic animal health* 29(1):15-25.
- Destoumieux-Garzon D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., Bachère, E. 2001. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *The Journal of Biological Chemistry* 276:47070-47077.
- Durán- Riveroll, L., Krock, B., Cembella, A., Peralta-Cruz, J., Bustillos-Guzmán, J.J. y Band-Schmidt, C.J. 2017. Characterization of benzoyl saxitoxin analogs from the toxigenic marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* by hydrophilic interaction liquid ion-chromatography-tandem mass spectrometry. *Natural Products Chemistry & Research* 5:5.

- Escovedo-Lozano, A.Y., Estrada, N., Ascencio, F., Contreras, G. y Alonso, R. 2012. Accumulation, biotransformation, histopathology and paralysis in the Pacific Calisco Scallop *Argopecten ventricosus* by the paralyzing toxins of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Marine Drugs* 10:1044-1065.
- Estrada-Muñoz, N.A. 2005. Efecto de las toxinas parálíticas (PSP) del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) en el sistema de defensa de la almeja mano de león, *Nodipecten subnodosus* (Mollusca: Pectinidae). Tesis para la obtención del grado de Maestra en ciencias, Uso, Manejo, Preservación de los Recursos Naturales. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste p. 143.
- Estrada, N., Rodríguez-Jaramillo, C., Contreras, G. y Ascencio, F. 2010. Effects of induced paralysis on hemocytes and tissues of the giant lions paw scallop by paralyzing shellfish poison. *Marine Biology* 157:1401-1415.
- FAO, 2006. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Disponible en línea.  
[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus\\_vannamei/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es) Última fecha de consulta 27/oct/2017.
- FAO, 2010. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Disponible en línea <http://www.fao.org/docrep/013/i1820s/i1820s.pdf> Última fecha de consulta 10/oct/2017.
- FAO, 2015. Anuario Estadísticas de pesca y acuicultura. Disponible en línea <http://www.fao.org/fishery/statistics/es> Consultado el 20/05/16. Última fecha de consulta 8/oct/2017.
- Fraga, S., Anderson, D.M., Bravo, I., Teguera, B., Steidinger, K.A. y Yentsch, C.M. 1988. Influence of upwelling relaxation on dinoflagellates and shellfish toxicity in Ria de Vigo, Spain. *Estuarine Coastal and Shelf science* 27:349-361.
- Franceschini-Vicentini, I., Ribeiro, B., Papa, K., Marques-Junior, J., Vicentini, C.A. y Valentini, P.M.C.M. 2009. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of

the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. International Journal Morphology 27(1):121-128.

Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M. y Panayiotidis, M.I. 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois Mutation Research 674:3–22.

Frías-Espericueta, M.G., Abad-Rosales, S., Nevárez-Velázquez, A.C., Osuna-López, I., Páez-Osuna, F., Lozano-Olvera, R. y Voltolina, D. 2008. Histological effects of a combination of heavy metal son Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles Aquatic. Toxicology 89:152-157.

Fuentes, C., Clement, A. y Aguilera, A. 2008. Summer *Alexandrium catenella* bloom and the impact on farming en the XI Aysén region, Chile. En: Moustrup, O., Doucette, G., Enevoldsen, H., Godhe, A., Hallegraeff, G., Luckas, B., Lundholm, N., Lewis, J., Rengefors, K., Sellner, K., Steidinger, K., Tester, P. y Zingone, A. (eds.). Proceeding of the International Conference on Harmful Algae. International Society for the Study of Harmful Algae and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Copenhagen pp 183-186.

Fuentes-Pascacio, J.A. 2010. Efecto de toxinas paralizantes de *Gymnodinium catenatum* en el copépodo *Pseudodiaptomus euryhalinus*. Tesis para la obtención del grado de Biólogo Marino. Universidad Autónoma de Baja California Sur p. 56.

Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J.J., Erler, K., Muñeton-Gómez, M.S., Luckas B., Tripp-Quezada, A., 2004. Paralytic shellfish toxins in the chocolata clam, *Megapitaria squalida* (Bivalvia: Veneridae), in Bahía de La Paz, Gulf of California. Revista Biologica Tropical 52:133-140.

Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J.J., Morquecho, L., Band- Schmidt, C.J., Alonso-Rodríguez, R., Erler, K., Luckas, B., Reyes- Salinas, A. y Gongora-González, D.T. 2005. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in the strains

- of *Gymnodinium catenatum* Graham from the Gulf of California, México. Marine Pollution Bulletin 50:208-236.
- Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D.J., Hernández-Sandoval, F. E. Erler, K. y Luckas, B. 2006. Paralytic shellfish toxin profiles in net phytoplankton samples from Bahía Concepción, Gulf of California, México. Marine Pollution Boletine 52:800-815.
- Gárate-Lizárraga, I., Pérez-Cruz, B., Díaz-Ortiz, J. y Band-Schmidt, C.J. 2008. Microalgas y biotoxinas marinas en las costas mexicanas. *Conversus* 9:22-26.
- Gárate-Lizárraga, I., Díaz-Ortiz, J.A., Pérez-cruz, B., Alarcón-Romero, M.A., Chávez-Almazán, I.A., García-Barbosa, J.I. y López-Silva, S. 2011. A multi-species dinoflagellate bloom and shellfish toxicity in the Costa Grande, Guerrero, México (December 2010). *CICIMAR Oceánides* 26(1):67-71.
- Gárate-Lizárraga y González-Armas, R. Fish die offs along southern coasts of Baja California. 2014. *Harful Algae News* (48):2014.
- Gárate-Lizárraga, I., Okolodkov, Y. y Cortés-Altamirano, R. 2016. Microalgas formadoras de florecimientos algales en el Golfo de California. Golfo de California En: García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S.I., Olivos-Ortiz, A y Núñez-Vázquez, E.J. (eds.). *Florecimientos algales nocivos en México* pp. 130-145.
- García, C., Bravo, M del C., Lagos, M. y Lagos, N. 2004. Paralytic shellfish poisoning: Post-mortem analyzing of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia Fjords. *Toxicon* 43:149-152.
- García, C., Rodríguez-Navarro, A., Díaz, J.C., Torres, R. y Lagos, N. 2009. Evidence of in vitro glucoronidation and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins by healthy human liver microsomes fraction. *Toxicon* 53:206-213.
- García-Lagunas, N. 2014. Cambios en la expresión génica de juveniles de *Crassostrea gigas* ante su expresión al dinoflagelado productor de toxinas

paralizantes *Gymnodinium catenatum*. Tesis para la obtención del grado de Doctor en ciencias, Uso, Manejo, Preservación de los Recursos Naturales. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste p 59.

García-Mendoza, E., Medina-Elizalde, J., Ruíz de la Torre, M.C., Rosas-Campos, A., Sánchez-Bravo, Y., Bustillos-Guzmán, J.J. y Núñez-Vázquez, E.J. 2015. Lecciones aprendidas del florecimiento algal nocivo de enero del 2015 en el norte del Golfo de California. II. Mortandad de organismos marinos. p. 31. III Congreso de la Sociedad Mexicana para el Estudio de los Florecimientos Algales Nocivos. 28-30 de octubre de 2015. Champotón, Campeche, México.

García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S.I., Olivos-Ortiz, A y Núñez-Vázquez, E. J. (eds.). 2016. Florecimientos Algales Nocivos en México. En: García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S.I., Olivos-Ortiz, A. y Núñez-Vázquez E.J. (eds.). *Florecimientos Algales Nocivos en México*. CICECE Ensenada, México. p. 438.

GEOHAB, 2003. Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, Implementation Plan. En: Gentien, P., Pitcher, G., Cembella, A. y Glibert, P. (eds.). SCOR and IOC, Baltimore and Paris p. 36.

Gessner, B.D., Bell, P., Doucette, G.J., Moczydlowski, E., Poli, A., Van-Dolah, F. y Hall, S. 1997. Hypertension and identification of toxin in human urine and serum following a cluster of mussel-associated paralytic shellfish poisoning outbreaks. *Toxicon* 35 (5):711-722.

Gibson, R. y Barker, P.L. 1979. The decapod hepatopáncreas. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 17:285-346

Gómez-Gil, B., Roque, A. y Guerra-Flores, A.L. 2001. Enfermedades infecciosas más comunes en la camaronicultura en México y el impacto del uso de antimicrobianos. En: Páez-Osuna, F. (ed.). *Camaronicultura y medio ambiente*. ICMYL-UNAM, México p. 452.

Gómez-Villarreal, M.C., Gárate-Lizárraga, I. y Bustillos-Guzmán, J.J. 2007. Toxinas paralizantes en ostión de piedra, *Crassostrea iridescens* en bahía de Banderas. Recursos y Medio. Conference XIV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiente. Disponible en línea

<https://www.researchgate.net/publication/294872920> Ultima fecha de consulta 23/ene/2018.

Guillard, R.R.L. 1973. Methods for microflagellates and nanoplankton. En: Stein, J. (ed.). *Handbook of phycolgical methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. London p. 448.

Guo, H., Liu, X., Ding, D., Guan, C. y Yi, X. 2014. The economic cost of red tides in China from 2008-2012. En: Trainer, V.L. y Takafumi, Y. *Proceedings of the Workshop on Economic. Impacts of Harmful Algal Blooms on Fisheries and Aquaculture*. PICES Scientific Report p. 86.

Günzel, D., Yu, A.S.L. 2013. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiological Reviews* 93:525–569.

Hallegraeff, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32(2):79-99.

Hallegraeff, G.M. 2015. Harmful marine algal blooms and climate change progress on a formidable predictive challenge. En: Botana, L.M. Luozao, M.C. y Vilariño, N. (eds.). *Climate change and marine and freshwater toxins* pp.181-193.

Hartshorne, R.P., Keller, B.U., Talvenheimo, J.A., Catterall, W.A. y Montal, M. 1985. Functional reconstitution of the purified brain sodium channel in planar lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82:240–244.

Hartshorne, R.P., Messner, D.J., Coppersmith, J.C. y Catterall, W.A. 1982. The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain Evidence for two nonidentical beta subunits. *Journal Biological Chemistry* 257:13888–13891.

- Hartshorne, R.P. y Catterall, W.A. 1984. The sodium channel from rat brain. Purification and subunit composition. *Journal Biological Chemistry* 259:1667–1675.
- Hernández-Orozco, M.L. y Gárate-Lizárraga, I. 2006. Síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de moluscos. *Revista Biomédica* 17:45-60.
- Hernández-Sandoval, F.E., López-Cortés, D.J., Núñez-Vázquez, E.J., Band-Schmidt, C.J., Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J.J. 2009. Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferación de *Gymnodinium catenatum* Graham en la Bahía de La Paz, México. *Hidrobiológica* 19(3):245-256.
- Hummert, C., Ritscher, M., Reinhardt, K., Luckas, B., 1997. Analysis of the characteristic PSP profiles of the pyrodinium bahamense and several strains of Alexandrium by HPLC based on ion pair chromatographic separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia*, 45:312-316.
- Hsieh, D.P.H. Huxtable, S. y Chang, G.H. 2000. Total production of C1/C2 by *Alexandrium tamarense* Hallegraeff, G. (ed.). Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms, Hobart, Tasmania, University of Tasmania, Hobart, Tasmania.
- Hwang, D.F., Chueh, C.H. y Jeng, S.S. 1989. Susceptibility of fish, Crustacean and Mollusks to tetrodotoxin and Paralytic Shellfish Poison. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56(2):337-343.
- Ibarra-Gámez, J.C., Galayh-Silva, L. Molina-Garza, J.Z. 2007. Distribución de la bacteria causante de la necrosis Hepatopáncreática (NHPB) en cultivos de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en México. *Ciencias-Marinas* 33(1):1-9.
- Isom, L.L., De Jongh, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F.X., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L. y Catterall, W.A. 1992. Primary structure and functional

expression of the  $\beta 1$  subunit of the rat brain sodium channel. *Science* 256:839–842.

Isom, L.L., Ragsdale, D.S., De Jongh, K.S., Westenbroek, R.E., Reber, B.F.X., Scheuer, T. y Catterall, W.A. 1995. Structure and function of the beta-2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM-motif. *Cell* 83:433–442.

Iwanaga, S. y Lee, B.L. 2005. Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals. *BMB Reports*, 38:128-150. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38(2):128-150.

Jiang, D., Lawrence, L.A., Neill, H.W. y Gong, H. 2000. Effects of temperature and salinity on nitrogenous excretion by *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 253:193-209.

Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L. y Söderhäll, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization *Immunobiology* 211:213-236.

Johansson, M. Söderhäll, K. 1989. Immunity in crustaceans and the proPO system. Reprinted from *Parasitology Today* 5(6):171-176.

Joint FAO WHO expert committee on food additives 2016. Evaluation of certain food contaminants. World Health Organization Technical Report Series 930:1–99

Kao, C.Y. 1993. Paralytic shellfish poisoning. En: Falconer, I. R. (ed.). *Algal Toxins in seafood and drinking water*, Academic Press. London, UK pp. 75-86.

Kazarinova-Noyes, K. Malhotra, J.D., McEwen, D.P., Mattei, L.N., Berglund, E.O., Ranscht, B., Levinson, S.R., Schachner, M., Shrager, P., Isom, L.L. y Xiao, Z. C. 2001. Contactin associates with Na<sup>+</sup>channels and increases their functional expression. *Journal of Neuroscience* 21:7517-7525.

- Komada, K., Ogata, T., Sato, S. y Sakamoto, S. 1990. Possible association of marine bacteria with paralytic shellfish toxicity of bivalves. *Marine Ecology Progress Series* 61:203-206.
- Lage, S., Reis Costa, P., Moita, T., Eriksson, J., Rasmussen, U y Jonasson-Rydberg, S. 2014. BMAA in shellfish from two Portuguese transitional water bodies suggests the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as a potential BMAA source. *Aquatic Toxicology* 152:131-138.
- Landsberg, J.A. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Review in Fisheries Science* 10(2):113-390.
- Larsson, N.G. y Massucci, M.G. 2016. Scientific Background Discoveries of Mechanisms for Autophagy. Nobelförsamlingen. The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. Disponible en línea  
[https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2016/advanced-medicineprize2016.pdf](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2016/advanced-medicineprize2016.pdf) Ultima fecha de consulta 21/nov/2017.
- Leanne, J., Flewelling, J., Naar, J.P., Abbott, J.P., Baden, D.G., Barros, N.B., Bossart, G.D., Bottein, M.Y.D., Hammond, D.G., Haubold, E.A., Heil, C.A., Henry, M.S., Jacocks, H.M., Leighfield, H., T.A., Pierce, R.H., Pitchford, T.D., Rommel, S.A., Scott, P.S., Steidinger, K.A., Truby, E.W., Van Dolah, F.M. y Landsberg, J.H. 2005. Brevetoxicosis: Red tides and marine mammal mortalities. *Nature* 435:755–756.
- Lehane, L. 2000. Paralytic Shellfish Poisoning: A review National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry Australia, Canberra.
- Lefebvre, K.A., Bill, B., Erickson, A., Baugh, K., O'Rourke, L., Costa, P.R., Nance, S. y Trianer, V.L. 2008. Characterization of dissolved and particulate saxitoxin levels in both field and cultured *Alexandrium* samples from Sequim Bay, WA. *Marine Drugs* 6:103–116.

- Lewitus, A.J., Horner, R.A., Caron, D.A., García-Mendoza, E., Hickey, B.M., Hunter, M., Huppert, D.D., Kudela, R.M., Langlois, G.W., Largier, J.L., Lessard, E.J., Raymond, J.E., Rensel, J., Strutton, P.G., Trainer, V.L. y Tweddle, J.F. 2012. Harmful algal blooms along the North American west coast region: History, trends, causes and impacts. *Harmful Algae* 19:133-159.
- Lightner, D.V. 1992. Shrimp virus diseases: diagnosis, distribution and management. En: Chamberlain, G.W. y Wyban, J. (eds.). *Proceeding Special session on Shrimp Farming*. The World Aquaculture Society, Baton Rouge pp. 238-253.
- Lightner, D.V. 1993. Diseases of penaeid shrimp, pp. 393-486. En: McVey, J. (ed.). *CRC Handbook of mariculture, 2a. (ed.). crustacean aquaculture* CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Lightner, D.V. 1996. *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for disease of cultured penaeid shrimp* (ed.). World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA p. 304.
- López-Cortés D.J., Band-Schmidt, C.J., Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J.J., Hernández-Sandoval, F.E. y Núñez-Vázquez, E.J. 2011. Co-ocurrence of *Chattonella marina* and *Gymnodinium catenatum* in Bahía de La Paz, Gulf of California (Spring 2009). *Hidrobiológica* 470(2):185-196.
- López-Cuevas, A. 2013. Efecto de la exposición de juveniles de ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) a dinoflagelados tóxicos productores de toxinas DSP y PSP. Tesis para la obtención del grado de Maestra en ciencias, Uso, Manejo, Preservación de los Recursos Naturales. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste p. 72.
- Magaña, H.A., Contreras, C. y Villarreal, T.A. 2003. A historical assessment of *Karenia brevis* in the western Gulf of Mexico. *Harmful Algae* 2:163–171.

- Malhotra, J.D., Kasen-Gillespire, K., Hortsch, M. y Isom, L.L. 2000. Sodium channel beta subunits mediate hemophilic cell adhesion and recruit ankyrin to 'points of cell-cell contact. *Journal Biology Chemistry* 275:11383-11388.
- Martin, J.L., Le Gresley, M.M., Haya, K., Septon, D.H., Burridge, L.E., Page, F.H. y Chang, B.D. 2006. Salmon mortalities associated with a bloom of *Alexandrium fundyense* in 2003 in the bay of Fundy, and subsequense early warming approached for industry. *African Journal of Marine Science* 28(2):431-434.
- McMinn, A., Hallegraeff, G.M., Thomson, P., Jenkinson, A.V. y Heijnis, H. 1997. Cyst and radionucleotide evidence for the recent introduction of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* into Tasmanian waters. *Marine Ecology Progress Series* 161:165-172.
- McLaughlin, P.A. 1983. Internal anatomy. En: Mantel, L.H. (ed.). *The Biology of Crustacea* 5. Internal anatomy and physio-logical regulation. Academic Press New York 1-49.
- McMahon, B.R. 2001. Control of cardiovascular function and its evolution in crustacean. *The Journal of Experimental Biology* 204:923-932.
- Mee, L.D., Espinosa, M. y Díaz, G. 1986. Paralytic Shellfish Poisoning with a *Gymnodinium catenatum* Red Tide on the Pacific Coast of Mexico. *Marine Environmental Research* 19:77-92.
- Merino-Virgilio, F. del C., Okolodkov, Y. B., Aguilar-Trujillo, A.C., Osorio-Moreno, I. y Herrera-Silveira, J.A. 2014. Florecimientos algales nocivos en las aguas costeras del norte de Yucatán (2001-2003). En: Botello, A.V., Rendón von Osten, J., Benítez, J.A. y Gold-Bouchot, G. (eds.). *Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias* pp. 579.
- Mier y Terán-Suárez, J., Castro-Georgana, V., Mayor Nucamendi, H.F., Brito-López, J.A. 2006. Florecimientos algales en Tabasco. *Salud en Tabasco* Disponible en

línea <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48712102>>ISSN 1405-2091. Última fecha de consulta 20/ene/2018.

Moestrup, O., Akselmann, R., Fraga, S., Hansen, G., Hoppenrath, M., Iwataki, M., Komárek, J., Larsen, J., Lundholm, N. y Zingone, A. (eds.) (2009). IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae. Disponible en línea <http://www.marinespecies.org/hab>. Última fecha de consulta 20/nov/2017.

Montoya, N. y Carreta, J.I. 2007. Informe sobre mortandad de aves marinas ocurridas en las costas de Chubut (noviembre de 2006), asociada a la presencia de toxinas paralizantes de moluscos. Informe técnico. Área: Programa Medio Ambiente Marino. Proyecto: Marea roja. Actividad: Análisis de toxinas 34:8.

Moore, M.N., Viarengo, A., Donkin, P., Hawkins, A.J.S. 2007. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopáncreas of blue mussels. *Aquatic Toxicology* 84:80-91.

Morales-Covarrubias, M.S. 2014. Montaje en Fresco. p. 29-47. En: Morales, V. y Cuéllar-Anjel, J. (eds.). 2014. *Guía Técnica Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos*. OIRSA, Panamá, República de Panamá pp. 382.

Morales-Covarrubias, M.S., Alonso-Rodríguez, R., Velázquez-Garay, J.A., Flores-Chavarría, A.M.G. y Alva-Martínez, A.F. 2016. Efecto de *Microcystis aeruginosa* en órganos y tejidos de postlarvas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en agua de baja salinidad. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia* (3):181-187.

Negri, A.P., Bolch, C.J.S., Geier, S., Green, D.H., Park, T.G.D y Blackburn, S.I. 2007. Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae* 6:774-780.

New, M.B. 1976. A review a dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture* 9:101-144.

- Nguyen-Thi, T.G. 2012. Pathogenesis of gill-associated virus disease in *Penaeus vannamei*. Tesis para la obtención del grado de Maestro en Ciencias, Gent University, Gent. Belgium p. 87.
- Núñez-Vázquez, E.J., Gárate-Lizárraga, I., Band-Schmidt, C.J., Cordero-Tapia, A., López-Cortes, D.J., Hernández-Sandoval, F.E., Heredia-Tapia, A., Bustillos-Guzmán, J.J. 2011. Impact of harmful algal blooms on wild and cultured animals in the Gulf of California. *Journal of environmental Biology* 32(4):413-423.
- Núñez-Vázquez E.J., Poot-Delgado, C.A., Yotsu-Yamashita, M., Dominguez-Solis, G., Hernández-Sandoval, F.E. y Bustillos-Guzmán, J.J. 2013. Toxicidad de los botetes silvestres *Spherooides* spp., y *Lagocephalus* spp., de las costas de Campeche, México. En: Memorias del XX Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar. Oct. 1-5. Los Cabos, B.C.S.
- Núñez-Vázquez, E.J., Ramírez-Camarena, C., Poot-Delgado, C.A, Almazán-Becerril, A., Aké-Castillo, J.A., Pérez-Morales, A., Hernández-Sandoval, F.E., Fernández-Herrera, L.J., Heredia-Tapia, A., Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D.J., Domínguez-Solís, G., Ley-Martínez, T.C., Cauich-Sánchez, Y.R. y Barraza-González, L.A. 2016. Toxinas marinas en el Golfo de México: orígenes e impactos pp: 309-323. En: García-Mendoza, E., Quijano-Sheggia, S.I., Olivos-Ortiz, A. y Núñez-Vázquez E.J. (eds.). *Florecimientos Algales Nocivos en México*. CICECE Ensenada, México pp. 438.
- Núñez-Vázquez, E.J., Band-Schmidt, C.J., Hernández-Sandoval, F.E., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortes, D.J., Cordero-Tapia, A., Heredia-Tapia, A., García-Mendoza, E., Pena-Manjarrez, J.L., Ruiz-de la Torre, M.C. y Medina-Elizalde, J. 2016. Impactos de los FAN en la salud pública y animal (silvestres y de cultivo) en el Golfo de California. En: García-Mendoza, E., Quijano-Sheggia, S.I., Olivos-Ortiz, A. y Núñez-Vázquez E.J. (eds.). *Florecimientos Algales Nocivos en México*. CICECE Ensenada, México pp. 438.

- Núñez-Vázquez, E.J., Ramírez-Camarena, C., Poot-Delgado, C.A., Almazán-Becerril, A. Aké-Castillo, J. A., Pérez-Morales, A., Hernández-Sandoval, F.E., Fernández-Herrera, L.J., Heredia-Tapia, A., Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzmán, J.J., López-Cortés, D.J., Domínguez-Solís, G., Ley-Martínez, T.C., Cauich-Sánchez, Y.R., Barra-González, L.A. 2016. Toxinas marinas en el Golfo de México: orígenes e impactos. En: García-Mendoza, E., Quijano-Sheggia, S.I., Olivos-Ortiz, A. y Núñez-Vázquez E.J. (eds.). *Florecimientos Algales Nocivos en México*. CICECE Ensenada, México pp. 438.
- Olenina, I., Hajdu, S., Edler, L., Andersson, A., Wasmund, N., Busch, S., Göbel, J., Gromisz, S., Huseby, S., Huttunen, M., Jaanus, A., Kokkonen, P., Ledaine, I. y Niemkiewicz, E. 2006. Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea HELCOM. *Baltic Sea Environmental Proceeding* 106:144.
- Oliveira-Soares, P.A., Charles-Delabie, J.H. y Serráo, J.E. 2004. Neuropile Organization in the brain of *Acromymex (Hymenoptera formicidae)* during the post embryonic Development. *Brazilian Archives of biology and technology*, 4:635-641.
- Oshima, Y. 1995a. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. En: Lassus, G., Arzul, E., Erhard, P., Gentien, C., Marcaillou (eds.). *Harmful Marine Algal Blooms*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris pp. 475-480.
- Oshima, Y. 1995b. Postcolumn derivatization liquid-chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *Journal of AOAC International* 78(2): 528-532.
- Paffenhöfer, G. A. 1971. Grazing and ingestion retaes of naulii, copepodids, and adults of the marine planktonic copepod *Calanus helgolandicus*. *Marine Biology* 11:286-298.
- Palomares-García, R., Bustillos-Guzmán, J.J., Band-Schmidt, C.J., López-Cortés, D.J., Luckas, B. 2006. Effect of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*

- on the grazing, egg production, and hatching success of the copepod *Acartia clausi*. *Ciencias Marinas* 32(1B):111–119.
- Park, T.G., Kim, C.H. y Oshima, Y. 2004. Paralytic shellfish toxin profiles of different geographic populations of *Gymnodinium catenatum* Dinophyceae in Korean coastal waters. *Phycological Research* 52:300-305.
- Pazos-Mandujano, R.A. 2012. Evaluación de la concentración letal media de *Gymnodinium catenatum* Graham, 1943 (cultivo, medio de cultivo y células) en postlarvas de *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. Tesis para la obtención del grado de Maestro en Ciencias. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, unidad académica Mazatlán, Universidad Nacional Autónoma de México pp. 56.
- Peña-Navarro, N. y Varela-Mejías, A. 2015. Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas en el camarón blanco *Penaeus vannamei* cultivado en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista de biología Marina y Oceanografía* 51:3.
- Pérez-Camacho, A.P. 1989. Las mareas rojas y la acuicultura en Galicia. *Cuadernos da Área de Ciencias Marinas* 4:111-120.
- Pérez-Farfante, I. y Kensley, B. 1997. Penaeid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. *Memories dun Museum National d Historie Naturelle, Paris, France* pp. 233.
- Pérez-Linares, J. 2008. Retención de toxinas y daños en tejidos de camarón patiblanco *Litopenaeus vannamei* Producidos por la exposición a *Gymnodinium catenatum* (PSP) y *Karenia brevis* (NSP). Tesis para la obtención del grado de Doctor en Ciencias. Uso, Manejo y Preservación de los recursos Naturales. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste pp. 151.
- Pérez-Linares, J., Ochoa, J.L. y Gago-Martínez, A. 2009. Retention and tissue damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population? *Toxicon* 53:185-195.

- Pérez-Morales, A., Band-Schmidt, C.J., Martínez-Díaz, S.F. 2016. Changes in mortality rates during the larval stage of the pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on the basis of algal (*Chaetoceros calcitrans* or *Tetraselmis suecica*) food density. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 3(9):415-420.
- Pierce, R.H, Henry, M.S, Blum, P.C., Hamel, S.L, Kirkpatrick, B., Cheng, Y.S, Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: assessing potential human exposure to marine biotoxins. *Harmful Algae* 4:965–972.
- Pierce, R.H. y Henry, M.S. 2008. Harmful algal toxins of the Florida red tide (*Karenia brevis*) natural chemical stressors in Soth Florida coastal ecosystems. *Ecotoxicology* 17(7):623-631.
- Poot-Delgado, C.A. 2010. Florecimientos algales nocivos en las costas de Campeche, Golfo de México. *Investigaciones y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 68:91-96.
- Poot-Delgado, C.A. 2016. Florecimientos algales nocivos en las costas de Campeche, Golfo de México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 68:91-96.
- PROFEPA, 2017. PROFEPA atiende e investiga mortandad de mamíferos marinos en alto Golfo de California. Comunicado. 2017. Disponible en línea <https://www.gob.mx/profepa/prensa/profepa-atiende-e-investiga-mortandad-de-mamiferos-marinos-en-alto-golfo-de-california?idiom=es> Ultima fecha de consulta 16/ene/2018.
- Puente-Carreón, E. 2009. Respuestas fisiológicas de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, a condiciones oscilantes de oxígeno disuelto y temperatura. Tesis para la obtención del grado de doctor en ciencias marinas. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas pp. 119.

- Puello-Cruz, A.C. 2013. Nutrición en cultivo de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) con baja salinidad. En: *Camaronicultura en agua de baja salinidad*. Morales-Covarrubias, M.S. (ed.). Editorial Trillas pp. 24-40.
- Quijano-Scheggia, S., Olivos-Ortiz, A., Bustillos-Guzmán, J.J., Garcés, E., Gaviño-Rodríguez, J., Galicia Pérez, M.C., Patiño-Barragán, M., Band-Schmidt, C.J., Hernández-Sandoval, F.E., López-Cortés, D.J. 2012. *Revista Biologica Tropical* 60(1):173-186.
- Ratcliffe, C.F., Qu, Y., McCormick, K.A., Tibbs, V.C., Dixon, J.E., Scheuer, T., Catterall, W.A. 2000. A sodium channel signaling complex: modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Natural Neuroscience* 3:437-444.
- Ratcliffe, C.F., Westenbroek, R.E., Curtis, R., Catterall, W.A. 2001. Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *Journal Cell Biology* 154:427-434.
- Rahardjo-Sidharta, B. y Ahyadi, H. 2007. Possible occurrence of toxic and harmful phytoplankton in Lembar bay, Lombok, Indonesia. *Marine Research Indonesia* 32(2):197-202.
- Ramírez-Ramírez, C. 2012. Una revisión desde la biología molecular a una deficiencia comúnmente encontrada en la práctica del fitoterapeuta: la atrofia muscular. Universidad Industrial de Santander. *Salud UIS* 44(3):31-39.
- Reiber, C.L. y Mc Mahon, B.R. 1998. The effect of progressive hypoxia on the crustacean cardiovascular system: a comparison of the freshwater crayfish (*Procambarus clarkii*), and the lobster (*Homarus americanus*). *Journal of Comparative Physiology B* 168:168-170.
- Reiber, C.L., McMahon, B.R., Burggren, W. 1997. Cardiovascular functions in two macruran decapod crustacean (*Procambarus clarkii*), and *Homarus*

*americanus*) during periods of inactivity, tail flexion and cardiorespiratory pauses. *The Journal of Experimental Biology* 200:1103-113.

Reis-Costa, P., Pereira, P., Guilherme, S., Baratac, M., Nicolau, L., Santos, M.A., Pacheco, M. y Pousão-Ferreira, P. 2012. Biotransformation modulation and genotoxicity in white seabream upon exposure to paralytic shellfish toxins produced by *Gymnodinium catenatum*. *Aquatic Toxicology* 106(107):42– 47.

Richlen, M.L., Morton, S.L., Jamali, E.A., Rajan, A. y Anderson, D.M. 2010. The catastrophic 2008–2009 red tide in the Arabian gulf region, with observations on the identification and phylogeny of the fish-killing dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* *Harmful Algae* 9:163–172.

Rodrigue, D.C. Etzel, R.A., Hall, S., de Porras, E., Velázquez, O.H., Tauxe, R.V., Kibourne, E.M. y Blake, P.A. 1990. Lethal paralytic shellfish poisoning in Guatemala. *Am The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42(3):267-271.

Rodrigues, S.M., De Carvalho, M., Mestre, T., Ferreira, J.J., Coelho, M., Peralta, R. y Vale, P. 2012. Paralytic shellfish poisoning due to ingestion of *Gymnodinium catenatum* contaminated cockles Application of the AOAC HPLC Official Method. *Toxicon* 59(5):558-566.

Rodríguez-Jaramillo, C., Hurtado, M A., Romero-Vivas, E., Ramírez, J.L., Manzano, M. y Palacios, E. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *Journal of Shellfish Research* 27(5):1129-1141.

Rodríguez-Jaramillo, M del C. 2014. Cambios fisiológicos durante la gametogénesis en respuesta a incremento de temperatura experimental y natural: comparación entre una especie de ostión templada (*Crassostrea gigas*) y una tropical (*C. corteziensis*). Tesis para la obtención del grado de doctora en ciencias marinas y costeras con orientación en acuicultura. Universidad Autónoma de Baja California Sur pp. 228.

- Ronsón-Paulín, J.A. 1999. Análisis retrospectivo y posibles causas de mareas rojas tóxicas en el litoral del sureste mexicano (Guerrero, Oaxaca, Chiapas) *Ciencias del Mar*, Universidad Nacional Autónoma de México 9:40-56.
- Rosenberry, B. 1998. *World's shrimp farming 1998*. Shrimp News International, San Diego, CA, USA.
- Ruppert, E. y Barnes, D. 1996. *Zoología de los invertebrados*, Mc Graw-Hill p. 683-690.
- SAGARPA, 2017. Comunicado de prensa. Disponible en línea <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/bajacaliforniasur/boletines/2017/abril/Documents/2017BS127.pdf> Última fecha de consulta 23/dic/2017.
- SAGARPA, 2017. Avanza México como una potencia en producción acuícola. Disponible en línea <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/bajacaliforniasur/boletines/2017/abril/Documents/2017BS135.PDF> Última fecha de consulta 23/dic/2017.
- Saldade-Castañeda, O., Vázquez-Castellanos, J.L., Galván, J., Sánchez- Anguiano, A., Nazar, A. 1991. *Salud Pública de México* 33(3):240-247. Disponible en línea <http://www.saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5395/5654> Última fecha de consulta 5/may/2017.
- Samson, J.C., Shumway, S.E. y Weis, J.S. 2008. Effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* on three species of larval fish a food-chain approach. *Journal of fish biology* 72:168-188.
- Sánchez-Flores, H.E. 2011. Envenenamiento paralizante severo por consumo de moluscos. Reporte de un caso. *Archivos de medicina de urgencias de México*. 3(1):30-33.

- Sar, E.A., Ferrairo, M.E. y Reguera, B. 2002. Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Instituto Español de Oceanografía, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO p. 311.
- Sephton, D.H., Haya, K., Martin, J.L., LeGresley, M.M. y Page, F.H. 2007. Paralytic shellfish toxins in zooplankton, mussels, lobsters and caged Atlantic salmon, *Salmo salar*, during a bloom of *Alexandrium fundyense* off Grand Manan Island, in the Bay of Fundy. *Harmful Algae* 6(5):745-758.
- Shimizu, Y., 1987, Dinoflagellate toxins. En: Taylor, F.J.R. The biology of dinoflagellates (Botanical monographs v. 21), Blackwell Scientific Publications, Boston 282-315.
- Shimizu, Y. 2004. Chemistry and Mechanism of Action. En: Botana, L.M. (ed.). Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection. Marcel Dekker inc USA pp. 151-172.
- Shumway, S.D. 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. *Journal World Aquaculture Society* 21:65-104.
- Smith, E.A., Grant, F., Ferguson, C.M.J., Gallacher, S. 2001. Biotransformation of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from bivalve mollusks. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2345-2353.
- Söderhäll, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish. Elsevier* 2:3-23.
- Söderhäll, K., Wu, C., Lin, X., Jiravanichpaisal, P. y Söderhäll, I. 2011. Hemocyte marker proteins and regulation of the proPO system in a crustacean *Pacifastacus leniusculus* pp. 177-194. En: Bondad-Reantaso, M.G., Jones, J.B., Corsin, F. y Aoki, T. (eds.). *Diseases in Asian Aquaculture VII*. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia pp. 385.
- Songhui, L. y Hodgkiss, I.K. 2004. Harmful algal blooms causative collected from Hong Kong waters. *Hidrobiológica* 512:231-238.

- Sousa, L.G. y Petriella, A.M. 2000. Histology of the hepatopancreas of the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Caridea). *Biocell* 24:189-95.
- Soonthornchai, W., Rungrassamee, W., Karoonuthaisiri, N., Jarayabhand, S., Klinbunga, K., Soderhall, P., Jiravanichpaisal, P. 2010. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio* harvery. *Developmental and Comparative Immunology* 34(1):19-28.
- Srinivasan, J. Schachner, M., Catterall, W.A. 1998. Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc. Natural Academic Science USA* 95:15753-15757.
- Talavera, V., Sánchez, D., Zapata, L.M. 1999. Camarón de mar. La importancia del buen manejo del estanque y el alimento en el cultivo del camarón. Alicorp., *Boletín Nicovita* 4(2):2.
- Taylor, F.J.R., Fukuyo, Y., Larsen, J., Hallegraeff, G.M., 2003. Taxonomy of harmful dinoflagellates. En: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris pp. 389-482.
- Trainer, V.L. y Baden, D.G. 1999. High affinity binding of red tide neurotoxins to marine mammal brain. *Aquatic Toxicology* 46:139-148.
- Vale, P. 2008a. Fate of Benzoate paralytic shellfish poisoning toxins from *Gymnodinium catenatum* in shellfish and fish detected by pre-column oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1190:191-197.
- Vale, P. 2008b. Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poison compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1195: 85-93.

- Vale, P. 2015 Effects of light quality and nutrient availability on accumulation of mycosporine-like amino acids in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 143:20-29.
- Van-Dolah, F.M. 2000. Marine algal toxins origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspective* 108(Suppl 1):133-141.
- Vargas-Montero, M., Freer-Bustamante, E., Guzmán, J.C. y Vargas, J.C. 2008. Florecimientos de dinoflagelados nocivos en la costa Pacífica de Costa Rica. *Hidrobiológica* 18:15:23.
- Vogt, G. 1985. Histologie and Cytologie der Mitteldarmmilse von *Penaeus monodon* (Decapoda). *Zoologischer Anzeiger* 215:61-80.
- Welsch, U., Sobotta, J. 2010. Histología. 2th ed. Editorial Médica Panamericana, España 450:151-173.
- Wetzel, R. y Likens, G. 2000. *Limnological analyses* 3<sup>a</sup> ed. Springer. Nueva York, EEUU pp. 429.
- Whyte, J.N.C., Haigh, N., Ginther, N.G. y Keddy, L.J. 2001. First record of blooms of *Cochlodinium* sp. (Gymnodiniales Dinodophyceae) causing mortality to aquacultured salmon on the west coast of Canada *Phycologia* 40(3):298-304.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C. y Neilan, B.A. 2010. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and its Analogs. *Marine Drugs* 8(7):2185-2211.
- Wilkens, J.L., Davidson, G.W. y Cavey, M.J. 1997. Vascular peripheral resistance and compliance in the lobster *Homarus americanus*. *Journal Experimental Biology* 200:477-485.
- Yu, R.C., Hummert, C., Luckas, B., Qian, P. Y., Li, J. y Zhou, M.J., 1998a. A modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. *Chromatographia* 48:671-676.

Zamudio, M. Licea, S. y Luna, R. 2013. Relative abundance and distribution of unamored dinoflagellates species in the south Gulf of México. 2005-2010. En: 1er, Chapter 22, publisher: The micropaleontological Society, Special Publicationes, Geological Society p. 233-238.

Zhen-Ming, C., Liu, G., Zhao, S., Li, J. y Peng, Y. 2010. Marine yeasts as biocontrol agents and producers of bio-products. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:1227–1241.

