

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



**MODELO TOXICOCINETICO DE TOXINAS DE TIPO PARALIZANTE EN LA**  
**ALMEJA DE SIFON, *Panopea globosa***

**TESIS**

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**ELVA ERENDIRA ARMENDÁRIZ GALLEGOS**

**ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. MARZO 2015**

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA  
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
POSGRADO EN ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA

MODELO TOXICOCINETICO DE TOXINAS DE TIPO PARALIZANTE  
EN LA ALMEJA DE SIFON, *Panopea globosa*

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y  
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ELVA ERENDIRA ARMENDÁRIZ GALLEGOS

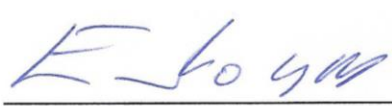
Aprobada por:



---

Dra. Graciela Guerra Rivas

Director de tesis



---

Dr. Ernesto García Mendoza

Sinodal



---

Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Sinodal

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis sinodales Dra. Graciela Guerra Rivas, Dr. Ernesto García Mendoza y Claudia M. Gómez Gutiérrez por su apoyo y guía durante la maestría y realización del proyecto.

A CONACYT por la beca de Maestría otorgada.

A la empresa Atenea en el Mar por el préstamo de infraestructura y el donativo de especímenes para la realización de este proyecto.

A UABC por el apoyo financiero para reactivos y materiales.

A Fundación Produce por los recursos otorgados a través del Proyecto Ficotoxinas en Almeja Generosa.

A FICOTOX por el préstamo de infraestructura, reactivos y materiales.

A mi familia y amigos por su confianza y fe en mis metas.

A todos los que trabajan y trabajaron en el laboratorio de Toxicología y Farmacología Marina, que me acompañaron, ayudaron y me compartieron sus conocimientos.

A todos los que trabajan y estudian en FICOTOX por su confianza, ayuda y enseñarme todo lo que estaba a su alcance para la realización del proyecto.

A mis muertos (abuelo, abuela, tía) por su amor que sigue dándome fuerzas para apreciar la vida, continua luchando y trabajando por lo que me hace feliz.

A mi niña Karla Armendáriz, que me acompañó durante todo el trabajo de maestría: clases, prácticas, trabajo, estudio, desvelos, aventuras, etc.

## RESUMEN

Con el fin de realizar un modelo toxicocinético para explicar la depuración y el tránsito de toxinas de tipo paralizante en la almeja de sifón *Panopea globosa*, se realizaron ensayos de bioacumulación y depuración. Para la bioacumulación de toxinas de tipo paralizante se alimentaron almejas de *Panopea globosa* con *Gymnodinium catenatum*, dinoflagelado conocido por producir toxinas de tipo paralizante llamadas saxitoxinas. Durante la depuración de toxinas se tomaron muestras de *Panopea globosa* y se partieron en tres tejidos principales: manto, sifón y otros tejidos. Los tejidos fueron analizados para evaluar su toxicidad en 6 días de depuración. El sifón fue el tejido que presentó menos toxicidad entre todos los tejidos analizados, seguido de manto y por último los otros tejidos. Los extractos de toxinas obtenidos de los tejidos de sifón y otros tejidos presentaron un patrón constante hacia la depuración en un período de 6 días. En cambio, los extractos de manto obtenidos de *Panopea globosa* durante cada día de la etapa de depuración, no presentaron consistentemente la tendencia a la disminución de toxicidad. Estos resultados sugieren la ocurrencia concomitante de procesos contrarios, haciendo tanto aportaciones al incremento de la toxicidad como al decremento de la misma. Bajo este esquema, estaría ocurriendo transferencia de toxinas desde otros compartimentos y biotransformación a sustancias más tóxicas. Al mismo tiempo, se llevarían a cabo biotransformaciones a metabolitos de menor toxicidad tanto como la eliminación de toxicidad por el manto.

## INDICE

|                            |    |
|----------------------------|----|
| AGRADECIMIENTOS.....       | II |
| RESUMEN.....               | IV |
| INTRODUCCION .....         | 1  |
| ANTECEDENTES.....          | 3  |
| HIPOTESIS.....             | 10 |
| OBJETIVO GENERAL .....     | 11 |
| OBJETIVOS ESPECIFICOS..... | 11 |
| METODOS.....               | 12 |
| RESULTADOS.....            | 44 |
| CONCLUSIONES .....         | 51 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.- <i>Gymnodinium catenatum</i> cepa GCCV-7 a su arribo al laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina para acondicionamiento y cultivo. La cepa fue obtenida de la Colección de Dinoflagelados Marinos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste..... | 14 |
| Figura 2.- Señalado con número 1 al 9: almejas <i>Panopea globosa</i> alimentadas con cultivos de <i>Gymnodinium catenatum</i> , colocadas por pares en peceras de 20litros. ....                                                                                               | 19 |

|                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 3.- Grupo control: 7 almejas <i>Panopea globosa</i> colocadas en una pecera de 60 L.....                                                                                                                                               | 20 |
| Figura 4.- Cultivo de cepa GCCV-7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> . a) Células individuales y cadenas de 2 y 3 células, b) Cadena de 6 células. ....                                                                                          | 27 |
| Figura 5.- Cultivo de cepa GCCV-7 a) Cadena de 8 células, b) Cadena de 4 células.....                                                                                                                                                         | 28 |
| Figura 6.- Especímenes de <i>Panopea globosa</i> a su llegada al laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina para acondicionamiento y fase experimental. Almejas donadas por la empresa Atenea en el mar. ....                           | 34 |
| Figura 7.- <i>Panopea globosa</i> alimentada con pasta de Isochrysis. a) Pecera con 7 organismos, b) - c) Acercamiento al fondo de la pecera donde se aprecian desechos de las almejas, d) Cubeta con desechos color café y verde.....        | 36 |
| Figura 8.- Fondo de la pecera con presencia de desechos de <i>Panopea globosa</i> alimentada con cultivos de <i>Gymnodinium catenatum</i> . ....                                                                                              | 37 |
| Figura 9.- Cromatograma obtenido de la mezcla de estándares de toxinas de referencia certificada GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, NEO, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, GTX5. Los picos con mala resolución.....                                                 | 45 |
| Figura 10.- Cromatograma obtenido de solución de mezcla de estándares de referencia certificados GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, NEO, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3 y GTX5, en el cual se observan 6 picos bien definidos y un pico sin buena resolución..... | 43 |

|                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11.- Cromatograma de extracto de toxinas de cultivo de <i>Gymnodinium catenatum</i> para toxinas GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, NEO, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3 y GTX5..... | 44 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla I.- Peso seco de almeja <i>Panopea globosa</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 17 |
| Tabla II.- Protocolo de alimentación para ocasionar la acumulación de toxinas en <i>Panopea globosa</i> mediante alimentación con <i>Gymnodinium catenatum</i> .....                                                                                                                                                   | 21 |
| Tabla III.- Condiciones de corrida para la identificación de toxinas PSP por HPLC oxidación post columna según Van De Riet (2009). La columna de tiempo indica el tiempo que va a tardar el solvente en pasar por la columna. La columna Solvente B muestra el porcentaje de solvente B con respecto a Solvente A..... | 25 |
| Tabla IV.- Densidad celular final de cada recipiente con <i>Gymnodinium catenatum</i> utilizado para la alimentación de <i>Panopea globosa</i> . ....                                                                                                                                                                  | 30 |

## LISTA DE GRAFICAS

|                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Grafica 1.- Curva de crecimiento del cultivo de <i>Gymnodinium catenatum</i> , que mostró la mayor densidad celular de todos los cultivos. Esta fue de 7,792 celml <sup>-1</sup> ..... | 29 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Grafica 2 .- Curva típica de crecimiento de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio de cultivo GSe.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 29 |
| Gráfica 3.- Curva de crecimiento de uno de los cultivos de <i>Gymnodinium catenatum</i> utilizados para la intoxicación de almejas <i>Panopea globosa</i> . Su densidad fue de 3,604 cel/ml. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 33 |
| Gráfica 4. Tiempo de muerte de ratones ocasionada por extractos preparados con tejidos de <i>Panopea globosa</i> alimentada con <i>Gymnodinium catenatum</i> . Las abscisas muestran el número de días transcurridos después de haber suspendido la alimentación con <i>G. catenatum</i> (etapa de depuración). Cada punto graficado representa el promedio de dos mediciones. Otros se refiere a la combinación de gónada, branquia, glándula digestiva, músculo aductor y pie. | 41 |
| Gráfica 5. Tiempo de muerte de ratones ocasionada por extractos preparados con tejidos combinados de gónada, branquia, glándula digestiva, músculo aductor y pie de <i>Panopea globosa</i> alimentada con <i>Gymnodinium catenatum</i> . Las abscisas muestran el número de días transcurridos después de haber suspendido la alimentación con <i>G. catenatum</i> (etapa de depuración). Cada punto graficado representa el promedio de dos mediciones.....                     | 41 |
| Gráfica 6. Tiempo de muerte de ratones ocasionada por extractos preparados con manto de <i>Panopea globosa</i> alimentada con <i>Gymnodinium catenatum</i> . Las abscisas muestran el número de días transcurridos después de haber suspendido la alimentación con <i>G. catenatum</i> (etapa de depuración). Cada punto graficado representa el promedio de dos mediciones.....                                                                                                 | 42 |

Gráfica 7. Tiempo de muerte de ratones ocasionada por extractos preparados con sifón de *Panopea globosa* alimentada con *Gymnodinium catenatum*. Las abscisas muestran el número de días transcurridos después de haber suspendido la alimentación con *G. catenatum* (etapa de depuración). Cada punto graficado representa el promedio de dos mediciones..... 43

## INTRODUCCION

Los florecimientos algales nocivos (FAN), más conocidos como "marea roja", son un aumento excesivo del fitoplancton marino que puede causar daño a otros organismos debido a un excesivo consumo de oxígeno o los nutrientes del agua (Smayda, 1997). Otro de las consecuencias del crecimiento en los FANs, que impacta seriamente a los ecosistemas marinos y a la salud pública es la producción de toxinas marinas por algunas especies de microalgas (Núñez-Vázquez et al., 2011). Es de gran interés comprender las causas y efectos relacionados a los FAN en los océanos alrededor del mundo debido a los daños que han provocado en la acuicultura, el turismo y la salud de distintos organismos, incluido el hombre (Herrera et al., 2008).

En México, los estudios realizados sobre los FAN se han enfocado en mejorar el monitoreo (Herrera et al., 2008) y en conocer sus efectos, como son las intoxicaciones que producen problemas gastrointestinales y neurológicos por el consumo de mariscos. Estas intoxicaciones se clasifican en base a los signos y síntomas del tipo de síndrome o envenenamiento que provocan (Herrera et al., 2008) siendo las más frecuentes el envenenamiento paralizante por mariscos (PSP, por sus siglas en inglés, Paralytic Shellfish Poisoning), envenenamiento diarreico por mariscos (DSP, Diarrhetic Shellfish Poisoning) y el envenenamiento amnésico por mariscos (ASP, Amnesic Shellfish Poisoning) (Band-Schmidt et al., 2001). La PSP es causada por ficotoxinas llamadas saxitoxinas, que son producidas por dinoflagelados pertenecientes a los géneros *Alexandrium*,

*Pyrodinium* y *Gymnodinium*; siendo *Gymnodiniumcatenatum* la causante de eventos tóxicos en las costas del Océano Pacífico en la República Mexicana.

En México, para evitar intoxicaciones por el consumo de mariscos, la Comisión Federal para la Prevención Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) realiza muestreos en los productos de la pesca, siguiendo la norma oficial NOM-242-SSA1-2009, donde se establece que los niveles permisibles para el consumo de carne de moluscos para saxitoxina es de 800µg/kg de carne, siendo el bioensayo en ratón el único ensayo legalmente aceptado para que las autoridades establezcan una veda sanitaria total o preventiva (Band-Schmidt *et al.*, 2011). Aunque el bioensayo ratón es el método oficial para la identificación de ficotoxinas, algunos laboratorios con validación de la Comisión de control analítico y ampliación de cobertura (CCAYAC), utilizan la cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC (por sus siglas en inglés, High Performance Liquid Chromatography), por ser el método oficial en la AOAC Internacional (Asociación de Análisis Químicos Oficiales). Tanto el bioensayo en ratón como el método por HPLC permiten estudiar el tránsito de ficotoxinas a través de un organismo, mediante estudios de toxicidad. Una de las herramientas de estudio en esta área son los modelos toxicocinéticos, que describen la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de compuestos químicos en la biota, cuya función es la de proporcionar información útil en la prevención de riesgos para los animales y el hombre (Krishnan y Peyret, 2009). Un modelo de esta naturaleza muestra la distribución de un compuesto

químico durante una intoxicación, ya sea en el organismo completo o en sus diferentes tejidos. Así mismo, describe la eliminación del xenobiótico y sus efectos deletéreos por el organismo a través del tiempo. En este trabajo se elaborará un modelo toxicocinético que describa la eliminación de la toxicidad ocasionada por ficotoxinas en la almeja de sifón *Panopea globosa*, especie de gran importancia comercial. Se espera que el producto de este estudio ayude a prevenir intoxicaciones por consumo de almeja en humanos y evitar pérdidas económicas en el sector pesquero.

## ANTECEDENTES

La República Mexicana posee 11,592.77 km de costas (cita). Esta gran extensión territorial permite la existencia de una gran diversidad de especies en las costas del país por lo cual se han establecido grandes pesquerías comerciales sobre todo en el Golfo de California (Cifuentes *et al.*, 1995). Desde sus aguas profundas hasta su superficie, el Golfo de California es una zona rica en nutrientes provenientes de ríos y actividades de agricultura (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2012) donde el fitoplancton es abundante y sirve como alimento a diversas poblaciones de peces y otros organismos (Núñez-Vázquez *et al.*, 2011). El sector pesquero y acuícola es importante para la población debido a que aporta insumos para la industria, divisas por venta de productos y generación de empleos. Por ello, el Gobierno Estatal y Federal aseguran la sanidad de los productos impulsando programas para diagnosticar, controlar y eliminar enfermedades y plagas en especies acuáticas (Secretaría de Pesca y Acuicultura, 2013). Un programa de esta naturaleza es el monitoreo de los florecimientos algales, que pueden alcanzar millones de células de microalgas por litro provocando algunas veces coloración del agua marina desde café oscuro a anaranjado y rojo, razón por la cual a este fenómeno también se le conoce como marea roja. Este fenómeno comúnmente está asociado a la producción de ficotoxinas marinas que intoxican a organismos marinos y al hombre. Cuando esto sucede se habla de un florecimiento algal, que en ocasiones puede ser nocivo (FAN) (Comisión Federal para la Protección contra

Riesgos Sanitarios, 2010). Actualmente se reconoce que menos del 2% de las especies son realmente nocivas para mamíferos, aves y la acuicultura (Sournia, 1995). Las ficotoxinas marinas pueden llegar a ser consumidas por el hombre debido a que las microalgas son consumidas por organismos que se alimentan por filtración, particularmente bivalvos, algunos de los cuales son capaces de sintetizar metabolitos de toxinas secundarias que posteriormente son liberadas y después acumuladas por predadores de estos organismos y así continuamente, ocasionando que los metabolitos se acumulen en varios eslabones de la cadena alimenticia pudiendo llegar hasta el ser humano cuando éste consume mariscos (Guéguen *et al.*, 2011). Uno de los problemas de salud que se presentan en el ser humano durante los FAN son las intoxicaciones por consumo de mariscos contaminados con ficotoxinas. Estas intoxicaciones se clasifican según los síntomas que se presentan en el humano, siendo las más frecuentes la de envenenamiento paralítico por mariscos (PSP, por sus siglas en inglés, Paralytic Shellfish Poisoning), envenenamiento diarreico por mariscos (DSP, Diarrheic Shellfish Poisoning) y el envenenamiento amnésico por mariscos (ASP, Amnesic Shellfish Poisoning) (Organización Mundial de la Salud, 2003).

Con el fin de poder detectar mareas rojas y conocer mejor las repercusiones en la salud pública como las intoxicaciones por consumo de mariscos, se han cultivado y estudiado microalgas productoras de FAN (Rodríguez, 2006). Son ejemplos *Alexandrium tamarense*, *A. catenella*, *Gymnodinium catenatum* y *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, las cuales son dinoflagelados

productores de toxinas PSP. En México sólo *Gymnodinium catenatum* ha sido reportada como productora de saxitoxina (Palomares *et al.*, 2006) que es la más representativa de las toxinas PSP. La saxitoxina produce en el hombre desde parálisis leves hasta un paro respiratorio (Yu *et al.*, 2005) mediante la inhibición de impulsos nerviosos al bloquear canales de sodio y evitar el paso del ión  $\text{Na}^+$  a través de membranas (Band-Schmidt *et al.*, 2011). La saxitoxina tiene más de 20 análogos (Asakawa *et al.*, 2006) y todos pertenecen a los alcaloides neurotóxicos, dividiéndose en tres grupos según los radicales de la cadena lateral: carbamoil, N-sulfocarbamoil y decarbamoil, siendo las toxinas del grupo carbamoil las más tóxicas y los derivados N-sulfocarbamoil las menos tóxicas (Vale, 2010). Las diferencias en la intensidad del efecto tóxico de las saxitoxinas dependen de la especie productora y el organismo que la consume (Hernández *et al.*, 2009), como en el caso de los moluscos bivalvos (Contreras *et al.*, 2011) que presentan una acumulación diferencial de toxinas (Hernández *et al.*, 2009) con mayor concentración en vísceras (Cembella *et al.*, 1993; Bricelj *et al.*, 1998) incluida la almeja *Panopea globosa* (Murillo, 2011). La evaluación de tasas de intoxicación y desintoxicación de ficotoxinas en moluscos bivalvos permitiría estimar su intensidad y duración durante la presencia de floraciones algales nocivas (FAN) (Moroño *et al.*, 1998, citado en Pérez, 2007).

La distribución de una toxina y los tiempos necesarios para la eliminación de los diferentes tejidos, se representan por medio de modelos dinámicos que se conocen como modelos toxicocinéticos. La base para su construcción es el



modelo ADBE, que asume que al ingresar un tóxico a un organismo, pasará por todas o algunas de las siguientes etapas: absorción, distribución, biotransformación y eliminación del sistema. A la capacidad del organismo de eliminar un tóxico o xenobiótico se le conoce como depuración y ésta puede ser igual o diferente en los tejidos en los que se distribuye el tóxico. Por lo tanto, la depuración total del tóxico será la suma de la depuración de cada tejido por lo que el tiempo y cantidad de eliminación dependerá de la afinidad de los tejidos por el tóxico. Un factor importante en el tránsito de las sustancias ajenas a un organismo (xenobiótico) a través de su cuerpo es el volumen de distribución o espacio disponible en los tejidos para contener al tóxico. Son importantes también las propiedades fisicoquímicas del xenobiótico y la naturaleza lipofílica del tejido, ya que de esto depende la tendencia de las sustancias a depositarse en los tejidos. Monitoreando sus concentraciones en los distintos compartimentos durante la intoxicación se puede estimar la cantidad incorporada por unidad de tiempo y la velocidad de bioacumulación del tóxico en el organismo, información que sirve de base para elaborar el modelo toxicocinético. Un modelo de este tipo es útil porque describe la ruta del xenobiótico dentro del organismo y contribuye a conocer el tiempo necesario para su depuración en una especie en particular. En la descripción, se considera la constancia con la que se incorpora la sustancia (Constante de incorporación,  $K_i$ ), la constancia con la que se depura del organismo (Constante de depuración,  $K_d$ ), las concentraciones en un momento dado y los tiempos que tarda en ser eliminada del organismo, así como el tiempo que su concentración

tarda en disminuir a la mitad o tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) (Guerra, 2010). Estos parámetros son obtenidos a través de bioensayos de bioacumulación seguidos de depuración (bioensayo de bioacumulación-depuración), que consisten en someter a individuos de la especie en estudio a una incorporación constante de la toxina y posteriormente monitorear los tejidos durante la eliminación, que se promueve al colocar a los especímenes en medios libres de la toxina. Durante esta etapa de clarificación se cuantifica en los tejidos la especie química de interés mediante un método confiable.

La velocidad de depuración de toxinas puede ser similar en distintos tejidos de un organismo, conociéndose este sistema como monocompartimental, cuando la velocidad de depuración de toxinas es diferente entre tejidos o entre un conjunto de tejidos de un organismo, se conoce como modelomulticompartimental. Se dice que un compartimento sigue una cinética de primer orden cuando la tasa de transferencia hacia un compartimento es directamente proporcional a la concentración del toxico en el compartimento. La biotransformación desempeña un rol importante en los modelos toxicocinéticos debido a la transformación de toxinas de menos a más tóxicas o viceversa, lo cual hace que los niveles tóxicos presentes en un tejido en monitoreo fluctúen. Lo anterior se ha demostrado mediante diversos estudios donde los moluscos bivalvos presentaron diferencias en los tiempos de depuración debido a los cambios entre análogos de toxinas paralizantes dentro de ciertos tejidos, como lo reportado para *Crassostrea gigas* por Gueguén *et al.* (2011), que describe a

la almeja como biotransformadora de toxinas GTX3 y GTX2 según la concentración inicial de estas toxinas.

Yu *et al.* (2005) y Bricelj *et al.* (2014) mencionan los factores abióticos y fisiológicos como factores que influyen en la depuración y tasa de depuración de toxinas paralizantes en moluscos bivalvos, por lo que un organismo puede presentar diferencias en la depuración de toxinas al encontrarse bajo distintas condiciones ambientales, como pueden ser la temperatura, nutrientes, fotoperiodo y salinidad. Debido a lo anterior la toxicocinética de toxinas paralizantes en algunos organismos se puede explicar tanto en un modelo monocompartimental como en un modelo multicompartimental, todo dependerá de las condiciones presentes en el momento de estudio.

Existen diversos métodos para la detección de ficotoxinas, siendo el más utilizado el bioensayo ratón (AOAC, 1990). Este método es oficial en la mayoría de los países y mide la toxicidad global en extractos de mariscos, tiene la ventaja de ser económico, rápido y confiable para detectar nuevas toxinas, pero presenta la desventaja de tener variabilidad en los resultados, además de no identificar individualmente las toxinas del extracto analizado. Sin embargo, la baja especificidad es de gran utilidad para evaluación de riesgo y la variabilidad puede reducirse si se incrementa el número de ratones (Fernández Cañamero, 2007) Otro método es el inmunoenzimático, que identifica las ficotoxinas por la formación de complejos enzima-anticuerpo. Aunque este método es más específico que el bioensayo ratón y requiere menos muestras (Oshiro *et al.*,

2006), la desventaja es su costo elevado y tampoco identifica individualmente las toxinas.

El método más utilizado para cuantificar cada toxina dentro de un grupo de compuestos análogos es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Mediante distintas técnicas de este método se obtiene mayor sensibilidad en el equipo (Bates *et al.*, 1975), como la derivatización post columna, que permite identificar siete o más toxinas PSP en muestras de moluscos en un análisis (Oshima, 1995). La técnica de Van De Riet (2009) que utiliza la oxidación post columna para la cuantificación de toxinas PSP en moluscos bivalvos, presenta como ventaja una buena correlación con el bioensayo ratón y los tiempos de retención son relativamente cortos, lo que es de utilidad cuando se requiere analizar múltiples muestras. Este método ha sido validado para el análisis de ficotoxinas en algunas especies de mejillón, almeja y vieiras, (Van de Riet *et al.*, 2011), siendo necesario validar en otros moluscos bivalvos, como *Panopea globosa*.

La almeja *Panopea* es de gran valor comercial (Calderón-Aguilera *et al.*, 2010) y en México se distribuye en ambas costas del Estado de Baja California (Ramírez-Félix *et al.*, 2012), encontrándose *P. generosa* en la costa occidental y *P. globosa* en el Golfo de California. La pesquería de almeja generosa, que representa un valor aproximado de 120 mdp anual, asciende a más 2,500 Ton en promedio por año (SAGARPA, 2014) disminuyendo durante vedas sanitarias por presencia de florecimientos algales nocivos. Por lo anterior, este

proyecto tiene el propósito de aportar un conocimiento sobre la distribución y eliminación de saxitoxinas por distintos tejidos de la almeja *Panopea globosa* alimentada con *Gymnodinium catenatum*, que sea de utilidad en la toma de decisiones para el establecimiento de vedas.

## HIPOTESIS

La depuración de saxitoxina en *Panopea globosa* puede ser descrita mediante un modelo toxicocinético monocompartimental con cinética de primer orden.

## OBJETIVO GENERAL

- Elaborar un modelo toxicocinético que describa la depuración de saxitoxina en la almeja de sifón *Panopea globosa* mediante la cuantificación de la ficotoxinas en tejidos a través del tiempo.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Desarrollar cultivos masivos de una cepa del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* para la producción de toxinas de tipo paralítico.
- Realizar ensayos de bioacumulación-depuración utilizando la cepa tóxica de *Gymnodinium catenatum* cultivada para la depuración de saxitoxina por *Panopea globosa*.
- Evaluar la exactitud, linealidad y sensibilidad del método HPLC-PCOX para la cuantificación de saxitoxina en tejidos de *Panopea globosa*.
- Elaborar el modelo toxicocinético para la depuración de saxitoxina y análogos por *Panopea globosa*.

## METODOS

### **1.- Cultivo de *Gymnodiniumcatenatum*.**

Se obtuvo una cepa de *Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-7) de la Colección de Dinoflagelados Marinos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CODIMAR de CIBNOR La Paz, B.C.S.) y se realizó la aclimatación al Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina de la Facultad de Ciencias Marinas (Figura 1), que cuenta con temperatura e iluminación controlada, así como aireación y agua de mar que proviene de la Bahía de Todos Santos y es filtrada a través de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Los organismos se colocaron en medio de cultivo GSe a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , ciclos de luz/obscuridad 12:12 y 10,000 lux de intensidad lumínica. El medio de cultivo se preparó con agua de mar del laboratorio, ajustando la salinidad a 32‰ con agua destilada y esterilizando en autoclave por 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ .



Figura 1.- *Gymnodinium catenatum* cepa GCCV-7 a su arribo al laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina para acondicionamiento y cultivo. La cepa fue obtenida de la Colección de Dinoflagelados Marinos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste



## **2.- Preparación de *G. catenatum* para los bioensayos**

Para la obtención de la densidad necesaria de cada cultivo en los bioensayos con *Panopea globosa*, se hicieron escalamientos consistentes en ir realizando resiembras de *G. catenatum*, incrementando el volumen del recipiente en cada nueva resiembra. La primera resiembra se realizó utilizando 1ml de cultivo inicial por cada 10ml de medio de cultivo GSe, iniciando los escalamientos en matraces Erlenmeyer de 50ml. De estos cultivos se llevó a matraces Erlenmeyer de 250ml y posteriormente a frascos de vidrio de 800ml y 1,600ml.

## **3.- Conteos celulares**

Para obtener curvas de crecimiento de los cultivos, se realizaron recuentos celulares cada tercer día tomando muestras de un mililitro por duplicado de cada cultivo, los cuales se fijaban con lugol y se contaba en cámara de Sedgewick-Rafter en un microscopio óptico en objetivo 10X.

Para conocer el volumen de cultivo necesario para la alimentación de almejas durante los bioensayos se realizaron recuentos celulares de cada cultivo antes de la alimentación diaria, utilizando una cámara de Sedgewick-Rafter en un microscopio óptico en objetivo 10X.

## **4.- Ensayos de toxicidad de bioacumulación-depuración en almeja *P. globosa***

#### a.- Organismos de prueba

Todos los organismos usados en los estudios de toxicidad fueron donados por la empresa Atenea en el Mar, y tenían las siguientes características: especímenes en fase adulta, con peso completo de  $490 \pm 20$  g (Promedio  $\pm$  desviación estándar) concha de  $13.5 \pm 1.2$  cm en su eje longitudinal y una longitud aproximada de 70 cm del sifón en extensión. Los especímenes, recibidos en las instalaciones de la empresa, fueron trasladados rápidamente al Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina, en donde fueron colocados en tanques de fibra de vidrio con agua de mar (Cap = 120 L) a  $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y aireación. Las almejas fueron diariamente alimentadas con pasta de microalgas Instant Algae® de Reed Mariculture Inc. durante el período de acondicionamiento y previo a la realización de los ensayos de toxicidad. La alimentación se realizó diariamente dando una ración dos veces al día. El agua de mar se mantuvo a una salinidad entre 32 y 33 o/oo

#### b.- Cálculo de la ración diaria de alimento para *P. globosa*.

La cantidad de alimento se calculó con base en la metodología descrita en el Documento Técnico de Pesca No. 471, Cultivo de bivalvos en criadero (FAO, 2006). Básicamente, se realizó lo siguiente:

Se sacrificaron 3 almejas al azar y se colocaron en un horno seco a  $121^{\circ}\text{C}$  por 48 horas para eliminar el agua del tejido, posteriormente se pesaron en balanza analítica, obteniendo los datos descritos en la tabla 1.

Tabla I.-Peso seco de almeja *Panopea globosa*

| Muestra | Peso Seco | Promedio |
|---------|-----------|----------|
| 1       | 71.7235g  | 64.95g   |
| 2       | 49.5774g  |          |
| 3       | 73.5616g  |          |

Con el promedio de peso seco obtenido se calcula el 3% de peso seco de la almeja *Panopea globosa* siguiendo la siguiente formula:

Peso necesario para alimentar moluscos = (peso seco del molusco x 3%) / 100%

Sustituyendo datos, la formula queda de la siguiente manera:

Peso necesario para alimentar *Panopea globosa* = (peso seco de *Panopea globosa* x 3%) / 100%

Con el resultado obtenido en “peso necesario para alimentar a *Panopea globosa*” se calcula la ración diaria de células necesarias de cultivo, como a continuación se muestra:

Ración diaria de células= peso necesario de alimento / peso seco de microalgas

c.- Bioensayo de acumulación-depuración.

Las 25 almejas se acondicionaron siguiendo las especificaciones de la técnica No. 471 de la FAO (en agua de mar a flujo constante, aireación continua y a 20°C) manteniéndose las condiciones por 7 días para la eliminación de contaminantes provenientes del lugar de extracción, durante este periodo los organismos se alimentaron con una pasta comercial de Isochrysis 1800 (Reed Mariculture ®)

Para la intoxicación de almejas con toxinas de tipo paralizante, 18 almejas divididas en dos grupos de 9, nombradas como serie R1 y serie R2, se colocaron por pares en peceras de vidrio con 16 litros de agua de mar y se alimentaron con cultivos de *Gymnodinium catenatum* (Figura 2) siguiendo el método de Pérez (2007) adaptado para *Panopea globosa*. Como se muestra en la tabla II, el protocolo para la dieta consistió en lo siguiente: 6 días con una densidad celular de 23,000 células al día por almeja, posteriormente, 2 días con una densidad celular de 50,000 células al día por almeja y finalmente, 4 días con cultivos de *Gymnodinium catenatum* con una densidad celular de 60,000 células al día por almeja. Después de transcurrido este tiempo de alimentación se sacrificaron 11 almejas y se alimentó por 2 días más a las 7 almejas restantes con cultivos de *Gymnodinium catenatum* a una densidad celular de 85,000 células al día por almeja. Después de transcurridos 14 días con este alimento, se suspendió esta dieta y se reemplazó la alimentación con pasta de

*Isochrysis*1800 (Reed Mariculture ®) para iniciar la etapa de depuración de las toxinas.

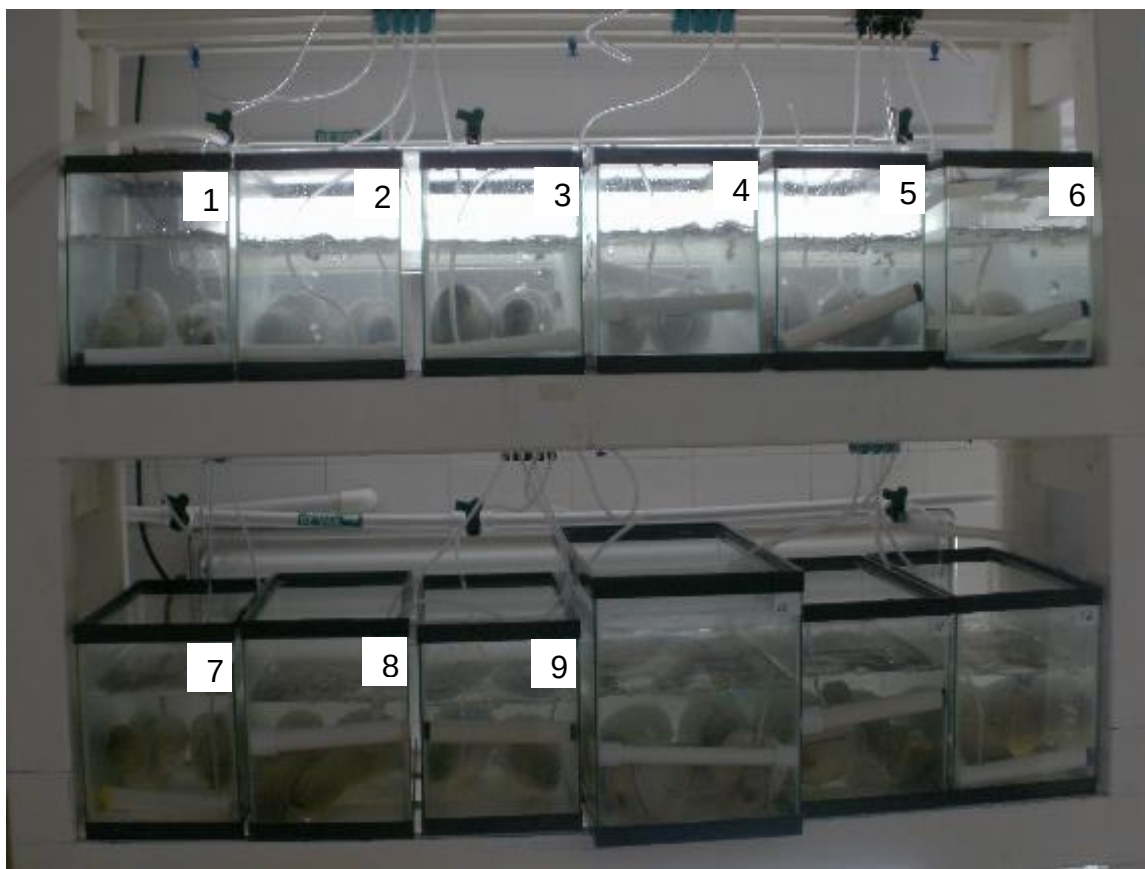


Figura 2.- Señalado con número 1 al 9: almejas *Panopea globosa* alimentadas con cultivos de *Gymnodinium catenatum*, colocadas por pares en peceras de 20litros.

Se utilizó un grupo de 7 almejas como grupo control y se colocaron en una pecera de vidrio con 40 litros de agua de mar (Figura 3), a este grupo se le siguió alimentando con alimento a base de pasta comercial de Isochrysis 1800 (Reed Mariculture ®)



Figura 3.- Grupo control: 7 almejas *Panopea globosa* colocadas en una pecera de 60 L

Para estimar el proceso de depuración de toxinas se tomó una muestra diaria de almeja alimentada con *Gymnodinium catenatum* y 1 almeja del grupo control, se practicó la disección y el cuerpo se dividió en tres paquetes de tejidos principales: sifón, manto y otros de tejidos. Posteriormente se realizó la extracción de toxinas y se analizó el extracto mediante el bioensayo ratón. Así

mismo, se tomaron muestras de tejido de las almejas en el último día de alimentación con *G. catenatum*, las cuales se consideraron como de tiempo 0 de depuración. Es decir, el último día de intoxicación y el primer día de depuración representan el máximo de toxicidad que teóricamente existe en los organismos de prueba.

Tabla II.- Protocolo de alimentación para ocasionar la acumulación de toxinas en *Panopea globosa* mediante alimentación con *Gymnodinium catenatum*

| alimentación por día con <i>Gymnodinium catenatum</i> |                    |   | 23,000 células |   |   |   |   |   | 50,000 células |   | 60,000 células |    |    |    | 85,000 células |     |
|-------------------------------------------------------|--------------------|---|----------------|---|---|---|---|---|----------------|---|----------------|----|----|----|----------------|-----|
|                                                       | DIA DE TRABAJO     | 0 | 1              | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7              | 8 | 9              | 10 | 11 | 12 | 13             | 14* |
|                                                       | Almejas en peceras |   |                |   |   |   |   |   |                |   |                |    |    |    |                |     |
| Pecera 1                                              | 2                  |   | x              | x | x | x | x | x | x              | x | x              | x  | x  | x  |                |     |
| Pecera 2                                              | 2                  |   | x              | x | x | x | x | x | x              | x | x              | x  | x  | x  |                |     |
| Pecera 3                                              | 2                  |   | x              | x | x | x | x | x | x              | x | x              | x  | x  | x  |                |     |
| Pecera 4                                              | 2                  |   | x              | x | x | x | x | x | x              | x | x              | x  | x  | x  | x              | x   |
| Pecera 5                                              | 2                  |   | x              | x | x | x | x | x | x              | x | x              | x  | x  | x  | x              | x   |
| Pecera 6                                              | 2                  |   | x              | x | x | x | x | x | x              | x | x              | x  | x  | x  | X              | x   |
| Pecera 7                                              | 2                  |   | x              | x | x | x | x | x | x              | x | x              | x  | x  | x  |                |     |
| Pecera 8                                              | 2                  |   | x              | x | x | x | x | x | x              | x | x              | x  | x  | x  | x              | x   |
| Pecera 9                                              | 2                  |   | x              | x | x | x | x | x | x              | x | x              | x  | x  | x  |                |     |

\* El día 14 en la etapa de alimentación para inducir la toxicidad, se consideró como el día 0 de depuración.

## 5.- Extracción de toxinas

a.- Extracción de toxinas a partir del cultivo de *Gymnodinium catenatum*

Se tomó un matraz Erlenmeyer de 250ml conteniendo un cultivo de *Gymnodinium catenatum* con densidad celular de 1236cel/ml y se filtró utilizando un filtro Whatman GF/F con poro de 25mm. Se colocó el filtro con el concentrado del cultivo en papel aluminio y se congeló hasta el día de la extracción (18hr a -2°C).

Para la extracción de las toxinas, se puso el filtro Whatman GF/F con el concentrado del cultivo de *Gymnodinium catenatum* dentro de un tubo falcón de 50ml y se llevó a un volumen de 4ml con HCl 0.1N. Posteriormente se llevó a ebullición en baño María, por 5 minutos. Acto seguido se dejó enfriar a temperatura ambiente (20°C); una vez estabilizada la temperatura, la solución se ajustó a un pH de 3 con NaOH 5M y HCl 5M. Posteriormente se centrifugó a 3000rpm por 20 minutos; el sobrenadante se transfirió a un frasco de vidrio, el cual se refrigeró a 4°C hasta su uso en el bioensayo en ratón y cromatografía líquida de alta resolución con oxidación post columna.

#### b.- Extracción de toxinas a partir de tejidos de *Panopea globosa*

**Metodología NOM 242-SSA1-2009.** Cada tejido se homogenizó en una licuadora (Oster, Modelo 6843); se tomaron 100mg del homogenado y se adicionó una solución de ácido clorhídrico 0.1N. Posteriormente se homogenizó nuevamente en licuadora, llevándolo a ebullición en baño María por 5 minutos. Se dejó enfriar y acto seguido se ajustó el pH a 3 con una solución de ácido clorhídrico 5M. Finalmente se ajustó el volumen a 200ml con ácido clorhídrico



0.1N homogenizando manualmente la solución final. Ésta se dejó reposar para decantar el sobrenadante, del cual se tomaron 40ml y se centrifugaron a 30000rpm durante 7 minutos. Se descartó el precipitado, dejando el sobrenadante listo para inyectarse a ratones.

**Metodología NOM 242-SSA1-2009 modificada.** El tejido (50 mg) se homogenizó con 50 ml de HCl 0.1 N y se llevó a pH 3 con HCl 5 N. Posteriormente se llevó a ebullición durante 5 minutos. Esta mezcla se dejó reposar para decantar el sobrenadante, del cual se tomaron 40 ml y se centrifugaron a 30000 rpm durante 7 minutos. Se descartó el precipitado, dejando el sobrenadante listo para inyectarse a ratones.

## **6.- Identificación y cuantificación de toxinas**

### **a.- Bioensayo en ratón**

De acuerdo con la NOM 242-SSA1-2009, que describe el bioensayo de ratón, para este trabajo se utilizaron ratones machos albinos, cepa Webster Suiza Hsd: ICR (CD1), con un peso entre 19 y 21 g. Para cada extracto de tejidos de la almeja *Panopea globosa* se utilizaron 2 ratones de conformidad con dicha norma. En cada análisis se tomó 1 mililitro de extracto de toxinas en cultivo de *Gymnodinium catenatum* con jeringa desechable con aguja de 27Gx13mm y se inyectó intraperitonealmente a un ratón con un peso entre 19-21g. A partir de este momento, se comenzó a contar el tiempo para registrar tiempo de muerte.

A medida que el tiempo fue avanzando se observó y registró la sintomatología.

#### b.- Cromatografía líquida de alta resolución

Utilizando el método oficial de la AOAC descrito por Van de Riet (Van De Riet *et al.* 2009), se prepararon soluciones con reactivos grado analítico o grado HPLC y se filtraron a través una membrana de Nylon de 0.2 $\mu$ m antes de usarse en el aparato de HPLC.

Para la identificación de toxinas GTX y STX, la fase móvil consistió en dos solventes. El solvente A consistió en heptano sulfonato de sodio 11mM, ácido fosfórico 5.5mM ajustado a pH=7.1 y el Solvente B fue una mezcla de heptano sulfonato de sodio 11mM, ácido fosfórico 16.5mM y acetonitrilo 11.5%, ajustado a pH=7.1.

Para la identificación de toxinas C, la fase móvil consistió en dos solventes. El Solvente A: Fosfato tetrabutilamonio 2mM, ajustado a pH=5.8 y Solvente B: fosfato tetrabutilamonio 2mM y acetonitrilo 4%, ajustando el pH=5.8.

Se preparó una solución de ácido fosfórico 100mM y ácido periódico, pH= 7.8, para utilizarse como oxidante post columna, una solución de ácido nítrico 0.75M para utilizarse como ácido post columna.

Se utilizó una columna cromatográfica Zorbax SB-8, 5 $\mu$ m, 4.6x250mm para la identificación de toxinas tipo C y una columna cromatográfica C-18, Agilent Zorbax Bonus RP, 3.5 $\mu$ m, 4.6x150mm para la identificación de toxinas GTX ySTX.

Las condiciones de corrida para la identificación y cuantificación de toxinas tipo PSP según Van De Riet (2009) se describen en la Tabla III.

Tabla III.- Condiciones de corrida para la identificación de toxinas PSP por HPLC oxidación post columna según Van De Riet (2009). La columna de tiempo indica el tiempo que va a tardar el solvente en pasar por la columna. La columna Solvente B muestra el porcentaje de solvente B con respecto a Solvente A.

| Toxinas GTX y STX                 |            | Toxinas C                         |                |
|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|----------------|
| Temperatura de columna: 30°- 40°C |            | Temperatura de columna: 10°- 20°C |                |
| Flujo de solvente A: 0.8ml/min    |            | Flujo de solvente A: 0.8ml/min    |                |
| Flujo de solvente B: 0.8ml/min    |            | Flujo de solvente B: 0.8ml/min    |                |
| Volumen de inyección: 10 $\mu$ L  |            | Volumen de inyección: 5 $\mu$ L   |                |
| Tiempo                            | Solvente B | Tiempo                            | Solvente B (%) |
| 0                                 | 0          | 0                                 | 0              |
| 7.9                               | 0          | 8                                 | 0              |
| 8                                 | 100        | 15                                | 100            |
| 18.5                              | 100        | 16                                | 100            |
| 18.6                              | 0          | 19                                | 0              |

|                                                                                                                                                     |   |    |   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|----|---|
| 24                                                                                                                                                  | 0 | 24 | 0 |
| Temperatura de reactor: 85°C<br>Flujo de oxidante post columna: 0.4ml/min<br>Flujo de ácido pos columna: 0.4ml/min<br>Tiempo de corrida: 24 minutos |   |    |   |

Se obtuvieron soluciones estándar certificados de calibración de SXT, GTX1y GTX 4, GTX2y GTX3, neosaxitoxina (NEO), dcSTX, C1y C2, dcGTX2y dcGTX 3 y GTX5 para la calibración del equipo, preparándose gravimétricamente soluciones estándar. Posteriormente se preparó una mezcla de soluciones estándar de toxinas STX y GTX, así como una mezcla de soluciones estándar de toxinas C1y C2.

Para realizar la calibración lineal del equipo, se prepararon soluciones diluidas 1/10, 1/4 y 1/2 de las mezclas de soluciones estándar de toxinas.

Antes de iniciar el uso de una columna (para toxinas GTX y STX o toxinas C) ésta se acondicionó la noche anterior con el solvente A correspondiente, haciendo pasar esta mezcla por la columna con una velocidad de flujo de 0.4mL/min y para la corrida se siguieron las condiciones descritas en la Tabla III.

## RESULTADOS

### 1.- Cultivo de *Gymnodinium catenatum*

Se logró mantener en condiciones de laboratorio cultivos de *Gymnodinium catenatum* por un tiempo mayor a un año, en recipientes no mayores de 1.6 litros, con densidad celular máxima de 7,792 cel/ml (Gráfica 1) y cultivos concadenas de 2, 3, 4, 6 y 8 células (Figuras, 4 y 5). La Gráfica 2 muestra una curva típica de crecimiento en la que se observan las fases de desarrollo de *G. catenatum*.

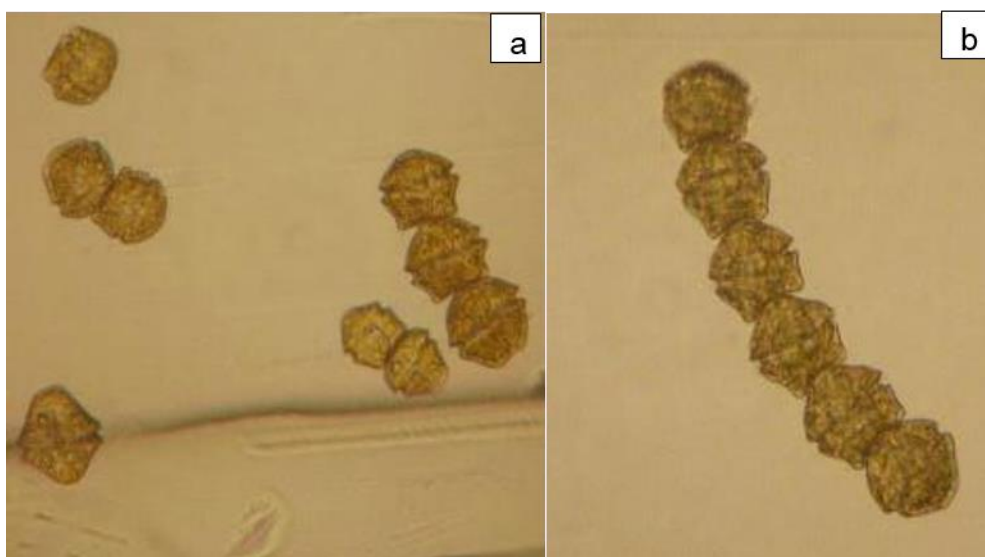


Figura 4.- Cultivo de cepa GCCV-7 de *Gymnodinium catenatum*. a) Células individuales y cadenas de 2 y 3 células, b) Cadena de 6 células.

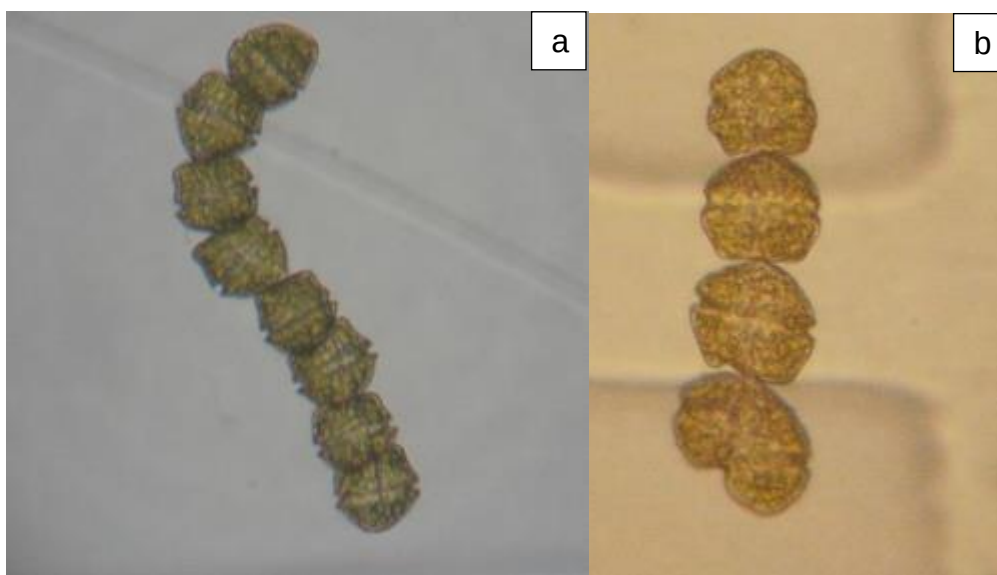
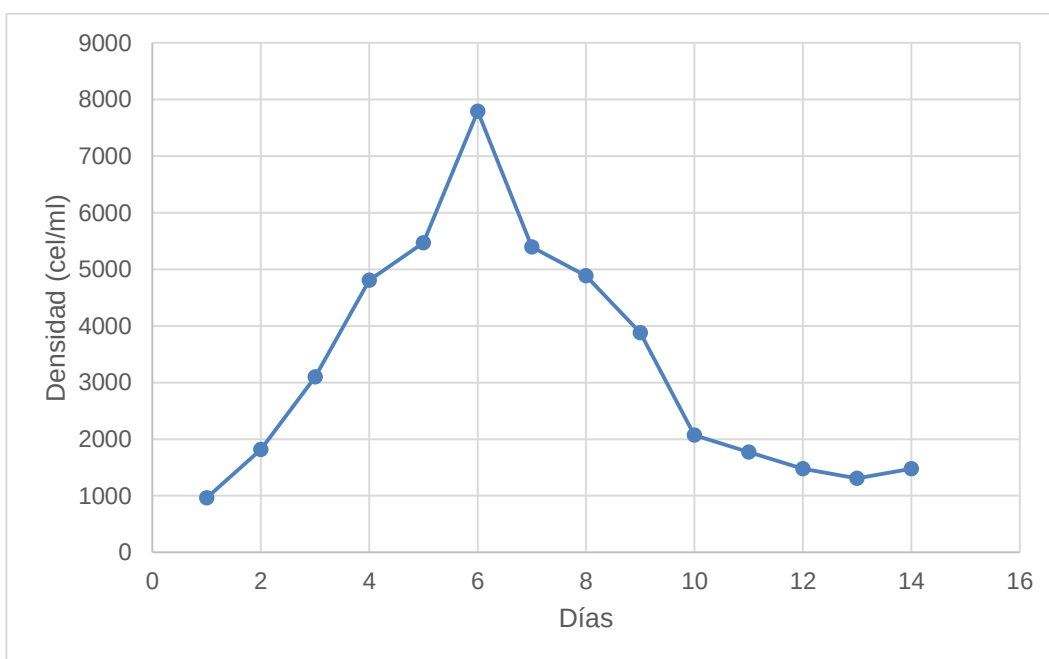
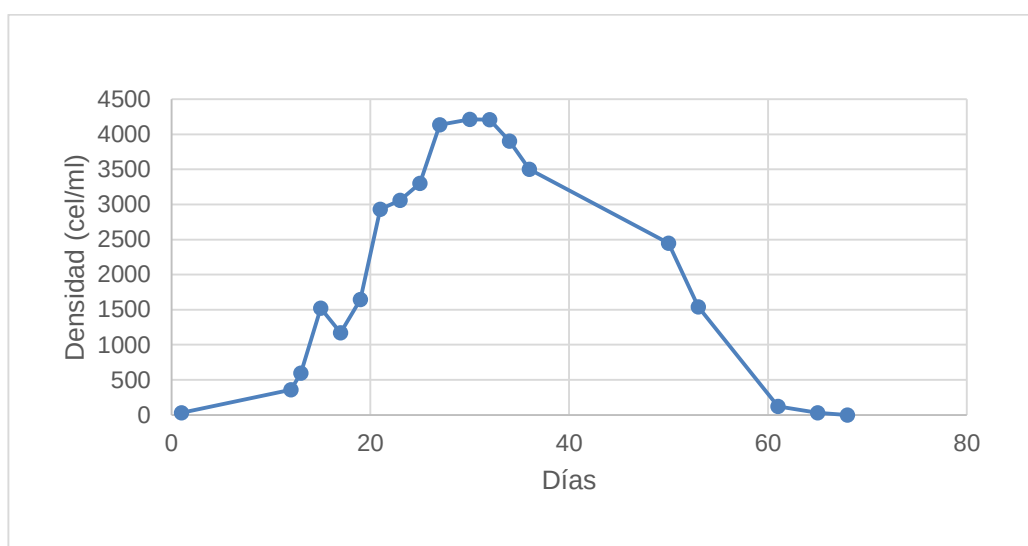


Figura 5.- Cultivo de cepa GCCV-7 a) Cadena de 8 células, b) Cadena de 4 células.



Grafica 1.- Curva de crecimiento del cultivo de *Gymnodinium catenatum*, que mostró la mayor densidad celular de todos los cultivos. Esta fue de  $7,792 \text{ cel/ml}^{-1}$



Grafica 2 .- Curva típica de crecimiento de *Gymnodinium catenatum* en medio de cultivo GSe

## 2.- Preparación de *Gymnodinium catenatum* para los bioensayos

Durante la fase experimental, se pudo escalar a *G. catenatum* hasta obtener 37 recipientes con capacidad variable, que sumaba un volumen total de 18,250 ml, cantidad que sirvió para proporcionar a 18 almejas raciones diarias superiores a los 23,000 células diarias por 12 días.

### 3.- Conteo celular

Los cultivos utilizados para la alimentación de *Panopea globosa*, presentaron fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

La mayoría de los cultivos utilizados para la ración diaria se encontraban en fase de muerte, con una densidad mediana de 602 cel dcGTX/ml, siendo 2,420 cel/ml la densidad máxima al momento de proporcionar la ración de alimento diario a *Panopea globosa*. En la Tabla IV se muestra la densidad final de cada recipiente que contenía cultivo de *G. catenatum*. Se observan también las anotaciones de cuartil 1 y cuartil 3, así como el valor de la mediana de los valores de densidad. Estos datos se manejaron con el fin de calcular el volumen necesario para proporcionar la ración previamente establecida. La Gráfica 3 muestra la curva de crecimiento de uno de los cultivos utilizados para la alimentación de *P. Globosa*.

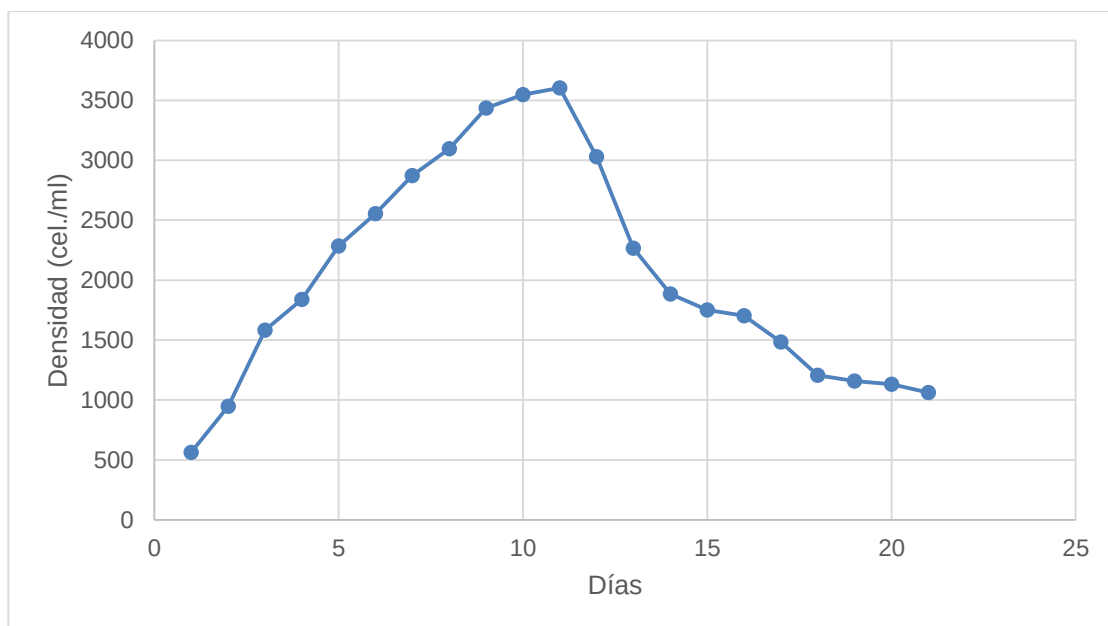
Tabla IV.- Densidad celular final de cada recipiente con *Gymnodinium catenatum* utilizado para la alimentación de *Panopea globosa*.

| Recipiente | Densidad de <i>Gymnodinium catenatum</i> al momento de la ración diaria de <i>Panopea</i> (cel/ml) |         | Valores |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|
| 1          | 1,061                                                                                              | mínimos | 1       |
| 2          | 2,005                                                                                              | Q1      | 309.5   |



|    |       |              |       |
|----|-------|--------------|-------|
| 3  | 1,170 | mediana      | 602   |
| 4  | 2,001 | Q3           | 1,134 |
| 5  | 950   | Max          | 2420  |
| 6  | 2,008 | intercuartil | 824.5 |
| 7  | 964   |              |       |
| 8  | 1,098 |              |       |
| 9  | 1,475 |              |       |
| 10 | 1,004 |              |       |
| 11 | 404   |              |       |
| 12 | 1,320 |              |       |
| 13 | 66    |              |       |
| 14 | 1     |              |       |
| 15 | 999   |              |       |
| 16 | 1,076 |              |       |
| 17 | 1,457 |              |       |
| 18 | 20    |              |       |
| 19 | 460   |              |       |
| 20 | 8     |              |       |
| 21 | 53    |              |       |
| 22 | 123   |              |       |
| 23 | 9     |              |       |
| 24 | 557   |              |       |
| 25 | 336   |              |       |
| 26 | 567   |              |       |

|    |       |  |  |
|----|-------|--|--|
| 27 | 819   |  |  |
| 28 | 2,420 |  |  |
| 29 | 1,708 |  |  |
| 30 | 28    |  |  |
| 31 | 283   |  |  |
| 32 | 575   |  |  |
| 33 | 602   |  |  |
| 34 | 397   |  |  |
| 35 | 761   |  |  |
| 36 | 369   |  |  |
| 37 | 600   |  |  |



Gráfica 3.- Curvade crecimiento de uno de los cultivos de *Gymnodinium catenatum* utilizados para la intoxicación de almejas *Panopea globosa*. Su densidad fue de 3,604 cel/ml.

#### **4.- Ensayos de toxicidad de bioacumulación-depuración en almeja *P. globosa***

##### **a.- Organismo de prueba**

A su llegada, los especímenes de *Panopea globosa* arribaron con aparente salud, mostrando una coloración típica sin verrugas en el sifón ni en el manto, consistencia firme y rápida respuesta al tacto (Figura 6).



Figura 6.- Especímenes de *Panopea globosa* a su llegada al laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina para acondicionamiento y fase experimental. Almejas donadas por la empresa Atenea en el mar.

Los desechos de las almejas alimentadas con pasta de *Isochrysis* 18000 presentaron una coloración café y verde oscuro y los desechos de las almejas alimentadas con cultivos de *Gymnodinium catenatum* presentaron una coloración café y amarillo claro, como se puede observar en las Figuras 7 y 8.

**b.- Ración diaria de alimento para *Panopea globosa*:**

Peso necesario para alimentar *Panopea globosa* =  $(64.95g \times 3\%) / 100\%$

Peso necesario para alimentar *Panopea globosa* = 1.95g

Peso seco de 1 millón de células de *Isochrysis* sp. = 0.000024g

Peso seco de 1 célula de *Gymnodinium catenatum* = 0.000087g

Ración diaria de células= peso necesario de alimento / peso seco de microalgas

Células de *Gymnodinium* al día por almeja = 1.95g / 0.00008693g

Células de *Gymnodinium* al día por almeja = 22,431.8 células

Millones de células de *IsochrYSIS* al día por almeja = 1.95g / 0.000024g

Millones de células de *IsochrYSIS* al día por almeja = 81,250 millones de células



Figura 7.- *Panopea globosa* alimentada con pasta de *Isochrysis*. a) Pecera con 7 organismos, b) - c) Acercamiento al fondo de la pecera donde se aprecian desechos de las almejas, d) Cubeta con desechos color café y verde.



Figura 8.- Fondo de la pecera con presencia de desechos de *Panopea globosa* alimentada con cultivos de *Gymnodinium catenatum*.

### c.- Bioensayo acumulación-depuración

Después de la aplicación de 1 ml de los extractos de las primeras muestras obtenidas de los tejidos de *P. globosa* en el primer día de la etapa de depuración, no se observó muerte de los ratones usados en el ensayo de toxicidad. Por esta razón, se incrementó el volumen a 2 ml de los mismos extractos utilizando ratones no usados previamente en experimentación. Sin embargo, tampoco se observaron síntomas de intoxicación. Con base en estas observaciones, se procedió a modificar la metodología (Ver Metodología NOM 242-SSA1-2009) para la extracción de la toxina en las muestras de tejidos obtenidos de almejas en el segundo día de la etapa de depuración. Al obtener los primeros extractos mediante esta modificación, se probaron y se observó la muerte del 50 % de los ratones usados en el ensayo, por lo que se procedió a

trabajar todos los demás tejidos mediante la metodología de la NOM 242-SSA1-2009 modificada.

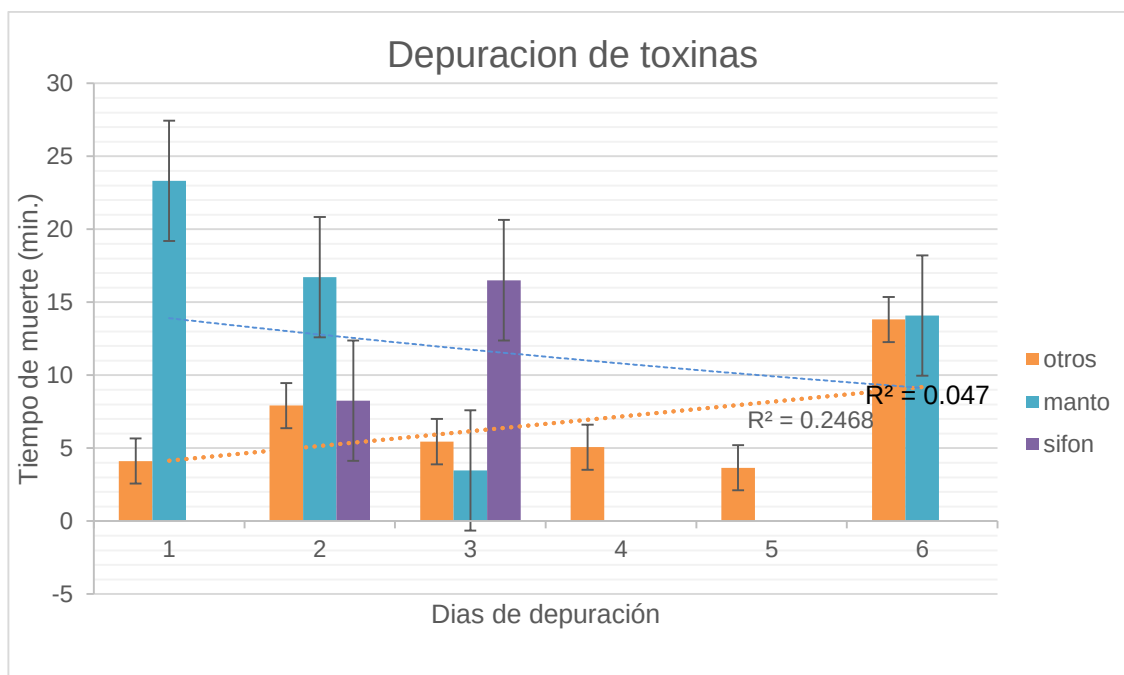
Los extractos más concentrados, obtenidos por esta metodología permitieron observar muerte en los ratones utilizados. Estos resultados se incluyen dentro de la tabla V. A partir de este tratamiento se procedió a utilizar el bioensayo de ratón modificado, tomando en consideración el tiempo y definiendo la toxicidad en términos del tiempo necesario para la muerte del animal ante la aplicación de 2 ml de extracto obtenido mediante la técnica de la NOM-242-SSA1-2009 modificada. Para los extractos que previamente se habían obtenido (día 0 y 1 de depuración), se utilizaron 2 ml después de concentrar la muestra mediante evaporación controlada. El total de valores obtenidos se incluyen en la Tabla V. En la gráfica 4 se registran todos los valores de tiempo de muerte ocasionados por todos los extractos y la tendencia del tiempo de muerte ocasionada por el extracto "otros", que es la combinación de tejidos de branquias, gónada, sistema digestivo, pie y musculo aductor. Para los otros tejidos, manto y sifón no se estableció la tendencia debido a que no hubo muertes que reportar para algunas muestras. Las gráficas 5-7 muestran el tiempo de muerte ocasionada por los extractos por separado.



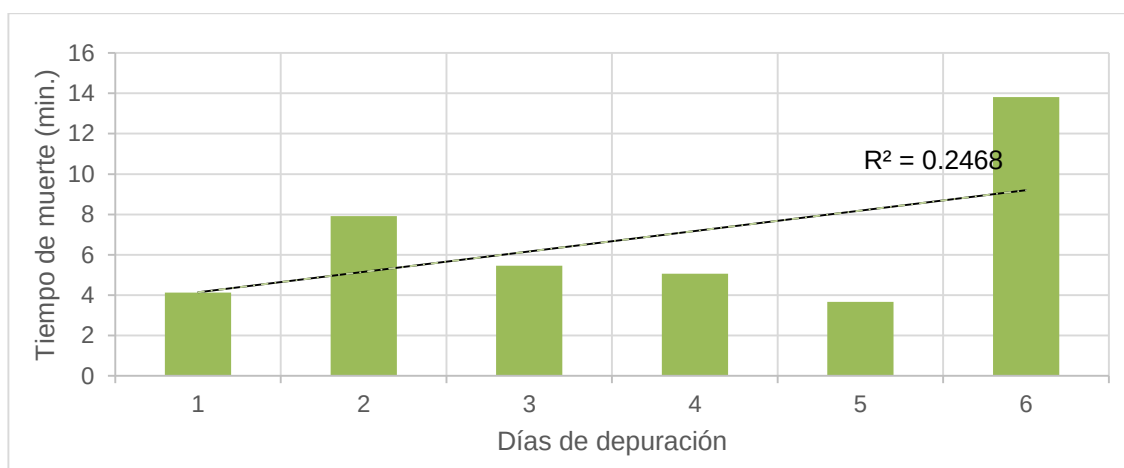
Tabla V. Tiempo de muerte de ratones de experimentación inyectados con extracto de tejidos de almejas *Panopea globosa* alimentadas con *Gymnodinium catenatum* durante 7 días. El efecto de muerte ocasionada por cada tejido se expresa en minutos, que indica el transcurso de tiempo desde la inyección hasta el fallecimiento del ratón. Cada valor representa el promedio de dos mediciones.

| ETAPA DE<br>DEPURACIÓN<br>EN LA ALMEJA | Tiempo de muerte<br>ocasionada por<br>extracto de tejido<br>(minutos)<br><br>OTROS* | Tiempo de muerte<br>ocasionada por<br>extracto de tejido<br>(minutos)<br><br>MANTO | Tiempo de muerte<br>ocasionada por<br>extracto de tejido<br>(minutos)<br><br>SIFÓN |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Día 1                                  | 4.12                                                                                | 23.325                                                                             | No muerte                                                                          |
| Día 2                                  | 7.915                                                                               | 16.72                                                                              | 8.26                                                                               |
| Día 3                                  | 5.45                                                                                | 3.475                                                                              | 16.51                                                                              |
| Día 4                                  | 5.065                                                                               | No muerte                                                                          | No muerte                                                                          |
| Día 5                                  | 3.66                                                                                | No muerte                                                                          | No muerte                                                                          |
| Día 6                                  | 13.815                                                                              | 14.09                                                                              | No muerte                                                                          |

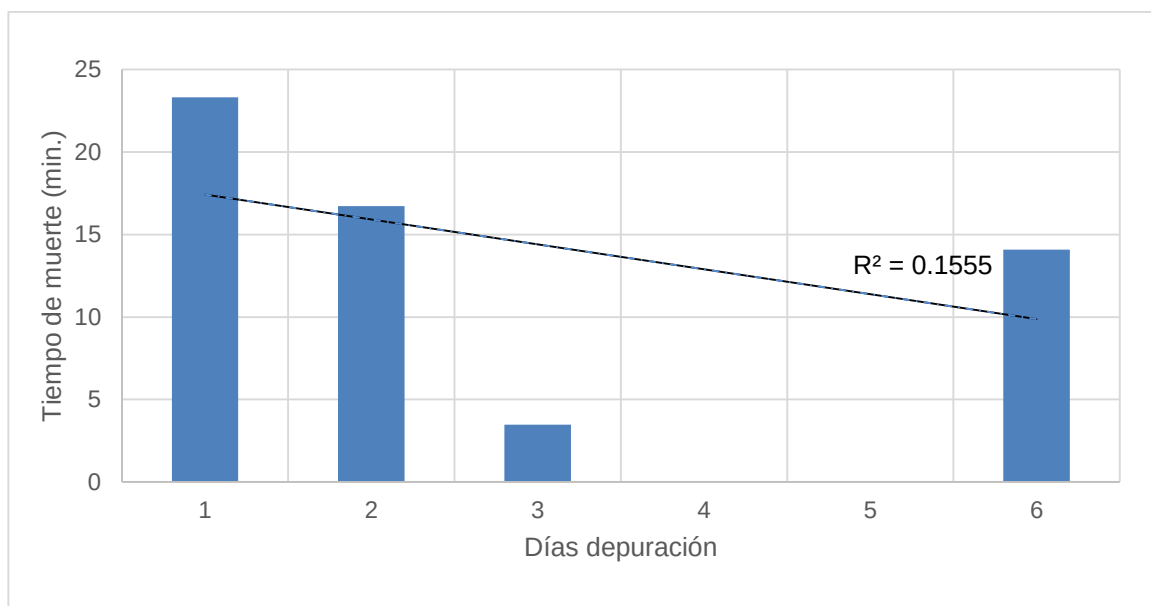
\*Otros: combinación de tejidos de branquias, gónada, sistema digestivo, pie y musculo aductor.



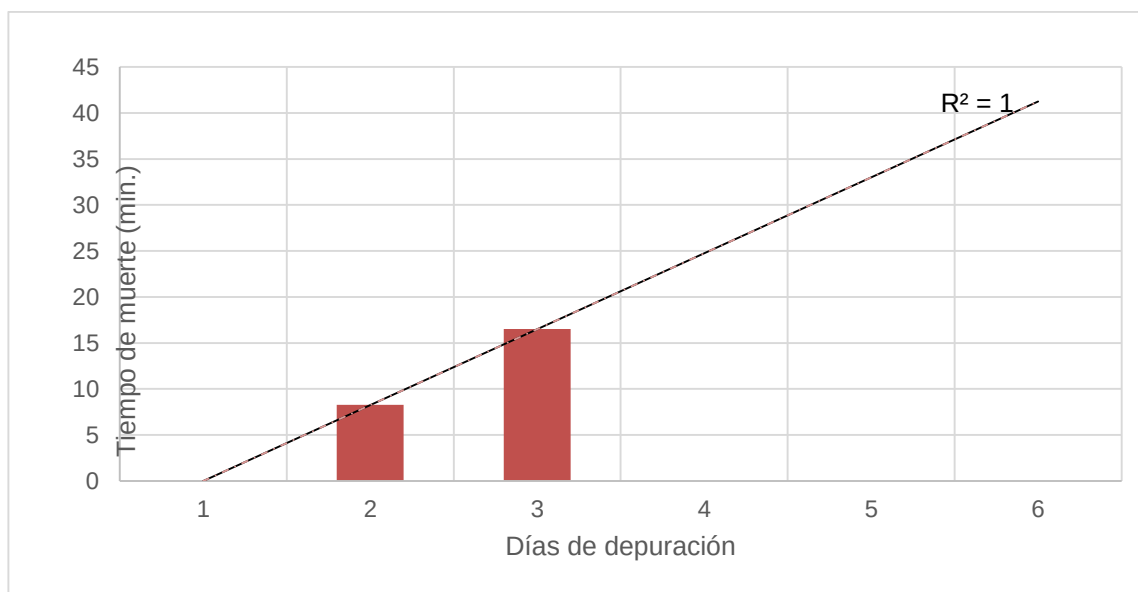
Gráfica 4. Tiempo de muerte de ratones ocasionada por extractos preparados con tejidos de *Panopea globosa* alimentada con *Gymnodinium catenatum*. Las abscisas muestran el número de días transcurridos después de haber suspendido la alimentación con *G. catenatum* (etapa de depuración). Cada punto graficado representa el promedio de dos mediciones. Otros se refiere a la combinación de gónada, branquia, glándula digestiva, músculo aductor y pie.



Gráfica 5. Tiempo de muerte de ratones ocasionada por extractos preparados con tejidos combinados de gónada, branquia, glándula digestiva, músculo aductor y pie de *Panopea globosa* alimentada con *Gymnodinium catenatum*. Las abscisas muestran el número de días transcurridos después de haber suspendido la alimentación con *G. catenatum* (etapa de depuración). Cada punto graficado representa el promedio de dos mediciones.



Gráfica 6. Tiempo de muerte de ratones ocasionada por extractos preparados con manto de *Panopea globosa* alimentada con *Gymnodinium catenatum*. Las abscisas muestran el número de días transcurridos después de haber suspendido la alimentación con *G. catenatum* (etapa de depuración). Cada punto graficado representa el promedio de dos mediciones.



**Gráfica 7.** Tiempo de muerte de ratones ocasionada por extractos preparados con sífon de *Panopea globosa* alimentada con *Gymnodinium catenatum*. Las abscisas muestran el número de días transcurridos después de haber suspendido la alimentación con *G. catenatum* (etapa de depuración). Cada punto graficado representa el promedio de dos mediciones.

## 5.- Identificación y cuantificación de toxinas

### a.- Bioensayo ratón

Después de seguir el procedimiento marcado por la metodología de NOM-242-SSA1-2009 para la extracción de toxina de tejidos de almeja en los primeros tres días de depuración, los extractos aplicados en ratones no ocasionaron efecto alguno de toxicidad. Por lo anterior, no se cuantificó la toxina en términos de UR

(unidades ratón), ya que el efecto de los extractos se reporta en unidades de tiempo (Ver sección 4c).

#### **b.- Cromatografía líquida de alta resolución**

Se realizaron los trabajos iniciales para la estandarización del método de Van de Riet (2009). Debido a fallas en el equipo que no pudieron ser resueltas, se cumplieron algunas de las metas necesarias para dicha calibración. Las dos metas alcanzadas fueron las siguientes: 1) Se establecieron las condiciones necesarias para lograr una resolución adecuada de una mezcla de estándares de toxinas de referencia certificada GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, NEO, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, GTX5 siguiendo el método de Van De Riet (2009), 2) Se logró la obtención de cromatogramas de un extracto de la cepa de *Gymnodinium catenatum* utilizada para este proyecto.

Se realizaron series de inyecciones de 10 µl al HPLC de una mezcla de estándares de toxinas de referencia certificada GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, NEO, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, GTX5 siguiendo el método de Van De Riet (2009), obteniendo cromatogramas con diferencias en los tiempos de resolución o picos con mala resolución (Figura 9).

En la Figura 10 se observa un cromatograma de una mezcla de estándares de toxinas de referencia certificada GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, NEO, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, GTX5 siguiendo el método de Van De Riet (2009), donde los

tiempos de retención fueron de 7.11, 7.54, 7.69, 8.73, 9.06, 9.35, 10.03, 15.88, 20.14, 20.15, 20.18 y 21.27 minutos.

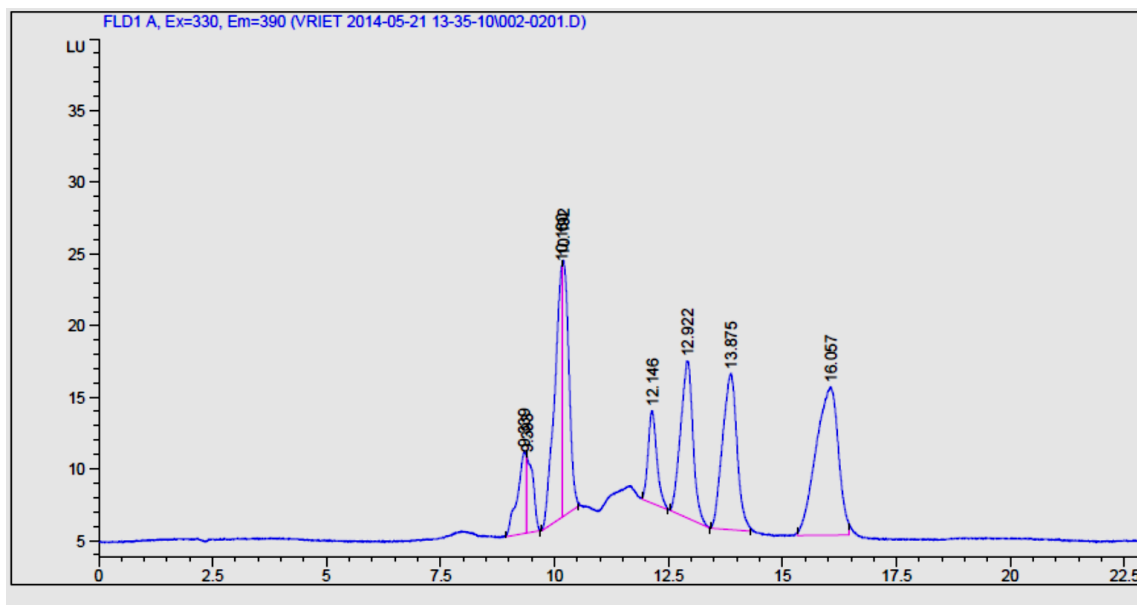


Figura 9.- Cromatograma obtenido de la mezcla de estándares de toxinas de referencia certificada GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, NEO, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, GTX5. Los picos con mala resolución.

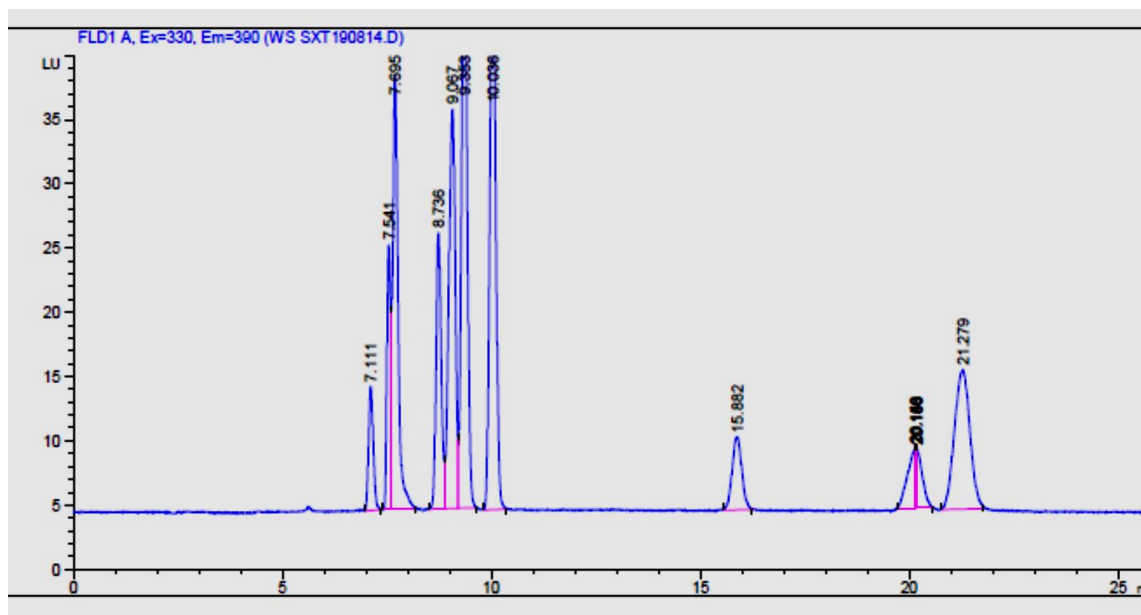


Figura 10.- Cromatograma obtenido de solución de mezcla de estándares de referencia certificados GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, NEO, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3 y GTX5, en el cual se observan 6 picos bien definidos y un pico sin buena resolución.

Se inyectó 10 µl al HPLC del extracto de toxinas del cultivo de *Gymnodinium catenatum* siguiendo las condiciones de corrida para identificación de toxinas GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, NEO, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3 y GTX5. El cromatograma muestra tiempos de retención similares a los valores obtenidos de los estándares de toxinas de referencia certificada, siendo de 2.4, 2.48, 2.89, 8.69, 9.08, 9.41 y 10.08 minutos. (Figura 11).



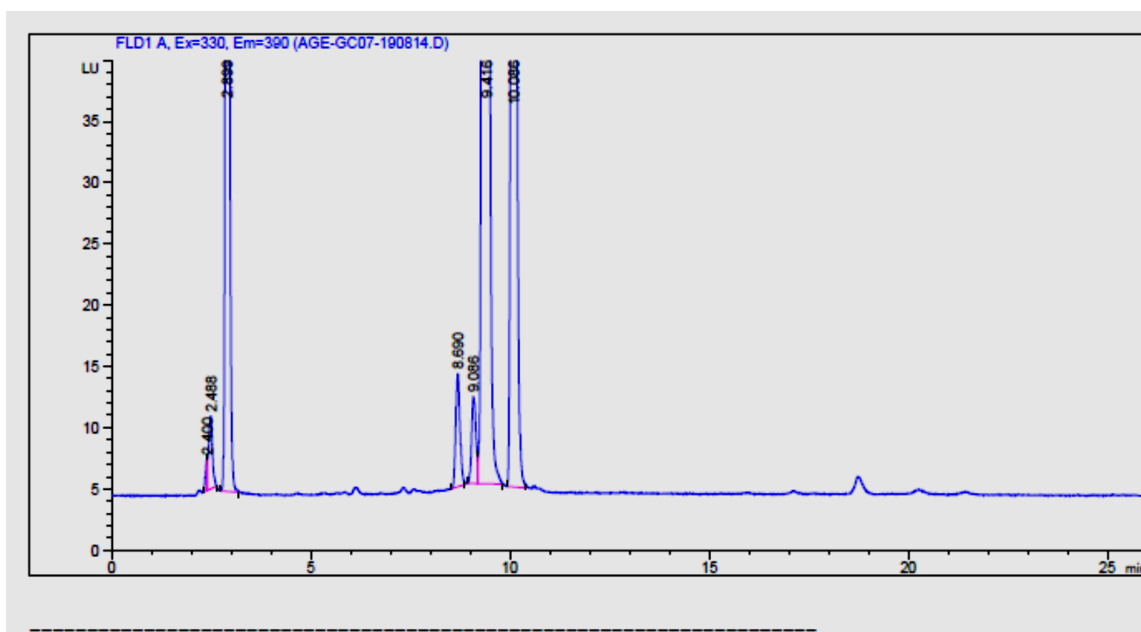


Figura 11.- Cromatograma de extracto de toxinas de cultivo de *Gymnodinium catenatum* para toxinas GTX1, GTX4, GTX2, GTX3, NEO, dcSTX, dcGTX2, dcGTX3 y GTX5.

Debido a que no se pudieron resolver los problemas de calibración de toxinas paralizantes con HPLC durante el periodo dedicado para la validación de la técnica de Van De Riet (2009), desafortunadamente se tuvo que suspender esta actividad.

## DISCUSION

Este trabajo es el primero en analizar la depuración de toxinas PSP producidas por *Gymnodinium catenatum* en almeja de sifón *Panopea globosa*, por lo cual, los datos obtenidos podrán ser utilizados como base para estudios posteriores de ficotoxinas en *Panopea globosa*.

Se sabe que los organismos marinos pueden presentar cambios significativos en la depuración de toxinas según las condiciones atmosféricas (Bricelj, *et al.*, 2014), por lo que el presente trabajo aporta las condiciones de laboratorio necesarias para la depuración rápida de toxinas PSP en almeja de sifón *Panopea globosa*.

La cepa de *Gymnodinium catenatum* utilizada en este estudio ha sido reportada por otros investigadores con perfil tóxico evaluado en tejidos de *Argopecten ventricosus* durante FANs (Band-Schmidt *et al.*, 2005). En el presente trabajo, los extractos de toxinas obtenidos de todos los tejidos de *Panopea globosa* alimentada con *Gymnodinium catenatum* presentaron un perfil de baja o nula toxicidad utilizando extractos obtenidos según la NOM 242-SSA1-2009 para el bioensayo en ratón. Esto permite suponer, en una primera hipótesis, que en dichos extractos las toxinas paralizantes o cualquier otro elemento tóxico soluble en los solventes usados para la extracción mediante este método, se encontraba en muy bajas concentraciones en los extractos utilizados. Una hipótesis alternativa es una rápida depuración de la toxicidad y al mismo

tiempo, una lenta incorporación por parte de *Panopea globosa*. Sin embargo, no es posible ser concluyente en la segunda hipótesis, ya que la almeja generosa no fue evaluada en relación a los niveles de concentración de toxinas paralizantes. Para evaluar la primera hipótesis, nuevas muestras de tejidos fueron tratadas mediante la NOM 242-SSA1-2009 modificada por nosotros para obtener extractos más concentrados, los cuales fueron llevados finalmente a la mitad de su volumen original, por evaporación lenta a bajas temperaturas. Dichos extractos, usados en las pruebas de toxicidad en ratón, permitieron observar tanto la sintomatología propia de intoxicación por toxinas de tipo paralizante como el síntoma final de muerte. A partir de estos hallazgos, todos los extractos fueron obtenidos mediante las modificaciones señaladas y a su vez, el ensayo ratón fue adaptado para evaluar la toxicidad en forma diferente a la indicada por dicha metodología.

La modificación de la prueba de toxicidad, realizada con base en la premisa de que una intoxicación depende del tiempo y la dosis del agente tóxico, consistió en utilizar el tiempo de manifestación de efectos nocivos como base para la evaluación de toxicidad. Por otra parte, en cada prueba se usaron extractos tratados exactamente bajo las mismas condiciones. Es bien sabido que los efectos tóxicos pueden ser evaluados mediante la exposición a concentraciones del agente causal o bien, mediante la medición del tiempo que tarda en manifestarse el efecto predeterminado como punto final del ensayo de toxicidad. En el presente trabajo, con base en las observaciones realizadas, el

punto final del bioensayo en ratón fue predeterminado como la aparición de muerte, de tal forma que el perfil de depuración de *Panopea globosa* está indicado por el tiempo de manifestación de la muerte de por lo menos 2/3 ratones en la prueba de toxicidad.

El análisis de resultados arroja como característica importante la escasa toxicidad mostrada por sifón. Los datos obtenidos para el tiempo de muerte registrado por extractos de homogenado de este tejido fueron solamente para dos muestras, ya que 4 de ellas resultaron inocuas para los ratones. Es decir, en estas 4 pruebas con ratones no se observaron los síntomas de intoxicación por toxinas paralizantes o de alguna otra sustancia y menos aún ocurrió la muerte de los organismos de prueba en el ensayo. Los extractos en los cuales se observó el efecto de muerte, de acuerdo con lo descrito por la gráfica 7, fueron únicamente los provenientes de los tejidos obtenidos de las almejas en el día 2 y 3 de depuración, los cuales fueron de 8.26 min y 16.5 min respectivamente. Estos resultados indican que *Panopea globosa* no contiene toxicidad en el sifón durante los últimos días de la etapa experimental de depuración. Por otra parte, estos hechos concuerdan con los reportes previos que indican que en *Panopea*, el sifón es el tejido con menor presencia de toxinas después de la exposición a FAN (Murillo, 2010, Curtis *et al.*, 2000). Lo anterior sugiere dos posibles explicaciones, en procesos que pueden ocurrir por separado o simultáneamente. Una de ellas es la falta de acumulación por tratarse de un tejido con poca o nula afinidad por las toxinas de tipo paralizante,

lo que se explica por el bajo contenido de lípidos en este tipo de tejidos, los cuales han sido documentados por otros autores. Por otra parte, la toxicidad mostrada en sólo dos días, que fueron los intermedios en la etapa de depuración, confirman que las toxinas pasan a través del sifón durante su expulsión al medio. Al mismo tiempo, la presencia de toxinas en estos extractos sugieren un posible involucramiento del sifón en el proceso de biotransformación, además de su participación en la eliminación.

Respecto al manto, sólo 4 de los extractos ocasionaron muerte, lo que se puede observar en la gráfica 6, la que describe además, un tiempo de muerte inicial alto (día 1 de depuración) y finaliza con un tiempo de muerte elevado también (día 6 de depuración). Cuando fueron tratados con las muestras de los primeros tres días de depuración de la almeja, los tiempos de muerte de los ratones fue disminuyendo, siendo de 23.32 minutos para el día 1 de depuración, 16.72 minutos para el día 2 de depuración y disminuyendo drásticamente hasta 3.47 minutos en el día 3 de depuración. Lo anterior indica para los tres primeros días de depuración un claro incremento de toxicidad en el manto a pesar de no existir ya exposición de *Panopea globosa* a las toxinas de *Gymnodinium catenatum*. En el tiempo subsiguiente, el 4º y 5º día de depuración, los extractos de manto no causaron muerte aunque sí los síntomas de intoxicación por PSP y en el último día de depuración, además de los síntomas ya conocidos de la intoxicación por toxinas paralizantes, nuevamente se observó la muerte en ratones en un tiempo de 14.09 minutos. Lo anterior demuestra un

aumento en la toxicidad en manto de *Panopea* en los primeros tres días de depuración, posteriormente un periodo de dos días de baja o nula toxicidad y al día final de depuración se presenta nuevamente toxicidad. Las fluctuaciones en la toxicidad de manto de *Panopea globosa* durante el periodo de depuración pueden deberse a biotransformaciones que incrementen la toxicidad, como en el caso de *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis* y *Spisula solidissima*, después de haber sido alimentados con dinoflagelados productores de toxinas paralizantes (Asakawa *et al.* 2005, Botelho *et al.*, 2010, Botelho *et al.*, 2012, Turner *et al.*, 2013). Otra explicación a la tendencia de la toxicidad a aumentar en la etapa temprana de depuración y a disminuir en la fase final puede ser que lo que se observa es el resultado de la transferencia continua de toxinas desde los distintos tejidos en estudio, comportamiento reportado en la depuración en los moluscos bivalvos (Botelho *et al.* 2012). De acuerdo con los resultados encontrados en el presente trabajo para el manto de *Panopea globosa* integrados con los hallazgos de otros autores, es posible elaborar un modelo cualitativo de depuración. En éste se manejaría el hecho de que al menos una fracción de las toxinas de tipo paralizante son canalizadas hacia el manto de *Panopea globosa* con vías a la eliminación.

Para estudios de depuración similares al presente, se asume que los tejidos de vísceras, hepatopáncreas, músculo aductor, pie y branquia poseen en bivalvos un coeficiente de remoción similar ante intoxicaciones por toxinas de tipo paralizante (Estrada *et al.*, 2006), siendo éste de 0.312 en promedio, fluctuando

entre 0.21 para vísceras y 0.45 para branquias (Li et al., 2005). Lo anterior fue tomado como base para combinar tejidos, de forma tal que todos éstos fueron agrupados asumiendo características cinéticas semejantes, combinando estos tejidos y etiquetándolos como "otros". Los ratones inyectados con extractos provenientes de "otros" tejidos de *Panopea globosa* de cada día, durante el período completo de depuración (6 días), ocasionaron la muerte de los ratones en un promedio de 8 minutos. Es decir, los tiempos de muerte ocasionados por los extractos obtenidos de tejidos de cada día de depuración fueron desde 3.7 minutos (obtenidos para el día 5) hasta 13.8 minutos ocasionado por los tejidos del día 6. En general, la tendencia es hacia el aumento en el tiempo de muerte, lo que indica una clara depuración de los tejidos a medida que el tiempo transcurre después de la exposición de *Panopea globosa* a *Gymnodinium catenatum*. Lo anterior ubicaría a *Panopea globosa* como un depurador rápido, ya que los resultados sugieren una clarificación total en períodos de semanas, lo que concuerda con reportes para otros moluscos bivalvos (Contreras et al., 2011, Botelho et al., 2010). Con base en el hecho observado de que en el conjunto de otros tejidos fue donde siempre se presentó la muerte en ratones, es posible hipotetizar que es en branquias, glándula digestiva, gónada, pie y músculo aductor en donde se tiene mayor afinidad por las toxinas y por lo tanto es el lugar más probable para su acumulación. Lo anterior ha sido descrito para *Panopea globosa* (Murillo, 2010), *Panopea abrupta* (Curtis et al., 2000) y *Spisula solidissima* (Bricejl et al., 2014) quienes reportan altas concentraciones en dichos tejidos. Los datos encontrados para "otros" tejidos en el presente

trabajo, concuerdan con la depuración descrita para *Mytilus galloprovincialis*, el cual se se ha reportado como un depurador rápido (Blanco *et al.*, 1997). Sin embargo, hay que considerar que los organismos marinos son susceptibles a los cambios climáticos. Bricejl *et al.* (2014) y Li *et al.* (2005) mencionan que ciertos moluscos bivalvos cambian sus tasas de depuración según las condiciones bióticas o abióticas, por lo que habría que continuar la investigación para conocer el efecto de cambios por factores abióticos en los tiempos de depuración de toxinas por *Panopea globosa*.

## CONCLUSIONES

- 1.- La hipótesis planteada en este trabajo: "La depuración de saxitoxina en *Panopea globosa* puede describirse mediante un modelo toxicocinético con cinética de primer orden" no pudo ser evaluada debido a la baja toxicidad encontrada en los tejidos después de un periodo de intoxicación de 6 días mediante alimentación con *Gymnodinium catenatum*.
- 2.- La toxicidad del sifón de *Panopea globosa*, medida en términos de tiempo de muerte por ensayo ratón, es muy baja o nula durante un tiempo de depuración de seis días, lo que indica baja afinidad por toxinas de tipo paralizante o bien, una rápida depuración de las mismas por el tejido.



3.- El manto de *Panopea globosa* durante un periodo de depuración de 6 días muestra resultados de toxicidad que permiten elaborar un modelo cualitativo de depuración en el que al menos una fracción de las toxinas de tipo paralizante son canalizadas hacia el manto de *Panopea globosa* con vías a la eliminación.

4.- Los tejidos combinados de vísceras, hepatopáncreas, músculo aductor, pie y branquias acumularon la mayor parte de toxicidad; siendo observada ésta en tejidos durante toda la etapa de depuración, que fue de 6 días.

5.- Los cambios de toxicidad en los tejidos, durante un periodo de depuración de 6 días por *Panopea globosa*, pueden deberse a biotransformaciones de las toxinas PSP o la transferencia de las toxinas de un compartimento a otro.

#### TRABAJOS CITADOS

AsakaAsakawa, M. et al., 2006. Accumulationn of Paralytic shellfish poison (PSP) and biotransformation of its components in oysters *crassostrea gigas* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Shokuhin Eisegaku Zasshi*, pp. 28-32.

Band-Schmidt, C. J. et al., vol. 21, num. 3, 2011. El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiologica*, pp. 381-413.

Band-Schmidt, C. M. y otros, 2005. Paralytic Shellfish toxin profile in strains of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten*

ventricosus G.B. Sowerby II from Bahía Conceptción, Gulf of California, México. Harmful Algae, Volumen 4, pp. 21-23.

Bates, H. A. & Rapoport, H., 1975. A chemical assay for saxitoxin, the Paralytic Shellfish Poison. Agricultural and Food Chemistry, 23(2), pp. 237-239.

Blanco, J., Moroño, J. F. & Reyero, M., 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One-and-two-compartment models and the effect of some enviromental variables. Marine Ecology Progress Series, Volumen 158, pp. 165-175.

Botelho, M. J., Vale, C., Mota, A. M. & Simoes Goncalves, M. d. L. S., 2010. Depuration kinetics of paralytic shellfish toxins in *Mytilus galloprovincialis* exposed to *Gymnodinium catenatum*: laboratory and field experiments. Journal of Enviromental Monitoring, Volumen 12, pp. 2269-2275.

Botelho, M. J., Vale, C., Velez Grilo, R. & Gomes Ferreira, J., 2012. Uptake and release of paralytic shellfish toxins by the clam *Ruditapes decussatus* exposed to *Gymnodinium catenatum* and subsequent depuration. Marine Enviromental Research, Volumen 77, pp. 23-29.

Bricelj, M. V., Cembella, A. D. & Laby, D., 2014. Temperature effects on kinetics of paralytic shellfish toxin elimination in Atlantic surfclams, *Spisula solidissima*. Deep-Sea Research, 103(II), pp. 308-317.

Bricelj, V. & Shumway, S., 1998. A review of paralytic shellfish poisoning toxins in bivalve mollusc: occurrence and transfer kinetics. Fisheries Science, Volumen 6, pp. 315-383.

Bustillos-Guzmán, J. y otros, 2012. Variaciones en el crecimiento y toxicidad en *Gynodinium catenatum* Graham del golfo de California bajo diferentes proporciones de nitrógeno y fósforo. Ciencias Marinas, 38(1A), pp. 101-117.

Calderon-Aguilera, L., 2010. Reproduction of the Cortes geoduck *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) and its relationship with temperature and ocean productivity. Journal of Shellfish .... Retrieved from <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.2983/035.029.010>.

Cembella, A. D., Shumway, S. E. & Lewis, N. I., 1993. Anatomical distribution and spatio-temporal variation in paralytic shellfish toxin composition in two bivalve species from the Gulf of Maine. Journal of shellfish Research, Volumen 12, pp. 389-403.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., 2003. Manual de buenas practicas de Produccion Acuicola de moluscos bivalvos para la inocuidad alimentaria. Mazatlan: CIAD AC.

Cifuentes Lemus, J. L., Torres García, P. & Frías, M., 1995. La pesca en México. [Online]

Available at:  
[http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/081/htm/sec\\_6.htm](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/081/htm/sec_6.htm)

[Accessed 03 abril 2013].

Comision Federal para la Proteccion contra Riesgos Sanitarios, 2010. Marea Roja. [Online]

Available at:  
<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Marea%20Roja/MareaRoja.aspx>

[Accessed 15 octubre 2012].

Comision Nacional de Ciencia y Tecnologia, 2011. Ciencia y Desarrollo. [Online]

Available at:  
<http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/Revista/250/articulos/vivir-cien-anos-la-almeja-generosa-en-el-pacifico-mexicano.html>

[Accessed 1 noviembre 2012].

Contreras, A. M., Marsden, I. D. & Munro, M. H., 2011. Effects of short-term exposure to paralytic shellfish toxins on clearance rates and toxin uptake in five species on New Zealand bivalve. *Marine and Freshwater Research*, 63(2), pp. 166-174.

Cortes Altamirano, R., 1998. Las Mareas Rojas. Mexico D.F.: AGT Editor.

Curtis, K. M., Trainer, V. L. & Shumway, S. E., 2000. Paralytic Shellfish Toxins in geoduck clams (*Panopea abrupta*): Variability, anatomical distribution, and comparison of two toxin detection methods. *Journal of Shellfish Research*, 19(1), pp. 313-319.

Cusick, K. D. & Sayler, G. S., 2013. An Overview on the marine neurotoxins, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine Drugs*, Volumen 11, pp. 991-1018.

Estrada, N. A. y otros, 2006. Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on uptake and fate of paralytic shellfish poisons in the Pacific giant lion-paw scallop *Nodipecten Subnodosus*. *Marine Biology*, Volumen 151, pp. 1205-1214.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2010. *Depuración de bivalvos: aspectos fundamentales y prácticos*. Roma: FAO.

Food and Agriculture Organization of the United Nations , 2006. *Cultivo de bivalvos en criadero: un manual práctico*. Roma: s.n.

Graham, H. W., 1943. *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. *Transaction of the American Microscopical Society*, 62(3), pp. 259-261.

Guéguen, M. y otros, 2011. Modelling of paralytic shellfish toxins biotransformations in the course of *Crassostrea gigas* detoxification kinetics. *Ecological Modelling*, Volumen 222, pp. 3394-3402.

Hae Jin, J. y otros, 2013. Red tides in Masan Bay, Korea in 2004-2005: I. Daily variations in the abundance of red-tide organisms and enviromental factors. *Harmful Algae*, Volumen 30, pp. 75-88.

Hernández-Sandoval, F. E. et al., 2009. Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferacion de *Gymnodinium catenatum* Graham en la Bahía de La Paz, México. *Hidrobiológica*, pp. 245-256.

Herrera Sepúlveda, A., Sierra Beltrán, A. & Hernández Saavedra, N., 2008. Floraciones algales nocivas: Perspectivas y estrategias biotecnológicas para su detección. *Biotecnología*, 12(1), pp. 23-40.

Krishnan, K. & Peyret, T., 2009. Ecotoxicology Modeling. En: J. Devillers, ed. *Emerging Topics in Ecotoxicology*. Canada: Springer, pp. 145-175.

Li, A. M. y otros, 2005. Uptake and depuration of paralytic shellfish toxins in the green lipped mussel, *Perna viridis*: A dynamic model. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(1), pp. 129-135.

Moroño A., J. M., Pazos, Y. & Blanco, J., 1998. Modelling the accumulation of psp toxins in galicia mussel: results and perspecives, La paz, B.C.S.: CICIMAR.

Murillo, R. (2011)

Núñez-Vázquez, E. y otros, 2011. Impact of harmful algal blooms on wild and cultured animal in the Gulf of California. *Journal of Environmental Biology*, Volumen 32, pp. 413-423.

Organización Mundial de la Salud, 2003. Respuesta de la salud pública a las armas biológicas y químicas. Washington D.C.: Panamericana/Formas e Impresos S.A..

Oshima, Y., 1995. Post-column derivatization liquid-chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *Journal of AOAC international*, pp. 528-532.

Oshiro, M. et al., 2006. Paralytic Shellfish poisoning surveillance in California using the Jellett rapid PSP test. *Harmful Algae* , pp. 69-73.

Palomares García, R. et al., 2006. Efecto del dinoflagelado tóxico *gymnodinium catenatum* sobre el consumo, la producción de huevos y la tasa de eclosión del copépodo *acartia clausi*. *Ciencias Marinas*, pp. 111-119.

Ramírez-Félix, E. et al., 2012. La pesca de almeja *Panopea* spp. en el noroeste de México. *Ciencia Pesquera*, pp. 57-66.

Rodriguez Palacio, M. C., 2006. Establecimiento de cultivos de dinoflagelados, Iztapalapa: Universidad Autonoma Metropolitana.

Secretaria de Pesca y Acuacultura, 2013. Plan de desarrollo Estatal. [Online]

Available at: <http://www.sepescabc.gob.mx/x/ped/>

[Accessed 10 abril 2013].

Smayda, T. J., 1997. What is a bloom? A comentary. *Limnology Oceanography*, Volumen 42, pp. 1132-1136.

Sournia, A., 1995. Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity. *Harmful Marine Algal Blooms*, pp. 103-112.

Turner, A. D., Lewis, A. M., O'Neil, A. & Hatfield, R. G., 2013. Transformation of paralytic shellfish poisoning toxins in UK surf clams (*Spisula solida*) for targeted production of reference materials. *Toxicon*, Volumen 65, pp. 41-58.

Van De Riet, J. y otros, 2011. Liquid Chromatography Post-Column Oxidation (PCOX) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, oysters, and scallops: Collaborative Study. *Food Biological Contaminants*, 94(4), pp. 1154-1176.

Van de Riet, J. M. et al., 2009. Liquid Chromatographic post-column oxidation method for analysis of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, scallops and oyster: Single-Laboratory validation. *Journal of AOAC International*, pp. 1690-1705.

Yu, K., Choi, M., Shen, X. & Wu, R. S., 2005. Modeling of depuration of paralytic shellfish toxins in *Chlamys nobilis* and *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, pp. 474-479.



wa, M. et al., 2006. Accumulation of Paralytic shellfish poison (PSP) and biotransformation of its components in oysters *Crassostrea gigas* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, pp. 28-32.

Band-Schmidt, C. J. et al., vol. 21, num. 3, 2011. El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiologica*, pp. 381-413.

Band-Schmidt, C. M. y otros, 2005. Paralytic Shellfish toxin profile in strains of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten ventricosus* G.B. Sowerby II from Bahía Concepción, Gulf of California, México. *Harmful Algae*, Volumen 4, pp. 21-23.

Bates, H. A. & Rapoport, H., 1975. A chemical assay for saxitoxin, the Paralytic Shellfish Poison. *Agricultural and Food Chemistry*, 23(2), pp. 237-239.

Blanco, J., Moróño, J. F. & Reyero, M., 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One-and-two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Marine Ecology Progress Series*, Volumen 158, pp. 165-175.

Botelho, M. J., Vale, C., Mota, A. M. & Simoes Goncalves, M. d. L. S., 2010. Depuration kinetics of paralytic shellfish toxins in *Mytilus galloprovincialis* exposed to *Gymnodinium catenatum*: laboratory and field experiments. *Journal of Environmental Monitoring*, Volumen 12, pp. 2269-2275.

Botelho, M. J., Vale, C., Velez Grilo, R. & Gomes Ferreira, J., 2012. Uptake and release of paralytic shellfish toxins by the clam *Ruditapes decussatus* exposed to *Gymnodinium catenatum* and subsequent depuration. *Marine Environmental Research*, Volumen 77, pp. 23-29.

Bricelj, M. V., Cembella, A. D. & Laby, D., 2014. Temperature effects on kinetics of paralytic shellfish toxin elimination in Atlantic surfclams, *Spisula solidissima*. *Deep-Sea Research*, 103(II), pp. 308-317.

Bricelj, V. & Shumway, S., 1998. A review of paralytic shellfish poisoning toxins in bivalve mollusc: occurrence and transfer kinetics. *Fisheries Science*, Volumen 6, pp. 315-383.

Bustillos-Guzmán, J. y otros, 2012. Variaciones en el crecimiento y toxicidad en *Gynodium catenatum* Graham del golfo de California bajo diferentes proporciones de nitrógeno y fósforo. *Ciencias Marinas*, 38(1A), pp. 101-117.

Calderon-Aguilera, L., 2010. Reproduction of the Cortes geoduck *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) and its relationship with temperature and ocean productivity. *Journal of Shellfish .... Retrieved from <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.2983/035.029.010>*.

Cembella, A. D., Shumway, S. E. & Lewis, N. I., 1993. Anatomical distribution and spatio-temporal variation in paralytic shellfish toxin composition in two bivalve species from the Gulf of Maine. *Journal of shellfish Research*, Volumen 12, pp. 389-403.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., 2003. *Manual de buenas practicas de Produccion Acuicola de moluscos bivalvos para la inocuidad alimentaria*. Mazatlan: CIAD AC.

Cifuentes Lemus, J. L., Torres García, P. & Frías, M., 1995. *La pesca en México*. [Online]

Available at:  
[http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/081/htm/sec\\_6.htm](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/081/htm/sec_6.htm)

[Accessed 03 abril 2013].

Comision Federal para la Proteccion contra Riesgos Sanitarios, 2010. *Marea Roja*. [Online]

Available at:  
<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Marea%20Roja/MareaRoja.aspx>

[Accessed 15 octubre 2012].

Comision Nacional de Ciencia y Tecnologia, 2011. *Ciencia y Desarrollo*. [Online]

Available at:  
<http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/Revista/250/articulos/vivir-cien-anos-la-almeja-generosa-en-el-pacifico-mexicano.html>

[Accessed 1 noviembre 2012].

Contreras, A. M., Marsden, I. D. & Munro, M. H., 2011. Effects of short-term exposure to paralytic shellfish toxins on clearance rates and toxin uptake in five

species on New Zealand bivalve. *Marine and Freshwater Research*, 63(2), pp. 166-174.

Cortes Altamirano, R., 1998. *Las Mareas Rojas*. Mexico D.F.: AGT Editor.

Curtis, K. M., Trainer, V. L. & Shumway, S. E., 2000. Paralytic Shellfish Toxins in geoduck clams (*Panopea abrupta*): Variability, anatomical distribution, and comparison of two toxin detection methods. *Journal of Shellfish Research*, 19(1), pp. 313-319.

Cusick, K. D. & Sayler, G. S., 2013. An Overview on the marine neurotoxins, saxitoxin: genetics, molecular targets, methods of detection and ecological functions. *Marine Drugs*, Volumen 11, pp. 991-1018.

Estrada, N. A. y otros, 2006. Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on uptake and fate of paralytic shellfish poisons in the Pacific giant lion's-paw scallop *Nodipecten Subnodosus*. *Marine Biology*, Volumen 151, pp. 1205-1214.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2010. *Depuracion de bivalvos: aspectos fundamentales y practicos*. Roma: FAO.

Food and Agriculture Organization of the United Nations , 2006. *Cultivo de bivalvos en criadero: un manual practico*. Roma: s.n.

Graham, H. W., 1943. *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. *Transaction of the American Microscopical Society*, 62(3), pp. 259-261.

Guéguen, M. y otros, 2011. Modelling of paralytic shellfish toxins biotransformations in the course of *Crassostrea gigas* detoxification kinetics. *Ecological Modelling*, Volumen 222, pp. 3394-3402.

Hae Jin, J. y otros, 2013. Red tides in Masan Bay, Korea in 2004-2005: I. Daily variations in the abundance of red-tide organisms and enviromental factors. *Harmful Algae*, Volumen 30, pp. 75-88.

Hernández-Sandoval, F. E. et al., 2009. Toxinas paralizantes en moluscos bivalvos durante una proliferacion de *Gymnodinium catenatum* Graham en la Bahía de La Paz, México. *Hidrobiológica*, pp. 245-256.

Herrera Sepúlveda, A., Sierra Beltrán, A. & Hernández Saavedra, N., 2008. Floraciones algales nocivas: Perspectivas y estrategias biotecnológicas para su detección. *Biotecnología*, 12(1), pp. 23-40.

Krishnan, K. & Peyret, T., 2009. Ecotoxicology Modeling. En: J. Devillers, ed. *Emerging Topics in Ecotoxicology*. Canada: Springer, pp. 145-175.

Li, A. M. y otros, 2005. Uptake and depuration of paralytic shellfish toxins in the green lipped mussel, *Perna viridis*: A dynamic model. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(1), pp. 129-135.

Moroño A., J. M., Pazos, Y. & Blanco, J., 1998. *Modelling the accumulation of psp toxins in galicia mussel: results and perspectives*, La paz, B.C.S.: CICIMAR.

Murillo, R., (2011) Caracterización de fitoplancton tóxico y acumulación diferencial de toxinas de tipo paralizante en la almeja *Panopea globosa* (Dall 1898) en la franja costera San Felipe-Puertecitos, B.C. Tesis de Licenciatura. Ensenada, Universidad Autónoma de Baja California.

Núñez-Vázquez, E. y otros, 2011. Impact of harmful algal blooms on wild and cultured animal in the Gulf of California. *Journal of Environmental Biology*, Volumen 32, pp. 413-423.

Organización Mundial de la Salud, 2003. *Respuesta de la salud pública a las armas biológicas y químicas*. Washington D.C.: Panamericana/Formas e Impresos S.A..

Oshima, Y., 1995. Post-column derivatization liquid-chromatographic method for paralytic shellfish toxins. *Journal of AOAC international*, pp. 528-532.

Oshiro, M. et al., 2006. Paralytic Shellfish poisoning surveillance in California using the Jellett rapid PSP test. *Harmful Algae* , pp. 69-73.

Palomares García, R. et al., 2006. Efecto del dinoflagelado tóxico *gymnodinium catenatum* sobre el consumo, la producción de huevos y la tasa de eclosión del copépodo *acartia clausi*. *Ciencias Marinas*, pp. 111-119.

Perez, B. (2007). *Tasa de depuración de toxinas paralíticas producidas por *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943) en la almeja Chocolate *Megapitaria squalida* (Sowerby, 1835)*. Tesis de Maestría. La Paz, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.

Ramírez-Félix, E. et al., 2012. La pesca de almeja *Panopea* spp. en el noroeste de México. *Ciencia Pesquera*, pp. 57-66.

Rodríguez Palacio, M. C., 2006. *Establecimiento de cultivos de dinoflagelados*, Iztapalapa: Universidad Autónoma Metropolitana.

Secretaría de Pesca y Acuicultura, 2013. *Plan de desarrollo Estatal*. [Online] Available at: <http://www.sepescabc.gob.mx/x/ped/> [Accessed 10 abril 2013].

Smayda, T. J., 1997. What is a bloom? A commentary. *Limnology Oceanography*, Volumen 42, pp. 1132-1136.

Sournia, A., 1995. Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity. *Harmful Marine Algal Blooms*, pp. 103-112.

Turner, A. D., Lewis, A. M., O'Neil, A. & Hatfield, R. G., 2013. Transformation of paralytic shellfish poisoning toxins in UK surf clams (*Spisula solida*) for targeted production of reference materials. *Toxicon*, Volumen 65, pp. 41-58.

Van De Riet, J. y otros, 2011. Liquid Chromatography Post-Column Oxidation (PCOX) method for the determination of paralytic shellfish toxins in mussels,

clams, oysters, and scallops: Collaborative Study. *Food Biological Contaminants*, 94(4), pp. 1154-1176.

Van de Riet, J. M. et al., 2009. Liquid Chromatographic post-column oxidation method for analysis of paralytic shellfish toxins in mussels, clams, scallops and oyster: Single-Laboratory validation. *Journal of AOAC International*, pp. 1690-1705.

Yu, K., Choi, M., Shen, X. & Wu, R. S., 2005. Modeling of depuration of paralytic shellfish toxins in *Chlamys nobilis* and *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, pp. 474-479.