

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**“MODELO TOXICOCINÉTICO PARA ÁCIDO DOMOICO EN ALMEJA
PISMO*Tivela stultorum* (MAWE, 1823)”**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA

OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA

MARÍA SOLEDAD SALINAS WHITTAKER

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. DICIEMBRE 2015

RESUMEN

Se evaluó la cinética de depuración del ácido domoico (AD) por la almeja Pismo (*Tivela stultorum*), realizando bioensayos de toxicidad en condiciones de laboratorio. Los organismos se seleccionaron por talla, de 11-12.5 cm en el eje longitudinal. Se llevaron a cabo tres bioensayos; el primero de exposición de AD a *T. stultorum*, el segundo de incorporación-depuración de AD y el tercero en una segunda etapa de incorporación-depuración. El AD utilizado para las intoxicaciones fue el estándar de ácido domoico de pureza $\geq 90\%$ grado HPLC (Sigma Aldrich Co.), disuelto con agua de mar filtrada y esterilizada, a una concentración de 1mg/mL. Para el primer bioensayo de exposición de AD a *T. stultorum* se realizó administrando 150 μ L del estándar por día, junto con el alimento (pasta comercial de *Isochrysis* sp.), durante un periodo de 15 días. Para el segundo y tercer bioensayo la incorporación fue por vía parenteral, mediante inyecciones de 450 μ L de AD en el poro de la almeja, cada 24 horas por 5 días y cada 8 horas por 1 día, respectivamente. Se cuantificó la concentración de AD en tres diferentes fracciones tisulares de la almeja Pismo; tejido muscular, tejidos blandos y hepatopáncreas. El método utilizado para la cuantificación fue extracción metanólica al 50%, separación por HPLC. Para el primer bioensayo, *T. stultorum* no incorporó AD a niveles cuantificables y para el segundo bioensayo sólo se cuantificó AD en tejidos blandos al término de éste. En el caso del bioensayo 3, los niveles de AD encontrados en tejidos de *Tivela stultorum*, indican que la capacidad de incorporación de esta toxina es mayor para los tejidos blandos que para el tejido muscular y hepatopáncreas. Los tejidos musculares

y blandos de *T. stultorum* muestran capacidad para disminuir los niveles de AD después de que se introdujo vía parenteral. Con los resultados obtenidos se obtuvo que la tasa de depuración calculada para el tejido muscular de la almeja Pismo (-2.748 d^{-1}) es mayor que la calculada para los tejidos blandos (-0.935 d^{-1}). El hepatopáncreas mostró un aumento en la concentración de AD en los primeros 4 días, al ser expuesto a un medio libre de la toxina. Este incremento en el nivel de AD en el hepatopáncreas fue simultáneo a la disminución de los niveles de la toxina en el tejido muscular y los tejidos blandos, lo que sugiere una movilización del AD desde éstos al hepatopáncreas.

Palabras clave: Ácido domoico; Almeja Pismo; Depuración

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

**“MODELO TOXICOCINÉTICO PARA ÁCIDO DOMOICO EN ALMEJA PISMO
Tivela stultorum (MAWE, 1823)”**

T E S I S

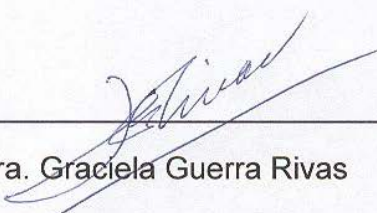
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta

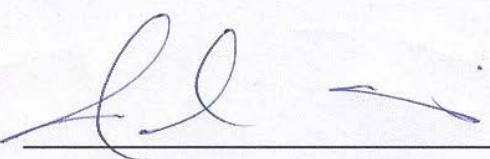
MARÍA SOLEDAD SALINAS WHITTAKER

Aprobada por:



Dra. Graciela Guerra Rivas

Director de tesis



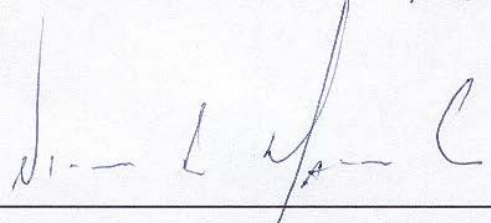
Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez

Sinodal



M.C. Sergio Raúl Canino Herrera

Sinodal



M.C. Víctor Alfonso Macías Carranza

Sinodal

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios, por darme la vida y a mi maravillosa familia, por guiar mis pasos para llegar donde estoy y ser quien soy.

A mi directora de tesis, la Dra. Graciela Guerra Rivas, por todo el apoyo incondicional que me dio durante la realización de la maestría, en especial todo el conocimiento que compartió conmigo, con el fin de hacerme una mejor profesional pero también una mejor persona. Al M.C. Víctor Macías, que no solo compartió sus conocimientos, sino que siempre tuvo tiempo para dedicarme y guiarme en el desarrollo del trabajo de laboratorio. A la Dra. Claudia Gómez por sus aportaciones al presente trabajo, que facilitaron de gran manera la realización de mi tesis. También agradezco al M.C. Raúl Canino, por sus sugerencias, apoyo y una amistad de años. A todos ellos, muchas gracias por compartir su dedicación, tiempo, experiencia y conocimiento.

A mi hermosa familia, ellos son y han sido mi inspiración para superarme y crecer en lo personal y profesional. Gracias Polo por apoyarme en cada una de las etapas de mi vida, en especial aguantarme durante esta. A mis papás, hermanos, abuela y mi familia que desde Chileme estuvieron apoyando y alentando a terminar este capítulo de la mejor manera.

A mis grandes amigos, los que he tenido la suerte de toparme a lo largo de mi camino, en especial a mi amigas Flor, Malena y Aracely, por su apoyo, porras y sacarme mil veces de apuros durante el transcurso de la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México, por haberme otorgado una beca para realizar estudios de Maestría en Ciencias en Oceanografía Costera. A la Facultad de Ciencias Marinas (FMC), Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) y Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño, de la Universidad Autónoma de Baja California, por haberme permitido realizar los estudios experimentales en sus instalaciones. Un agradecimiento especial al Laboratorio de Farmacología y Toxicología Marina, FCM y a las chicas del laboratorio por el apoyo y motivación.

Y por último, quiero dedicar esta tesis a mis hijos, Emilio y Camila, ustedes son el mejor regalo y título que he logrado en la vida.

Mil gracias a todos.



ÍNDICE

Resumen	II
Agradecimientos.....	IV
Índice.....	VII
Lista de tablas	IX
Lista de figuras	X
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes	5
3. Objetivos	15
3.1. Objetivo general	15
3.2. Objetivos particulares.....	15
4. Hipótesis	16
5. Métodos	17
5.1. Diseño experimental.....	17
5.2. Organismos de prueba.....	17
5.3. Condiciones generales en los bioensayos	19
5.4. Disección de especímenes.	20
5.5. Bioensayo 1. Exposición de <i>Tivela stultorum</i> al ácido domoico	20
5.6. Bioensayo 2. Incorporación y depuración de AD por <i>Tivela stultorum</i>	23

5.7	Bioensayo 3. Segunda etapa de incorporación y depuración de AD por <i>Tivela stultorum</i>	26
5.8	Cuantificación de ácido domoico (AD)	29
5.8.1	Pretratamiento de las muestras	30
5.8.2	Extracción de toxina	30
5.8.3	Análisis químico mediante HPLC.....	31
5.9	Tratamiento de datos	33
5.9.1	Cálculo de concentraciones de AD.....	33
5.9.2	Modelación	34
6	Resultados	36
6.1	Bioensayo 1. Exposición de <i>Tivela stultorum</i> al ácido domoico	37
6.2	Bioensayo 2. Incorporación y depuración de AD por <i>Tivela stultorum</i>	39
6.3	Bioensayo 3. Segunda etapa de incorporación y depuración de AD por <i>Tivela stultorum</i>	41
6.4	Aplicación del modelo a los datos del bioensayo.	42
7	Discusión.....	46
8	Conclusiones.....	53
9	Bibliografía	54

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Cronograma de actividades para el Bioensayo 1, que comprendió la evaluación de la incorporación de AD por <i>Tivela stultorum</i> . Los recuadros azules corresponden a las fechas programadas para realizar disecciones y los verdes al periodo de incorporación de AD. Durante el período de incorporación se administró AD en el alimento.	23
Tabla II. Programación de la aplicación de inyecciones de AD y tiempos de depuración, como se realizó en el Bioensayo 3. Se muestran cada organismo con los tiempos y dosis a los que se sometieron, así como los tiempos a los cuales se practicó la disección. Todas las almejas expuestas en este experimento, fueron expuestas previamente a las dosis del Bioensayo 2.	27
Tabla III. Tratamiento y condiciones utilizadas para cada muestra antes de la cuantificación de AD.	30
Tabla IV. Condiciones de trabajo del método analítico mediante HPLC para la cuantificación de AD.	32
Tabla V. Concentraciones de AD en µg/g de las diferentes fracciones tisulares de almejas Pismo del bioensayo 3. TM = tejido muscular; TB= tejidos blandos; y HP= hepatopáncreas.	41
Tabla VI. Tiempo que tarda <i>T. stultorum</i> en depurar el 50% y el 99% del AD (µg/g) de AD incorporado. Los valores fueron calculados con base en la tasa de depuración obtenida mediante intoxicación por inyección. Se incluye en la tabla el límite de cuantificación del AD.	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ácido domoico (tomado de Clayden <i>et al.</i> , 2005).	7
Figura 2. Anatomía interna de una almeja Pismo, valva izquierda sin manto 19	19
(Tomado de Fitch, 1953).	19
Figura 3. a) Distribución de <i>Tivela stultorum</i> en las peceras para el bioensayo 1, diseñado para la incorporación de AD por los organismos, mediante el alimento administrado. b) Pecera de incorporación de AD del día 15. Se observa el sistema de aireación y de filtración por placa utilizado en el Bioensayo 1.....	22
Figura 4. Posición y punto de entrada de la inyección realizada para la incorporación del AD en la almeja Pismo en los Bioensayos 2 y 3.	25
Figura 5. a) Distribución de <i>T. stultorum</i> en el Bioensayo 3, de intoxicación aguda de AD, con aireación y recambio de agua diario. 3, b) <i>T. stultorum</i> después de ser alimentada con la pasta comercial <i>Isochrysis sp.</i> Instant Algae®; Isochrysis 1800.	28
Figura 6. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18 y su respectiva guarda columna instalada en el equipo de HPLC utilizado.....	32
Figura 7. Cromatograma para ácido domoico en HPLC. Se observa una señal a 242 nm con ancho de banda ± 4 en las condiciones descritas para esta tesis, presentando un tiempo de retención aproximado de 8 minutos.....	36
Figura 8. Mucosidad producida por <i>T. stultorum</i> en el bioensayo 1, de incorporación de AD por alimentación en el día 12 del bioensayo.	39

Figura 9. Disección de un espécimen de <i>T. Stultorum</i> . Se observa el corte realizado para realizar la separación entre el pie y los tejidos blandos del organismo.....	40
Figura 10. Mucosidad producida por la <i>T. Stultorum</i> del grupo control, en el bioensayo.....	42
Figura 11. Regresión exponencial con sus ecuaciones del decaimiento de la concentración de AD ($\mu\text{g/g}$) en tejidos musculares (TM) y tejidos blandos (TB) de <i>Tivela stultorum</i>	44
Figura 12. Variación en el tiempo de la concentración de AD en $\mu\text{g/g}$ de tejido en hepatopáncreas (HP) de <i>Tivela stultorum</i>	44
Figura 13. Regresión exponencial con su ecuación del decaimiento de la concentración de AD en $\mu\text{g/g}$ en el cuerpo completo de <i>Tivela stultorum</i> , en función del tiempo.	45

1. INTRODUCCIÓN

Los fenómenos conocidos como florecimientos algales, que son el aumento exponencial de la biomasa fitoplanctónica, han cobrado importancia a nivel mundial, debido al aparente incremento de la frecuencia, intensidad y distribución geográfica de estos episodios (Hernández-Orozco y Gárate-Lizárraga, 2006). Muchos de estos florecimientos algales son inocuos y contribuyen grandemente a la fertilidad de las zonas costeras; sin embargo, algunos tienen efectos negativos sobre los niveles tróficos superiores (Hallegraeff, 1993; Lehane, 2000; citado en Hernández-Orozco & Gárate-Lizárraga, 2006). Debido a que producen ficotoxinas marinas, estos eventos tóxicos son conocidos como florecimientos algales nocivos (FAN).

Las ficotoxinas son productos naturales de origen algal que pueden llegar al hombre u otros depredadores a través de la cadena alimenticia al consumir moluscos, crustáceos, gasterópodos o peces (Rossini y Hess, 2010). Éstas pueden ser incorporadas en forma de aerosol o por contacto directo con el agua de mar (Van Dolah, 2000).

Debido al impacto de las ficotoxinas en la salud humana y en los ecosistemas marinos, el estudio de los FAN es un tema que ha captado el interés de la comunidad científica. Existe un gran número de programas internacionales dirigidos al estudio de estos eventos (Anderson *et al.*, 2010, citado en Band-schmidt *et al.*, 2011) que abarcan diversos aspectos, tales como el ciclo de vida

de las especies responsables, su taxonomía, biogeografía, ecofisiología, toxicidad, estrategias de mitigación, ecología y regulación de la presencia de sus toxinas en los mariscos, entre otros (Band-schmidt *et al.* 2011).

En México los FAN son frecuentes y se han sido reportados en diferentes puntos del país (Ochoa, 2003), estos florecimientos han causado severos daños ambientales en México (Sierra-Beltrán *et al.*, 1997), registrándose en algunos casos pérdidas económicas de hasta 300,000 USD día⁻¹ (Llewellyn *et al.*, 2006; citado en Band-schmidt *et al.*, 2011).

De las diferentes microalgas productoras de FAN, se han identificado ciento treinta y cinco especies como productores de toxinas (Moestrup, 2015). Entre ellas se encuentran las diatomeas, del género *Pseudo-nitzschia* (PN), especie que produce el ácido domoico (AD) como toxina (Lefebvre & Robertson, 2010), la cual es la causante de la intoxicación amnésica por consumo de moluscos.

A pesar de que el AD se identificó inicialmente en la macroalga roja *Chondria armata*, no fue hasta después de los episodios tóxicos ocurridos en Canadá en 1987, que fue atribuido también a las diatomeas del género PN (AESAN, 2009). En este episodio, ocurrido en la Isla Príncipe Eduardo en Canadá, el AD dejó como consecuencia tres muertes, seis hospitalizaciones de por vida y 107 casos de intoxicación aguda en seres humanos, como consecuencia de ingerir moluscos contaminados con AD (Quilliam y Wright, 1989; citado en Hatfield *et*

al. 1994). A su vez, se ha reportado mortandad de aves, mamíferos marinos y peces causada por consumo de organismos filtradores que contenían AD (Sierra-Beltrán *et al.*, 1997, 1998). Lo anterior atribuye a que los organismos marinos que se alimentan de fitoplancton, en específico del género PN, o de otros organismos que hayan ingerido este tipo de fitoplancton, pueden acumular el AD mediante bioconcentración. Muchos invertebrados filtradores parecen asimilar fácilmente el AD al ingerir PN, pero se ha reportado que existen diferencias importantes entre especies en la eliminación o depuración del AD (Schultz *et al.*, 2013).

Para poder entender la relación entre la acumulación y la depuración de un tóxico como el AD en un organismo se utiliza la ruta que siguen los tóxicos desde que son administrados hasta que son eliminados. Dicha vía se conoce como procesosADBE, por las siglas de los procesos biológicos que comprende: absorción, distribución, biotransformación y excreción (Pérez-Martínez & Villabona-Rodríguez, 2014).

Para predecir las tasa de absorción y de eliminación existen modelos toxicocinéticos que usan términos matemáticos para describir cuantitativamente las relaciones entre una variable independiente como el tiempo y una variable dependiente como lo es la concentración de un toxico, como lo es el AD(Seabury & Stork, 2014).

Diversos autores han elaborado los modelos toxicocinéticos para bivalvos para calcular tasas de acumulación y depuración para el AD. Se ha reportado que la vida media del AD en mejillones del género *Mytilus* y ostiones de la especie *Crassostrea gigas* es del orden de horas a unos pocos días, mientras que en las almejas como *Pecten maximus* y almejas navaja como *Siliqua patula* presenta vida media de varios meses hasta años (Novaczek *et al.*, 1991; Drumet *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 2002a, b; Mafra *et al.*, 2010; citado en Schultz *et al.*, 2013).

En el caso de la almeja Pismo (*Tivela stultorum*) no existen reportes de estudios o modelos que ayuden a comprender la absorción o depuración del AD, ya que la almeja Pismo, por ser un organismo filtrador, está expuesto a bioacumular el AD cuando se encuentra en el medio marino.

Debido a que *Tivela stultorum* es un recurso de relevancia económica (CONABIO, 2015) conocer la depuración del AD aportará una solución a un problema actual para los comercializadores de esta almeja, ya que las ficotoxinas marinas, representan un grave problema sanitario, económico y social a nivel mundial. Cada año las intoxicaciones en humanos debido a este tipo de toxinas se cuentan por miles y las pérdidas económicas por centenares de millones (Fonfría-Subirós, 2009).

Por lo antes expuesto, es que se hace una necesidad aportar más conocimiento sobre la capacidad la almeja Pismo para depurar las ficotoxinas como es el

AD. Asimismo, es necesario generar un modelo que permita estimar el tiempo de depuración del AD específicamente para la almeja Pismo.

El modelo cinético que será construido, como meta final de esta tesis, aportará el conocimiento sobre la capacidad de la almeja Pismo para depurar el AD, una vez que ha sido intoxicada.

2. ANTECEDENTES

En México, la Secretaría de Salud (SS), a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), ha definido seis tipos de síndromes asociados a las ficotoxinas establecidos con base en la sintomatología de la intoxicación y los medios de transmisión.

La SS, la COFEPRIS, la Dirección de Regulación Sanitaria, la Secretaría de Marina (SEMAR) y el Centro de Estudios Tecnológicos del Mar, dependiente de la Secretaría de Educación Pública (CETMAR-SEP), realizan monitoreos mensuales y obtienen muestras de fitoplancton y medidas de variables físicas y químicas. Estos monitoreos tienen la finalidad de detectar FAN en una etapa temprana y establecer medidas de prevención cuando las especies responsables sean tóxicas o nocivas (Band-schmidt *et al.*, 2011).

En general, los programas basados en la enumeración e identificación de especies causantes de los FAN son suficientes para prevenir la intoxicación en los seres humanos, sin embargo, las técnicas de seguimiento

microscópicas requieren de una alta habilidad taxonómica, son largas y, dependiendo de la persona que las realice, muy variables. (FAO, 1995).

No obstante, en la revisión realizada por Band-schmidt y colaboradores en 2011, sobre el estado actual del estudio de FAN en México, concluyen que ha habido un avance importante en el estudio de los FAN, pero aun existen líneas de investigación relacionadas con este tema que se han abordado pobremente o no se han considerado, como son el impacto en la acuicultura y vida silvestre, estudios de biosíntesis, metabolismo y excreción, relación estructura-actividad, exposición crónica a FAN, las estrategias de mitigación, entre otros.

Dentro de las toxinas producidas por las microalgas causantes de eventos de FAN se encuentra el AD. Esta toxina es un compuesto natural, que pertenece a la familia de los kainoides, que se clasifican como neuroexcitantes o excitotoxinas que interfieren con los mecanismos de neurotransmisión en el cerebro.

A pesar que el AD fue aislado originalmente en la década de los años 1950 de la macroalga roja *Chondria armata* (FAO 1995; Ravn 1995) y en los 70's, fue detectado en *Alsidium corallinum*, una macroalga roja del Mediterráneo (Todd, 1993), fue detectado posteriormente en algunas especies de microalgas, en particular las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* y *Nitzschia* en la diatomea *Amphora coffaeiformis* (FAO, 1995).

La estructura química del AD (fig. 1) es ácido 4-[6-carboxilo hepta-2,4-dien-2-il]-3-(carboximetil)pirrolidina-2-carboxílico, $C_{15}H_{21}NO_6$, tiene un peso molecular: 311.33g/mol (PubChem, 2015), es un aminoácido cristalino, soluble en agua y ligeramente soluble en metanol y etanol (AESAN, 2009).

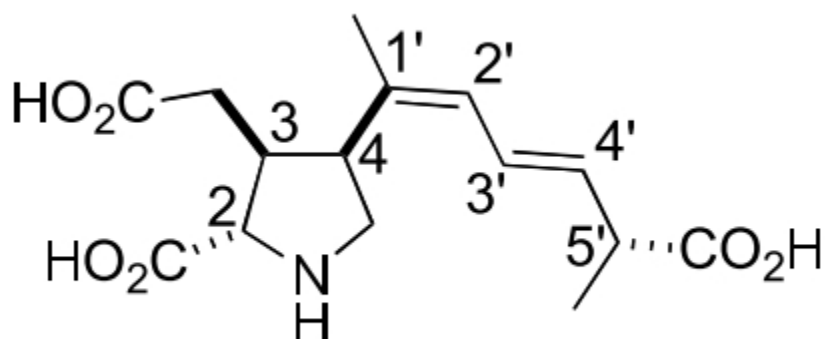


Figura 1. Estructura química del ácido domoico (tomado de Clayden *et al.*, 2005)

Hasta la fecha han sido identificados 10 isómeros (AESAN, 2009). El AD puede purificarse por diversos métodos cromatográficos y su detección se facilita por espectroscopía UV por poseer un cromóforo fuerte (FAO, 1995).

El AD, estructuralmente, es similar al ácido glutámico, lo que le permite unirse en el cerebro al grupo de la familia de los receptores del glutamato, donde el AD se une de manera irreversible, causando un daño neuronal (Costa *et al.*, 2005).

Debido a la toxicidad del AD, una grave intoxicación humana ocurrió en Canadá en el año 1987, cuando 150 personas se presentaron gravemente enfermas al consumir mejillones, que contenían AD en su tejido, resultando la

hospitalización de 19 personas y la muerte de 4 adultos mayores (Jeffery *et al.*, 2004).

Con los datos obtenidos de esta intoxicación de Canadá, se reportó que los efectos son más intensos en personas de edad avanzada con un historial clínico previo y también que la susceptibilidad a la intoxicación depende del sexo, el estado fisiológico y la edad (Pulido, 2008; citado en AESAN, 2009). También se ha reportado una relación entre altas dosis ingeridas y el aumento en la severidad de los síntomas para aquellos pacientes que habían consumido entre 1 y 5 mg/kg de peso corporal (AESAN, 2009). Es en este primer incidente de intoxicación amnésica por consumo de molusco (por sus siglas en inglés ASP) donde se identifica como a la diatomea *Pseudo-nitzschia* (antes *Nitzschia*) *pungens forma multiseriata*, como la productora de AD (Bates *et al.*, 1989; FAO, 1995).

De las microalgas marinas perteneciente al género *Pseudo-nitzschia* (PN), los autores Lefebvre y Robertson (2010) se refieren a trece especies de este género como potenciales productoras de AD; mientras que Parsons y colaboradores (2013) reportan 14 especies de PN como capaces de producir esta toxina, por su parte Lundholm (2015) reporta que 12 especies de este género como productoras de AD, esto señala que existen discrepancias entre los diferentes autores sobre cuantas especies de PN son capaces de producir AD.

Por otra parte, Sierra-Beltrán y colaboradores publican en 1997 el primer reporte de intoxicación por AD en México, FAN que fue producido por *Pseudo-nitzschia spp.*, que causó muerte de aves en la parte sur de la península de Baja California. En el Golfo de California, también en el año 1997 hubo otro FAN de PN, en el cual murieron 766 aves y 67 mamíferos marinos a través del consumo de sardina con un alto contenido de *Pseudo-nitzschia australis frenguelli* en sus vísceras (Band-Schmidt, *et al.*, 2011).

Por otra parte, García-Mendoza y colaboradores (2009) concluyen que *Pseudo-nitzschia australis frenguelli*, fue la especie más abundante de PN en un FAN ocurrido en la Bahía de Todos Santos, Baja California, en abril de 2007, sin embargo, no hubo informes de varamientos de mamíferos marinos cerca de la Bahía, lo que indica que la concentración de AD o el tiempo que estuvo presente la toxina en el medio no fue suficiente para causar intoxicaciones en los niveles tróficos superiores.

Debido a los efectos tóxicos del AD tanto en humanos como en otros seres vivos, tras los episodios tóxicos de 1987, Canadá estableció una concentración guía, usada para el monitoreo rutinario de la ASP. Dicho límite fue calculado de la exposición a la toxina por el consumo de una ración tipo de mejillones "*Mytilus edulis*" (AESAN, 2009) y establece que la concentración de AD debe ser menor a 20 ppm en la porción comestible de molusco bivalvos (HealthCanada, 2012). Basado en este límite, la Unión Europea (UE) estableció en 1997 (Directiva 97/61/CE), que "El contenido de ASP en las partes

comestibles de los moluscos (el cuerpo entero o cualquier parte consumible por separado) no deberá sobrepasar los 20 microgramos de ácido domoico por gramo de tejido según el procedimiento de análisis HPLC”(FAO, 2007; AESAN 2009).Al igual que en la UE, Estados Unidos establece en el NSSP (National Shellfish Sanitation Program) que el límite permisible 20 ppm por carne cruda comestible de molusco (FAO, 2011). A su vez, las autoridades mexicanas establecen en la NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados, que el límite máximo permisible de AD es de 20 mg/kg en carne de molusco.

Por consiguiente, se han descrito diferentes métodos analíticos para conocer la concentración de AD en la carne de molusco y así cumplir con lo establecido en las diferentes legislaciones antes expuestas. El utilizado actualmente es el método químico por cromatografía líquida de alta eficiencia o HPLC por extracción clorhídrica o por metanólica aceptado por la Asociación Oficial de Químicos Analítica (siglas en inglés AOAC), siendo el más aceptado la extracción metanólica por HPLC (Ravn, 1995; Pérez-Calderón, 2002).Este método de extracción agua/metanol fue descrito por los autores Lawrence y Ménard (1991) como un método más sencillo, con porcentajes de recuperación mayores a los realizados con la extracción con ácido clorhídrico, utilizada previamente como método de extracción recomendado para AD.

En la legislación mexicana se indica que la extracción metanólica es la metodología de prueba oficial para la extracción de AD en carne de molusco,

como se estipula en la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, “Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba”.

Por otra parte, Vale y Sampayo (2002) hacen una comparación entre los métodos por extracción clorhídrica, metanol al 50% y metanol al 80%, llegando a la conclusión que el método de metanol/agua al 50% es el que tiene un mayor porcentaje de recuperación, y el máximo de recuperación se presenta cuando el análisis se hace el mismo día del tratamiento de las muestras. Asimismo, García-Mendoza y colaboradores (2009) utilizan este método para analizar el contenido de AD en agua de mar en la Bahía de Todos Santos después de un Bloom de *Pseudo-nitzschia*, y realizar un reporte de su presencia en la zona sur del sistema de corrientes de California.

Aparte de los métodos por HPLC para la cuantificación de AD, existe el método de bioensayo en ratones, descrito por la AOAC (Método Oficial 959.08), como bioensayo de ratón para el veneno paralizante por intoxicación por moluscos (PSP por sus siglas en inglés Paralytic Shellfish Poisoning), el cual fue modificado y también se utiliza para la detección de ácido domoico, al ampliarle el tiempo de observación, de aproximadamente 15 minutos a 4 horas (AOAC, 1984; Todd, 1990; citado en Ravn, 1995), y establecen que cuando los moluscos contienen 40 µg de ácido domoico por gramo en peso húmedo de carne de mejillón, causan síntomas en los ratones (Iverson *et al.*, 1989 citado en Ravn 1995). A pesar de que el AD puede ser detectado usando el bioensayo en

ratones para toxinas PSP, la prueba no tiene sensibilidad suficiente para detectar el AD a los niveles establecidos por las regulaciones actuales (Vale y Sampayo 2002), de 20 µg de ácido domoico por gramo en peso húmedo de carne de mejillón.

Por otro lado, la capacidad analítica con respecto al AD ha permitido que se hayan cuantificado las concentraciones de AD en diferentes organismos como el caso de los mariscos (moluscos bivalvos, gastrópodos, cangrejos, langostas y otros) que acumulan AD por filtración directa de las células del plancton o al alimentarse directamente con organismos contaminados (por ej. carnívoros y necrófagos). La velocidad de acumulación de ficotoxinas por mariscos que se alimentan por filtración es específica para cada especie y en la mayoría de los casos está relacionada directamente con la cantidad de células disponibles a los animales (FAO, 1995). Dentro de la información disponible, sobre acumulación y depuración del AD, la mayoría está enfocada a moluscos bivalvos (Villac *et al.*, 1993; citado en FAO, 1995).

Los mejillones han sido uno de los bivalvos más utilizados para bioensayos de acumulación de AD, por consiguiente diversos autores han reportado que la tasa de acumulación de AD es alta en comparación a otras especies de moluscos bivalvos (Mafra *et al.*, 2010). A su vez, la almeja *Pecten maximus* ha sido ampliamente estudiada y está documentada la acumulación de AD en sus distintos órganos (Campbell *et al.*, 2003, Blanco *et al.*, 2002; FAO 2005), encontrando una concentración de AD más elevada en el hepatopáncreas o

glándula digestiva (aprox. 80%), luego en los tejidos blandos (aprox. 14%), y en menor cantidad en la gónada y en el músculo aductor (AESAN, 2009).

Como se menciona anteriormente, se sabe que las diferentes especies de moluscos tienen distintas tasas de acumulación y la toxina se encuentra en diferentes concentraciones en el organismo, todo esto junto con la capacidad analítica de los métodos de cuantificación de AD, han impulsado una línea de investigación sobre modelos que permitan comprender y explicarla cinética de acumulación y depuración del AD.

En la bibliografía, se han descrito dos grandes modelos para la depuración del AD en moluscos, el primero tipo utiliza un modelo de un compartimiento, considerando que la eliminación del AD es a una tasa constante y el segundo tipo se utiliza un modelo de dos compartimentos, en el cual una parte de la toxina se depura rápidamente y otra parte se elimina a mucha menor velocidad (Mafra *et al.*, 2010).

El primer modelo describe una tasa constante de depuración, lo que lleva a un decaimiento exponencial de las concentraciones de la toxina durante el periodo de depuración, este tipo de modelo ha sido indicado como adecuado para los moluscos bivalvos *Mytilus edulis* y *Placopecten magellanicus*. (Novaczek *et al.*, 1992; Douglas *et al.*, 1997; Silvert y Subba Rao 1992; citado en Blanco *et al.*, 2002). Mafra y colaboradores (2010) indican en el estudio que realizaron sobre la acumulación y la eliminación de AD por *Mytilus edulis* y *Crassostrea virginica*,

que un modelo de decaimiento exponencial es suficiente para describir cuantitativamente la eliminación de AD para ambos moluscos.

En relación al segundo tipo, de dos compartimentos, Blanco en el 2002 utilizó este modelo para el *Mytillus galloprovincialis* y con esto describió cualitativamente mejor la cinética de desintoxicación, pero no produjo una mejora estadísticamente significativa del ajuste. De esta misma manera, Mafra y colaboradores (2010) obtuvieron, en el estudio anteriormente mencionado, que el ajuste del modelo de dos cajas de depuración tenía buen ajuste, pero un mayor grado de incertidumbre.

Para la almeja Pismo no se tienen datos sobre las tasas de la acumulación y depuración de AD, ya que para esta almeja existe un alto grado de desconocimiento biológico y pesquero, y sobreexplotada (CONABIO, 2015). Por el hecho de no contar con estas tasas, no se puede plantear la elaboración de un modelo toxicocinético para el AD en la almeja Pismo.

Por todo lo expuesto anteriormente, se hace necesario disponer de datos que permitan el aumentar el conocimiento de la biología de la especie y que también permitan entender las características específicas de la incorporación y depuración del AD como la distribución de la toxina en los diferentes tipos de tejidos de la almeja Pismo. Por consiguiente, una vez que se obtengan los datos de incorporación y depuración del AD por la almeja Pismo, se podrá comprender mejor y predecir a través de la elaboración de un modelo, el

comportamiento de *T. stultorum* al ser expuesto al AD, Este modelo es muy importante ya que se puede usar como una herramienta para manejar de una manera correcta, en caso de un evento FAN del género PN, este recurso de aprovechamiento sustentable y a su paso como un bien mayor proteger la salud humana.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Elaborar un modelo de la cinética de depuración del ácido domoico por la almeja Pismo *Tivela stultorum*.

3.2 Objetivos particulares

- Optimizar el método analítico de HPLC que será utilizado para cuantificar niveles de AD en tejidos de *Tivela stultorum*.
- Diseñar e implementar ensayos de bioacumulación de AD en *Tivela stultorum*
- Cuantificar la concentración de AD en tejidos de *Tivela stultorum* sometida a bioacumulación de la toxina mediante ensayos de toxicidad.
- Obtener parámetros cinéticos de bioacumulación de AD por *Tivela stultorum*

4 HIPÓTESIS

La depuración de AD por *Tivela stultorum* sigue una cinética de primer orden y puede ser representada mediante un modelo de un compartimento.

5 MÉTODOS

5.1 Diseño experimental

Para el desarrollo de esta tesis, se realizaron 3 bioensayos con el fin de obtener la información necesaria para elaborar el modelo toxicocinético del AD en la almeja Pismo *Tivela stultorum*. En todos los ensayos, el organismo de prueba fue sometido a intoxicación con ácido domoico, aunque en condiciones diferentes ajustadas al objetivo pertinente. Al final de cada ensayo se practicó una disección de los animales de experimentación y cada fracción tisular fue analizada mediante una técnica analítica descrita para AD en tejidos usando HPLC. Previo a la realización de los ensayos de toxicidad, el método analítico fue optimizado usando AD como estándar.

5.2 Organismos de prueba

En todos los bioensayos se utilizó como organismo de prueba *Tivela stultorum*, conocida también como almeja Pismo. *T. stultorum* es un molusco bivalvo filtrador, toma su nombre común del lenguaje de los indios Chumash, que se desarrollaron ampliamente a lo largo de la costa occidental de California, en Estados Unidos. La palabra Pismo proviene del vocablo chumash "pismu" o alquitrán en español, indicativo de los grandes depósitos propios del área alrededor de Pismo beach, zona en la que a principios del siglo anterior se encontraba *T. stultorum* en grandes cantidades (Pattison, 2006: en Status of the Fisheries Report, 2008). Los más recientes estudios sobre la distribución de *T.*

stultorum reportan que esta especie tiene una distribución desde Halfmoon Bay, California, Estados Unidos hasta Bahía Magdalena en Baja California, México (Pattison, 2006 en Status of the Fisheries Report, 2008)

La anatomía externa de *T. stultorum* se caracteriza por tener valvas grandes y gruesas, las que son de color variable, particularmente en los individuos jóvenes, que van desde un tono beige claro a café oscuro. En ocasiones es posible encontrar individuos que presentan líneas color chocolate que irradian desde el umbo. La almeja Pismo tiene una forma triangular simétrica, el ligamento se ubica en la zona posterior de la almeja y es externo y prominente. Esta especie llega a medir, en su eje longitudinal, alrededor de 18.4 cm; generalmente vive en la zona intermareal en playas arenosas, pero también puede encontrarse en pantanos o estuarios y se entierra generalmente dentro de los primeros 15 centímetros del sedimento (Fitch, 1953).

La anatomía interna de los moluscos bivalvos, incluyendo a la almeja Pismo, se divide en: manto, músculo aductor, branquias, pie, sistema digestivo, sistema circulatorio, sistema nervioso y sistema urogenital, todo lo cual conforma las partes blandas del cuerpo de la almeja (Helm *et al.*, 2006). Estas partes blandas están encerradas y protegidas por las valvas (Fitch, 1953). Partes de la anatomía interna de la almeja Pismo fueron representadas en la Figura 2 (Fitch, 1953).

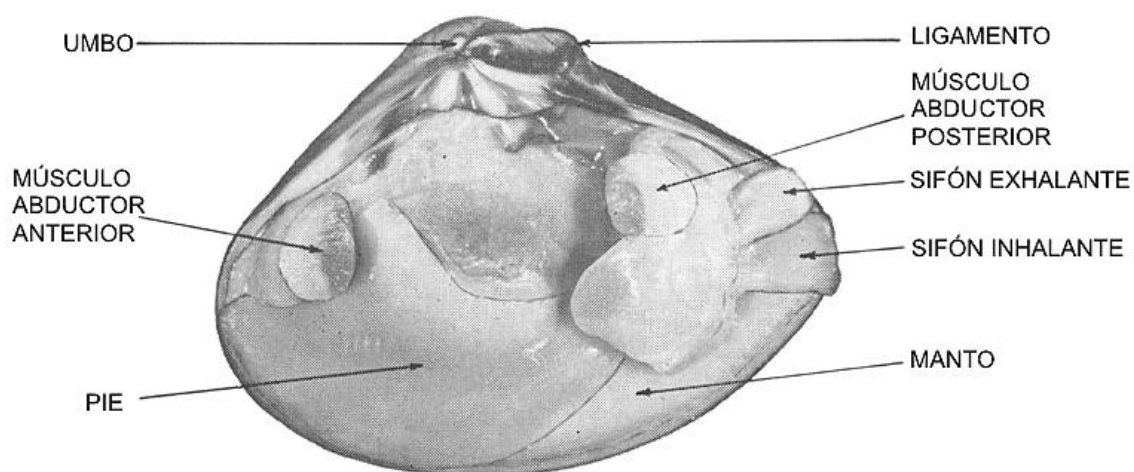


Figura 2. Anatomía interna de una almeja Pismo, valva izquierda sin manto (Tomado de Fitch, 1953).

5.3 Condiciones generales en los bioensayos

Los organismos de prueba de todos los ensayos fueron adquiridos en el Mercado Negro de mariscos y pescados de Ensenada, B.C. una semana antes del inicio de cada bioensayo. Cada individuo fue seleccionado por tamaño, dentro del intervalo de 11 a 12.5 cm en su eje longitudinal. Antes de cada bioensayo, las almejas fueron aclimatadas a condiciones de laboratorio, previo a la administración de AD, a una temperatura ambiente de 20° C y aireación constante. Para la alimentación de los organismos se utilizó la pasta comercial de *Isochrysis sp.* (Instant Algae®; Isochrysis 1800 de Reed Mariculture, Inc.), considerando una alimentación adecuada para cada tipo de bioensayo. Periódicamente se realizaron mediciones de oxígeno mediante un oxímetro para asegurar la constancia de este elemento dentro de cada pecera.

5.4 Disección de especímenes.

Al término de cada bioensayo, se utilizó el siguiente procedimiento general para las disecciones de los organismos de prueba: los tejidos obtenidos de la almeja fueron distribuidos en tres diferentes fracciones tisulares: tejido muscular, tejidos blandos y hepatopáncreas, etiquetados como TM, TB y HP respectivamente. En la fracción TM se colocó el músculo aductor y el pie; la fracción tisular contenida en TB se formó con el sistema digestivo sin hepatopáncreas, el manto, las branquias y el sistema urogenital, y por último, se separó la fracción del hepatopáncreas, HP.

5.5 Bioensayo 1. Exposición de *Tivela stultorum* al ácido domoico

Este bioensayo consistió en una intoxicación crónica en el que la incorporación de AD fue mediante la alimentación. El objetivo de este experimento fue el de establecer el intervalo de concentraciones adecuadas para ocasionar una intoxicación en los organismos y que a la vez, permitieran la presencia de AD en los tejidos en concentraciones detectables por el método analítico preparado para este fin.

Se utilizaron 25 organismos, los que se repartieron de la siguiente manera: 5 organismos por pecera, con un total de 5 peceras. Cada pecera contenía 15 litros de agua de mar, sistema de aireación y filtración por placas. No se hicieron recambios de agua durante la realización del bioensayo. Los organismos fueron alimentadas con pasta comercial de *Isochrysis*

sp., mencionada anteriormente, administrando una dosis de 1.46×10^9 células por almeja por día, para acercarse a los requerimientos nutrimentales de la almeja Pismo (Coe, 1947). La pasta fue suspendida en 100 mL de agua de mar antes de ser añadida a las peceras. El día 9 del bioensayo se disminuyó la cantidad de alimento a 1.56×10^8 células por almeja por día. El tiempo total de duración de este ensayo fue de 15 días.

La intoxicación crónica se realizó utilizando un estándar de ácido domoico de pureza $\geq 90\%$ grado HPLC (Sigma Aldrich Co.) disuelto en agua de mar filtrada y esterilizada, a una concentración de 1mg de AD por mL de agua, el cual fue administrado junto con el alimento, en cantidades de 150 μ L por día, durante los 15 días que duró el bioensayo.

Las peceras usadas en el bioensayo 1 fueron etiquetadas como ADi para indicar la experimentación en relación a la incorporación de AD (Fig. 3), y numeradas de acuerdo al día en el que se realizó la disección del grupo de almejas como: ADi0, ADi3, ADi6, ADi9, ADi12 y ADi15 (Tabla I). Conforme a esta nomenclatura, las almejas de la pecera ADi0, fueron sacrificadas inmediatamente después de administrarles AD (tiempo 0 de incorporación de AD). Las almejas de la pecera ADi3 fueron sacrificadas después de haberles suministrado AD durante 3 días; las de la pecera ADi6, fueron sacrificadas después de 6 días de estar expuestas a la incorporación de AD y así sucesivamente. Con la finalidad de tener una línea base, se formó un grupo control, el cual fue alimentado de la misma manera que los grupos con

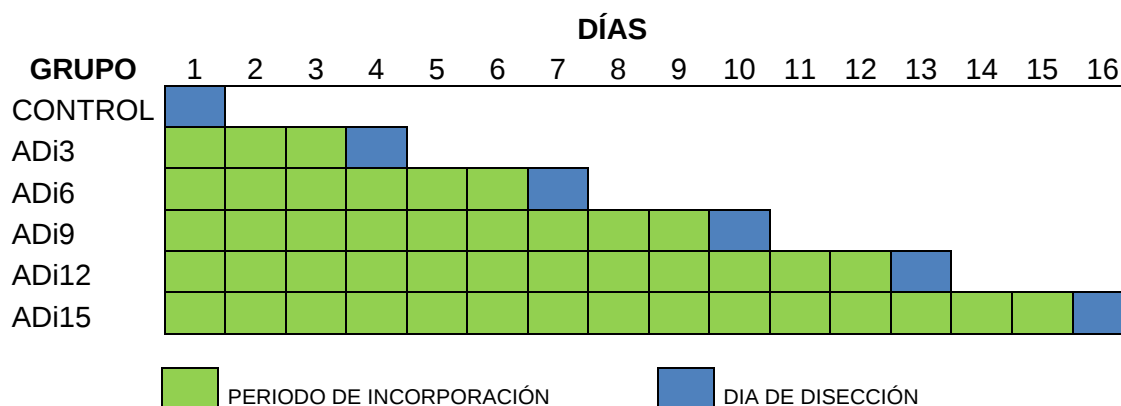
tratamiento, pero no se les agregó AD en el alimento. Éste estuvo compuesto por 30 almejas Pismo, expuestas a las mismas condiciones de laboratorio. El grupo control fue dispuesto en diferentes peceras, de manera que las disecciones se pudieran hacer en paralelo a las disecciones del grupo ADi, y una disección inicial como tiempo cero.

La disección consistió en separar los tejidos para cuantificar el AD presente en TM, TB y HP, según se describe en el punto 5.8 de la metodología.



Figura 3. a) Distribución de *Tivela stultorum* en las peceras para el bioensayo 1, diseñado para la incorporación de AD por los organismos, mediante el alimento administrado. b) Pecera de incorporación de AD del día 15. Se observa el sistema de aireación y de filtración por placa utilizado en el Bioensayo 1.

Tabla I. Cronograma de actividades para el Bioensayo 1, que comprendió la evaluación de la incorporación de AD por *Tivela stultorum*. Los recuadros azules corresponden a las fechas programadas para realizar disecciones y los verdes al periodo de incorporación de AD. Durante el período de incorporación se administró AD en el alimento.



Una vez terminado el bioensayo, a la pecera AD15 se le realizó una limpieza de paredes y se remojaron dentro de la misma pecera, la grava, filtro y desechos de los 15 días, con dos litros de metanol-agua (50:50), el cual fue utilizado como solvente de extracción y del cual se tomó una muestra para cuantificar el AD, utilizando el mismo equipo que se usó en la metodología para cuantificar AD en los tejidos.

5.6 Bioensayo 2. Incorporación y depuración de AD por *Tivela stultorum*

El segundo bioensayo consistió en una intoxicación aguda en el que la incorporación de AD fue por vía parenteral. El objetivo de este experimento fue el de ocasionar una intoxicación en los organismos que permitiera la presencia de AD en los tejidos en concentraciones lo suficientemente elevadas para que

fueran detectables por el método analítico durante la depuración, para observar este proceso a través del tiempo en las diferentes fracciones tisulares analizadas.

Se utilizaron 6 organismos para hacer el bioensayo de intoxicación aguda, cada organismo fue puesto de manera individual en una pecera, con sistema de aireación y se le realizaron recambios de agua diario. Los 6 especímenes fueron distribuidos de la siguiente manera: 2 almejas fueron destinadas a ser organismos control y 4 fueron usadas para tratamiento con AD. El agua de mar utilizada para los recambios se dejó a la temperatura del laboratorio, de 20° C, durante 48 horas antes de ser utilizada para el recambio.

Las almejas fueron alimentadas con la pasta comercial de *Isochrysis sp.*, previamente disuelta en 100 mL de agua de mar antes de ser añadida a las peceras, utilizando 1.56×10^8 células por almeja por día.

La incorporación del AD al organismo se realizó inyectando 450 µL del estándar de ácido domoico de pureza $\geq 90\%$ grado HPLC (Sigma Aldrich Co.). La solución se preparó disolviendo el AD en agua de mar filtrada y esterilizada, a una concentración de 1mg/mL. La administración se realizó cada 24 horas durante 5 días. Las inyecciones fueron aplicadas con una jeringa de insulina y una aguja 25G (0.50 mm de ancho x 38 mm de largo), directamente en el poro de la almeja ubicada en el ligamento de la concha, en el lado posterior de la almeja (Fig. 4).

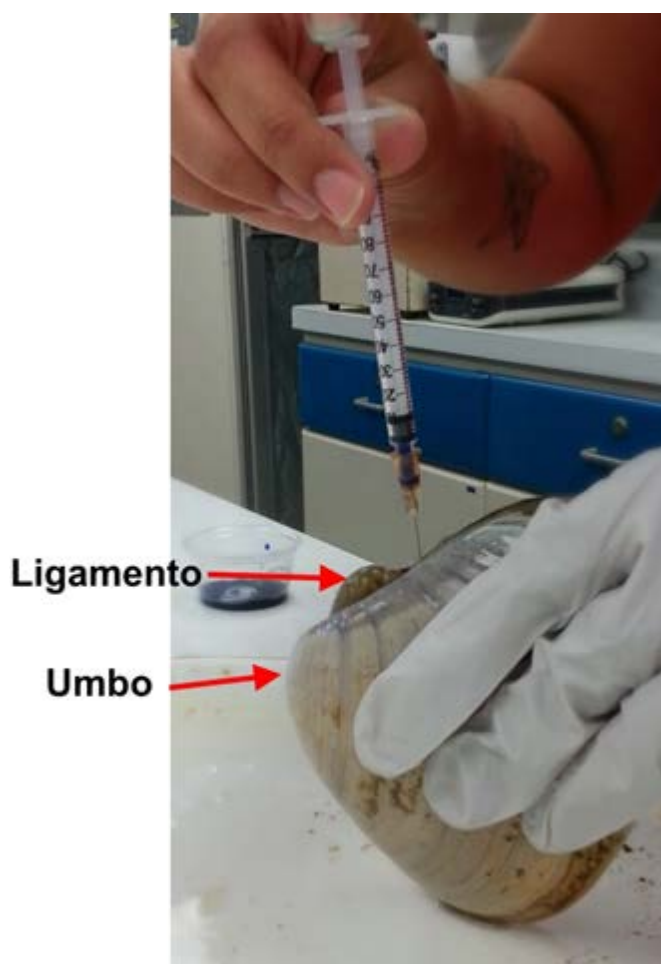


Figura 4. Posición y punto de entrada de la inyección realizada para la incorporación del AD en la almeja Pismo en los Bioensayos 2 y 3.

Se tuvo un grupo control para tener una línea base del bioensayo, que estuvo sometido a las mismas condiciones de temperatura, aireación y alimentación a las almejas utilizadas para la intoxicación aguda.

Al término de 5 días se realizó la disección de una de las almejas intoxicadas y una del control, y se llevó a cabo el análisis utilizando el método descrito en el punto 5.8 de la metodología para la cuantificación del AD, separando los

tejidos, al igual que en el bioensayo anterior, en tejidos blandos (TB), tejidos musculares (TM) y hepatopáncreas (HP). Después de cuantificar el AD, se tomó la decisión de incrementar las dosis de AD a los especímenes restantes en el grupo expuesto a AD, continuando la exposición para pasar a los organismos a una segunda etapa en el nivel de incorporación de AD, renombrando el experimento como Bioensayo 3.

5.7 Bioensayo 3. Segunda etapa de incorporación y depuración de AD por *Tivela stultorum*

El tercer bioensayo consistió en una intoxicación aguda en el que la incorporación de AD fue por la vía parenteral, al igual que en el bioensayo 2; el objetivo de este experimento fue el de incrementar los niveles de AD en los organismos, mediante una intoxicación con dosis de la toxina mayores que las obtenidas en el experimento anterior. De la misma manera que en el bioensayo 2, se buscó tener en los tejidos concentraciones altas de AD para tratar de asegurar detectabilidad por el método analítico, y poder observar la depuración del AD a través del tiempo en las diferentes fracciones tisulares analizadas.

Cada almeja fue puesta individualmente en una pecera (Fig. 5) con aireación constante, y recambios de agua, la cual era previamente temperada por 48 horas a temperatura ambiente en el laboratorio.

Tres de los organismos utilizados en este bioensayo, provenientes del grupo expuesto a AD del Bioensayo 2, les fueron administradas dosis adicionales de

AD mediante inyecciones, en el poro de la almeja. En este segundo régimen, en cada inyección se administraron por individuo 450 μ L del estándar de ácido domoico con una pureza $\geq 90\%$ grado HPLC (Sigma Aldrich Co.) diluido con agua de mar filtrada y esterilizada, a una concentración de 1mg/mL. En total, se aplicaron 3 dosis, inyectadas una cada 8 horas (Tabla II). Por otra parte, se tuvo un organismo control, al cual se le alimentó de manera rutinaria y no se le administró AD. Al igual que en los bioensayos anteriores, las almejas fueron alimentadas con la pasta comercial de *Isochrysis sp.* en concentración de 1.56×10^8 células por almeja por día, suspendida en 100 mL de agua de mar antes de ser añadida a las peceras.

Las inyecciones fueron realizadas con una jeringa de insulina y una aguja 25G (0.50 mm de ancho x 38 mm de largo), en el poro de la almeja ubicada en el ligamento de la concha, lado posterior de la almeja (Fig. 4).

Tabla II. Programación de la aplicación de inyecciones de AD y tiempos de depuración, como se realizó en el Bioensayo 3. Se muestran cada organismo con los tiempos y dosis a los que se sometieron, así como los tiempos a los cuales se practicó la disección. Todas las almejas expuestas en este experimento, fueron expuestas previamente a las dosis del Bioensayo 2.

Organismo	Núm. de dosis de 450 μ L de AD y tiempos de aplicación después de iniciado el experimento	Tiempo que depuró (h)	Tiempo de disección después de iniciado el experimento (h)
Control 1	NA	NA	24
Control 2	NA	NA	48
Control 3	NA	NA	96
1 (Expuesto a AD)	3 (0, 8 y 16 h)	0 h	24

Organismo	Núm. de dosis de 450 μ L de AD y tiempos de aplicación después de iniciado el experimento	Tiempo que depuró (h)	Tiempo de disección después de iniciado el experimento (h)
2 (Expuesto a AD)	3 (0, 8 y 16 h)	48	72
3 (Expuesto a AD)	3 (0, 8 y 16 h)	96	120

La depuración se inició a las 24 horas de iniciada la intoxicación aguda, tiempo al cual se suspendieron las dosificaciones de AD y se transfirieron los organismos a peceras con agua libre de toxinas. En este momento, se estableció el tiempo inicial de la depuración y se realizó la primera disección, con la finalidad de cuantificar el AD en los tejidos. La siguiente disección se realizó a las 48 horas y por último una tercera disección a las 96 horas de iniciado el periodo de depuración (Tabla II).



Figura 5. a) Distribución de *T. stultorum* en el Bioensayo 3, de intoxicación aguda de AD, con aireación y recambio de agua diario. 3, b) *T. stultorum* después de ser alimentada con la pasta comercial *Isochrysis* sp. Instant Algae®; Isochrysis 1800.

La depuración se inició a las 24 horas de iniciada la intoxicación aguda, tiempo al cual se suspendieron las dosificaciones de AD y se transfirieron los organismos a peceras con agua libre de toxinas. En este momento, se estableció el tiempo inicial de la depuración y se realizó la primera disección, con la finalidad de cuantificar el AD en los tejidos. La siguiente disección se realizó a las 48 horas y por último una tercera disección a las 96 horas de iniciado el periodo de depuración (Tabla II).

A la par con la disección de las almejas intoxicadas, se realizó la disección de una almeja control, para obtener la línea base del bioensayo. El grupo control estuvo sometido a las mismas condiciones de temperatura, aireación y alimentación a las almejas utilizadas para la intoxicación aguda.

Para cada disección y cuantificación de AD se llevó a cabo un análisis, utilizando el procedimiento que se describe a continuación en el punto 5.8 de la metodología, separando los tejidos al igual que en los bioensayos anteriores.

5.8 Cuantificación de ácido domoico (AD)

Para medir las concentraciones de AD, se utilizó como base el procedimiento descrito por la European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EU-RL-MB)(EU-RL-MB, 2008), que utiliza un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa con detector en el UV-Visible, el cual es una modificación del procedimiento descrito por Quilliam y colaboradores (Quilliam *et al.*, 1995). Éste consiste en extraer la toxina amnésica del tejido de

la muestra, utilizando una mezcla de metanol/agua (50:50), y la detección con un HPLC-UV.

5.8.1 *Pretratamiento de las muestras*

Las muestras de tejido fueron sometidas a un pretratamiento de limpieza, disección, separación y homogenización de los tejidos (European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EU-RL-MB), 2008) (Tabla III).

Tabla III. Tratamiento y condiciones utilizadas para cada muestra antes de la cuantificación de AD

Tratamiento	Condiciones
Limpieza y disección	Se realizó dentro del laboratorio húmedo a 20° C de temperatura controlada, con agua destilada y equipo de disección.
Separación	Se separaron los tejidos en: hepatopáncreas, tejidos blandos y tejidos musculares y se etiquetaron como HP, TB y TM respectivamente. Se utilizaron envases receptores sumergidos en hielo escarcha para mantener la temperatura alrededor de 4° C.
Homogenización	Se licuó a velocidad media por menos de 2 minutos

5.8.2 *Extracción de toxina*

Del homogenado obtenido en la etapa anterior, se extrajo una muestra de cada tipo de tejidode aproximadamente 10 ± 0.1 g, con excepción de las muestras de hepatopáncreas para los bioensayos 2 y 3, en donde se utilizó 2 ± 0.1 g.

Cada una de las muestras representativas pesadas fueron depositadas en tubos de centrifuga donde se les agregó el solvente de extracción, el que es

una mezcla de metanol y agua (50:50), 20 mL para las muestras de 10 ± 0.1 g y 4 mL para las muestras de 2 ± 0.1 g. Una vez agregado el solvente se les agitó durante 1 minuto, para luego ser centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos, a 4°C de temperatura.

El sobrenadante obtenido después de la centrifugación, se llevó a un matraz de aforación de 25 mL y 5 mL según correspondiera al peso de la muestra. De esta mezcla se filtró aproximadamente 1 mL a través de un filtro de jeringa Acrodisc® con membrana de PTFE de 25 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.45 μ m. El filtrado fue transferido a un vial ámbar previamente etiquetado con el tipo de tejido y el bioensayo correspondiente. Estos viales con el filtrado fueron almacenados en refrigeración a -20°C de temperatura hasta su utilización.

5.8.3 Análisis químico mediante HPLC

El cromatógrafo utilizado fue un HPLC marca Agilent 1200, Series Pure Liquid Chromatography, con bomba cuaternaria, calefactor de columna y automuestreador modelo G1311A. La columna utilizada fue la columna analítica de fase reversa Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6 x 150 mm, tamaño de partícula 5 μ m y un guarda columna (para este tipo de columna) como protección (Fig. 6).

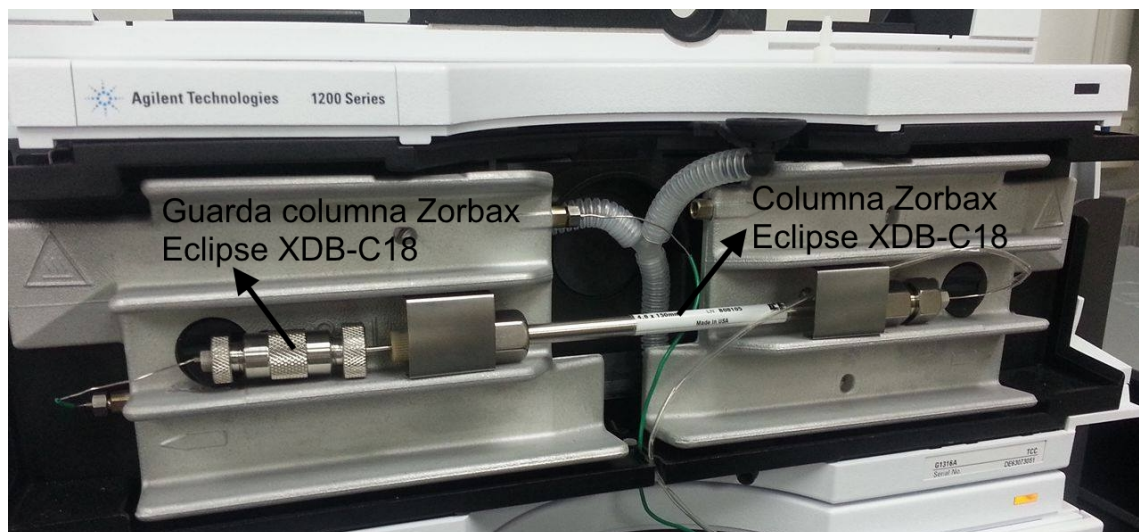


Figura 6. Columna Zorbax Eclipse XDB-C18 y su respectiva guarda columna instalada en el equipo de HPLC utilizado.

Las condiciones de trabajo del HPLC que se detallan en la Tabla IV, fueron utilizadas para todos análisis de las muestras y curvas de calibración.

Tabla IV. Condiciones de trabajo del método analítico mediante HPLC para la cuantificación de AD.

Bomba:	
Tiempo estabilización	30 min
Fase móvil	Acetonitrilo-Solución TFA*(10:90)
Flujo de fase móvil	1.5 ml/min
Presión	101 - 106 bar
Solvente de limpieza	Metanol (HPLC)
Tiempo Limpieza	30 min
Inyector:	
Volumen de inyección	60 µl
Columna:	
Temperatura de la columna	40 °C
Tiempo de corrida	12 min
Detector:	
Señal	242 nm
Ancho de banda	4 nm
Tiempo de retención AD	App. 8 min

*Solución TFA= Ácido Trifluoroacético 0.1% en Agua (grado HPLC)

5.9 Tratamiento de datos

5.9.1 Cálculo de concentraciones de AD

Para calcular las concentraciones de AD se realizó previamente una curva de calibración, utilizando un estándar de ácido domoico de pureza $\geq 90\%$ grado HPLC (Sigma Aldrich Co.) diluido con agua de mar filtrada y esterilizada, a una concentración de 1mg/mL, para así obtener una ecuación de la recta y luego asociar los valores obtenidos para cada muestra en $\mu\text{g/mL}$. Se utilizaron dos diluyentes diferentes para hacer la curva de calibración, la primera como indica el método, acetonitrilo:agua, 1:9 v/v y la segunda, utilizando el sobrenadante que obtuvo mediante una extracción con el método descrito.

Para prevenir interferencias y traslape de picos causadas por el triptófano (Quilliam *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 2009), se realizaron corridas de una mezcla de estándar de AD y triptófano en proporciones 1:10, para ver la resolución del método.

Para calcular la concentración de AD (AD_m) presente en la muestra, en $\mu\text{g/g}$ como indica el método, se utiliza la siguiente ecuación:

Ec. (1)

$$AD_m \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{AD_c V_f}{P}$$

Dónde:

AD_c es la concentración de AD en µg/mL de la muestra diluida, la cual es calculada utilizando la curva de calibración.

V_f es el volumen final del homogenizado, más el solvente de extracción, una vez aforado en mL.

P es el peso del tejido analizado en gramos.

5.9.2 Modelación

Para la modelación, se asumió un modelo de una caja para la depuración del AD por la almeja Pismo, suponiendo que la eliminación del AD es a una tasa constante como se muestra en la ecuación 2.

Ec. (2)

$$\frac{\partial(AD)}{\partial t} = -k(AD)$$

Dónde:

$\frac{\partial(AD)}{\partial t}$ es la variación de la concentración a través del tiempo t, durante la etapa de depuración

AD es la concentración inicial de AD en µg/g

k es la tasa de depuración (día⁻¹).

Resolviendo analíticamente la ecuación 2 se obtiene la ecuación 3, quedando expresada la ecuación en términos de exponencial, con potencia negativa, se puede calcular la constante o tasa de decaimiento.

Ec. (3)

$$AD(t) = (AD)_0 \times e^{-k(t)}$$

Dónde:

(AD)₀ es la concentración inicial de AD en el organismo

AD(t) es la concentración de ácido domoico en el organismo después de un tiempo t

t es el tiempo en días

k es la tasa de decaimiento o depuración (día⁻¹).

Al conocer la tasa de depuración (k) se pueden calcular las concentraciones en un momento dado y los tiempos que tarda en ser eliminada del organismo, así como el tiempo que tarda la concentración en disminuir a la mitad [o tiempo de vida media (t_{1/2})].

6 RESULTADOS

Se utilizó la curva de calibración de AD en la que el diluyente utilizado fue un filtrado del sobrenadante de una extracción con el método descrito a una almeja Pismocontrol, con lo que se obtuvo un tiempo de retención de aproximadamente 8 minutos (Fig.7). Dependiendo del día, el tiempo de retención varió ligeramente, pero se mantuvo la consistencia entre los tiempos de retención de los puntos de la curva de calibración y los tiempos de retención de las muestras, en una misma corrida.

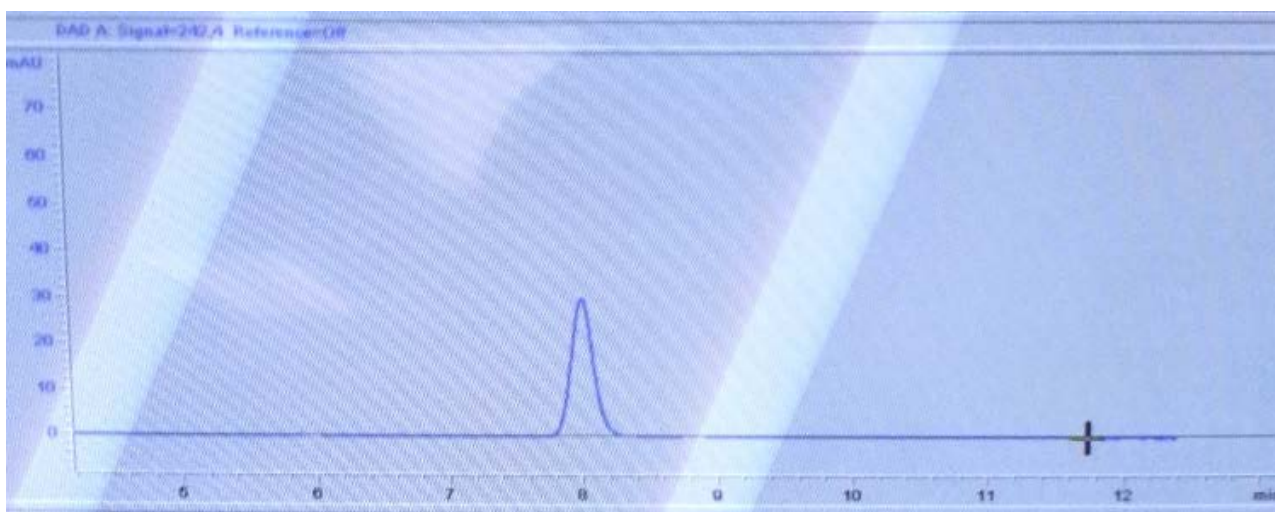


Figura 7. Cromatograma para ácido domoico en HPLC. Se observa una señal a 242 nm con ancho de banda ± 4 en las condiciones descritas para esta tesis, presentando un tiempo de retención aproximado de 8 minutos.

En la medición de interferencia con triptófano se encontró que existe una diferencia en el tiempo de retención entre los picos de triptófano (6.4 minutos

app.) y el AD (8 minutos app.), ligeramente mayor a 1.5 minutos, dando una buena resolución. A su vez se mantuvieron las proporciones de las concentraciones seleccionadas de 50 $\mu\text{g/g}$ de triptófano y 5 $\mu\text{g/g}$, con una área de integración aproximadamente 10 veces mayor.

El límite de detección fue calculado como tres veces la desviación estándar del mismo punto medido por triplicado, obteniéndose un valor de 0.009 $\mu\text{g/g}$ y un límite de cuantificación como diez veces la desviación estándar, con un valor de 0.030 $\mu\text{g/g}$.

6.1 Bioensayo 1. Exposición de *Tivela stultorum* al ácido domoico

Para este bioensayo no se encontraron valores cuantificables de AD en los tejidos analizados durante el tiempo de incorporación de 15 días. Tampoco se obtuvieron valores detectables de AD en los extractos de la grava, filtro, desechos de las almejas y paredes de la pecera ADi15. El grupo control no presentó valores detectables de AD. Al noveno día de iniciada la incorporación de AD, se observó que las almejas empezaron a producir mucosidad excesiva, con un deterioro de la salud posterior (Fig.8), hasta llegar a la muerte en algunos casos. Los organismos que presentaron dichos síntomas pertenecían a las peceras ADi12 y ADi15, donde murieron 2 y 3 organismos respectivamente. Por esta razón, las disecciones y el análisis para cuantificar AD en los tejidos de los organismos de la pecera AD12 sólo se realizaron con 3 individuos y la de AD15 con dos.

El grupo control, que se expuso a las mismas condiciones de laboratorio y alimentación, también presentó la problemática de la producción de mucosidad por parte de las almejas y su posterior deterioro de salud, comenzando en el día 7 del bioensayo y presentando mayor mortalidad que el grupo AD incorporación, con 6 organismos muertos del total de 30 almejas utilizadas como grupo control.

Se disminuyó la cantidad de la pasta comercial utilizada como alimento *Isochrysis sp.* Instant Algae®; Isochrysis 180, en el día 9 del bioensayo desde 1.46×10^9 células por almeja por día a 1.56×10^8 células por almeja por día.

La temperatura del agua de las peceras se mantuvo entre los $19 \pm 1^\circ \text{C}$, con niveles de oxígeno superiores a los 3 mg/L de oxígeno disuelto en el agua de mar, con un promedio de 6.2 mg/L de oxígeno disuelto en el agua de mar.



Figura 8. Mucosidad producida por *T. stultorum* en el bioensayo 1, de incorporación de AD por alimentación en el día 12 del bioensayo.

6.2 Bioensayo 2. Incorporación y depuración de AD por *Tivela stultorum*

Una vez finalizado el bioensayo 1 de intoxicación aguda, se realizó la disección de los tejidos (Fig. 9) y posteriormente se cuantificó el AD de una de las almejas, para ver la concentración de AD que se había incorporado a sus

diferentes tejidos (TB, TM y HP), después de inyección directa a la zona de los tejidos blandos a través del poro del ligamento.



Figura 9. Disección de un espécimen de *T. Stultorum*. Se observa el corte realizado para realizar la separación entre el pie y los tejidos blandos del organismo.

El tejido blando fue el único que presentó concentraciones detectables, encontrando $6.7\mu\text{g}$ de AD por g de tejido. Para el hepatopáncreas y los tejidos musculares no se detectó la presencia de AD.

La temperatura fue mantenida durante todo el bioensayo 2 a $19.4 \pm 0.5^\circ \text{C}$ gracias a los recambios de agua, la cual pudo estabilizarse a la temperatura del laboratorio.

6.3 Bioensayo 3. Segunda etapa de incorporación y depuración de AD por *Tivela stultorum*

De los tres organismos inyectados se hicieron las cuantificaciones del AD en el orden indicado en la Tabla V, obteniendo como resultados diferentes niveles de concentración para los tejidos, donde las mayores concentraciones se presentan en TB. Para el caso de TM y HP, las concentraciones estaban por debajo del límite de detección, que para esta metodología fue de 0.009 µg/g, en determinado tiempo (Tabla V).

Tabla V. Concentraciones de AD en µg/g de las diferentes fracciones tisulares de almejas Písmo del bioensayo 3. TM = tejido muscular; TB= tejidos blandos; y HP= hepatopáncreas.

Tiempo que depuró (h)	TM AD (µg/g)	TB AD (µg/g)	HP AD (µg/g)
0	5.938	20.236	<0.009
48	0.223	0.527	0.498
96	<0.009	0.481	0.565

La variación de la temperatura del agua de mar durante el bioensayo fue de $19.1 \pm 0.2^\circ \text{C}$, con condiciones de recambio total y aireación constante, en donde el oxígeno se mantuvo sobre los 8 mg/L de oxígeno disuelto en agua de mar.

Al iniciar el bioensayo 3, las almejas del grupo control habían permanecido en condiciones de laboratorio las 3 semanas previas, ya que eran parte del grupo

de almejas del bioensayo 2, en el que comenzaron a presentar mucosidad (Fig. 10). Una de las almejas murió antes del último día del bioensayo 3.



Figura 10. Mucosidad producida por la *T. Stultorum* del grupo control, en el bioensayo.

6.4 Aplicación del modelo a los datos del bioensayo.

Para la modelación se utilizaron los datos obtenidos en el Bioensayo 3, ya que los resultados de los bioensayos anteriores se encontraban bajo el límite de detección y/o eran insuficientes, como en el caso del bioensayo 2, en el cual se obtuvo sólo un valor.

Para la constante de decaimiento (k), en el intervalo de tiempo de desarrollo del bioensayo 3, se describió un modelo de caja para la depuración del AD por la almeja Pismo, obteniendo una constante para los tejidos blandos (k_{TB}) un valor de -0.935 d^{-1} , y para los tejidos musculares (k_{TM}) un valor de -2.748 d^{-1} (Fig.11). Esto último, suponiendo que la eliminación del AD es a una tasa constante y que las regresiones exponenciales tienen un coeficiente de correlación de Pearson (r) de -0.9740 para tejidos musculares y de -0.8765 para tejidos blandos.

Con las constantes k_{TM} y k_{TB} , se calcularon el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), el tiempo para eliminar el 99% de la concentración inicial ($t_{99\%}$) y el tiempo en que se llegaría al límite de cuantificación (t_{LC}), establecido para esta tesis en $0.009 \text{ } \mu\text{g/g}$ (Tabla VI).

Tabla VI. Tiempo que tarda *T. stultorum* en depurar el 50% y el 99% del AD ($\mu\text{g/g}$) de AD incorporado. Los valores fueron calculados con base en la tasa de depuración obtenida mediante intoxicación por inyección. Se incluye en la tabla el límite de cuantificación del AD.

Tiempos (días)	TM (Tejido muscular) $k_{TM} = -2.748$	TB (Tejidos blandos) $k_{TB} = -0.935$	Organismo completo $k_{AP} = -0.945$
Tiempo de vida media, $t_{1/2}$	0.25	0.74	0.73
Tiempo para depurar el 99 % de AD inicial, $t_{99\%}$	1.67	4.93	4.87
Límite de detección, t_{LC}	2.19	6.33	6.02

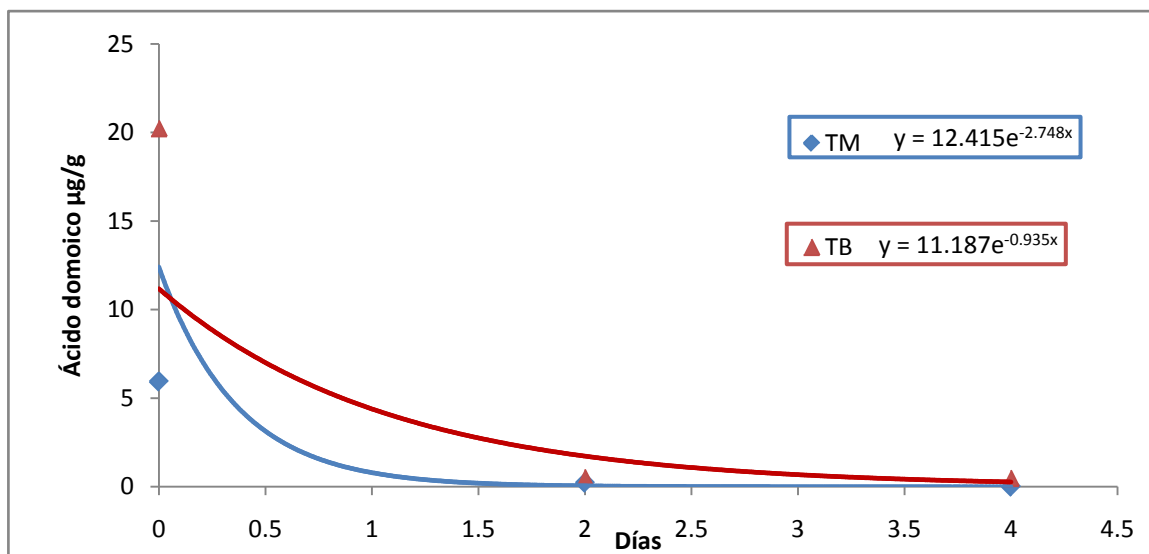


Figura 11. Regresión exponencial con sus ecuaciones del decaimiento de la concentración de AD ($\mu\text{g/g}$) en tejidos musculares (TM) y tejidos blandos (TB) de *Tivela stultorum*.

En el caso del hepatopáncreas se observó un comportamiento diferente durante el bioensayo 3. En un inicio la concentración de AD se encuentra bajo el límite de detección y luego se incrementa dicha concentración hasta llegar a $0.565 \mu\text{g/g}$ de AD (Fig. 12).

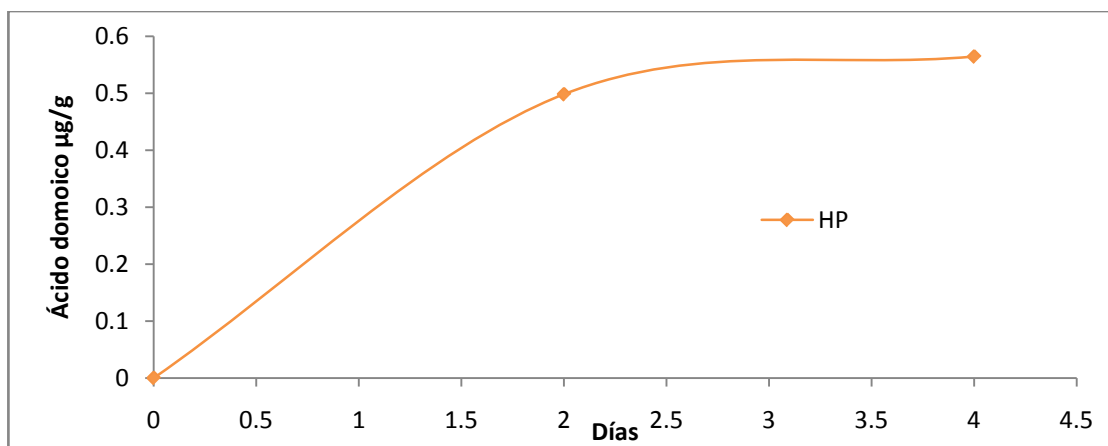


Figura 12. Variación en el tiempo de la concentración de AD en $\mu\text{g/g}$ de tejido en hepatopáncreas (HP) de *Tivela stultorum*.

Al considerar las concentraciones del organismo completo, se calculó una tasa de decaimiento (k_{AP}) para la almeja Pismo, que fue muy similar a la calculada para los tejidos blandos, donde se obtuvo un valor para k_{AP} de -0.945 d^{-1} (Fig.13) con un valor de $r = -0.8924$. Se calculó el $t_{1/2}$, $t_{99\%}$ y t_{LC} para la concentración inicial de AD en el organismo completo (Tabla VI).

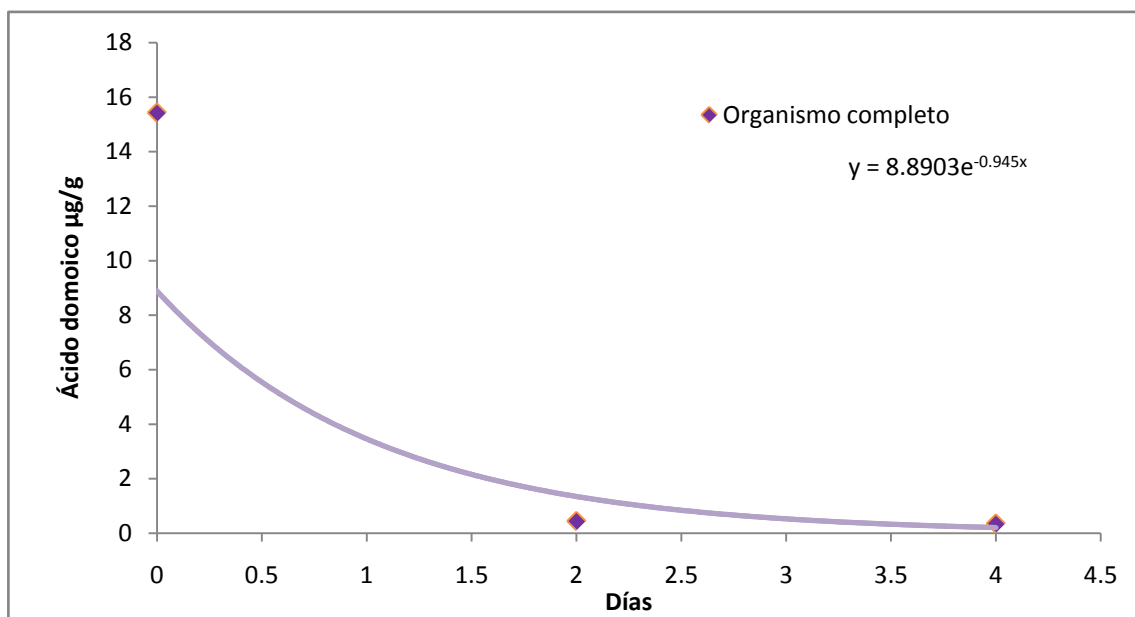


Figura 13. Regresión exponencial con su ecuación del decaimiento de la concentración de AD en µg/g en el cuerpo completo de *Tivela stultorum*, en función del tiempo.

7 DISCUSIÓN

Las curvas de calibración que se realizaron con dos diluyentes diferentes, primero como indica el método, acetonitrilo:agua, 1:9 v/v y segundo, utilizando el sobrenadante de una extracción practicada a una almeja Pismocontrol, presentaron tiempos de retención y áreas de integración muy similares. A pesar de las semejanzas, se decidió utilizar la curva de calibración elaborada con el filtrado del sobrenadante obtenido de la extracción de una almeja Pismo. Esta decisión se tomó debido a que esta matriz sería más parecida a la de los extractos obtenidos en las muestras, por lo que el tiempo de almacenamiento previo a las lecturas con el HPLC, tuvieron un efecto similar en los puntos de la curva y las muestras.

De las interferencias posibles, como es el caso del triptófano, se obtuvo una buena resolución, como lo mencionan diferentes autores (Lefebvre *et al.* 1999; Maroulis *et al.* 2008; FAO 1995; Quilliam 2003). Es decir, se obtuvo una diferencia en el tiempo de retención entre los picos de 1.5 minutos aproximadamente, y se mantuvieron las proporciones de las concentraciones seleccionadas en proporción de AD:Triptófano (1:10). Por esta razón, se puede decir que este compuesto, que se encuentra presente en concentraciones importantes en tejidos de mariscos (FAO 1995), no causa falsos positivos ni interfiere en la cuantificación del AD bajo las condiciones de trabajo establecidas. .

Para el bioensayo 1, cuyo objetivo fue el de observar la incorporación de AD, las cantidades de toxina administradas junto con el alimento no fueron lo suficientemente altas para provocar una intoxicación que se pudiera detectar. Es decir, la incorporación del AD no rebasó la velocidad con la cual el organismo depura esta toxina.

La expulsión de mucosa durante el bioensayo puede estar relacionado con la concentración del alimento, como lo reporta Maeda-Martínez (2002), indicando que las altas dosis de alimento concentrado en cultivos controlados, administrados en dos o tres pulsos al día, pueden llevar a los bivalvos al rechazo pre-digestivo del alimento en forma de pseudoheces, que es la parte del bolo alimenticio amalgamado por moco. De acuerdo con este autor, este bolo alimenticio mezclado con moco no se digiere y se expulsa a la cavidad paleal, para luego expulsarlas al exterior de la concha (Helmet *al.*, 2006). Por otro lado, los autores Beninger y St-Jean (1997) hacen mención de que este tipo de moco de rechazo de pseudoheces, es de alta viscosidad como el observado durante el bioensayo (Fig. 8 y 10).

El grupo en el que primero se presentó la mucosidad y que además, se mostró en mayor número, de organismos, fue en el grupo control. Respecto a este grupo, no es posible afirmar que la causa haya sido la toxina, ya que no les fue administrada. Más bien, este hecho (ausencia de AD en las peceras), podría confirmar que las almejas estuvieron sobrealimentadas ya que concuerda con lo mencionado por Maeda-Martínez. Por esta razón, las almejas estarían

disminuyendo su ingesta de alimento y por ende, la producción de pseudoheces.

Al término del bioensayo 2, cuyo objetivo fue observar más claramente la depuración, sólo se obtuvieron concentraciones cuantificables en los tejidos blandos pero no en los otros dos tipos de tejidos. Esto indica que, en la almeja Pismo, el AD, aún inyectado, es sometido a una tasa de eliminación mayor que la tasa de acumulación. Como se sabe, la administración parenteral tiene la ventaja de la velocidad sobre otras vías de entrada, ya que introduce los inyectables de forma directa o casi directa a la circulación sistémica. Por esta razón, se esperaba que al optar por esta vía se lograra incrementar la acumulación de AD en tejidos, partiendo de la premisa de que la Velocidad de incorporación sería mucho mayor que la velocidad de eliminación. Asimismo, se esperaba que esta condición permitiera acumular mayor cantidad de AD para así poder observar su disminución en función del tiempo. Sin embargo, los niveles de AD acumulado no se incrementaron en la medida en que se esperaba, y nuevamente, se observó su ausencia en los tejidos. Se puede suponer que al finalizar el periodo de inyecciones de AD, los organismos se encontraban en la etapa en la que la tasa de incorporación es mayor a la tasa de eliminación. De ser así, una prolongación del tratamiento podría haber ocasionado la acumulación, pero al parecer, el tiempo del bioensayo fue insuficiente y el número de dosis de AD tampoco fue suficiente para que se

acumulara de tal forma, que se pudiera cuantificar en los demás tejidos analizados.

En el tercer bioensayo, se encontró que los niveles de AD variaban en concentración dependiendo del tipo de tejido y el tiempo de depuración. Los tejidos blandos (TB) fueron los que contenían mayor concentración al iniciar la depuración, de 20.236 $\mu\text{g/g}$. Durante la depuración, en TB se llegó a disminuir el nivel de AD a concentraciones de 0.48 $\mu\text{g/g}$. Este mismo comportamiento se registró para el tejido muscular TM, el cual, aunque las concentraciones iniciales fueron más bajas, de 5.93 $\mu\text{g/g}$ iniciales se llegó hasta la situación en que el AD no llegó a ser detectado. Comparando ambos, TB y TM, se pone de manifiesto que TB presenta mayor capacidad que TM para acumular AD, aunque no así una mayor rapidez que TM para eliminarlo. Esto concuerda con lo que indican las tasas de depuración encontradas, ya que TM posee una constante de depuración 3 veces mayor que la de TB.

Por el contrario, en el hepatopáncreas, al inicio de la depuración el AD no era detectable con el método de cuantificación, pero al término de las 96 horas de depuración su concentración se había elevado hasta 0.56 $\mu\text{g/g}$, por lo que se puede decir que hubo una transferencia desde los tejidos blandos hacia el hepatopáncreas. Esta conducta es contraria a lo señalado por varios autores que reportan que en otras especies de bivalvos, han observado que las mayores concentraciones de AD se encuentran en el hepatopáncreas, desde el cual se transfieren al resto de los tejidos (FAO, 1995). Por tratarse de una

especie diferente a las reportadas, y porque la vía de entrada del AD fue por inyección en los tejidos blandos, no por alimentación, como los casos mencionados en otros experimentos, es que no se puede hablar de un comportamiento natural contrario a lo informado, sin embargo, se puede decir que sí existe transferencia de AD dentro de la almeja *Tivela stultorum*.

Por otra parte, las disecciones de los grupos control, para la línea base, se hicieron simultáneamente con las disecciones de las almejas intoxicadas con AD. El control no presentó concentraciones de AD detectables, cumpliendo con el objetivo de ser una base para los bioensayos.

La capacidad analítica del método utilizado para la cuantificación de AD ha permitido que diferentes autores hayan realizado modelos para esta toxina de su cinética de absorción y depuración. De la misma forma, los valores de AD obtenidos en el presente trabajo, durante el último bioensayo realizado, permitieron calcular las tasas de decaimiento o depuración; aplicando regresión exponencial, constantes de depuración para el tejido muscular. Así, podemos usarlos en esta primera aproximación para considerar que la depuración de AD es menor en los tejidos blandos, mientras que los TM estarían depurando a una velocidad mayor.

Mafray colaboradores(2010) indican que para mejillones y ostiones, las tasas de depuración para los tejidos viscerales, es mayor que para los tejidos no viscerales, lo que estaría indicando un patrón contrario a lo observado en la

presente tesis. Dicha situación podría deberse a que el AD fue inyectado y no entró por vía digestiva, en donde habría pasado por todos los procesos de biotransformación que conllevan la propia digestión de los alimentos. Dado que en el presente trabajo no se cuantificaron metabolitos del AD, no es posible refutar o apoyar esta idea.

Al considerar la tasa de depuración para el organismo completo, se obtuvo un valor muy similar a la tasa de depuración de los tejidos blandos, debido a que el cálculo de la concentración para el total del organismo se hizo con el aporte proporcional al peso de cada tipo de tejido y los tejidos blandos fueron aproximadamente 2.6 veces más pesados que los tejidos musculares y 15 veces más que el hepatopáncreas.

El coeficiente de correlación de Pearson (r), que se calculó para saber el grado de relación entre el tiempo y la concentración de AD, para los tejidos musculares y blandos, así como para la almeja en su totalidad, presentó una correlación negativa, indicando que entre las variables existe una relación inversa, es decir, al aumentar el tiempo disminuye la concentración de AD. La mayor correlación obtenida fue para TM, que fue más alta que para TB, con una $r = -0.97$.

Respecto al tiempo de vida media de la toxina en los tejidos de la almeja Pismo, se encontró que éste es menor a un día, aproximadamente 18 horas. Este hallazgo concuerda con los de Schultz y colaboradores (2013),

quienes reportan que para algunos tipos bivalvos como mejillones (*Mytilus sp.*) y ostiones (*Crassostrea gigas*), la vida media del AD en tejidos es del orden de horas a unos pocos días, lo que sería el caso de *Tivela stultorum*, con los datos obtenidos en esta tesis.

Por otra parte, el tiempo en el que las concentraciones de AD en la almeja Pismo se encuentra por debajo del límite de cuantificación sería un poco más de 6 días, en comparación con lo reportado por Mafrá y colaboradores (2010) donde mencionan que a partir del cuarto día las concentraciones de AD eran indetectables para algunos individuos de las especies de *C. virginica* y *M. edulis*.

8 CONCLUSIONES

Los niveles de AD encontrados en tejidos de *Tivela stultorum*, indican que la capacidad de incorporación de esta toxina es: Tejidos blandos>Tejido muscular>>>Hepatopáncreas.

El tejido muscular y los tejidos blandos de *T. stultorum* muestran capacidad para disminuir los niveles de AD después de que esta toxina es introducida mediante vía parenteral a través del poro.

Las constantes de depuración calculadas para *T. stultorum* indican que la tasa de depuración de AD por tejido es: Tejido muscular > Tejidos blandos.

En *T. stultorum*, el hepatopáncreas muestra aumento de AD en los primeros 4 días en condiciones de depuración por colocación del organismo en un medio libre de la toxina.

El incremento en el nivel de AD en el hepatopáncreas de *T. stultorum* en condiciones de depuración, y la concomitante disminución en el tejido muscular y los tejidos blandos, sugieren movilización de la toxina desde éstos al hepatopáncreas.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). 2009. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre los criterios de seguridad aplicables a contenido de ácido domoico en la vieira (*Pecten maximus*) para su recolección. 12 p.
- Alexander, J, Benford, D, Boobis, A, Ceccatelli, S, Cravedi, J, Domenico, A Di, Doerge, D, Dogliotti, E, Edler, L, Farmer, P, Fink-gremmels, J, Fürst, P, Guerin, T, Knutsen, HK, Livesey, C, Machala, M, Mutti, A, Schlatter, J, Leeuwen, R Van. 2009. Marine biotoxins in shellfish – Domoic acid. EFSA J.: 1–61.
- Band-Schmidt, CJ, Bustillos-Guzmán, JJ, López-Cortés, DJ, Núñez-Vázquez, E, Hernández-Sandoval, FE. 2011. El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiológica* 21: 381–413.
- Bates, SS, Bird, CJ, de Freitas, ASW, Foxall, R, Gilgan, M, Hanic, LA, Johnson, GR, McCulloch, AW, Odense, P, Pocklington, R, Quilliam, MA, Sim, PG, Smith, JC, Subba Rao, D V, Todd, ECD, Walter, JA, Wright, JLC. 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 46: 1203–1215.
- Beninger, PG, St-Jean, SD. 1997. The role of mucus in particle processing by suspension-feeding marine bivalves: Unifying principles. *Mar. Biol.* 129: 389–397.
- Campbell, D a., Kelly, MS, Busman, M, Wiggins, E, Fernandes, TF. 2003. Impact of preparation method on gonad domoic acid levels in the scallop, *Pecten maximus* (L.). *Harmful Algae* 2: 215–222.
- Clayden, J, Read, B, Hebditch, KR. 2005. Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues. *Tetrahedron* 61: 5713–5724.
- Coe, WR. 1947. Nutrition, growth and sexuality of the Pismo clam (*Tivela stultorum*). *J. Exp. Zool.* 104: 1–24.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO.), Descripción de CONABIO. Almeja Pismo (*Tivela stultorum*) 13 de octubre de 2015. [Online] Disponible en: <http://bios.conabio.gob.mx/especies/4013551> [Último acceso 6 noviembre

2015].

- Costa, PR, Rosa, R, Duarte-Silva, A, Brotas, V, Sampayo, MAM. 2005. Accumulation, transformation and tissue distribution of domoic acid, the amnesic shellfish poisoning toxin, in the common cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquat. Toxicol.* 74: 82–91.
- European Union Reference Laboratory for Marine Biotoxins (EU-RL-MB). 2008. EU-Harmonised Standard Operating Procedure for determination of domoic acid in shellfish and finfish by RP-HPLC using UV detection. 12 p.
- Fitch, John E., 1953. Common marine bivalves of California. [Online] Disponible en: <http://content.cdlib.org/view?docId=kt5f59n7nr&brand=calisphere> [Último acceso 6 noviembre 2015].
- Fonfría-Subirós, E. 2009. Ficotoxinas marinas: métodos de detección en extractos de molusco. books.google.com.
- García-Mendoza, E, Rivas, D, Olivos-Ortiz, A, Almazán-Becerril, A, Castañeda-Vega, C, Peña-Manjarrez, JL. 2009. A toxic *Pseudo-nitzschia* bloom in Todos Santos Bay, northwestern Baja California, Mexico. *Harmful Algae* 8: 493–503.
- Hatfield, CL, Wekell, JC, Gauglitz, EJ, Barnett, HJ. 1994. Salt clean-up procedure for the determination of domoic acid by HPLC. *Nat. Toxins* 2: 206–11.
- Helm, M. M.; Bourne, N. & Lovatelli, A. 2006. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. *FAO Doc. Técnico Pesca* 471: 184.
- Hernández-Orozco, M, Gárate-Lizárraga, I. 2006. Síndrome de envenenamiento paralizante por consumo de moluscos. *Rev. Biomed* 17: 45–60.
- Jeffery, B, Barlow, T, Moizer, K, Paul, S, Boyle, C. 2004. Amnesic shellfish poison. *Food Chem. Toxicol.* 42: 545–557.
- Lawrence, JF, Ménard, C. 1991. Confirmation of domoic acid in shellfish using butyl isothiocyanate and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 550: 595–601.
- Lefebvre, K a, Powell, CL, Busman, M, Doucette, GJ, Moeller, PD, Silver, JB, Miller, PE, Hughes, MP, Singaram, S, Silver, MW, Tjeerdema, RS. 1999. Detection of domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event. *Nat. Toxins* 7: 85–92.

- Lefebvre, KA, Robertson, A. 2010. Domoic acid and human exposure risks: a review. *Toxicon* 56: 218–30.
- Lundholm, N. (Ed) (2015). *Bacillariophyceae*, in *IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae*. Disponible en <http://www.marinespecies.org/HAB>. [Último acceso 11 noviembre 2015].
- Maeda-Martínez, AN. 2002. *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y acuicultura*. Editorial Limusa. 501 p.
- Mafra, LL, Bricelj, VM, Fennel, K. 2010. Domoic acid uptake and elimination kinetics in oysters and mussels in relation to body size and anatomical distribution of toxin. *Aquat. Toxicol.* 100: 17–29.
- Maroulis, M, Monemvasios, I, Vardaka, E, Rigas, P. 2008. Determination of domoic acid in mussels by HPLC with post-column derivatization using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 876: 245–51.
- Moestrup, Ø., Akselmann, R., Fraga, S., Hansen, G., Hoppenrath, M., Iwataki, M., Komárek, J., Larsen, J., Lundholm, N, Zingone, A. (Eds) 2009 onwards. *IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae*. Disponible en <http://www.marinespecies.org/hab> [Último acceso 10 noviembre 2015].
- Ochoa, J. 2003. ENSO phenomenon and toxic red tides in Mexico. *Geofis. Int.* 42: 505–515.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y, Alimentación (FAO). 1995. *Biotoxinas marinas.*, p 97–172.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y, Alimentación (FAO). 2007. *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura.*
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO). 2011. *Guide for the Control of Molluscan Shellfish. National Shellfish Sanitation Program. National Shellfish Sanitation Program (NSSP) 2011 Revision. Interstate Shellfish Sanit. Conf.:* 547.
- Pattison, 2006 en *Status of the Fisheries Report*, 2008
- Parsons, ML, Dortch, Q, Doucette, GJ. 2013. An assessment of *Pseudo-nitzschia* population dynamics and domoic acid production in coastal

- Louisiana. *Harmful Algae* 30: 65–77.
- Pérez-Calderón, R. 2002. Validación de la metodología para la determinación de ácido domoico (biotoxina ASP) en moluscos bivalvos por cromatografía líquida de alto rendimiento (. *Rev. Peru. Med. Exp. y Salud*
- Pérez-Martínez, LK, Villabona-Rodríguez, MM. 2014. Caracterización de las intoxicaciones por medicamentos en niños menores de cinco años en Bogotá en los años 2008 a 2012.
- PubChem, 2015. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=5282253, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5282253> [Último acceso 11 noviembre 2015].
- Quilliam, M. 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. ... , *Monogr. Oceanogr. Methodol.* 11.
- QUILLIAM, MA, XIE, M, HARDSTAFF, WR. 1995. Rapid extraction and cleanup for liquid chromatography determination of domoic acid in unsalted seafood. *J. AOAC Int.* 78: 543–554.
- Ravn, H. 1995. Amnesic shellfish poisoning (ASP).
- Rossini, GP, Hess, P. 2010. Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning. *EXS* 100: 65–122.
- Schultz, IR, Skillman, A, Sloan-Evans, S, Woodruff, D. 2013. Domoic acid toxicokinetics in Dungeness crabs: new insights into mechanisms that regulate bioaccumulation. *Aquat. Toxicol.* 140-141: 77–88.
- Seabury, RW, Stork, CM. 2014. *Encyclopedia of Toxicology. Pharmacokinetic and Toxicokinetic Modeling.* Elsevier. 856-861 p.
- Sierra-Beltrán, A, Palafox-Urbe, M, Grajales-Montiel, J, Cruz-Villacorta, A, Ochoa, JL. 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 35: 447–453.
- Sierra-Beltrán, AP, Cruz, A, Núñez, E, Del Villar, LM, Cerecero, J, Ochoa, JL. 1998. An overview of the marine food poisoning in Mexico. En: *Toxicon.*, p 1493–1502.
- Todd, E. 1993. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning: a review. *J. Food Prot.* 56.

Vale, P, Sampayo, MADM. 2002. Evaluation of extraction methods for analysis of domoic acid in naturally contaminated shellfish from Portugal. *Harmful Algae* 1: 127–135.