



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**“EFECTO DE LAS TOXINAS PARALÍTICAS (PSP)
DEL DINOFLAGELADO *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae)
EN EL SISTEMA DE DEFENSA DE LA ALMEJA MANO DE LEÓN,
Nodipecten subnodosus (Mollusca: Pectinidae).”**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta

Norma Angélica Estrada Muñoz

La Paz, B.C.S., marzo de 2005.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 16 del Mes de Febrero del 2005, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Efecto de las toxinas paralíticas (PSP) del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) en el sistema de defensa de la almeja mano de león, *Nodipecten subnodosus* (Mollusca: Pectinidae)."

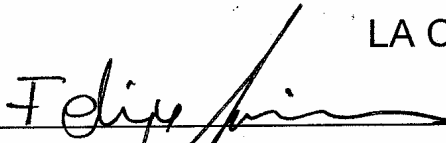
Presentada por el alumno:

Norma Angélica Estrada Muñoz

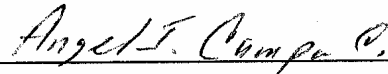
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

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

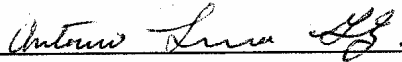
LA COMISION REVISORA



Dr. Felipe Ascencio Valle
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Angel Campa Córdova
CO-TUTOR



Dr. Antonio Luna González
CO-TUTOR



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Conformación de comité

La presente tesis fue dirigida por:

Dr. Felipe Ascencio Valle Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Felipe Ascencio Valle Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Angel Luna Campa Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Antonio Luna González Universidad Autónoma de Baja California Sur

El comité revisor de tesis estuvo integrado por:

Dr. Felipe Ascencio Valle Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Angel Luna Campa Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Antonio Luna González Universidad Autónoma de Baja California Sur

El jurado de examen de grado estuvo integrado por:

Dr. Felipe Ascencio Valle Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Angel Luna Campa Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Antonio Luna González Universidad Autónoma de Baja California Sur

Suplente

Dr. Alfonso Maeda Martínez Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

RESUMEN

Este trabajo documenta los efectos que tienen las toxinas del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*, un conocido productor de toxinas paráliticas de moluscos (PSP), en el sistema de defensa de juveniles de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. Estas toxinas tienen una acción bloqueante reversible y altamente específica de los canales de sodio, evitando la generación del potencial de acción en membranas excitables. Las almejas se alimentaron con diferentes concentraciones del dinoflagelado tóxico en condiciones controladas de laboratorio para determinar las tasas de ingestión y aclaramiento durante 7 horas en dos tallas; se realizaron cortes histológicos para observar el efecto de las toxinas en los distintos tejidos. Se llevaron a cabo experimentos donde se alimentó durante periodos cortos (< 24 h) y periodos largos de hasta 12 d con *G. catenatum*, suplementando la dieta con *Isochysis galbana*. Asimismo, se provocó un estrés severo mediante la inyección del extracto crudo de las toxinas en el músculo aductor. La extracción de las toxinas, así como la toxicidad de *G. catenatum* se determinaron mediante el método de ensayo ratón (AOAC), así como se obtuvo la dosis letal media (DL₅₀) del extracto crudo de estas toxinas en *N. subnodosus*. Se estudió el efecto de las toxinas en términos de producción de moléculas relacionadas al sistema de defensa: enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS: peroxidación de lípidos), enzimas hidrolíticas (lisozima, proteasas, glicosidasas, fosfatasa, lipasas y esterasas) acetilcolinesterasa, óxido nítrico, así como el conteo total de hemocitos. En los experimentos de alimentación se determinaron los efectos en los tejidos (branquias, glándula digestiva, manto y músculo) mientras que en los experimentos de inyección del extracto crudo los efectos se evaluaron en la hemolinfa. Los resultados del presente estudio muestran que los juveniles *N. subnodosus* no exhibieron aparentemente respuestas fisiológicas adversas cuando se alimentaron con el dinoflagelado tóxico *G. catenatum* a diferentes tiempos, sin embargo a concentraciones elevadas de alimento la talla más pequeña presentó la producción de pseudoheces, el cierre parcial de las valvas y la reducción en las tasas de alimentación, recuperándose después de unas horas; se observó melanización en branquias y manto, así como acumulación de hemocitos en tejidos. Al parecer estos dinoflagelados pueden formar parte de los requerimientos nutricionales, y la baja sensibilidad a las toxinas podría deberse a un mecanismo interno en los canales de sodio que inhibe la unión de las toxinas con sus receptores específicos. Sin embargo, debido a un estrés severo provocado por la inyección de las toxinas a dosis subletales, se observó la retracción del manto y la falta de capacidad del cierre de las valvas en un 60% de los organismos estudiados, los cuales en su mayoría se recuperaron a las 120 h, lo cual se reflejó en algunas de las enzimas estudiadas. La mayoría de estas enzimas se presentaron tanto en los tejidos como en la hemolinfa. Las enzimas antioxidantes no mostraron efectos evidentes. Se detectaron enzimas hidrolíticas que pueden en un momento dado servir de indicadores del sistema de defensa como lisozima, fosfatasa ácida, β glucuronidasa, tripsina y α quimiotripsina, así como otras moléculas relacionadas al sistema neuroinmune como la acetilcolinesterasa y la óxido nítrico las cuales también mostraron diferencias significativas. Asimismo, el conteo total de hemocitos también fue un buen indicador. Debido al estrés severo al parecer *N. subnodosus* experimentó periodos de inmunosupresión durante las primeras 24 horas, con una posterior recuperación, lo cual se reflejó claramente tanto en el conteo de hemocitos como en la mayoría de las enzimas lisosomales medidas en la hemolinfa y esto puede ser debido a la baja sensibilidad de las toxinas además del efecto reversible de estas.

Palabras clave. *Nodipecten subnodosus*, *Gymnodinium catenatum*, PSP, enzimas, defensa.

ABSTRACT

This work documents the effects caused by toxins from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*, a known producer of Paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins, in the defense system of Pacific lion's paw scallop juveniles, *Nodipecten subnodosus*. The mode of action of these toxins involves a reversible and highly specific block of ion transport by the sodium channel and thus of the action potential in excitable membranes. The scallops were fed with different concentrations of the toxic dinoflagellate under laboratory controlled conditions to determine the ingestion and clearance rates during 7 h in two sizes; histological records were made to observe the effect of the toxins in the different tissues. Short (<24h) and long (until 12 d) term feeding experiments with *G. catenatum* were carried out, supplementing the diet with a mixture of *Isochrysis galbana*. A severe stress was caused by means of the injection of the crude extract of the toxins in the adductor muscle. The extraction of the toxins as well as *G. catenatum* toxicity were carried out by mouse bioassay method (AOAC), and also lethal media dose (DL₅₀) of these extracts was determined in *N. subnodosus*. The effect of the toxins in the defense system was determined: antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS: lipid peroxidation), hydrolytic enzymes (lysozyme, proteases, glycosidases, phosphatases, lipases and esterases), acetylcholinesterase, nitric oxide, as well as the total hemocyte count. In feeding experiments, the tissues were analyzed (gills, digestive gland, mantle and muscle) while in the experiments of injection of the crude extract the effects were determined in the hemolymph. The results of the present study show that the juveniles of *N. subnodosus* exhibited no apparent detrimental physiological responses during the feeding experiments with *G. catenatum* at different times, nevertheless at high concentrations of food the smallest size showed pseudofeces production, partial shell closure and reduction of the feeding rates, recovering their physiological state after some hours; melanization in mantle and gills and hemocyte aggregation were observed. Apparently these dinoflagellates can form part of the nutritional requirements of the scallop and the low sensitivity to the toxins would be due to an internal mechanism in the sodium channels that inhibit the union of the toxins with its specific receptors. However, the effect of the severe stress caused by the injection at sublethal doses, lead to mantle retraction and incapacity of shell closure in aproximate 60% of the studied organisms, the majority of wich recovered at 120 h, which was reflected in some of the enzymes studied. The majority of these enzymes were present in both the tissues and hemolymph. The antioxidant enzymes did not show evident effects. Hydrolitic enzymes were detected that are able to serve of indicators of the defense system as lysozyme, acid phosphatase, β glucuronidase, trypsin and α chymotrypsin, as well as other molecules related to the neuroimmune system such as acetylcholinesterase and nitric oxide which also showed significant differences. Likewise, the total hemocyte count also was a good indicator. Due to the severe stress, it seems that *N. subnodosus* experienced periods of immunosupresion during the first 24 h with a subsequent recovery, which clearly reflected in the count of hemocytes as in the majority of the lysosomal enzymes measured in the haemolymph and this can be attributed to the reduced sensitivity to toxins in addition to their reversible effect.

Key words. *Nodipecten subnodosus*, *Gymnodinium catenatum*, PSP, enzymes, defense.

Esta tesis está dedicada a toda mi familia la cual siempre me ha apoyado...

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por proporcionarme la beca No. 172583 para la realización de la maestría.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. por permitirme realizar los estudios de posgrado de maestría.

Gracias al Dr. Felipe Ascencio Valle por brindarme todas las facilidades para llevar a cabo este trabajo, por su ayuda y su gran apoyo.

A la Ing. Bioq. Maria de Jesús Romero por soportarme en las buenas y en las malas, por su ayuda y sobre todo por sus risas.

A los Drs. Angel Campa Córdova y Antonio Luna González por estar al pendiente de este trabajo y por sus consejos.

A los Drs. Dariel Tovar y Alfonso Maeda por su ayuda y aportes a esta tesis.

A los compañeros de laboratorio de Patogénesis Microbiana y anexos, que en algún momento me ofrecieron su apoyo.

A mis compañeros de maestría y a los amigos que están cerca de mi, así como a los que están lejos por su amistad incondicional...

Al Laboratorio de Cultivo de Microalgas (Cinthya Aldana, Adriana Greene y Julian Garzón), por proporcionarme el alimento de las almejas.

A la Dra. Lourdes Morquecho por proporcionarme la cepa de *Gymnodinium catenatum*, así como a la M. en C. Minerva Cerro quien me ayudó con el cultivo de esta especie.

A Ernesto León de Rancho Bueno por haber suministrado durante toda la tesis las almejas utilizadas en este estudio.

A los laboratorios de Histología (Carmen Rodríguez), Bioquímica Fisiológica (Daniel Ceseña, Roberto Hernández), Larvicultura de Organismos Marinos (Miguel Robles), Laboratorio de Ecofisiología (Armando Monje), Laboratorio de Genética Acuícola (José Luis Ramírez), Laboratorio de Genética Molecular (Delia Rojas), al Bioterio (Ernesto Sepúlveda, Teresa Medina, Maria Medina), Laboratorio de Biotecnología de Microalgas (Berta Olivia Arredondo), Laboratorio de Ecología Química y Toxicológica (Tania Zenteno), a los talleres de servicio y apoyo técnico, Laboratorio de Computo de Posgrado (Horacio Sandoval, Manuel Melero), así como a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo en diversas etapas del desarrollo de la tesis.

A La Paz por ser un maravilloso lugar para llevar a cabo cualquier sueño que uno tenga.

Y al mar por existir...

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
1. INTRODUCCIÓN	
Importancia de moluscos bivalvos. Familia Pectinidae	1
<i>Nodipecten subnodosus</i> (Sowerby, 1875)	1
Alimentación en bivalvos	2
<i>Mecanismos de alimentación en pectínidos</i>	3
<i>Pectínidos y alimento tóxico</i>	4
<i>Gymnodinium catenatum</i> (Graham, 1943)	5
<i>Toxinas Paralíticas de Moluscos (PSP)</i>	6
Sistema de defensa en moluscos bivalvos	9
<i>Hemocitos de moluscos bivalvos</i>	10
<i>Familia Pectinidae: hemocitos</i>	10
<i>Fagocitosis</i>	11
Intermediarios reactivos del oxígeno (EROs)	11
Intermediarios reactivos del nitrógeno (ERNs)	13
<i>Oxido Nítrico (ON)</i>	13
Enzimas antioxidantes	14
<i>Superóxido dismutasa (SOD; E.C. 1.15.1.1)</i>	15
<i>Glutación peroxidasa (Se-GPX; EC 1.11.1.9)</i>	16
<i>Catalasa (CAT; E.C. 1.11.1.7)</i>	16
Peroxidación de lípidos	17
Enzimas hidrolíticas	17
<i>Lisozima (E.C. 3.2.1.17)</i>	18
Acetilcolinesterasa (E.C. 3.1.1.7)	19
2. ANTECEDENTES	
Trabajos realizados con pectinidos: <i>Nodipecten subnodosus</i>	20
Moluscos bivalvos y alimentación	21
Organismos tóxicos como alimento de bivalvos	22
<i>Gymnodinium y bivalvos</i>	24
<i>Toxinas paralíticas (PSP) y bivalvos</i>	24
Sistema de defensa bivalvos	26
<i>Hemocitos</i>	27
<i>Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno</i>	28
<i>Oxido nítrico</i>	29
<i>Enzimas antioxidantes</i>	30
<i>Peroxidación de lípidos</i>	31
<i>Enzimas hidrolíticas y lisozima</i>	32
<i>Acetilcolinesterasa</i>	33
3. JUSTIFICACION	35
4. OBJETIVOS	
Objetivo general	36
Objetivos particulares	36

5. METODOLOGÍA	Pág.
Diseño experimental	
Cultivo de microalgas y obtención de almejas	37
Experimentos de alimentación	37
Experimentos a corto plazo	
<i>Tasas de ingestión y aclaramiento</i>	38
<i>Efecto de las toxinas</i>	39
Experimentos a largo plazo	40
Obtención de la curva de crecimiento de <i>G. catenatum</i>	41
<i>Extracción de la toxina de <i>G. catenatum</i></i>	41
<i>Prueba de toxicidad. Ensayo ratón</i>	41
Experimentos de inyección del extracto crudo	42
<i>Dosis letal media (DL₅₀) en <i>N. subnodosus</i></i>	42
<i>Efecto de las toxinas</i>	43
<i>Obtención de extractos de tejidos y procesamiento de la hemolinfa</i>	43
Análisis bioquímicos	
Cuantificación de proteína	44
Cuantificación carbohidratos	44
Cuantificación lípidos	45
Enzimas antioxidantes	
<i>Superóxido Dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1)</i>	45
<i>Glutation peróxidasa GPX (Se-GPx; EC 1.11.1.9)</i>	45
<i>Catalasa (CAT, E.C. 1.11.1.7)</i>	46
Enzimas hidrolíticas	
<i>Actividad lisozima</i>	46
<i>Sistema API ZYM</i>	46
Peroxidación de lípidos	47
Oxido Nítrico	47
Acetilcolinesterasa (AChE, E.C. 3.1.1.7)	48
Cortes histológicos	48
Estadísticos	48
Metodología resumida	49
6. RESULTADOS	
Características generales de <i>Nodipecten subnodosus</i>	
<i>Altura de las conchas y peso húmedo</i>	51
Características generales de <i>Gymnodinium catenatum</i>	
<i>Curva de crecimiento y toxicidad</i>	52
Tasas de ingestión y aclaramiento de <i>N. subnodosus</i>	54
Sistema de defensa en <i>Nodipecten subnodosus</i>	
Experimentos cortos de alimentación (< 48 h)	
-5 horas de exposición al dinoflagelado tóxico. Mediciones en glándula, branquia, manto y músculo	58
-48 horas de exposición al dinoflagelado tóxico. Medición en glándula; alimentación continua y discontinua	62
Experimento largo de alimentación (24 días)	
-24 días de exposición al dinoflagelado tóxico: 12 días de toxificación y 12 días depuración. Medición en glándula	62
Inyección del extracto crudo del dinoflagelado tóxico en <i>N. subnodosus</i>.	
- <i>Dosis Letal Media (DL₅₀) de <i>N. subnodosus</i></i>	65
- <i>Experimento de exposición a la toxina inyectada. Duración 5 horas. Medición en hemolinfa</i>	66
- <i>Experimento de exposición a la toxina inyectada durante 5 días. Medición en hemolinfa</i>	68
Cortes histológicos	74

7. DISCUSIÓN	Pág.
Respuesta de alimentación con el dinoflagelado tóxico	
<i>Tasas de ingestión y aclaramiento</i>	75
<i>Dinoflagelados como alimento de bivalvos</i>	78
<i>Respuestas fisiológicas a la exposición de las toxinas PSP</i>	82
Sistema de defensa en <i>Nodipecten subnodosus</i>	85
<i>Efecto de la alimentación en el sistema de defensa</i>	85
<i>Componentes bioquímicos (proteínas, lípidos y carbohidratos)</i>	86
<i>Células inmunocompetentes. Hemocitos</i>	87
<i>EROs, enzimas antioxidantes y peroxidación de lípidos</i>	90
<i>Enzimas hidrolíticas. Lisozima y serin proteasas</i>	92
<i>Acetilcolinesterasa (AChE)</i>	99
<i>Oxido Nítrico (ON)</i>	101
8. CONCLUSIONES	104
9. BIBLIOGRAFIA	108
10. ANEXOS	126

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Fotografías de la almeja en estudio <i>Nodipecten subnodosus</i> (mano de león).....	2
Fig. 2. Representación esquemática del movimiento de las partículas alimenticias a lo largo del manto de <i>Pecten maximus</i>	4
Fig. 3. Fotografías de <i>Gymnodinium catenatum</i> . Organismo tóxico productor de toxinas paralíticas de moluscos (PSP).....	6
Fig. 4. Estructuras representativas de las toxinas PSP producidas tanto por dinoflagelados como cianobacterias.....	8
Fig. 5. Diagrama de flujo que muestra de manera general la metodología realizada con los tejidos.....	49
Fig. 6. Diagrama de flujo que muestra de manera general la metodología realizada con la hemolinfa.....	50
Fig. 7. Descripciones alométricas de altura de la concha en relación con el peso húmedo de tejido, de las clases de tallas de <i>Nodipecten subnodosus</i> empleadas en el presente trabajo.....	51
Fig. 8. Porcentaje de contribución de tejidos individuales al peso húmedo total en <i>Nodipecten subnodosus</i>	52
Fig. 9. Se muestra la talla del dinoflagelado <i>Gymnodinium catenatum</i>	53
Fig. 10. Curva de crecimiento de <i>Gymnodinium catenatum</i>	53
Fig. 11. Ingestión de células durante 7 horas en <i>Nodipecten subnodosus</i> de dos tallas: a) 2.77 ± 0.21 y b) 5.17 ± 0.53 cm.....	56
Fig. 12. Relación de las tasas de ingestión y aclaramiento con las diferentes concentraciones de <i>Gymnodinium catenatum</i> , a distintos tiempos.....	57
Fig. 13. Análisis de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como, la actividad de diversas enzimas en <i>Nodipecten subnodosus</i> alimentadas con el dinoflagelado tóxico <i>Gymnodinium catenatum</i> . Talla 5.9 ± 0.39 cm de altura de concha. Duración del experimento 5 horas.....	59
Fig. 14. Actividad de enzimas hidrolíticas en los tejidos de la almeja <i>Nodipecten subnodosus</i> alimentada con el dinoflagelado tóxico <i>Gymnodinium catenatum</i> . Talla de 5.9 ± 0.39 cm de altura de concha. Duración del experimento 5 horas.....	60

Fig. 15. Análisis en glándula digestiva de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como, la actividad de diversas enzimas en organismos de la especie <i>Nodipecten subnodosus</i> expuestos mediante alimentación (continua y discontinua) al dinoflagelado tóxico <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 48 h. Talla 5.9 ± 0.39 cm de altura de concha	63
Fig. 16. Análisis en glándula digestiva de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como, la actividad de diversas enzimas en organismos de la especie <i>Nodipecten subnodosus</i> alimentados con el dinoflagelado tóxico <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 24 d. Talla 5.9 ± 0.39 cm de altura de concha	64
Fig. 17. Dosis Letal Media (DL ₅₀) en almejas de la especie <i>Nodipecten subnodosus</i> inyectadas con el extracto crudo de las toxinas del dinoflagelado tóxico <i>Gymnodinium catenatum</i> . Talla de 6.1 cm	65
Fig. 18. Conteo hemocitos de la hemolinfa de <i>Nodipecten subnodosus</i> . Efecto del extracto crudo de las toxinas de <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 5 horas de exposición. Talla de 6.1 ± 0.61 cm	66
Fig. 19. Análisis en hemolinfa de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como, la actividad de diversas enzimas en organismos de la especie <i>Nodipecten subnodosus</i> expuestos mediante una inyección de las toxinas del dinoflagelado <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 5 h. Talla 6.1 ± 0.61 cm de altura de concha	67
Fig. 20. Actividad de enzimas hidrolíticas en la hemolinfa de la almeja <i>Nodipecten subnodosus</i> inyectada con toxinas del dinoflagelado <i>Gymnodinium catenatum</i> (Talla de 6.1 ± 0.61 cm de altura de concha). Duración del experimento 5 horas	69
Fig. 21. Conteo hemocitos de la hemolinfa de <i>Nodipecten subnodosus</i> . Efecto del extracto crudo de las toxinas de <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 5 d de exposición	70
Fig. 22. Análisis de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como, la actividad de diversas enzimas en la hemolinfa de <i>Nodipecten subnodosus</i> expuestos mediante una inyección de las toxinas del dinoflagelado <i>Gymnodinium catenatum</i> durante 3 d. Talla 6.1 ± 0.61 cm de altura de concha	71
Fig. 23. Actividad de enzimas hidrolíticas en la hemolinfa de la almeja <i>Nodipecten subnodosus</i> inyectada con toxinas del dinoflagelado <i>Gymnodinium catenatum</i> (Talla de 6.1 ± 0.61 cm de altura de concha, organismos con gónadas maduras). Duración del experimento 3 d	72
Fig. 24. Cortes histológicos de <i>Nodipecten subnodosus</i> de la talla de 2.7 cm de altura de concha expuestas durante 7 horas al dinoflagelado tóxico <i>Gymnodinium catenatum</i>	74

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Microbios que producen toxinas PSP	7
Tabla II. Tasas de ingestión en juveniles de <i>Nodipecten subnodosus</i> expuestos a diferentes concentraciones de <i>Gymnodinium catenatum</i> , durante 7 h, en dos tallas: a) 2.77 ± 0.21 y b) 5.17 ± 0.53 cm de altura de concha	55
Tabla II. Tasas de aclaramiento en juveniles de <i>Nodipecten subnodosus</i> expuestos a diferentes concentraciones de <i>Gymnodinium catenatum</i> , durante 7 horas, en dos tallas: a) 2.77 ± 0.21 y b) 5.17 ± 0.53 cm de altura de concha	55
Tabla IV (Anexos). Tabla de Sommer que muestra la relación tiempo de muerte: unidad ratón para las toxinas paralíticas de moluscos (PSP)....	
Tabla V (Anexos). Tabla de corrección para los pesos de los ratones para el ensayo ratón de PSP	

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Acido Desoxiribonucleico
ANOVA	Análisis de Varianza
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATP	Adenosin Trifosfato
BChE	Butirilcolinesterasa
CAT	Catalasa
CE	Corriente exhalante
DL50	Dosis Letal Media
D	Dosis
DNTB	5-5-diotiobis-(2-ácido nitrobenzoico)
DSP	Diarretic Shellfish Poisoning
<i>eq sax</i>	Equivalentes de saxitoxina
ERNs	Especies Reactivas de Nitrógeno
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
FC	Factor Corrección
FD	Factor de Dilución
FO	Fenoloxidasa
GPX	Glutación Peroxidasa
GSH	Glutación reductasa
GST	Glutación S-transferasa
HPLC	High Precision Liquid Cromatography
KDa	Kilo Daltons
LF	Flagelo longitudinal
LIS	Lisozima
μ	Tasa de Crecimiento Específica
MDA	Malondialdehído
NAG	N-acetil glucosamina
NAM	N-acetil ácido murámico
ON	Oxido nítrico
ONS	Oxido nítrico sintasa
ONS _n	Oxido nítrico sintasa neuronal
ONS _e	Oxido nítrico sintasa endotelial
ONS _i	Oxido nítrico sintasa inducible
proFO	Profenoloxidasa
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
PUFA	Acidos Grasos Polinsaturados
PUR	Promedio de las Unidades Ratón
R	Radical libre
Se-GPX	Glutación Peroxidasa dependiente de Selenio
SOD	Superóxido Dismutasa
STX	Saxitoxina
TA	Tasa de aclaramiento
TBARS	Sustancias Reactivas al Acido Tiobarbitúrico
TF	Flagelo transversal
Tg	Tiempo de Generación
TI	Tasa de ingestión
TNB	5-tio-2-ácido nitrobenzoico
UR	Unidades ratón

1.INTRODUCCIÓN

Importancia de moluscos bivalvos: Familia Pectinidae

Entre los invertebrados marinos, los moluscos bivalvos constituyen el grupo de mayor importancia económica, ya que se les considera de alto valor comercial y nutricional. Además, los cultivos y pesquerías de ostiones, pectínidos y mejillones aportan importantes beneficios a la economía de diferentes países, debido a la gran demanda de nuevas fuentes de alimento requerido por una población mundial en continuo crecimiento (Sindermann, 1990).

Uno de los grupos de moluscos bivalvos de gran importancia es el de la familia Pectinidae, el cual incluye alrededor de 400 especies vivientes distribuidas en todo el mundo, donde 67 se encuentran en la región de Iberoamérica con 28 representantes en las costas del Pacífico mexicano. Algunas especies han alcanzado gran importancia comercial, lo que ha llevado a la realización de estudios para la obtención de una tecnología de cultivo en el ámbito comercial. En los últimos años, la producción mundial de pectínidos se ha incrementado de manera espectacular y el interés por este grupo ha suscitado el desarrollo de numerosos estudios (Lodeiros *et al.*, 2001).

***Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1875)**

Nodipecten subnodosus o mejor conocida como mano de león, es un pectínido que se encuentra en fase experimental para ser cultivado comercialmente. *N. subnodosus* es un hermafrodita funcional y se distribuye desde la Laguna Ojo de Liebre en la península de Baja California, México, hasta las costas del Perú. Habita en lagunas, bahías y canales profundos de más de 6 m, donde ocurren fuertes corrientes de mareas. Esta especie ha sido sujeta a explotación desde 1991 y desde entonces se ha formado y mantenido una pesquería en la península de Baja California que en 1999 superó las 150 ton métricas de músculos (Peña, 2001; Maeda-Martínez *et al.*, 2001).

El sector productor tiene mucho interés por cultivar esta especie debido a su alto valor comercial derivado del buen sabor y el gran tamaño del músculo aductor. Los adultos llegan a medir 22 cm de altura y alcanzan un peso húmedo total y de músculo de 1 900 y 250 g respectivamente (Fig. 1) (Maeda-Martínez *et al.*, 2001).

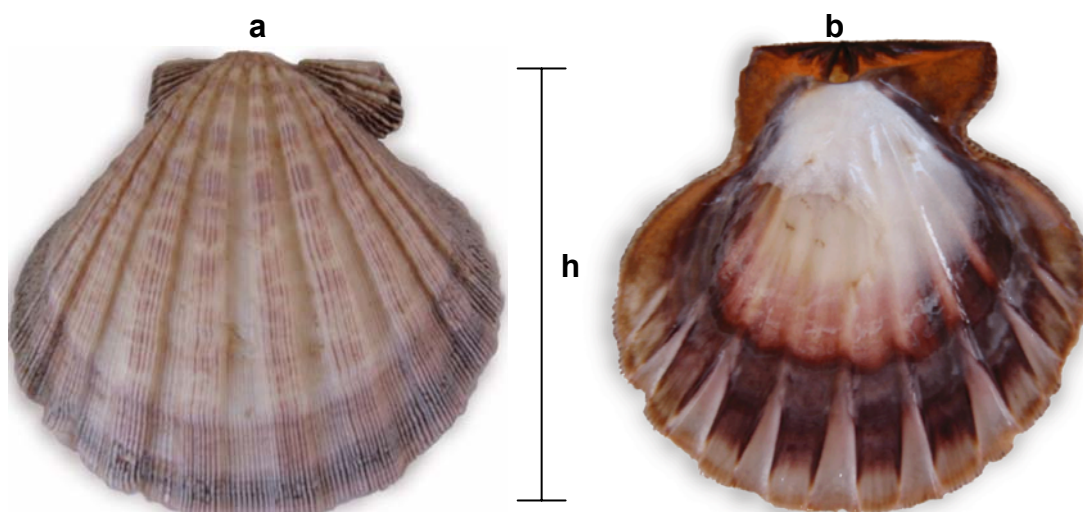


Figura. 1. Fotografías de la concha de *Nodipecten subnodosus*. Pueden alcanzar una talla de 22 cm de altura. a) vista exterior; b) vista interior. h: altura concha.

Alimentación en bivalvos

Los pectínidos son organismos epibentónicos filtradores que se encuentran habitando profundidades entre 10 y 100 m. Se alimentan de la oferta de alimento que está en suspensión a unos pocos centímetros sobre el fondo, por lo tanto su relación con el seston es muy intensa. Estos organismos se alimentan removiendo el material particulado suspendido en el agua, el que además de fitoplancton (principal componente del seston), incluye partículas inertes que componen el detritus.

Para entender los procesos de alimentación en moluscos bivalvos es importante tomar en cuenta las tasas de ingestión y aclaramiento. La remoción de partículas suspendidas en el agua por parte de los bivalvos filtradores recibe el nombre de tasa de aclaramiento y se entiende como el volumen de agua liberada de sus partículas por unidad de tiempo (L/h). Asimismo, las tasas de ingestión se definen como el número de células retenidas de cierto volumen de agua por unidad de tiempo. Estos parámetros nos permiten definir el estado fisiológico del organismo (Navarro, 2001; López, 2003).

La gran mayoría de los bivalvos son capaces de retener partículas por sobre los 3-4 μm con una eficiencia del 100%, pero se han descrito diferentes efectos dependiendo de la especie. Entre los factores que juegan un papel importante en la retención de partículas se encuentran la orientación y velocidad de la corriente de agua, así como, la concentración de alimento. Se ha documentado que un exceso en la velocidad del flujo de agua trae como consecuencia un menor crecimiento en los organismos debido a la inhibición en la filtración y por tanto en la alimentación (Parés, 1996). El factor de la concentración de alimento no está totalmente entendido, sin embargo, se ha descrito que algunas especies de bivalvos reducen su capacidad de retención a medida que aumenta la concentración de alimento, así como, a concentraciones bajas de alimento los organismos pueden filtrar a una tasa muy baja solamente para cumplir con la demanda respiratoria pero no alimenticia (Parés, 1996; Navarro, 2001).

Mecanismos de alimentación en pectínidos

Para cualquier organismo que sea filtroalimentador el proceso de alimentación puede dividirse en cuatro pasos: transporte del agua a través de las estructuras filtradoras, captura y separación de las partículas del medio, transporte de las partículas capturadas desde los órganos filtradores a la boca y por último la ingestión de estas partículas (La Barberá, 1981).

Los pectínidos son filtroalimentadores ciliados que no presentan regiones especializadas del manto que formen sifones, como se presenta en la mayoría de los bivalvos, con lo que las corrientes inhalantes y exhalantes siguen una trayectoria definida debido a la dirección del movimiento de los cilios de las branquias y del manto. El agua entra en la cavidad del manto a lo largo del límite ventral y anterior y sale a través de la abertura posterior. Las partículas son atrapadas por los cilios y mucus de la región de la superficie branquial, y con la misma corriente de agua son transportadas hacia la boca, donde son ingeridas y llevadas al estomago y a la glándula digestiva, que son los lugares donde ocurren los procesos de ingestión y absorción, produciendo heces intestinales o heces de bajo contenido calórico. Cuando la concentración de alimento es elevada los bivalvos regulan la ingestión de partículas aumentando la cantidad de material capturado pero no ingerido en forma de lo que se conocen como pseudoheces (Parés, 1996; Navarro, 2001).

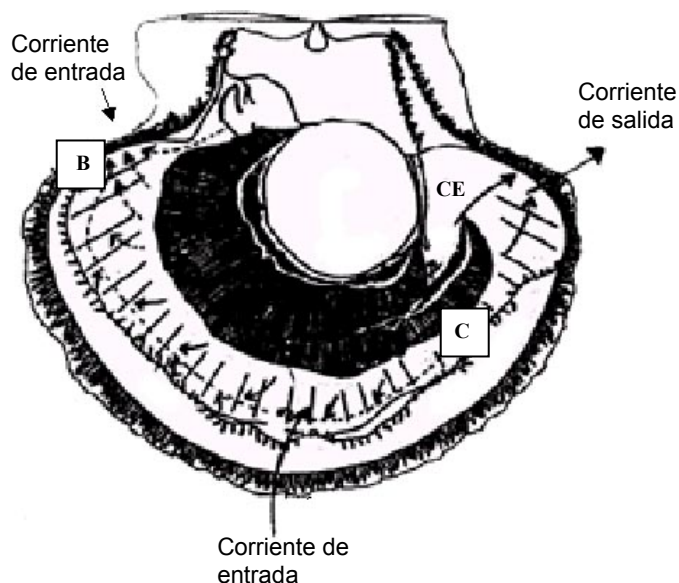


Figura. 2. Representación esquemática del movimiento de las partículas a lo largo del manto de *Pecten maximus*. Las flechas pequeñas indican el movimiento de los cilios del manto. La flecha que va de C a B muestra el patrón principal del movimiento de partículas en el manto. CE corriente exhalante (Tomado de Parés, 1996).

Pectínidos y alimento tóxico

Los pectínidos, al igual que el resto de los bivalvos, presentan una total dependencia para su alimentación de la materia orgánica en suspensión en el agua. Dado que el principal componente de ésta es el fitoplancton, las interrelaciones entre los pectínidos y éste último son muy intensas. En la mayor parte de los casos, estas interacciones son positivas para los bivalvos, ya que el fitoplancton sirve de alimento, sin embargo, en otras ocasiones no lo son, porque ciertos organismos del fitoplancton son productores de toxinas donde el contacto o la ingestión de estas pueden producir diversos efectos nocivos tanto para el humano como para las especies de importancia comercial. Así, cuando alguna de estas especies tóxicas se desarrollan hasta llegar a concentraciones elevadas, sus efectos se hacen sentir, resintiéndose las explotaciones pesqueras o de acuicultura (Blanco-Pérez, 2001).

Debido a que los pectínidos son organismos filtradores que extraen su alimento del agua que bombean a través de su sistema digestivo, pueden concentrar toxinas del ambiente marino en sus vísceras, y en algunos casos los moluscos ingieren, acumulan y transmiten pasivamente estos organismos y sustancias tóxicas de peligro para los humanos, con lo que representan efectos negativos tanto a nivel comercial como de salud pública.

Además, pueden causar la mortandad masiva de los organismos cultivados, la falta de reclutamiento en poblaciones naturales, o se pueden suponer únicamente ligeros trastornos del crecimiento de los organismos cultivados. Así, en general, el estudio del fitoplancton tóxico ha cobrado gran interés debido al impacto que llegan a ocasionar en la salud y a los ecosistemas costeros, así como en las actividades económicas como la pesca, la acuicultura y el turismo. Sin embargo, los efectos negativos del fitoplancton nocivo como alimento de moluscos bivalvos, son poco conocidos (Sindermann, 1990).

Los efectos de las especies que producen toxinas que afectan directamente a los organismos explotados dependen del tipo de toxina, de su concentración en las células y de la sensibilidad de los organismos afectados. Los efectos causados por acumulación de toxinas dañinas para el hombre dependen además, de la capacidad de acumulación de los bivalvos, la cual varía tanto en el tipo de toxinas como con las especies. Asimismo, los organismos afectados directamente por organismos tóxicos la mayoría de las veces no sufren ningún tipo de alteración en sus características, de manera tal, que a simple vista, no es posible detectar su nivel de toxicidad (Blanco-Pérez, 2001).

Existen varias posibilidades por las que la presencia de organismos tóxicos afectan a los bivalvos incluyendo: a) la modificación del medio, b) la interacción física directa, c) la interacción química por medio de la producción de sustancias que alteran las funciones de los organismos filtradores, y d) la interacción biológica (fundamentalmente la depredación) (Blanco-Pérez, 2001).

***Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943)**

Entre los organismos que causan efectos nocivos están los dinoflagelados del género *Gymnodinium* (Pyrrhophyta: Dinophyceae), las cuales son responsables de la producción de un número de toxinas que han sido asociadas con eventos tóxicos en diversas partes del mundo, y además son de los principales productores de las conocidas mareas rojas (Pan *et al.*, 1999). Una de las especies dentro de este género es *G. catenatum* un dinoflagelado planctónico descrito por primera vez en el Golfo de California por Graham en 1943 (Fig. 3).

Estos organismos se observan típicamente en formaciones de varias células las cuales llegan a formar cadenas de más de 64 organismos, aunque también se encuentran comúnmente como organismos individuales. Las tallas de *G. catenatum* varían entre 30 y 60 μm de longitud y entre 25 y 40 μm de ancho (Graham 1943; Blackburn *et al.*, 1989)

Se distribuye en zonas costeras de todo el mundo, tanto cálidas como templadas. La especie se ha reportado en costas de México (Morey-Gaines, 1982; Mee *et al.*, 1986), Venezuela (La Barbera-Sánchez & Gamboa-Maruez, 2001), en las costas de Argentina (Balech, 1964), Costa Rica (Viquez & Hargraves, 1995), Japón (Ikeda *et al.*, 1989), Australia (Hallegraeff *et al.*, 1989), Filipinas (Fukuyo *et al.*, 1993), Egipto (Labib, 1998) y Europa (Franca & Almeida, 1989; Giacobbe *et al.*, 1995), entre otros.



Figura. 3 Fotografías de *Gymnodinium catenatum*. Organismo tóxico productor de toxinas paralíticas de moluscos (PSP). Puede estar como organismos individuales o formar cadenas de más de 60 organismos.

Toxinas Paralíticas de Moluscos (PSP)

Las toxinas paralíticas de moluscos (PSP: Paralytic Shellfish Poisoning) son producidas por varios géneros de fitoplancton tóxico como *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium*, así como otros organismos tanto eucariotas como procariotas (Tabla I). *Gymnodinium catenatum* es un conocido productor de toxinas paralíticas de moluscos (Morey-Gaines, 1982). Estas toxinas ocurren en todo el mundo y son consideradas un serio problema para el desarrollo de la industria comercial, representan un riesgo para la salud pública, así como, son una amenaza para el ambiente marino en general (La Barbera-Sánchez & Gamboa-Maruez, 2001).

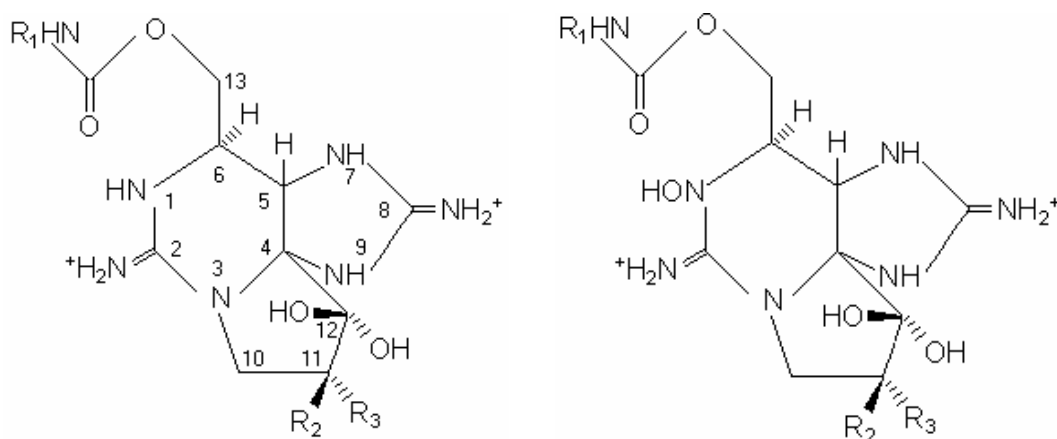
Tabla I. Microorganismos que producen toxinas PSP

Organismos	Phyla	
<i>Alexandrium spp.</i>	Pyrrhophyta	Eucariota, dinoflagelados
<i>Pyrodinium bahamense var. Compresa</i>	Pyrrhophyta	Eucariota, dinoflagelados
<i>Gymnodinium catenatum</i>	Pyrrhophyta	Eucariota, dinoflagelados
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Cyanophyta	Procariota, cianobacteria
<i>Anabaena circularis</i>	Cyanophyta	Procariota, cianobacteria
<i>Lyngbya wollei</i>	Cyanophyta	Procariota, cianobacteria
<i>Oscillatoria morigeotii</i>	Cyanophyta	Procariota, cianobacteria
<i>Moraxela spp.</i>	Eubacteria	Eucariota, gram negativa

Las PSP están generalmente asociadas con el consumo de moluscos en países como Estados Unidos, Japón, Asia, Europa del Oeste, Chile, Nueva Zelanda y Canadá del Este, entre otros (Cladouhos, 1997; FDA, 2001; Bauder *et al.*, 2001). El efecto perjudicial en la salud se debe a la acción de toxinas presentes en los dinoflagelados, los cuales son ingeridos por moluscos bivalvos por filtración de agua, y transferidos a la cadena trófica, siendo consumidos por los humanos (Maeda-Martínez *et al.*, 2001b). Tienen una acción bloqueante reversible y altamente específica de los canales de sodio, es decir bloquean la generación del potencial de acción en membranas excitables (fibras musculares y nerviosas), lo cual produce diversos efectos en el hombre y en los vertebrados en general (Bricelj & Shumway, 1998; Blanco-Pérez, 2001). En el humano actúa principalmente sobre el sistema nervioso periférico, produciendo diversos síntomas que dependen de la gravedad de la intoxicación. En casos graves se produce parálisis muscular y gran dificultad para respirar, llegando a la muerte por parálisis respiratoria. De las toxinas de origen fitoplanctónico, este grupo es el que más muertes ha producido (Shumway, 1989; Blanco-Pérez, 2001).

Las toxinas PSP son acumuladas por bivalvos durante afloramientos tóxicos del plancton. Las toxinas se distribuyen en diferentes tejidos del cuerpo y son transferidas a otros niveles tróficos. Después de la desaparición de las células tóxicas en el medio, los bivalvos permanecen tóxicos por un periodo variable de tiempo, dependiendo en la cinética de depuración.

Más de 20 derivados estructuralmente relacionados a las PSP han sido identificados en dinoflagelados tóxicos y bivalvos filtro-alimentadores que consumen éstos. Estas toxinas varían ampliamente en su potencia o actividad biológica. Están constituidas por varias toxinas entre las que destacan la Saxitoxina, Neosaxitoxinas y las Gonyaulotoxinas (Fig. 4). La saxitoxina es la mejor caracterizada, y entre sus características se encuentran que es termoestable, estable en soluciones ácidas y soluble en agua. Ciertos organismos, como *Gymnodinium catenatum*, son responsables de la producción de un número de toxinas, incluyendo la saxitoxina y sus derivados.



Saxitoxina. $R_1, R_2, R_3=H$

Gonyautoxina-II: $R_1, R_2=H, R_3=OSO_3$

Gonyautoxina-III: $R_1, R_3=H, R_2=OSO_3$

Gonyautoxina-V (B1):1 toxina: $R_1=SO_3, R_2, R_3=H$

epi-Gonyautoxina-VIII (C1): $R_1=SO_3, R_2=H, R_3=OSO_3$

Gonyautoxina-VIII (C2): $R_1=SO_3, R_2=OSO_3, R_3=H$

Neosaxitoxina: $R_1, R_2, R_3=H$

Gonyautoxina-IV $R_1, R_2=H, R_3=OSO_3$

Gonyautoxina-I: $R_1, R_3=H, R_2=OSO_3$

Gonyautoxina-VI (B2):1 toxina: $R_1=SO_3, R_2, R_3=H$

C3: $R_1=SO_3, R_2=H, R_3=OSO_3$

C4: $R_1=SO_3, R_2=OSO_3, R_3=H$

Figura. 4. Estructuras representativas de las toxinas PSP producidas tanto por dinoflagelados como por cianobacterias. Éstas están divididas en dos series: saxitoxina y neosaxitoxina. Las variaciones en las estructuras se debe a la presencia y ausencia de porciones sulfato de O y N y por las diferencias estereoquímicas.

La toxicidad neta se mide mediante el ensayo ratón (Association of Official Analytical Chemists, AOAC, 1984), método adoptado mundialmente para monitorear los niveles de toxinas en moluscos para la seguridad del consumo humano. Sin embargo, los métodos analíticos como la cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente o el espectrofotómetro de masas, son más sensibles y pueden utilizarse para determinar la concentración de toxinas individuales (Bricelj & Shumway, 1998).

Sistema de defensa en moluscos bivalvos

El conocimiento general de biología de mano de león *Nodipecten subnodosus*, así como de otros moluscos bivalvos de importancia económica, se ha incrementado con la intención de mejorar la producción comercial. Sin embargo, todavía existen procesos fisiológicos poco conocidos. Uno de los principales problemas del cultivo es la presencia y diseminación de enfermedades por lo que se requieren estudios del sistema de defensa de estos moluscos para poder evaluar las modificaciones producidas por el medio ambiente o por la presencia de agentes nocivos como es el caso de las toxinas producidas por microalgas tóxicas.

Los vertebrados poseen un poderoso sistema inmune adquirido con linfocitos e inmunoglobulinas, capaces de adaptarse a microorganismos invasores. Sin embargo, los invertebrados no poseen inmunoglobulinas, ni tampoco memoria precedida por el encuentro con un patógeno (Roch, 1999). El conocimiento de los mecanismos de defensa y resistencia a enfermedades es esencial en los estudios de fisiología y patología animal. Los mecanismos de defensa en moluscos se conocen relativamente poco, pero los estudios experimentales son frecuentemente frenados debido a la carencia de sistemas de modelos adecuados *in vitro* (Mortensen & Glette, 1996).

Los moluscos, como todos los invertebrados, disponen de un sistema de defensa que los protege contra patógenos. Este sistema en moluscos parece estar restringido a una inmunidad innata o natural que se encuentra presente como en todos los animales principalmente en la sangre o hemolinfa (hemocitos), ya que es el vehículo ideal para movilizarse y llegar a los sitios donde son requeridos. El sistema inmune de los moluscos está constituido de células circulantes o hemocitos, proteínas plasmáticas y reacciones integradas en sistemas multiméricos que involucran ambos tipos de componentes, celular y humoral (Vargas-Albores & Barracco, 2001).

Los mecanismos de defensa celular envuelven la fagocitosis de patógenos y su degradación por enzimas líticas y/o la producción de metabolitos reactivos del oxígeno y su encapsulación si son muy grandes para ser fagocitados. Por otro lado, las reacciones humorales incluyen diferentes factores solubles en el plasma, como las aglutinas, enzimas lisosomales, lectinas opsonizantes y otras moléculas que en combinación con las reacciones celulares protegen al organismo de infecciones y otros contaminantes ambientales (Barracco *et al.*, 1999).

Hemocitos de moluscos bivalvos

Los hemocitos forman la línea de defensa primaria contra agentes infecciosos en moluscos y son responsables de las actividades de inflamación, reparación de heridas, estallido respiratorio, fagocitosis y encapsulación (Volety *et al.*, 1999). Los hemocitos de bivalvos no son homogéneos tanto en morfología como en función (Xue & Renault, 2001). Los estudios sobre respuesta inmune celular de los moluscos bivalvos se deben en gran medida de la caracterización de las células. Aunque existen varios estudios sobre los tipos de hemocitos de moluscos bivalvos y sus características, algunas controversias han dificultado el establecimiento de una clasificación adecuada y práctica (Vargas-Albores & Barracco, 2001).

Los hemocitos los podemos dividir en granulares y hialinos dependiendo de la forma y función. Los hemocitos granulares son generalmente denominados fagocitos aunque los hialinocitos también tienen actividad fagocítica. Los hemocitos granulares o granulocitos tienen abundantes gránulos citoplasmáticos y son al parecer las células inmunológicamente más reactivas. Los hemocitos hialinos no tienen gránulos o tienen un número reducido de los mismos, y aparentemente participan en menor grado en la respuesta de defensa (Luna-González, 2003).

Familia Pectinidae : hemocitos

En contraste con otros bivalvos, algunas características del sistema inmune de pectínidos parecen ser particulares para este grupo, como es la aparente ausencia de hemocitos granulares en gran parte de las especies estudiadas, con excepción de *Argopecten purpuratus* (Riquelme, 1999), que presenta solamente hemocitos hialinos que al parecer están diferenciados, algunos de los cuales podrían funcionar como granulocitos. Por ejemplo en la especie *Nodipecten nodosus*, cultivada en Brasil no se han encontrado hemocitos granulares típicos. Sin embargo, cabe señalar que esta característica sólo ha sido descrita en pocas especies y falta determinar si es una situación generalizada entre los pectínidos. Debido a esto cabe el cuestionamiento sobre cual es la población celular que asume las funciones de los hemocitos granulares, ya que estos son usualmente descritos como las células inmunológicas más activas y sus gránulos son los mayores depósitos de efectores inmunológicos como son: las enzimas hidrolíticas, los péptidos antimicrobianos, las lectinas y el sistema profenol oxidasa (Vargas-Albores & Barracco, 2001; Maeda-Martínez *et al.*, 2001).

Fagocitosis

Como ya se mencionó, los mecanismos de defensa de bivalvos están mediados primariamente por los hemocitos, referidos como macrófagos, los cuales responden a las partículas extrañas u organismos ya sea fagocitándolos y destruyéndolos por medio de enzimas hidrolíticas, especies reactivas de oxígeno y factores antimicrobianos; encapsulándolos cuando son demasiado grandes para ser fagocitados o removiéndolos del huésped por migración a través de las membranas epiteliales (diapédesis) (Luna-González, 2003).

La fagocitosis se ha reconocido como un importante fenómeno compartido por todos los animales. La fagocitosis también está envuelta en la nutrición, y se determinó recientemente como parte de un complejo sistema de defensa. El propósito de este sistema es neutralizar y eliminar los materiales extraños, incluyendo partículas inorgánicas, organismos vivos (patógenos y no patógenos) así como células modificadas (Roch, 1999). Los hemocitos de bivalvos comienzan la fagocitosis de partículas extrañas inmediatamente después del contacto (Mortensen & Glette, 1996). En las almejas la fagocitosis se lleva a cabo por hemocitos periféricos que se encuentran en la hemolinfa, la mayor función inmunológica mediada por células en invertebrados (Blaise *et al.*, 2002).

Intermediarios reactivos del oxígeno (EROs)

Durante el proceso de fagocitosis los hemocitos llevan a cabo un fenómeno conocido como estallido respiratorio de manera similar al observado en fagocitos de mamíferos. El mecanismo involucrado en la destrucción intracelular del material fagocitado comprende la generación de varios intermediarios reactivos del oxígeno y nitrógeno (Luna-González, 2003).

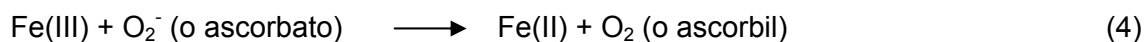
Las funciones de las células inmunes están especialmente ligadas a la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs), tales como las que se encuentran en la actividad microbicida de fagocitos, actividad citotóxica o a la respuesta linfoproliferativa de los mitógenos. Sin embargo, cantidades excesivas de EROs son dañinas para las células inmunes, porque pueden atacar los componentes celulares y dañar a la célula o matarla oxidando los lípidos de membrana, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (De la Fuente & Victor, 2000). Está bien establecido que las EROs son mediadores importantes de la actividad fagocítica de vertebrados, sin embargo con respecto al papel exacto en la defensa en bivalvos no está bien establecida (Roch, 1999).

Aunque la mayoría del oxígeno consumido por los organismos aerobios sufre una completa reducción por la citocromo oxidasa para formar agua, se producen varias reacciones enzimáticas y no enzimáticas en las células que resultan en una reducción parcial del oxígeno generando especies tales como radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot OH$). El radical superóxido y el peróxido de hidrógeno son poco reactivos y tienen una larga vida en sistemas biológicos, sin embargo, su peligro radica en el hecho que ambos se transforman (vía espontánea o mediante reacciones catalizadas), en radicales hidroxilo altamente reactivos que causan un gran daño a la mayoría de las macromoléculas biológicas, incluyendo lípidos de membrana, proteínas y ADN (Hermes-Lima *et al.*, 1998).

Las especies reactivas de oxígeno son continuamente producidas en sistemas biológicos como productos del metabolismo oxidativo. La reducción univalente del O_2 produce el radical anión superóxido (O_2^-) que puede ser dismutado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ecuación (1). La ecuación (2) muestra la reacción del O_2^- con el H_2O_2 la cual da lugar al potente radical hidroxilo ($\cdot OH$), conocida como reacción Haber-Weiss (Winston & Di Giulio, 1991; Hermes-Lima *et al.*, 1998).



Aunque esta reacción es termodinámicamente favorable, es cinéticamente lenta, por lo que los metales de transición, particularmente el Fe, se requieren para la catálisis para la producción de $\cdot OH$, especialmente complejos de Fe(II) citrato y Fe(II) ATP, ecuaciones (3) y (4).



El resultado neto del ciclo redox de la catálisis del hierro, la suma de las ecuaciones (3) y (4), es la reacción de Haber-Weiss, ecuación (2). La ecuación (4) es la reacción de Fenton, donde se ha propuesto que el Fe y Cu en altas valencias, Fe(IV) o Cu(III), se forman como intermediarios y son también altamente reactivos en sistemas biológicos (Winston & Di Giulio, 1991; Hermes-Lima *et al.*, 1998).

Intermediarios reactivos del nitrógeno (ERNs)

Existen otras especies reactivas que no son metabolitos del O_2^- y que también están involucrados en la destrucción intracelular del material fagocitado, que comprenden intermediarios reactivos del nitrógeno. Los intermediarios reactivos del nitrógeno se derivan del óxido nítrico (ON), un radical libre que es producido de la L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (ONS). El ON en vertebrados parece trabajar en la regulación del tono vascular, en las señales celulares al cerebro, y en la eliminación de patógenos en una respuesta inmune no específica.

El ON puede reaccionar consigo mismo y con otras moléculas como el anión superóxido (O_2^- ; ecuación 5), oxígeno molecular (O_2), agua (H_2O) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para generar moléculas reactivas como anhídrido nitroso (N_2O_3), peroxinitrito ($ONOO^-$), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e hidroxilo (OH^-) (Roch, 1999; Luna-González, 2003).



Oxido Nítrico (ON)

El oxido nítrico (ON) es una molécula mensajera inestable con múltiples funciones biológicas que incluyen la relajación del músculo liso, neurotransmisión y la citotoxicidad mediada por macrófagos. ON es altamente reactivo con oxígeno molecular, con el anión superóxido y con hierro de grupos heme y también con hierro no perteneciente a grupos heme. ON y sus derivados también interactúan con grupos tiol de las proteínas y glutatona para formar nitrosotioles. Por este mecanismo la ON puede ser estabilizada y su función prolongada. La nitrosilación de enzimas tal como la GAPDH y la proteína quinasa C bloquean su actividad catalítica (Asahi *et al.*, 1995).

El ON es biosintetizado a partir del aminoácido L-arginina en al menos tres isoformas diferentes de la óxido nítrico sintasa (neuronal n ONS; endotelial e ONS; e inducible i ONS). La activación de los distintos tipos celulares tales como macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y hepatocitos con citocinas proinflamatorias resultan en la expresión de las distintas isoformas de la ONS (Gharavi & El-Kadi, 2003).

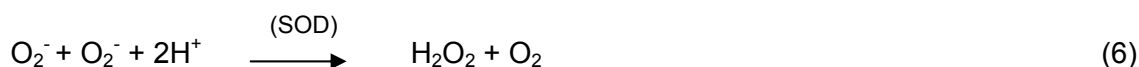
En general, el ON reacciona en agua con oxígeno y sus intermediarios reactivos para producir otros radicales (NO_2), aniones moderadamente inestables (NO_2^-), aniones muy estables (NO_3^-), óxidos altamente inestables (N_2O_3) y peróxidos inestables (ONOO^-). La mayoría de estas formas aparecen solamente durante unos cuantos segundos después de que la óxido nítrico sintasa (ONS) se activa catalíticamente y sólo las formas más estables pueden detectarse por métodos convencionales (Gharavi & El-Kadi, 2003). La ON es producida por varios tipos celulares en un rango de picomoles a nanomoles y tiene un rango corto de vida ($t_{1/2} < 5$ s) en fluidos biológicos; además es difícil medir directamente la producción de la ON, con lo que generalmente mediante el análisis de los productos estables de la oxidación de la ON, como son los NO_2^- y NO_3^- , es posible estimar los niveles de ON en fluidos biológicos y medios de cultivos celulares (Moncada, 1991). Existen varios métodos para medir NO_2^- como ensayos colorimétricos, análisis por quimioluminiscencia, cromatografía de gases y métodos fluorométricos. Sin embargo, el método comúnmente empleado es el análisis de NO_2^- en soluciones acuosas conocido como ensayo colorimétrico de Griess (Nagano, 1999).

Enzimas antioxidantes

Una producción excesiva de EROs y ERNs puede causar muerte celular, necrosis de tejidos e incluso amenazar la salud del individuo. Para contrarrestar los efectos no deseados, los organismos utilizan estrategias de defensa antioxidantes que involucran componentes enzimáticos y no-enzimáticos, aunque también se encuentran presentes para evitar los efectos citotóxicos causados por el metabolismo celular. Los componentes no-enzimáticos son antioxidantes de bajo peso molecular como ácido ascórbico, α -tocoferol, ácido úrico, glutatión, β -carotenos y vitamina E. Los componentes enzimáticos incluyen enzimas protectoras o antioxidantes como la glutatión-peroxidasa dependiente de selenio (Se-GPX), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), que interactúan directamente con los EROs neutralizándolos. Los antioxidantes son responsables de proteger a células y moléculas del estrés oxidativo y son muy importantes para terminar la cascada de producción de radicales libres y las reacciones en cadena que inducen peroxidación de lípidos, y también juegan un papel vital en mantener las células inmunes en un ambiente reducido. (De la Fuente & Victor, 2000; Campa, 2002; Luna-González, 2003). Un balance en las enzimas oxidantes como en las antioxidantes es de gran importancia para mantener la homeostasis en los organismos aerobios (Asahi *et al.*, 1995).

Superóxido dismutasa (SOD) (E.C. 1.15.1.1).

La superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que está presente universalmente en las células con metabolismo aerobio y es esencial para la supervivencia de éstas. El sustrato es un radical libre inestable que puede estar presente sólo en pequeñas cantidades, y la reacción catalizada se lleva a cabo rápidamente aún en ausencia de la enzima (McCord & Fridovich, 1969; Fridovich, 1975). El radical superóxido es eliminado catalíticamente por esta enzima, el cual parece ser un importante agente de la toxicidad del oxígeno y esto provee una defensa contra esta toxicidad. La reacción se lleva a cabo mediante la dsimutación de estos radicales:



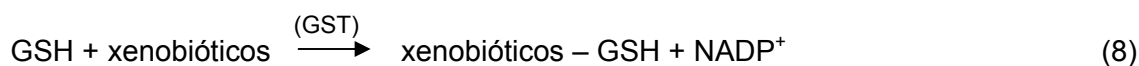
Existen tres variedades de la superóxido dismutasa las cuales son la SOD Cu/Zn, SOD Mn y SOD Fe. La SOD Cu/Zn se encuentra en el citosol de las células eucariotas, con un peso molecular de 32 KDa y está formada por dos subunidades idénticas donde una contiene Cu_2^+ y la otra contiene Zn_2^+ . Las propiedades de la SOD Cu/Zn han sido remarcablemente resistentes a una modificación evolutiva, y las enzimas obtenidas de hongos, plantas, aves y mamíferos son difícilmente distinguibles excepto por diferencias menores en la composición de aminoácidos y en los espectros de resonancia electrónica (Fridovich, 1975).

La SOD Mn se encuentra en bacterias como *Escherichia coli* y *Streptococcus mutants* con un peso molecular de 40 KDa y es un dímero formado por dos subunidades de igual tamaño que contienen un átomo de manganeso por subunidad. Asimismo, se ha encontrado que las mitocondrias de organismos eucariotas contienen una SOD similar a la de estas bacterias, tal como se ha demostrado a partir de mitocondrias de hígado de pollo y humano, solo que en lugar de tener dos subunidades tienen cuatro, además de que poseen un peso molecular cercano a los 80 KDa. Así, se han relacionado ampliamente estos dos tipos de SOD tanto de bacterias y de mitocondrias, siendo que la SOD mitocondrial y la encontrada en el citosol de eucariotas (SOD Cu/Zn) no tienen relación alguna (Fridovich, 1975).

Respecto a la SOD Fe se ha encontrado en *Escherichia coli* localizada en el espacio periplásmico. Se ha relacionado ampliamente con la SOD Mn y es una enzima que provee una defensa eficaz contra O_2^- exógeno. Se ha establecido que la valencia del hierro que sirve como centro catalítico es Fe(III). Enzimas similares se han encontrado en algunas algas verde azules, así como, en algunas bacterias marinas (Fridovich, 1975).

Glutación peroxidasa (Se-GPX; EC 1.11.1.9)

La glutación peroxidasa (GPX) es una enzima antioxidante que elimina varios peróxidos. Se conocen tres isoenzimas, GPX celular, GPX extracelular y GPX hidroperóxida fosfolípida, donde cada una de estas tiene una seleno-cisteína en su centro catalítico. GPX celular, la forma más caracterizada, puede reaccionar con peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos pero no con hidroperóxidos de lípidos (Asahi *et al.*, 1995). Es una enzima que se encuentra localizada en el citosol y en la membrana interna mitocondrial. La descomposición de peróxidos ocurre mediante la utilización del péptido glutatona (GSH) como co-sustrato (ecuación 7). También parte del sistema es la glutación S-transferasa (GST) que cataliza la conjugación de la glutación reducida (GSH) a xenobióticos nucleofílicos o componentes celulares dañados por el ataque de oxiradicales que resultan en una destoxificación (ecuación 8) (Hermes-Lima *et al.*, 1998).



La importancia central en mamíferos radica en destoxificar H_2O_2 e hidroperóxidos de lípidos, aunque su actividad comparada con otras enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa, es proporcionalmente menor en invertebrados que en vertebrados (Gamble *et al.*, 1995).

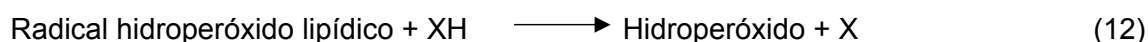
Catalasa (CAT) (E.C. 1.11.1.7)

Las catalasas son proteínas homotetraméricas que contienen grupos hemínicos; la masa de cada unidad es 50 KDa, aproximadamente. CAT está asociada principalmente a los peroxisomas y cierta actividad se encuentra en el citosol. La catalasa se encuentra en varios tipos de células y el peróxido de hidrógeno es su único sustrato, con lo que remueve los productos generados de la actividad SOD.



Peroxidación de lípidos

También se presenta una peroxidación de lípidos asociada al estrés oxidativo particularmente con membranas de células ricas en lípidos polinsaturados (PUFA). Aunque toda clase de macromoléculas son susceptibles al ataque de radicales, los PUFA son especialmente sensibles a la oxidación debido a sus estructuras de doble cadenas conjugadas. El ataque radical en los lípidos da lugar a la formación de hidroperóxidos de lípidos, que se pueden descomponer para formar alcanos, alquenos, cetonas y aldehídos. El aldehído producido más importante es el malondialdehído (MDA), que forma bases de Schiff con aminas de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos. Las ecuaciones (10)-(13) muestran la secuencia de reacciones en la peroxidación de ácidos grasos polinsaturados.



Esta forma de daño oxidativo se ha demostrado que ocurre en las glándulas digestivas y branquias de bivalvos de agua dulce, con enzimas antioxidantes que promueven la recuperación del tejido dañado (Blaise *et al.*, 2002). La peroxidación de los lípidos refleja el daño a las membranas celulares de los radicales libres. El proceso de peroxidación es también una fuente de otros productos citotóxicos que pueden dañar el ADN y enzimas (Ringwood *et al.*, 1999).

Enzimas hidrolíticas

En adición a los EROs de origen celular, varias hidrolasas intracelulares pueden estar envueltas en procesos citotóxicos como actividades antimicrobianas y antitumorales. (Anderson *et al.*, 1992). Dentro de los hemocitos existen diversas de estas enzimas con actividad de lisozima, proteasas, glicosidasas, fosfatasas, lipasas y estereasas indicativas de la presencia de lisosomas y han sido usadas para definir la función de los hemocitos en diferentes especies de bivalvos (Luna-González, 2003). Es de particular interés que las células digestivas del hepatopáncreas de moluscos son ricas en lisosomas y se ha mostrado que los lisosomas pueden acumular y secuestrar compuestos extraños como xenobióticos lipofílicos como un incremento en la actividad autofagocítica (Svensson & Förlin, 1998).

En la mayoría de los estudios, el análisis concierne sólo a algunas enzimas. Sin embargo, el proceso de resistencia a una infección puede involucrar una reacción general más que la función de ciertas enzimas individuales en estos organismos que carecen de una respuesta inmune específica. Por lo tanto, es importante conocer el estado metabólico general (Xue & Renault, 2000). Las enzimas lisosomales dentro de los hemocitos, matan y degradan las partículas fagocitadas y en algunos casos son liberadas de la célula al plasma u otros tejidos donde pueden modificar la conformación molecular de la superficie de las partículas y con ello favorecer su reconocimiento y fagocitosis (Luna, 2003).

Lisozima (E.C. 3.2.1.17)

La lisozima es una enzima constituyente común de los tejidos biológicos y secreciones; ha sido encontrada en un gran número de organismos tanto vertebrados como invertebrados y está presente en grandes cantidades en los huevos de gallina, lágrimas, tracto digestivo de rumiantes y la hemolinfa de Lepidoptera. Se sabe que es una enzima que participa en los procesos digestivos, así como, en el sistema de defensa de un gran número de organismos (Garrett & Grisham, 1995). Es una proteína globular que contiene 129 amino ácidos y fue descubierta en 1922 por Alexander Flemming por accidente. Desde que fue descubierta ha sido importante para la comunidad científica ya que fue la primer enzima de la cual se obtuvo su estructura tridimensional por cristalografía de rayos X en 1950 (Phillips, 1967).

La lisozima es una enzima secretora relativamente pequeña que hidroliza un número de sustratos estructuralmente similares, siendo los mejores sustratos para esta enzima los copolímeros de polisacáridos de N-acetil glucosamina (NAG) y N-acetil ácido murámico (NAM), las cuales representan la unidad estructural de una gran cantidad de paredes celulares bacterianas.

Esta enzima es más efectiva contra bacterias Gram positivas ya que la capa de peptidoglicanos es relativamente accesible a la enzima, asimismo, la lisozima es efectiva contra bacterias Gram negativas solamente después de que la membrana exterior ha sido comprometida. Así, los mecanismos de lisar las paredes celulares de las bacterias ha contribuido con los científicos en cómo actúan estas enzimas y la forma de liberación de sus productos (Ito *et al.*, 1999; Garrett & Grisham, 1995).

Se le ha denominado como una molécula protectora contra bacterias patógenas como *Mycrococcus lysodeikticus*, *Bacillus subtilis*, *B. Megaterium*, *Escherichia coli*, *Gaffya tetragena*, *Sallmonella pullorum* y *Shigella sonnei*, formando así parte del sistema de defensa de los moluscos (Rodrick & Cheng, 1974).

Acetilcolinesterasa (AChE, E.C. 3.1.1.7)

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor en el sistema nervioso periférico y central de vertebrados e insectos, y la mayoría del conocimiento acerca de su síntesis ha derivado de estudios del sistema nervioso de mamíferos, además de que se ha identificado en tejidos no neuronales de mamíferos incluyendo linfocitos, epitelio mucocutáneo, células gastrointestinales, respiratorias y urogenitales, placenta y endotelio vascular, entre otros.

La presencia de ACh en invertebrados, plantas, líquenes, hongos y bacterias, ha sido sugerida indirectamente por estudios donde se emplean protocolos histoquímicos o bioquímicos para examinar los componentes colinérgicos, por ejemplo la acetilcolinesterasa (AChE) (Horiuchi *et al.*, 2003).

Las colinesterasas son moléculas que hidrolizan la acetilcolina. Han sido clasificadas en dos grandes grupos, ya sea como acetilcolinesterasas o butirilcolinesteras (BChE), dependiendo de la hidrólisis del sustrato y la sensibilidad a inhibidores (Bocquené *et al.*, 1997).

La AChE es una serin hidrolasa que pertenece a la familia de las esterasas en los organismos eucariotes. El papel biológico de esta enzima es la terminación de los impulsos de transmisión y sinapsis colinérgica en el sistema nervioso debida a una rápida hidrólisis del neurotransmisor ACh (Schumacher *et al.*, 1986).

Además, las colinesterasas hidrolizan una gran variedad de sustratos incluyendo colin esterés e insecticidas organosfosfatados. Los pasos químicos consisten en un ataque nucleofílico en el sustrato, generando un intermediario de acil-enzima o una fosforil-enzima, con su posterior desacilación o desfosforilación (Bocquené *et al.*, 1997).

2. ANTECEDENTES

Se han realizado gran cantidad de trabajos referentes a los mecanismos de alimentación, acumulación y depuración de las ficotoxinas en distintos organismos como peces, crustáceos y moluscos, debido al impacto que causan comercialmente. La mayoría de los trabajos donde se relaciona a las ficotoxinas con los moluscos se han encaminado a desarrollar técnicas que permitan el monitoreo de estas ficotoxinas que son potencialmente tóxicas para el consumo humano. Así, los moluscos han sido reconocidos como vectores de ficotoxinas para los consumidores por años, pero los efectos negativos que causan estas toxinas en moluscos han recibido menos atención, destacando algunos trabajos realizados en mejillones y ostiones de importancia económica. Asimismo, en general los trabajos realizados en organismos de la familia Pectinidae son trabajos aislados, y la literatura referente al efecto de las ficotoxinas paralíticas (PSP) en estos es reciente y escasa.

Trabajos realizados con pectínidos: *Nodipecten subnodosus*

Los trabajos relacionados al grupo de los pectínidos se han llevado a cabo principalmente en países como Japón, China, Canadá, Gran Bretaña y Francia, sin embargo en países iberoamericanos como Chile, México, Venezuela y Perú, entre otros, existe un reciente interés para realizar un esfuerzo de tipo científico encaminado al conocimiento de la biología, fisiología y bases tecnológicas del cultivo. Actualmente, algunas investigaciones están encaminadas a conocer su marco ambiental, tecnologías del cultivo referentes a la alimentación, crecimiento y reproducción.

Dentro del grupo de los pectínidos, *Nodipecten subnodosus* es un organismo que se encuentra en fase experimental con potencial para ser explotado comercialmente en acuicultura, con lo que los trabajos relacionados con esta especie son variados, entre los que cabe destacar:

- Desarrollo de tecnología para el cultivo integral (García *et al.*, 1994).
- Efecto del flujo y la concentración de alimento sobre el crecimiento, peso y tasa de filtración (Parés, 1996).
- Cultivo larvario a nivel piloto (Velasco, 1997).

- Determinación de la ración alimenticia y la densidad de cultivo sobre el desarrollo larval (Ortiz *et al.*, 1997).
- Fijación de larvas en cámaras de flujo descendente y eficiencia comparativa de sustratos artificiales (González *et al.*, 1997).
- Acondicionamiento gonádico (Gutiérrez *et al.*, 1997).
- Acondicionamiento gonadal, desarrollo embrionario y cultivo de larvas, alimentados con cuatro especies de microalgas (Villavicencio, 1997).
- Efecto de la velocidad de flujo y concentración de alimento sobre el crecimiento (García *et al.*, 2000).
- Evaluación de dietas de microalgas en el crecimiento (Cerón, 2000).
- Estudio de la estructura genética, biogeografía y morfometría (Correa, 2001).
- Estudio sobre bioquímica posmortem y procesamiento (Ocaño *et al.*, 2001)
- Estudio sobre biología reproductiva (Valdez, 2001).
- Crecimiento de juveniles bajo condiciones de cultivo (Barrios *et al.*, 2003; Otter, 2001)
- Susceptibilidad a enfermedades bacterianas (Luna *et al.*, 2002)
- Tasas de ingestión y aclaramiento (López, 2003).
- Determinación del rango de tolerancia y resistencia térmica, así como temperatura óptima para el crecimiento (González, 2003).
- Actividad de la fenoloxidasa en larvas, juveniles y adultos (Luna *et al.*, 2003).
- Estudio de la poliploidia para su mejoramiento genético (Maldonado, 2003).
- Crecimiento y gametogénesis (Racotta *et al.*, 2003).

Moluscos bivalvos y alimentación

Los bivalvos adquieren ficotoxinas mediante alimentación de los organismos que se encuentran en suspensión, con lo que son organismos filtroalimentadores sestotróficos, que tienen la capacidad de ingerir tanto partículas vivas como muertas del seston. Por esta razón es importante entender como se llevan a cabo los mecanismos de alimentación para así determinar como les pueden afectar las ficotoxinas. En general en bivalvos se han realizado gran cantidad de trabajos referentes a la alimentación de estos, de los cuales los más importantes se enfocan a la cantidad y calidad del alimento, así como a los factores bióticos y abióticos que influyen en el proceso.

Entre los puntos que cabe resaltar se conoce que los organismos de mayor tamaño consumen una mayor cantidad de alimento que tallas pequeñas, sin embargo, en términos de unidades específicas de tejido seco, esta relación es inversa (Owen 1974). Asimismo, la actividad filtroalimentadora está en función de la concentración de partículas, esto indica que los bivalvos regulan la cantidad de agua filtrada libre de partículas (Winter, 1978b). Las tasas de filtración e ingestión en moluscos, mantienen una relación directa con la concentración de partículas, mientras que las de aclaramiento y bombeo decrecen. También la calidad de alimento es un factor importante. Shumway (1991), indica que la mayoría de los bivalvos son capaces de retener partículas entre 3 y 4 μm con 100% de eficiencia, además de que se ha reportado en diversos trabajos que las mezclas de varias especies contribuyen a un mayor valor energético, así como a una mejor nutrición, lo que conlleva a mayores incrementos en longitud y peso.

Dentro de los factores fisicoquímicos, la temperatura juega un papel importante en los procesos alimenticios, ya que es considerada como el factor ambiental más importante que determina el metabolismo en organismos poiquiloterms (Navarro, 2001). En general las tasas de filtración y aclaramiento se incrementan dentro de un intervalo de temperatura hasta llegar a un óptimo donde se estabiliza, y fuera de ese intervalo, las tasas de aclaramiento y filtración disminuyen drásticamente. También la velocidad del flujo se ha documentado que juega un papel importante en estos procesos de alimentación, ya que como lo mencionan Wildish *et al.* (1987), determina el suplemento alimenticio, la tasa y la eficiencia de captura de partículas, y en algunos casos, su comportamiento alimenticio; velocidades de corrientes altas pueden potencialmente reducir el crecimiento inhibiendo la actividad alimenticia.

Organismos tóxicos como alimento de bivalvos

Entre los organismos que pueden servir en un momento dado de alimento para los moluscos bivalvos están los dinoflagelados, donde una gran cantidad de estos organismos son productores de diversas toxinas. Los moluscos bivalvos adquieren estas toxinas mediante filtración de dichos organismos, los cuales les sirven de alimento, por lo cual la mayoría de los trabajos han sido encaminados a exponer en condiciones controladas a los organismos a diferentes concentraciones microalgales o estudios en condiciones medio ambientales, para determinar procesos de energía fisiológica, asimilación, depuración, compartimentalización y cinética de las toxinas, entre otros (Navarro, 2001).

Los dinoflagelados del género *Alexandrium* y *Gymnodinium* son ampliamente reconocidos como organismos productores de toxinas. Ambos géneros producen las denominadas toxinas parálíticas de moluscos (PSP). *Gymnodinium catenatum* es un dinoflagelado que se ha estudiado ampliamente ya que su aparición ha sido asociada con toxinas parálíticas presentes en moluscos bivalvos de interés comercial. La saxitoxina, principal componente de las toxinas parálíticas, se aisló por primera vez de *Saxidomus giganteus*, y ésta, y al menos otros 20 derivados en varias combinaciones y concentraciones, se han asociado con la PSP (Oshima, 1995).

Los primeros registros de estas toxinas asociadas a *G. catenatum* se reportaron en los años 70's, observándose un incremento en la distribución de PSP a nivel mundial (Morey-Gaines, 1982; Hallegraeff, 1993). Las apariciones de episodios tóxicos son comunes en regiones templadas, particularmente en Norte y Sudamérica, Europa, Sudáfrica, Japón y Australasia, y en regiones ecuatoriales como en Centroamérica y la India (Landsberg, 1997).

A pesar de la variada información referente a *G. catenatum* como vector de intoxicación, la mayoría de los trabajos en donde se ha utilizado dinoflagelados tóxicos como alimento, están enfocados a organismos del género *Alexandrium*, además existen pocos estudios relacionados con pectínidos.

Entre los estudios generados con pectínidos y otros bivalvos en general se encuentran los de Scarratt *et al.* (1993), los cuales demostraron que en *Mytilus edulis* y *Placopecten magellanicus* las células de *Alexandrium tamarense* fueron retenidas vivas simulando una transferencia de lugar, con lo que mencionan el potencial que pueden tener estas células para ser transportadas de un lugar a otro.

Además Mardsen & Shumway (1993), estudiaron el efecto de *A. tamarense* en la asimilación de oxígeno y las tasas de alimentación en los bivalvos *M. edulis*, *Mya arenaria*, *Geukensia demissa*, *P. magellanicus* y *Crassostrea virginica*, utilizando como organismo control dinoflagelados de la misma especie no tóxicos. Encontraron que no existe diferencia en el consumo de oxígeno tanto en la prealimentación y postalimentación, así como tampoco entre la cepa tóxica y la no tóxica. Sin embargo, las tasas alimenticias disminuyeron para *P. magellanicus* y *M. arenaria* respecto a la cepa tóxica comparada con la no tóxica.

Gymnodinium y bivalvos

La mayoría de los trabajos realizados con el género *Gymnodinium* están enfocados al monitoreo de afloramientos, a la dinámica poblacional, crecimiento y producción de toxinas. Existe una gran cantidad de bibliografía relacionada a la adquisición de ficotoxinas de *Gymnodinium catenatum* por moluscos bivalvos en ambientes naturales en países como Japón, Portugal, España, Australia, entre otros, donde se han enfocado a la caracterización e identificación de estas, principalmente con objeto de monitorearlas y minimizar las pérdidas comerciales, así como, para salvaguardar la salud pública. Además, los estudios que se han llevado a cabo en condiciones controladas son escasos (Franca & Almeida, 1989; Hallegraeff *et al.*, 1989; Bravo *et al.*, 1990; Oshima *et al.*, 1990; Taleb *et al.*, 2001). Sin embargo, no existen reportes donde se involucre a *Gymnodinium* con bivalvos pectínidos.

Mejillones de la especie *Mytilus galloprovincialis* fueron expuestos a *G. catenatum*, para estudiar la cinética de destoxificación. Blanco-Pérez *et al.*, (1997), encontraron que los perfiles de las toxinas tanto en los dinoflagelados como en los mejillones fue similar y argumentan que las variables ambientales en la cinética de destoxificación no tienen efecto alguno.

Matsuyama *et al.* (1999), estudiaron el efecto de afloramientos tóxicos del dinoflagelado *Gymnodinium mikimotoi* en las tasas de aclaramiento del mejillón *Mytilus galloprovincialis* y la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas*. Encontraron que ambos bivalvos disminuyeron las tasas de aclaramiento, así como, exhibieron varias respuestas negativas tal como la retracción del manto y cierre gradual de las valvas.

Toxinas paralíticas (PSP) y bivalvos

Asimismo, entre los trabajos que cabe mencionar respecto al efecto de las toxinas en moluscos, está el de Twarog *et al.* (1972) y Twarog (1974), que estudiaron la conducción de los potenciales de acción en los nervios de ciertos moluscos bivalvos expuestos a la saxitoxina. Parece ser que el mecanismo que se genera en esos bivalvos depende de un incremento en la conductancia de los iones sodio. Además reportaron que la resistencia a la saxitoxina es una propiedad de las fibras nerviosas individuales.

Entre los trabajos más sobresalientes con pectínidos, se encuentran los de Bauder y col. que durante varios años han hecho un esfuerzo por describir el efecto de las ficotoxinas en bivalvos y han propuesto varias metodologías y mecanismos que han permitido determinar los efectos fisiológicos, utilizando como organismo modelo al pectínido *Argopecten irradians* expuestos al dinoflagelado tóxico productor de toxinas diarreicas (DSP) *Prorocentrum lima* (Bauder *et al.*, 1996; Bauder & Cembella, 2000; Bauder *et al.*, 2001). La mayoría de los trabajos realizados en pectínidos referentes a las ficotoxinas paráliticas se han llevado a cabo en *Pecten maximus*, *Placopecten magellanicus* y *Patinopecten yessoensis*, expuestos a dinoflagelados tóxicos del género *Alexandrium*. Entre los trabajos que describen los procesos de acumulación y depuración de toxinas se encuentran los de Lassus *et al.* (1996), quienes estudiaron a *P. maximus* describiendo el papel de los riñones en la bioacumulación de las toxinas paráliticas y de como se lleva a cabo la biotransformación y la distribución anatómica de estas. Los riñones presentaron una mayor toxicidad que la glándula digestiva que es donde comúnmente se encuentra la mayor toxicidad.

Por otro lado, en *P. magellanicus* se estudió la asimilación, biotransformación y depuración de las toxinas paráliticas tanto en condiciones de campo como de laboratorio. Observaron que la composición de toxinas en los bivalvos pueden diferir considerablemente de las toxinas presentes en los dinoflagelados, y que se presenta una variación espacio-temporal entre individuos (Cembella *et al.*, 1993; Cembella *et al.*, 1993b; White *et al.*, 1993; Cembella *et al.*, 1994). Oshima (1991) y Sekiguchi *et al.* (2001) encontraron que en *P. yessoensis* la toxina es retenida durante largos periodos de tiempo, y que tanto la distribución anatómica como los perfiles de toxinas en cada tejido cambian durante el periodo de depuración. Además, se ha reportado variación en la toxicidad entre individuos y comentan que las toxinas incorporadas en la almeja sufren cambios en compuestos derivados que no son detectados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Asimismo, respecto a los efectos que causan estas toxinas a nivel fisiológico están los trabajos de Twarog & Yamaguchi (1975) y Lesser & Shumway (1993) que han determinado el efecto de las toxinas PSP en dos pectínidos de importancia comercial: *P. magellanicus* y *A. irradians*, respectivamente. De las dos especies de pectínidos probadas hasta la fecha, únicamente *A. irradians* presenta un sistema nervioso que es sensible moderadamente a la saxitoxina, siendo *P. magellanicus* prácticamente insensible.

Chauvaud *et al.* (1998), observaron que en poblaciones naturales de *P. maximus* que fueron expuestas a afloramientos nocivos del dinoflagelado *G. cf. nagasakiense*, se observó una reducción en el crecimiento de la concha, siendo los organismos juveniles de dos años de edad mayormente afectados que los de un año, debido probablemente a mayores tasas de filtración.

Wikfors *et al.* (2000), estudiaron a *A. irradians* en varios estadios de vida (embriones, larvas, poslarvas y juveniles) expuestos a varios cultivos de microalgas tóxicas. Entre las variables medidas fueron supervivencia, crecimiento, desarrollo, comportamiento de alimentación e histopatología. Se observaron efectos letales y subletales a la exposición aguda a estos organismos con lo que dicen que estos organismos potencialmente tóxicos afectan la biología de las poblaciones.

Lu & Hwang (2002), estudiaron el efecto del dinoflagelado tóxico *Alexandrium minutum* y la biotransformación de toxinas en varias especies de bivalvos, determinando que en todos los bivalvos estudiados se presenta una baja susceptibilidad a las toxinas PSP por efecto de una inyección intramuscular >300 Unidades Ratón/20g. Sin embargo, se presentaron efectos anormales especie específicos los cuales variaron con la concentración de *A. minutum* como alimento entre las diferentes especies.

Sistema de defensa en bivalvos

Durante los últimos treinta años se ha desarrollado cierto interés en cómo los moluscos se defienden asimismos de los organismos invasores. Ahora se tiene gran información acerca de los componentes del sistema inmune de moluscos e insectos, que cualquier otro grupo de invertebrados (Cheng, 1989). Sin embargo, los estudios se han llevado a cabo en pocas especies, principalmente en caracoles de agua dulce y algunas ostras. Además, son pocos los estudios fisiológicos en relación a la exposición de dinoflagelados tóxicos y al efecto que estos organismos tóxicos pudieran tener en el sistema de defensa de moluscos bivalvos.

Los mecanismos de defensa se han evaluado en distintos moluscos sobre varios agentes como protozoos parásitos, levaduras y bacterias (González & Arenas, 2002). Aunque se han descrito varias bacterias patógenas que afectan a los cultivos de pectínidos, como los organismos del género *Vibrio* sp., poco se conoce sobre su distribución, forma de transmisión, mecanismos de patogenicidad y otras variables que

podrían ayudar a prevenir su establecimiento y diseminación. Shumway (1990), ha descrito la estrecha relación existente entre afloramientos de fitoplancton nocivo y moluscos bivalvos, describiendo fenómenos de inmunosupresión, con diversas consecuencias en los moluscos, desde una marcada susceptibilidad a patógenos, hasta una elevada incidencia de neoplasias. Sin embargo, son pocos los trabajos que se han enfocado al efecto de los agentes bióticos como productores de estrés, siendo los que refieren al efecto de xenobióticos y metales pesados los más abundantes, observándose efectos adversos en varios organismos estudiados.

Hemocitos

Debido a que los estudios sobre respuesta inmune celular de los moluscos bivalvos dependen en gran medida de la caracterización de las células, existen varios trabajos que refieren al tipo y función de hemocitos presentes en la hemolinfa de moluscos bivalvos (Ford & Alcox, 1993; López *et al.*, 1997; Hine, 1999; Cima *et al.*, 2000; Grizel *et al.*, 2003). Los hemocitos cumplen varias funciones como reparación de la concha y lesiones, transporte y digestión de nutrientes, así como, defensa interna, sin embargo, no son homogéneos tanto en morfología como en función (Xue & Renault, 2001). Se han encontrado dos tipos principales de hemocitos los granulares y los hialinos, donde se cree que los granulares son los que llevan principalmente las funciones de defensa, sin embargo, como lo mencionan Vargas-Albores & Barracco (2001), en todos los pectínidos estudiados no se han encontrado hemocitos granulares a excepción de *Argopecten purpuratus* (Riquelme, 1999).

Además, varios parámetros hematológicos y serológicos se han medido para indicar el estado del sistema de defensa inmune de moluscos bivalvos. En moluscos pectínidos no se conocen claramente los mecanismos de defensa. Sin embargo, se ha establecido que los moluscos en general, y los pectinidos en particular, tienen defensas contra los patógenos que involucran respuestas humorales y celulares (Vargas-Albores & Barracco, 2001). Esta bien establecido que materiales extraños o nocivos introducidos en los moluscos o aquellos que los pueden dañar, son eliminados ya sea mediante fagocitosis o por medio de encapsulación (Cheng, 1989). Como sugieren Cheng & Rifkin (1970), la encapsulación representa el hecho de que los hemocitos no puedan fagocitar material extraño debido a que puede ser muy grande para ser endocitado. La mayoría de los trabajos relacionados al sistema inmune en moluscos bivalvos están enfocados en las habilidades quimiotácticas, fagocíticas y de quimioluminiscencia de los hemocitos.

Entre los trabajos de importancia en pectínidos están los realizados con la especie *P. maximus* donde Mortensen & Glette (1996), estudiaron la actividad fagocítica de los hemocitos mantenidos *in vitro*. Asimismo, en la misma especie Lambert & Nicolas (1998), hicieron estudios referentes a la actividad específica de inhibición en los hemocitos de esta especie debido a la presencia de *Vibrio pectenida*. Lambert & Nicolas (1998), así como, Hauton *et al.* (2001), determinaron la respuesta de los hemocitos a la inoculación por bacterias y von Brand *et al.* (1999), describieron los tipos de hemocitos en *A. purpuratus*

Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

La formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y nitrógeno (ERNs) son vías comunes de toxicidad inducida por condiciones ambientales estresantes. Se han asociado generalmente a efectos de contaminación donde y se proponen como biomarcadores de una toxicidad mediada por contaminantes asociados con el estrés oxidativo.

En los moluscos bivalvos la producción de especies reactivas ha sido particularmente demostrada en los mejillones, *Mytilus edulis* (Noel *et al.*, 1991; Pipe, 1992), *Mytilus galloprovincialis* (Pipe *et al.*, 1995) y *Perna perna* (Barracco *et al.*, 1999); en las ostras *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* (Bachère *et al.*, 1991), *Crassostrea virginica* (Anderson, 1994); en las almejas *Tridacna crocea*, *Mya arenaria* y *Mercenaria mercenaria* (Anderson, 1994; Nakayama & Maruyama, 1998); y en los pectínidos *Patinopecten yessoensis* (Nakamura *et al.*, 1995) y *Pecten maximus* (LeGall *et al.*, 1991).

En pectínidos, Le Gall *et al.* (1991), reportaron la producción de EROs en los hemocitos de *P. maximus* e investigaron la producción de EROs en las infecciones producidas por microorganismos que infectan las branquias de estos pectínidos, causando altas mortalidades. Nakamura *et al.* (1995), con *P. yessoensis* fue de los primeros en mostrar la capacidad de los hemocitos de producir EROs como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Posteriormente, Lambert & Nicolas (1998), reportaron que en *P. maximus* la producción de EROs fue suprimida o altamente reducida cuando los hemocitos se incubaron con bacterias del género *Vibrio*.

Oxido Nítrico

El óxido nítrico (ON) juega un papel importante en la regulación fisiológica de diversos organismos, por ejemplo, vasodilatación, liberación de neurotransmisores, etc. (Stefano *et al.*, 2004). Varios tejidos de vertebrados e invertebrados responden a señales de moléculas externas por una rápida liberación de ON mediada por la óxido nítrico sintasa (ONS) (Stefano *et al.*, 2002). El ON en conjunto con la superóxido dismutasa (SOD), un potente antioxidante, juega un papel importante en la producción de peroxinitrítos los cuales son potentes especies reactivas que los organismos utilizan generalmente contra bacterias (Arumugam *et al.*, 2000).

Entre los trabajos realizados con invertebrados, en general, cabe señalar los de Ottaviani *et al.* (1993) y Franchini *et al.* (1995), donde evidencian la producción de ON y su utilización como agente bactericida en los inmunocitos de invertebrados, así como, los trabajos de Conte & Ottaviani (1995) referentes a la actividad de la ONS en hemocitos de moluscos.

Los trabajos con pectínidos son escasos, pero cabe señalar los trabajos con otras especies de bivalvos como el de Annikova *et al.* (1999), en donde revelaron histoquímicamente la presencia de óxido nítrico sintasa (ONS) en las gónadas de machos y hembras de las especies *Modiolus kurilensis*, *Crenomytilus grayanus*, *Anadar broughtoni*, *Mizuhopecten yessoensis* y *Mercenaria stimpsoni*. También encontraron una distribución específica de ONS conteniendo diversos elementos nerviosos y sugieren que el ON puede ser una molécula de señal endógena que participa en la gametogénesis y en los procesos de regulación de algunos bivalvos.

Dyuzen *et al.* (1999), estudiaron la ONS en el sistema nervioso central de *M. yessoensis* y *M. kurilensis*. No se revelaron diferencias en la distribución del ON producido por las células entre machos y hembras. En las neuronas del sistema nervioso central de *M. yessoensis* no se encontró actividad ONS. Se sugiere que el ON en invertebrados juega un papel importante en la mediación nitrérgica de la regulación de varios procesos fisiológicos.

Entre los trabajos realizados con mejillones del género *Mytilus* se encuentran los de Arumugam *et al.* (2000), quienes estudiaron la producción *in vitro* de ON en los hemocitos de *Mytilus galloprovincialis*, estimulados por PMA, laminaran, lipopolisacáridos y por fagocitosis de células de levaduras. Concluyen que la óxido nítrico sintasa (ONS) y NADPH oxidasa están envueltos en el sistema de defensa de *M. galloprovincialis*.

Asimismo en la misma especie, Gourdon *et al.* (2001), demostraron la presencia del ON en los hemocitos. Por otra parte, Stefano *et al.* (2002), realizaron *in vitro* la liberación de ON en *Mytilus edulis*, con lo que demostraron que la liberación basal de ON de varios tejidos se lleva a cabo en una manera cíclica y que el tiempo del ciclo y la magnitud está sujeta a regulación por estímulos externos. También Stefano *et al.* (2004), encontraron que el ON modula la activación microglial en la misma especie.

Por otro lado, Gainey *et al.* (2003), demostraron que el ON regula la potenciación del músculo de las branquias de *Mercenaria mercenaria* de manera estacional, así como, los hemocitos de *Ruditapes decussatus* producen ON en presencia de zymosan y lipopolisacáridos de bacterias (Tafalla *et al.*, 2003).

Enzimas antioxidantes

Entre las enzimas asociadas con la liberación de los óxido radicales, se encuentran las enzimas antioxidantes. Desde los años 90's se han realizado una serie de estudios que han examinado el efecto de los antioxidantes en invertebrados acuáticos. Sin embargo, son pocos los trabajos que se han enfocado al efecto de los agentes bióticos como productores de estrés. La mayoría son trabajos relacionados a niveles basales de estas enzimas, así como, a la exposición a xenobióticos, acumulación de metales pesados, entre otros, en la respuesta a enzimas como la glutatión peroxidasa (GPX), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD).

Se han medido los niveles basales de la catalasa en el mejillón *Mytilus californianus* (Marks & Fox, 1937), SOD, CAT, GPX y glutatión reductasa (GSH) en *Mytilus edulis* (Ramos-Martínez *et al.*, 1983; Winston *et al.*, 1990), SOD, CAT y peroxidasa en las almejas *Calyptogena magnifica* y *Mercenaria mercenaria* (Blum & Fridovich, 1984).

Gamble *et al.* (1995), realizaron un trabajo donde describen la función de varias enzimas antioxidantes como la GPX, SOD y CAT en cuatro invertebrados marinos: *M. edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* y *Asteria rubens*. Encontraron que la mayor actividad de enzimas antioxidantes se presentó en los tejidos digestivos y que las fuentes exógenas (como los xenobióticos) en la producción de oxiradicales pueden ser importantes en la determinación de los niveles de defensas antioxidantes.

Asimismo, en la almeja *Pecten jacobaeus* se midieron los niveles basales de CAT, SOD, GPX y se compararon con la almeja del Antártico *Adamussi colbecki*. Encontraron los mayores niveles de estas enzimas antioxidantes en la glándula y branquias, no observándose diferencias en los niveles de estas enzimas entre ambas especies (Viarengo *et al.*, 1995). Regoli *et al.* (1997) y (1998), estudiaron el estrés oxidativo en la almeja del Antártico *A. colbecki* y el efecto a una exposición aguda a metales. Las condiciones adversas a las cuales está sometida esta almeja se manifestó en elevados niveles de CAT en la glándula digestiva, lo que sugiere una adaptación a condiciones extremas, así como una elevada actividad de la glutatión S-transferasa puede estar referida a la alimentación. Sin embargo, con la exposición a metales, las actividades de glutatión total, glutatión S-transferasa y CAT resultaron en una reducción significativa.

Arumugam *et al.* (2000), estudiaron la producción in vitro de SOD en los hemocitos de *Mytilus galloprovincialis*, estimulada por PMA, laminarin, lipopolisacáridos y por la fagocitosis de células de levaduras. Además Geret *et al.* (2002), estudiaron el efecto de la concentración de Cu en las branquias de la almeja *Ruditapes decussatus*. Analizaron las actividades de enzimas antioxidantes como la CAT, SOD, GPX, en las branquias tanto en la fracción citosólica como en la mitocondrial. Encontrando una disminución en las actividades SOD, CAT y GPX de la fracción mitocondrial.

Peroxidación de lípidos

A pesar de la naturaleza de las defensas antioxidantes, una consecuencia ampliamente reconocida de la producción de oxiradicales es la peroxidación de lípidos celulares. Se ha observado un efecto marcado en la peroxidación de lípidos y enzimas antioxidantes debido a la exposición a lugares contaminados por diversas fuentes, principalmente debido a la exposición de metales pesados, siendo los mejillones principalmente utilizados como biomarcadores sensibles a la contaminación de los sistemas acuáticos (Sole *et al.*, 1994; Prakash & Rao, 1995; Cavaletto *et al.*, 2002; Torres *et al.*, 2002; Lau & Wong, 2003). Asimismo, esta peroxidación, así como las enzimas antioxidantes también está relacionada con factores ambientales (Sheenan & Power, 1999; Regoli *et al.*, 1997 y 1998; Abele *et al.*, 2001). Esta forma de daño oxidativo se ha demostrado que ocurre en las glándulas digestivas y branquias de bivalvos de agua dulce, con enzimas antioxidantes que promueven la recuperación del tejido dañado (Blaise *et al.*, 2002). En bivalvos marinos, por ejemplo, en *Mytilus edulis* se ha demostrado la presencia de una peroxidación de lípidos que es mediada enzimáticamente (Musgrave *et al.*, 1987).

Asimismo, en la almeja *Pecten jacobaeus* se midió la peroxidación de lípidos y se comparó con la almeja del Antártico *Adamussi colbecki*, encontrando una menor susceptibilidad de *A. colbecki* en la glándula digestiva explicado por los factores extremos a los cuales están expuestas. Además se midieron los niveles basales de *Mizuhopecten yessoensis* en todos los tejidos, durante el ciclo reproductivo, donde se observó una mayor peroxidación en glándula y gónadas, aumentando los niveles antes del desove (Viarengo *et al.*, 1995).

Geret *et al.* (2002), estudiaron el efecto de la concentración de Cu en las branquias de la almeja *Ruditapes decussatus*. Analizaron las concentraciones de malondialdehído (MDA), en las branquias tanto en la fracción citosólica como en la mitocondrial. Encontraron que la peroxidación de lípidos mediada por la formación de MDA, fue dependiente del contenido de Cu.

Enzimas hidrolíticas y lisozima

Las enzimas hidrolíticas y moléculas citotóxicas producidas por los hemocitos contribuyen a la destrucción de organismos patógenos. También pueden participar en la inmunomodulación por la producción de citocinas y neuropéptidos (Renault *et al.*, 2001). Rodrick & Cheng (1974), Cheng & Rodrick (1975) y Genthner *et al.* (1999), estudiaron las enzimas lisosomales y otras enzimas en la hemolinfa de *Crassostrea virginica* y *Mercenaria mercenaria*, encontrando actividad de enzimas como la lisozima, fosfatasa alcalina, β glucuronidasa, amilasa, lipasa y otras.

Los hemocitos de *Dreissena polymorpha*, un mejillón de agua dulce, mostraron actividad fosfatasa ácida, esterasa no específica y β -glucuronidasa. La presencia de hidrolasas y glicosidasas en los gránulos sugiere que estos pertenecen al sistema lisosomal. Además, observaron la presencia de metales traza en los lisosomas de los granulocitos, lo que sugiere que los hemocitos granulares participan en la acumulación de metales, así como en los mecanismos de transporte y detoxificación. (Giamberini *et al.*, 1996). López *et al.* (1997b), caracterizaron las enzimas de los hemocitos de *Ruditapes decussatus* durante varios meses del año no mostrando una variación estacional. Encontraron la presencia de proteasas, glicosidasas, fosfatasas y estererasas, así como actividad lisozima. Cima *et al.* (2000), realizaron una caracterización morfofuncional de los hemocitos de *Tapes philippinarum* y detectaron enzimas hidrolíticas y oxidativas debidas

a la estimulación con levaduras. Tanto los granulocitos como los hialinocitos fueron positivos para fosfatasa alcalina, esterasa no específica, peroxidasa y citocromo C oxidasa, y solamente los granulocitos fueron positivos para β glucuronidasa, esterasa ácida y arilsulfatasa. Luna (2003), encontró actividad hidrolítica en ovocitos, larvas, juveniles y adultos de *C. gigas*. Los niveles más altos de actividad fueron encontrados en hemocitos, observando diferencias relacionadas con los niveles encontrados en plasma. Asimismo, se demostró la presencia de actividad lisozima, la cual mostró diferencias entre edades.

Acetilcolinesterasa

La presencia de acetilcolina (ACh), potente neurotransmisor que es hidrolizado por la acetilcolinesterasa (AChE), ha sido demostrada en todos los reinos del mundo vivo (Horiuchi *et al.*, 2003). La mayoría de los trabajos realizados con la ACh y AChE, se han llevado a cabo en vertebrados e insectos. Los estudios en moluscos bivalvos están enfocados en el efecto de ciertos contaminantes y pesticidas. Galgani *et al.* (1992), seleccionaron la actividad acetilcolinesterasa para medir los efectos de los carbamatos y organofosforos en *Mytilus edulis*. Raineri (1995), localizó actividad AChE mediante histoquímica en embriones y larvas de *Mytilus galloprovincialis*.

Bocquene (1997), estudió el efecto de los insecticidas como los carbamatos y organofosforados en *Pecten maximus* y *Aequipecten opercularis*, los cuales son tóxicos para la mayoría de los organismos, y tienen la capacidad de inactivar colinesterasas en especial la acetilcolinesterasa, tomando el lugar del sustrato natural de la enzima. Hamza *et al.* (1998), probaron el efecto de dos contaminantes en *Ruditapes decosatus* y midieron la actividad acetilcolinesterasa. Talesa *et al.* (2001), detectaron tres formas de la acetilcolinesterasa en *Mytilus galloprovincialis*, dos formas solubles que representaron el 80% de la actividad total y la tercer forma fue purificada de los tejidos y se encontró como un dímero globular con una cola de fosfatidilinositol. Asimismo, tres formas fueron encontradas en *Scapharca inaequivalvis*: dos formas solubles (un tetrámero globular y un dímero con subunidades catalíticas), así como, un dímero menor globular (Talesa *et al.*, 2002).

También Galloway *et al.* (2002), expusieron a *M. edulis* a carbamatos y organofosforados y se midió la enzima AChE en hemolinfa y tejidos. Por otra parte, con el pectínido *P. ziczac* se evaluó la actividad acetilcolinesterasa en la hemolinfa por exposición a insecticidas organofosforados y carbamatos (pesticidas), encontrando cierta inhibición en experimentos agudos *in vivo*, así como, un efecto estacional reflejado en la contaminación del ambiente marino (Owen *et al.*, 2002).

Lau & Wong (2003), estudiaron la enzima que degrada los transmisores neurales de la AChE en *Perna viridis*, y encontraron que es tejido dependiente, tamaño independiente y dependiente de la localización de los tejidos. Robillard *et al.* (2003), estudiaron al mejillón de agua dulce *Anodonta cygnea* donde correlacionaron los factores abióticos con niveles de pesticidas en el agua, encontrando que la relación de CAT y AChE se ve afectada por los factores abióticos sin embargo no existe relación con los niveles de pesticidas en el medio. Asimismo, Bocquené *et al.* (1997), describieron las colinesterasas presentes en *C. gigas*, reportando dos tipos, donde sugieren que son codificadas por genes diferentes.

3. JUSTIFICACIÓN

Las zonas ostrícolas del Noroeste de México han sufrido pérdidas considerables en los cultivos de almejas (llegando en algunos casos al 100%), sin contar con una explicación satisfactoria de las causas del fenómeno. Una de las características de los cultivos acuícolas, incluyendo el de *Nodipecten subnodosus*, es la generación de estrés producidos por agentes tanto bióticos como abióticos. Los eventos tóxicos son un claro ejemplo de agentes bióticos que impactan considerablemente las condiciones de salud de moluscos. El estudio del sistema inmune de *N. subnodosus* es importante para poder evaluar las modificaciones producidas por el medio ambiente o por perturbaciones bióticas. Para ello, es importante detectar y describir los componentes del sistema inmune de estos moluscos como la lisozima, enzimas antioxidantes, oxido nitrico, etc. y buscar las actividades específicas de estos componentes y los genes que los codifican, que son sintetizadas en los hemocitos como respuesta a un estímulo. Adicionalmente, con el uso de nuevas herramientas de biología molecular podría llegarse, en un tiempo corto, a conocer las proteínas involucradas en la defensa de estos organismos, que son sintetizadas en los hemocitos como respuesta a un estímulo. Asimismo, utilizando esta misma metodología es posible conocer las diferencias o similitudes en la respuesta inmune generada por *N. subnodosus* en comparación con otros moluscos, lo que serviría de base para generar hipótesis relacionadas con la diversidad biológica de la respuesta inmune en estos moluscos.

La predicción de la acumulación de tóxicos y la determinación de las cinéticas de incorporación y eliminación de éstos o de otros compuestos nocivos, permitirá una mejora substancial en la estimación de la duración de los efectos, y abrirá posibilidades para encontrar mecanismos de detoxificación. La utilización conjunta de estos conocimientos y sistemas de control progresivamente más optimizados llevará a minimizar tanto los periodos de cierre de las explotaciones, como del costo de los propios sistemas de control, manteniendo la seguridad de los productos obtenidos.

En este trabajo se pretende describir los procesos responsables de la inmunidad de *N. subnosodus*, lo cual permitirá conocer sus posibles mecanismos de acción, incluyendo actividad, activación y control de éstas. Este conocimiento también contribuirá al diseño de metodologías para evaluar la respuesta inmune en procesos infecciosos y el efecto de parámetros ambientales, como el caso de los eventos nocivos y sus especies tóxicas de microalgas-biotoxinas, sobre el sistema de defensa de *N. subnodosus*.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar el efecto de las toxinas paralíticas del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*, en el sistema de defensa de la almeja mano de león, *Nodipecten subnodosus*.

Objetivos particulares

- Obtención de las tasas de ingestión y aclaramiento en juveniles de dos tallas de *N. subnodosus* en función de la concentración de alimento tóxico (*G. catenatum*), en sistemas cerrados, para determinar el efecto de la toxicidad algal en las tasas de alimentación.
- Realizar cortes histológicos en distintos tejidos de *N. subnodosus* para determinar si existe alguna histopatología debido a la alimentación con *G. catenatum*.
- Extracción de las toxinas de *G. catenatum* y determinación de la toxicidad de la cepa mediante ensayo ratón, así como realización de la curva de crecimiento de esta especie. Asimismo, determinar la dosis letal media (DL₅₀) en *N. subnodosus* mediante inyección del extracto crudo de las toxinas de *G. catenatum*.
- Efecto de moléculas relacionadas al sistema de defensa (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, peroxidación de lípidos, enzimas hidrolíticas, acetilcolinesterasa), en branquias, glándula digestiva, manto y músculo de juveniles de *N. Subnodosus* alimentados a diferentes tiempos con *G. catenatum*.
- Efecto de moléculas relacionadas al sistema de defensa (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, peroxidación de lípidos, enzimas hidrolíticas, lisozima, acetilcolinesterasa y óxido nítrico), en la hemolinfa de juveniles de *N. subnodosus* inyectados con el extracto crudo de las toxinas de *G. catenatum*.

5.METODOLOGÍA

DISEÑO EXPERIMENTAL

Cultivo de microalgas y obtención de almejas

El dinoflagelado planctónico marino *Gymnodinium catenatum* (cepa GCCV-6), aislado de Bahía Concepción en Baja California Sur, México, se obtuvo del cepario del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Se cultivó en recipientes de 20 Lt de capacidad, en medio GS-e descrito por Blackburn *et al.* (1989), bajo ciclos de 16:8 h (luz/oscuridad), con lámparas fluorescentes de 70 W, a 22°C en condiciones anaerobias. Para los experimentos de alimentación, los cultivos de *G. catenatum* se obtuvieron al comienzo de la fase exponencial tardía (aproximadamente 10^6 cel/L). Asimismo, la microalga *Isochrysis galbana* (cepa ISG-1) (Parke 1938), se utilizó como fuente de alimento no tóxica de dieta control. *I. galbana* se creció en medio de cultivo MA – F/2, a una salinidad de 3.2 ‰ y una temperatura de 22°C. Durante el periodo de aclimatación las almejas se alimentaron con una mezcla de tres especies de microalgas (*Chaetoceros gracilis*, *C. calcitrans* e *Isochrysis galbana*, 1:1:1), las cuales fueron cultivadas en contenedores de 20 L de capacidad en medio F2 con 24 h de luz. Los organismos de la especie *Nodipecten subnodosus* se obtuvieron del estero Rancho Bueno, Bahía Magdalena, Baja California Sur (24° 32' N; 111° 42' W) de aproximadamente 2-6 cm de altura de concha. Se colocaron en contenedores de 40 L de capacidad a 22°C con aireación constante y agua de mar filtrada (1 µm), para su aclimatación. Se realizaron recambios totales de agua diariamente.

Experimentos de alimentación

Juveniles de *Nodipecten subnodosus* se utilizaron para examinar los efectos de la exposición a *G. catenatum* en la actividad de alimentación y la cinética de la toxina paralítica (PSP). Se llevaron a cabo experimentos a corto plazo (<24 h) para determinar las tasas de ingestión y aclaramiento, así como para ver el efecto de las toxinas en el sistema de defensa en la almeja, mientras que los efectos de la toxina también se examinaron en experimentos a largo plazo (48 h y 24 d). Previo a los experimentos de alimentación, los organismos se acondicionaron durante 48 h a la concentración experimental, así como a los contenedores correspondientes, utilizando un sistema de alimentación tipo riego por goteo. La metodología se presenta resumida en la Figura 5.

Experimentos a corto plazo

Tasas de ingestión y aclaramiento

Las mediciones de las tasas de ingestión (TI) y aclaramiento (TA) se realizaron para obtener la actividad alimenticia de las almejas expuestas a la toxina parálitica (PSP) producida por células de *Gymnodinium catenatum* (con un diámetro aproximado de 35 μm de altura). Las tasas de ingestión y aclaramiento se determinaron con la eliminación de las células algales en suspensión, en sistemas cerrados a lo largo del tiempo, donde sólo se les suministró una vez el alimento a diferentes concentraciones. Se utilizaron dos tallas de almejas de la especie *Nodipecten subnodosus*: 2.77 ± 0.21 y 5.17 ± 0.53 cm. Las almejas se colocaron en recipientes de 1500 mL de capacidad (3 recipientes por tratamiento con 5 ó 3 juveniles por contenedor dependiendo de la talla de la almeja, (2.77 y 5.17 cm de altura respectivamente). El experimento se llevó a cabo en la oscuridad, para evitar el desarrollo de las microalgas. El agua se mantuvo aireada con difusores para que la dieta experimental se distribuyera uniformemente.

Para la talla de 2.77 cm de altura se realizaron 8 tratamientos (4 donde se les suministró *G. catenatum* a diferentes concentraciones y 4 con las mismas concentraciones con la diferencia que a éstas se les adicionó una concentración constante de *Isochrysis galbana* 3.5×10^7 cel/L). Todas las concentraciones experimentales se calcularon para un volumen final de 1500 mL. Para la talla de 5.17 cm de alto solo se probaron 4 tratamientos (4 diferentes concentraciones de *G. catenatum* adicionando una concentración constante de *I. galbana* de 3.5×10^7 cel/L). Las diferentes concentraciones de *G. catenatum* fueron las siguientes: 200, 450, 850 y 1650 cel/mL para ambas tallas. Los controles fueron almejas alimentadas solamente con *I. galbana* (3.5×10^7 cel/Lt), así como almejas sin alimento y recipientes únicamente con las microalgas (sin organismos) en las mismas condiciones. Se utilizó otro recipiente por cada tratamiento con 5 organismos cada uno para realizar cortes histológicos. Se tomaron muestras de la suspensión (5 mL) de cada contenedor al comienzo del experimento, a las 0.25, 1, 2.30 y 7 h. Para la enumeración de las células de *Gymnodinium* estas se fijaron con una solución de formol al 6%. Se utilizaron cámaras Sedwick-Rafter adicionando 1 mL y contando todo el campo a través del microscopio de luz. Para la enumeración del resto de las microalgas se utilizó un contador electrónico (Coulter multisizer) con una apertura de 100 μm .

Las almejas se sacrificaron a las 7 h después de haber comenzado el experimento para determinar el peso total del tejido fresco, alto, largo y ancho de la concha. Se separaron las glándulas digestivas de cada organismo y se combinaron por cada tratamiento. La tasa de aclaramiento se estimó de acuerdo a la ecuación (Coughlan, 1969):

$$TA = \ln(C_0/C_1) \times V/t \times n^{-1}, \quad (14)$$

, donde C_0 y C_1 son la densidad celular inicial y final, respectivamente, V es el volumen de la suspensión, t el intervalo de tiempo y n el número de almejas. Las tasas de ingestión máxima (TI) se calcularon multiplicando la TA por la concentración de células (Bauder *et al.*, 2001).

Efecto de las toxinas

Asimismo, se realizó un experimento de 5 h en almejas de talla de 5.9 ± 0.39 cm de alto. Se aclimataron durante 48 h en sistemas cerrados. Se les suministró una ración única de *Gymnodinium catenatum* de aproximadamente 2×10^7 células por recipiente (20 L), con 15 almejas por recipiente, por triplicado. A las 5 horas de comenzado el experimento las almejas se sacrificaron y se separaron los tejidos (branquia, glándula, manto y músculo) y se juntó cada tejido por separado en tres grupos de cada una de las replicas. Se congelaron a -80°C hasta su procesamiento para la medición de enzimas relacionadas al sistema de defensa de la almeja.

Experimentos a largo plazo.

Los experimentos a largo plazo se llevaron a cabo para determinar la respuesta del sistema de defensa a la exposición por la toxina. Juveniles de *Nodipecten subnodosus* de una talla promedio de 5.9 ± 0.39 cm de altura se aclimataron en sistemas cerrados por dos semanas a 22°C y 35 ‰, en recipientes de 20 L de capacidad con agua de mar filtrada ($1\mu\text{m}$), con 20 organismos por recipiente.

En la etapa de aclimatación se alimentaron con una concentración constante de una mezcla de microalgas (*Chaetoceros gracilis*, *C. calcitrans* e *Isochrysis galbana*, 1:1:1) con una dosis de 300×10^7 cel/recipiente/día. La alimentación se llevó a cabo mediante un sistema de goteo por gravedad racionando la cantidad de alimento por día. Posterior al

periodo de aclimatación, se realizaron dos experimentos uno de 48 h y otro de 24 d. En el experimento de 48 h se determinaron los efectos que podría tener la exposición con el dinoflagelado tóxico por una parte con alimentación discontinua y otra con alimentación continua, en sistemas cerrados con aireación constante. En la alimentación discontinua se le adicionó alimento cada 6 h durante 2 d, mientras que la alimentación continua se llevó a cabo mediante el sistema de goteo por gravedad.

Ambos tratamientos recibieron una concentración total al día por recipiente de aproximadamente 2×10^7 células de *Gymnodinium catenatum*. Después de transcurridas las 48 h se sacrificaron para determinar el peso húmedo total, y se separaron y pesaron los siguientes tejidos por individuo: manto, branquia, músculo y glándula digestiva. Posteriormente se hizo una combinación por tejido de cada uno de los 20 organismos. Para los ensayos bioquímicos relacionados al sistema de defensa se utilizó solamente la glándula digestiva.

En el experimento de 24 d se colocaron 20 organismos en recipientes de 20 L de capacidad, 20 organismos por contenedor. El experimento consistió en un periodo de 12 d alimentados con una concentración constante de *G. catenatum* (aprox. 1×10^6 cel/individuo/día) en combinación con una concentración de 25×10^6 cel/individuo/día de *I. galbana*, y posteriormente al periodo de alimentación se llevó a cabo un periodo de destoxificación de otros 12 d, donde se les alimentó con una concentración de *I. galbana* de 200×10^6 cel/individuo/día. Los controles se alimentaron solamente con *I. galbana* a una concentración de 400×10^6 cel/mL durante los 24 d.

Se hicieron recambios totales cada 2 d para evitar la re-ingestión de la materia fecal. Se removieron 8 almejas cada 4 d (días: 1, 4, 8, 12, 13, 16, 20 y 24) tanto de los controles como de los tratamientos. También se tomaron muestras de *G. catenatum* para realizar los conteos correspondientes y se fijaron en formol al 6%. A las almejas sacrificadas se les disectó el manto, branquias, músculo y glándula digestiva y se combinaron los tejidos iguales de cada uno de los grupos de almejas recolectadas. Se pesaron cada uno de los tejidos, se determinó el peso total del tejido fresco, alto, largo y ancho de la concha. Los tejidos se congelaron a -80°C hasta su procesamiento, utilizándose solamente la glándula digestiva para los ensayos del sistema de defensa de la almeja.

Obtención de la curva de crecimiento de *G. catenatum*

Se inocularon 5000 cel/mL en 50 mL de medio de cultivo GS-e, a 22°C con ciclos 16:8 (luz:oscuridad). Se tomaron muestras cada 4 d y se fijaron con formol al 6%. Se contaron en una cámara Sedwick-Rafter y se obtuvieron las cel / mL. Basados en Guillard (1973), se obtuvieron la tasa de crecimiento específica (μ) y el tiempo de generación (Tg) (ecuaciones 15 y 16).

$$\mu \text{ (divisiones / día)} = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1) \quad (15)$$

x_1 y x_2 , densidades celulares a dos tiempos

$$Tg \text{ (días)} = (\ln 2) / \mu \quad (16)$$

Extracción de la toxina de *G. catenatum*

Se tomaron 2 L de cultivo de *Gymnodinium catenatum* que se encontraban en fase exponencial tardía (aprox. 20 d de cultivo). Se realizó el conteo del número de células. Se centrifugó a 5000 g, durante 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 50 mL de HCl 0.1 N (verificando que el pH se encontrara entre 2-4, si no era así se ajustó con NaOH 0.1 N). Se rompieron con perlas de vidrio y posteriormente se calentaron a ebullición durante 5 min. Se centrifugó a 5000 g por 5 min. La toxina extraída se almacenó a 4°C hasta su utilización.

Prueba de toxicidad. Ensayo ratón

Para probar la toxicidad de la cepa, se utilizaron ratones albinos CD-1 de 19-21 g, de acuerdo al método de la AOAC (1984). A partir de la toxina extraída se inoculó 1 mL del extracto ácido a cada ratón (entre 3 y 5 ratones) por vía intraperitoneal. Se observó al ratón cuidadosamente y se registró el tiempo de muerte. Si el tiempo de muerte o el tiempo medio de muerte de varios ratones fue <5 min, entonces se hicieron diluciones para obtener tiempos de muerte de entre 5-7 min que es el óptimo. Se determinaron los tiempos medios de muerte y de acuerdo a la Tabla de Sommer (Tabla IV, Anexos) se obtuvieron las unidades ratón (UR), obteniendo la media. Si los ratones pesaban < 19 g ó > 21 g, se hizo la corrección para cada ratón multiplicando las unidades ratón correspondientes al tiempo de muerte de cada ratón por el factor de corrección de peso por medio de la Tabla V (anexos). Se obtuvieron los datos en equivalentes de saxitoxina (eq STX) de acuerdo a las ecuaciones 17, 18 y 19.

$$\mu\text{g eq STX} / 1\text{g} = (\text{PUR} \times \text{FC} \times \text{FD} \times 200) / 100 \quad (17)$$

PUR = promedio de las unidades ratón

FC = factor corrección

FD = factor de dilución

UR = unidad ratón

Conociendo que,

$$1\text{UR} = 0.215 \mu\text{g eq STX} \quad \text{UR} / \text{mL} = (\mu\text{g eq STX} / 1 \text{ g}) / 0.2 \mu\text{g eq STX} \quad (18)$$

$$\text{Toxicidad} (\mu\text{g eq STX} / \text{cel}) = (\text{UR}/\text{mL}) / (\text{cel dinoflagelado} / \text{mL}) \quad (19)$$

Experimentos de inyección del extracto crudo

Juveniles de *N. subnodosus* de una talla promedio de 6.15 ± 0.61 cm de altura se aclimataron en sistemas cerrados por dos semanas a 22°C y 35 ‰, en recipientes de 20 L de capacidad con agua de mar filtrada ($1\mu\text{m}$), con 20 organismos por recipiente. En la etapa de aclimatación se alimentaron con una concentración constante de una mezcla de microalgas (*Chaetoceros calcitrans*, *C. gracilis* e *Isochrysis galbana*, 1:1:1) con una dosis de 300×10^7 cel/recipiente/día. La alimentación se llevó a cabo mediante el sistema de goteo por gravedad racionando la cantidad de alimento por día.

Dosis letal media (DL₅₀) en Nodipecten subnodosus

Posterior al periodo de aclimatación, la toxicidad del extracto crudo se determinó de acuerdo al método de DL₅₀ de Molinengo (1979) modificado por Meier & Theakston (1986). Se utilizaron almejas de 6.17 ± 0.67 cm, que se colocaron en recipientes de 20 L de capacidad con aireación continua. Alícuotas de 0.5 mL se inyectaron en el músculo aductor con ayuda de una jeringa de insulina. El nivel de toxicidad se estableció por diluciones seriadas (mg) del extracto crudo (1632, 816, 408, 204, 102 y 51 ng eq sax/cel). Se utilizaron alícuotas similares como blanco empleando HCl 0.1 N sin toxina. Ocho almejas fueron inyectadas por cada dilución y la estimación de la toxicidad aguda se registró midiendo el tiempo que el animal tardaba en morir (tiempo de supervivencia) en un intervalo de 72 h, anotando además el peso de cada animal. Según Molinengo (1979), al graficar D/T (dosis/tiempo supervivencia) en el eje de las abscisas contra la dosis (D) en el eje de las ordenadas se obtiene una línea recta y las constantes de a (pendiente) y b (ordenada al origen) de esta línea de regresión, se extraen con cálculos simples. El punto

a, donde la línea de regresión interseca la ordenada, es la dosis más pequeña del veneno que mata al 50% de los animales experimentales en un tiempo ilimitado y el punto b es el tiempo mínimo de supervivencia. Con lo que tenemos la ecuación lineal: $D = a + b(D/T)$.

Efecto de las toxinas

Se llevaron a cabo dos experimentos para determinar el efecto de la toxina en la hemolinfa, uno de 8 h y otro de 5 d. En el experimento de 8 h, a 15 almejas se les administraron 500 μ l de toxina (80 ng eq sax/cel/mL) a cada almeja mediante una inyección con jeringa de insulina en el músculo aductor. Se observaron los efectos y se les extrajeron aproximadamente 2 mL de hemolinfa a cada organismo después de 8 h de aplicada la inyección. Se hicieron alícuotas de 300 μ l y se mantuvieron a -80°C hasta su procesamiento. La metodología se resume en la Figura 6.

Para el experimento de 5 d se utilizaron 48 almejas a las cuales se les inyectó la misma cantidad de toxina que en el experimento anterior y la hemolinfa se procesó de igual manera. Se colocaron 20 almejas en contenedores de 20 L de capacidad. Se tomaron muestras al azar de 8 organismos a las 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h de iniciado el experimento. Después de la inyección se les siguió alimentando como en el periodo de aclimatación pero a dosis más bajas (*Chaetoceros gracilis*, *C. calcitrans* e *Isochrysis galbana*, 1:1:1; con una dosis de 1×10^6 cel/recipiente/día). Como controles se utilizaron almejas a las cuales se les inyectaron 500 μ l de HCl 0.1 N (no se observaron efectos adversos).

Obtención de extractos de tejidos y procesamiento de la hemolinfa.

A partir de los experimentos donde se procesaron los tejidos estos se homogeneizaron con un pistón de plástico, en una proporción de 100 mg/mL de solución amortiguadora de acuerdo al análisis a realizarse. Asimismo, en los experimentos donde se utilizó la hemolinfa, ésta se obtuvo del músculo aductor con una jeringa de insulina estéril. Se extrajeron entre 1 y 2 mL de cada organismo. La hemolinfa extraída se colocó inmediatamente en hielo para evitar la agregación de los hemocitos. Se hicieron alícuotas de 300 μ l de plasma. Las muestras se utilizaron inmediatamente o fueron congeladas a -80°C .

En los experimentos en los que se utilizó la hemolinfa, se rompieron los hemocitos con la acción mecánica de perlas de vidrio (1:1 w/w), en un vortex con ciclos de 15 seg vortex/ 15 seg hielo, tres veces. Se centrifugó a 5000 g, por 10 min a 4°C y el sobrenadante se congeló a -80°C hasta su procesamiento. La observación y conteo de hemocitos se llevó a cabo fijando la hemolinfa en formol al 6% (1:4 v:v). Los hemocitos se contaron en una cámara Neubauer y con un contador electrónico (Coulter multisizer) con una apertura de 100 µm, obteniéndose el promedio de ambas mediciones

ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

Cuantificación de proteína

El ensayo para determinar la cantidad de proteína soluble se realizó por medio del kit “Bio-Rad” el cual esta basado en el método de Bradford (1976). Este es un ensayo en el cual el colorante azul de Coomasie cambia de coloración en respuesta a diferentes concentraciones de proteína. Este colorante se enlaza principalmente con residuos de aminoácidos como arginina. La determinación de la coloración del pigmento se realizó espectrofotométricamente por el método de microplaca con previa elaboración de una curva estándar de albúmina sérica bovina (1mg/mL).

Cuantificación de carbohidratos

La cuantificación de carbohidratos se determinó de acuerdo al método de Strickland & Parsons (1972), el cual se basa en la reacción con antrona en material orgánico, en base a su simplicidad y sensibilidad. En este método todas las hexosas (en la forma de mono o polisacáridos) son expresadas como equivalentes de la cantidad de glucosa. Las metilpentosas también son reportadas cuantitativamente como un equivalente en peso de glucosa. Las pentosas (monómeros o polímeros) y los hexuronidos son registrados como una fracción del equivalente de la cantidad de hexosa. La determinación se realizó espectrofotométricamente por el método de microplaca con previa elaboración de una curva estándar con glucosa (10 mg/mL).

Cuantificación lípidos totales

La determinación de lípidos totales se determinó de acuerdo al método de sulfovainillina descrito por Barnes & Blackstock (1973). Este método estima los lípidos totales en tejidos de animales marinos y depende de la reacción de los lípidos con el ácido sulfúrico, ácido fosfórico y vainillina para dar un complejo color rojo. Este método colorimétrico ha sido estandarizado para lípidos totales de suero de sangre determinados gravimétricamente. La determinación se realizó espectrofotométricamente por el método de microplaca con previa elaboración de una curva estándar de colesterol en etanol (10 mg/mL, Merck ó Boehringer Mannheim).

Enzimas antioxidantes

Superóxido Dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1)

La superóxido dismutasa es una enzima cuyo sustrato es un radical libre inestable, por lo que la medición de su actividad catalítica debe ser indirecta. Normalmente un ensayo para esta enzima consiste en dos componentes: un generador del radical superóxido y un detector de éste. Un detector es una sustancia que resulta modificada debido al poder reductor del radical superóxido. El generador del radical debe producirlo a una tasa constante. El radical reaccionará con el detector en ausencia de la SOD. Si la SOD está presente competirá con el detector por el radical superóxido. Un ensayo confiable de entre los ensayos disponibles, es el espectrofotométrico inicialmente descrito cuando la función de SOD fue identificada (McCord & Fridovich, 1969). En este ensayo la reacción xantina/xantina oxidasa es la generadora del radical libre y el citocromo C es el detector de éste. Por lo tanto, este ensayo es una técnica que se basa en la inhibición de la reducción del citocromo C por la SOD.

Glutación peroxidasa (GPX, EC 1.11.1.9)

Glutación peroxidasa es una seleno enzima localizada en el citosol y en la membrana interna mitocondrial. Esta enzima es menos eficaz que CAT en la reducción de H_2O_2 , pero reduce eficientemente a los peróxidos de lípidos a expensas de glutatona (GSH) como sustrato reductor. La glutatión reductasa (GS-SG) formada en la reacción es nuevamente reducido a GSH por la enzima glutatona reductasa, usando a NADPH como cosustrato; generado por la actividad catalítica de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en el ciclo de las pentosas. Las peroxidasa son inducibles bajo varias condiciones de estrés

oxidativo que causan el incremento de H_2O_2 y la peroxidación de las biomoléculas. Peróxido de hidrógeno (GPX dependiente de Se) o hidroperóxido de cumeno (GPX total: GPX dependiente de Se + actividad de glutatión S-transferasas) pueden ser usados como sustratos de la GPX. La actividad de esta enzima se determina siguiendo los cambios de extinción del NADPH a 340 nm (coeficiente de extinción $6.2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), al acoplar la producción de GSSG a la reacción de la enzima glutatión reductasa a saber.

Catalasa (CAT, E.C. 1.11.1.7)

El producto de la actividad de SOD, puede ser removido por la actividad de catalasa. Las catalasas son proteínas homotetraméricas que contienen grupos hemínicos; la masa de cada subunidad es 50 kDa, aproximadamente. La CAT está asociada principalmente a los peroxisomas y cierta actividad se encuentra en el citosol.

La actividad catalasa se determinó de acuerdo a Aebi (1985), por registro de la disminución de la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a 240 nm con base a un coeficiente de extinción $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, donde 1 unidad de catalasa descompone $1 \mu\text{mol}$ de $H_2O_2 \text{ min}^{-1}$. Por lo tanto el cambio en la densidad óptica (desaparición del peróxido de hidrógeno) por unidad de tiempo es una medición de la actividad catalasa.

Enzimas hidrolíticas

Lisozima (LIS, EC 3.2.1.17)

La actividad lisozima (muramidasa) se determinó mediante el método de Lie *et al.* (1986). El ensayo se basa en la medición de la actividad lisozima mediante la lisis de la pared celular de *Micrococcus lysodeikticus*. La lisozima hidroliza las uniones β -(1-4) glicosídicos entre el ácido N-acetil murámico y los residuos de N-acetil-D-glucosamina presentes en los mucopolisacáridos de la pared celular de una gran variedad de microorganismos.

Sistema API ZYM

El kit comercial para la detección de la actividad enzimática (API ZYM; BioMérieux) es un micrométodo semicuantitativo colorimétrico que permite detectar 19 diferentes actividades enzimáticas tales como proteasas (leucil arilamidasa, valyl amidasa, cistil arilamidasa, tripsina, α -quimiotripsina), lipasas (lipasa estereasa (C8), lipasa (C14)), glicosidasas (α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -

glucosaminidasa, α -manosidasa, α -fucosidasa), esterasas (esterasa (C1)), y fosfatasas (fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, naftol fosfohidrolasa). La detección se realizó de acuerdo al fabricante. Las actividades enzimáticas se expresaron como el sustrato hidrolizado en nanomoles por gramo de proteína (nmol/mg proteína).

Peroxidación de lípidos

Un método sensible y reproducible utilizado como indicador de la peroxidación de lípidos es la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El ensayo se basa en la producción de malondialdehído (MDA) como producto de la peroxidación de lípidos que se genera tras la descomposición de los hidroperóxidos, y que puede reaccionar con ácido tiobarbitúrico para formar un complejo: este complejo puede detectarse por espectrofotometría o por fluorescencia. La reacción del TBA con MDA ocurre a pH ácido (1.5-3.0), y está influenciada por la presencia de ácidos en la solución (HCl, ácido perclórico, ácido fosfórico, etc.), y posiblemente también por la fuerza iónica. La actividad se detecta a una absorbancia de 532 nm (Hermes-Lima *et al.*, 1998). Para estimar la peroxidación se determinó colorimétricamente la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), cuantificado como equivalentes de malondialdehído (MDA) por mg de proteína (Persky *et al.*, 2000).

Oxido Nítrico (ON)

En una solución acuosa, el ON se degrada rápidamente a nitrato y nitrito, por lo que la producción integrada de óxido nítrico puede ser estimada de la determinación de las concentraciones de los productos finales de nitritos y nitratos. La cuantificación espectrofotométrica del nitrito utilizando la reacción de Griess, un método comúnmente utilizado, es directa pero no mide el nitrato. Esta prueba emplea la enzima nitrato reductasa dependiente de NADG o reductantes químicos (como el cadmio ó zinc), para cuantificar la conversión de nitrato a nitrito previo a la cuantificación del nitrato utilizando el reactante de Griess proveyendo de esta manera una determinación exacta de la producción total de NO (Arumugam *et al.*, 2000). El método colorimétrico de Griess es ampliamente utilizado y se basa en dos pasos de diazotización en donde el NO_2^- en la muestra reacciona con ácido sulfanílico para producir un ion diazonio, el cual es

posteriormente acoplado a la N-(naphtyl) etilenediamina para formar un derivado azo cromofórmico. Aunque la reacción de Griess es simple y rápida, el límite de detección para la NO_2^- es solamente de 0.1-1 μM , con lo que se restringe su aplicación en muestras biológicas (Gharavi & El-Kadi, 1999).

Acetilcolinesterasa (AChE, E.C. 3.1.1.7)

La actividad de la hidrólisis de la acetilcolinesterasa, sobre el sustrato específico acetiltocolina, se cuantifica espectrofotométricamente midiendo el incremento del color amarillo producido por la presencia de 5-tio-2-ácido nitrobenzoico (TNB), el cual es producto de la reacción de tiocolina y el 5-5-diotiobis-(2-ácido nitrobenzoico, DNTB), y la actividad se determina a una absorbancia a 412 nm. Una unidad de acetilcolinesterasa se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la hidrólisis de 1 μM de acetilcolina por minuto.

Cortes histológicos

Los cortes histológicos se realizaron en organismos de 2.7 ± 0.7 cm de altura de concha, expuestos durante 7 horas al dinoflagelado tóxico *G. catenatum*. Se utilizó el proceso de inclusión en parafina, y tinción con hematoxilina-eosina. Esta técnica utiliza dos colorantes: en primer lugar los cortes se someten a la acción de la **hematoxilina**, colorante básico, que se une a cualquier sustancia que tenga grupos ácidos, tales como los grupos fosfato del ADN y a las proteínas nucleares que poseen carga negativa. A continuación, los cortes se someten a la acción de la **eosina**, colorante débilmente ácido, que colorea a las estructuras básicas. Una vez realizados los cortes se analizaron mediante microscopía óptica (Junqueira, 1988).

Estadísticos

Los efectos de las diferentes concentraciones de dinoflagelados tóxicos administrados como alimento en las tasas de ingestión y aclaramiento, se examinaron utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Las diferencias significativas entre las medias de las tasas alimenticias se probaron con el análisis de diferencias de medias SHD Tukey. Se utilizó la prueba t de Student para detectar diferencias significativas en las actividades enzimáticas entre los controles y los organismos alimentados o inyectados con el dinoflagelado tóxico, utilizando el software *Statistica 5.5* y *SPSS 11.0* para Windows.

TEJIDOS

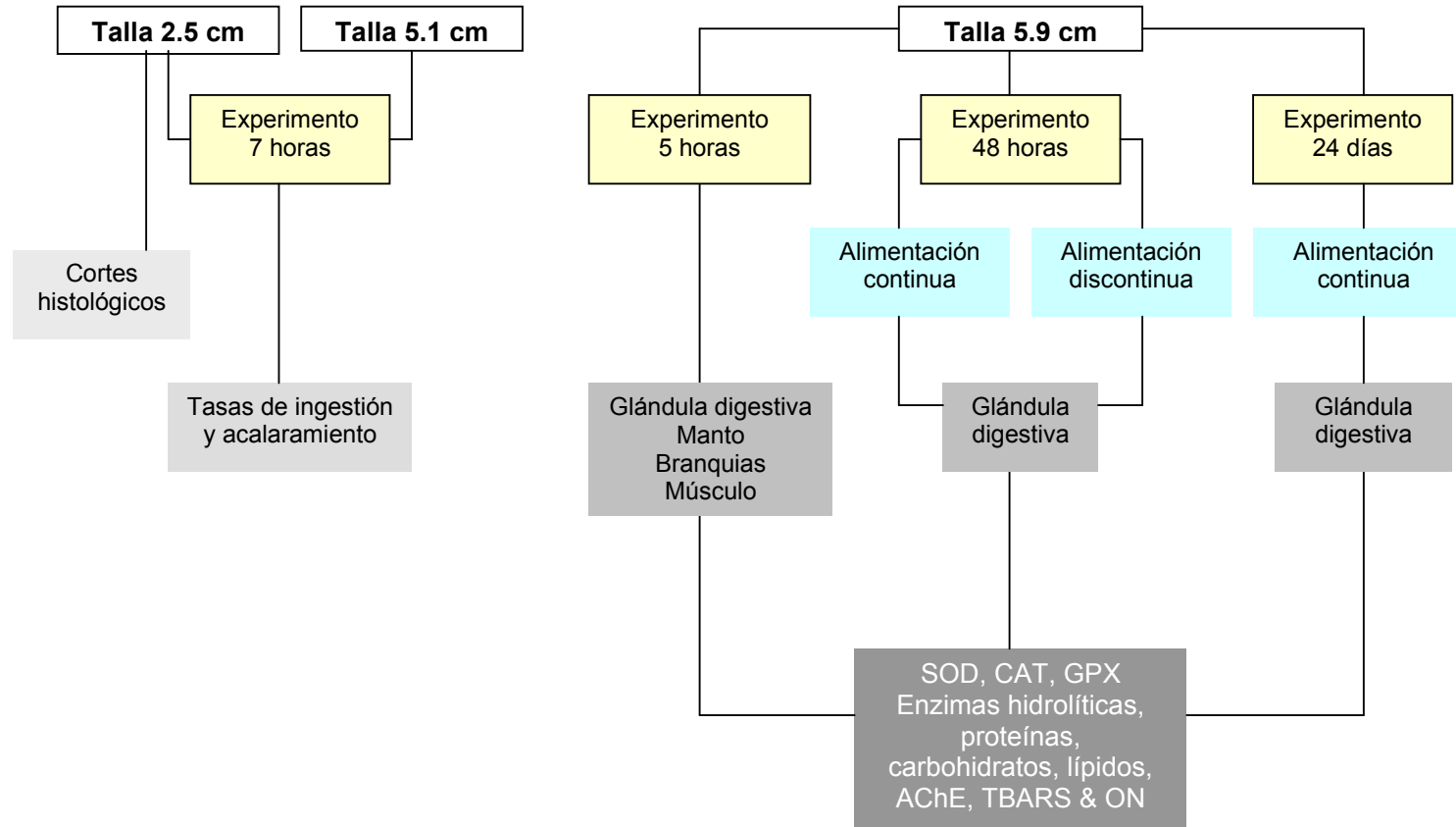


Figura 5. Diagrama de flujo que muestra de manera general la metodología utilizada en este trabajo. Experimentos de alimentación con *Nodipecten subnodosus* expuestos a *Gymnodinium catenatum*: tallas de las almejas, duración del experimento, forma de alimentación con el dinoflagelado tóxico, tejidos utilizados para los ensayos, forma de procesamiento de las muestras, análisis bioquímicos. Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), enzimas hidrolíticas, acetilcolinesterasa (AChE), peroxidación lípidos (TBARS) y óxido nítrico (ON).

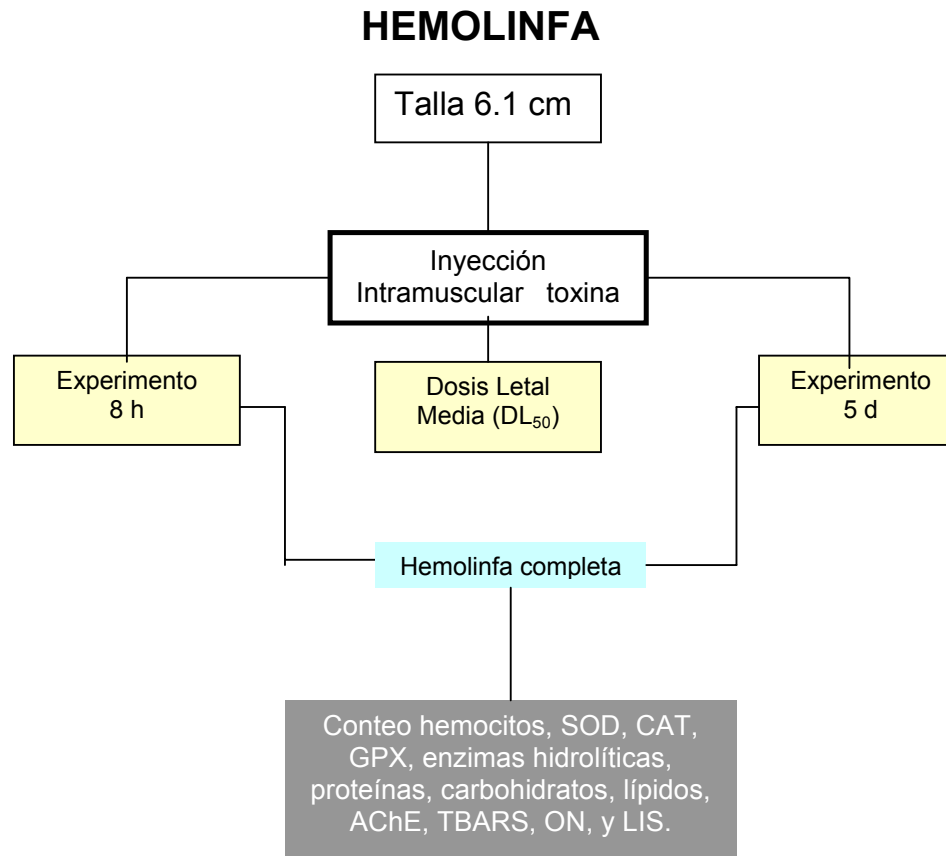


Figura 6. Diagrama de flujo que muestra de manera general la metodología utilizada para analizar la hemolinfa de *Nodipecten subnodosus*. Exposición a la toxina de *Gymnodinium catenatum* mediante una inyección en el músculo aductor de *Nodipecten subnodosus*: talla de las almejas, forma de administración de la toxina, duración del experimento, forma de procesamiento de las muestras, análisis bioquímicos. Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), enzimas hidrolíticas, acetilcolinesterasa (AChE), peroxidación lípidos (TBARS), óxido nítrico (ON) y lisozima (LIS).

6. RESULTADOS

Características generales de *Nodipecten subnodosus*

Altura de las conchas y peso húmedo

La Figura 7 muestra la relación entre la altura de la concha y el peso húmedo de los tejidos de *Nodipecten subnodosus*. Las tallas de las almejas utilizadas en este estudio fueron: 2.7 ± 0.2 , 5.1 ± 0.07 , 5.9 ± 0.39 y 6.15 ± 0.61 cm. Los resultados muestran una mayor correlación ($R^2 = 0.5295$) entre talla y peso en los organismos de menor edad. Asimismo, la Figura 8 representa el porcentaje de contribución de tejidos individuales al peso húmedo total. En ambas figuras se observa que la relación es muy similar para todas las clases de talla; sin embargo, en las tallas de 5.9 y 6.1 cm el músculo aductor contribuyó con el mayor porcentaje respecto al peso húmedo total para así dar lugar también a una reducción en el porcentaje del peso de las branquias respecto al total. Cabe mencionar que en la talla más grande se encontraron individuos con gónadas en etapa de maduración y algunos con gónadas maduras.

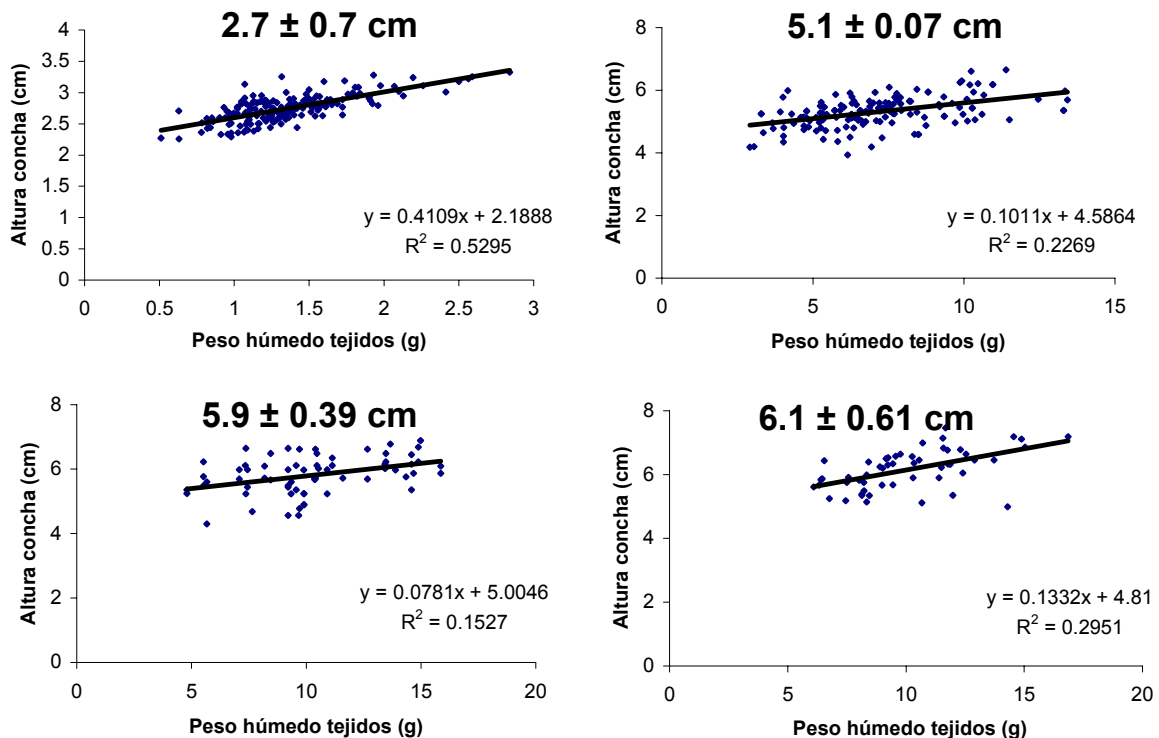


Figura 7. Descripciones alométricas de altura de la concha en relación con el peso húmedo de tejido, de las clases de tallas de *Nodipecten subnodosus* empleadas en el presente trabajo (media \pm desviación estándar de las clases de talla). En cada gráfica se presenta la ecuación que mejor describe la recta y la R^2 .

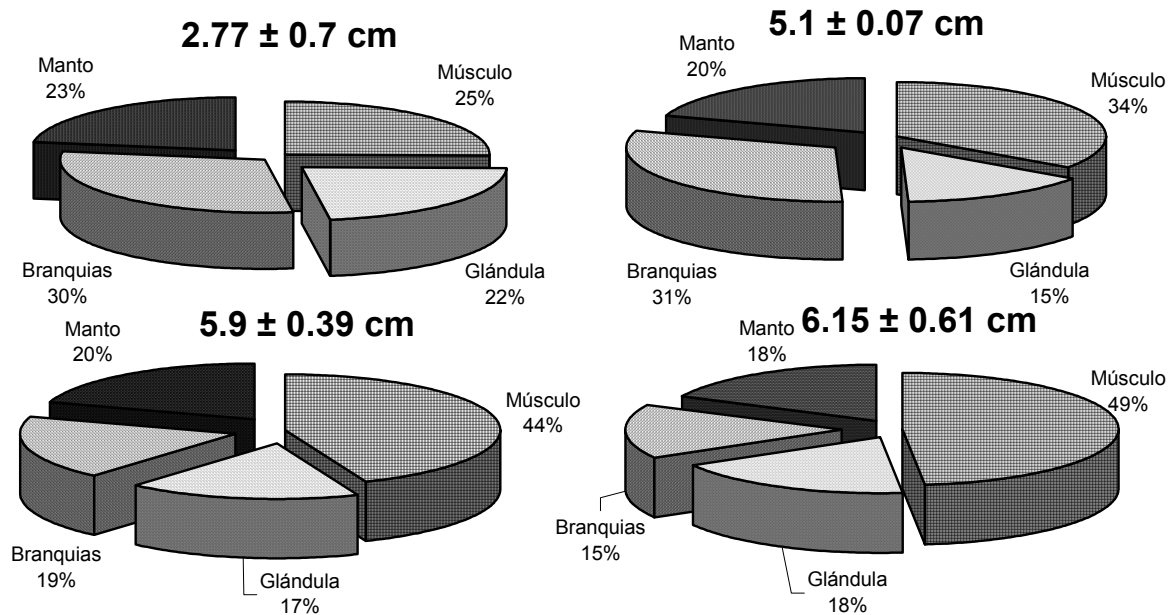


Figura 8. Porcentaje de contribución individual de tejidos al peso húmedo total en *Nodipecten subnodosus*, de las clases de talla empleadas en el presente trabajo (media \pm desviación estándar). El peso húmedo total para las clases de talla es el siguiente: 2.77 \pm 0.7 cm, 1.35 \pm 0.38 g; 5.1 \pm 0.07 cm, 7.03 \pm 2.28 g; 5.9 \pm 0.39 cm, 10.91 \pm 3.54 g; 6.15 \pm 0.61 cm, 10.44 \pm 3.06 g).

Características generales de *Gymnodinium catenatum*

Curva de crecimiento y toxicidad

Gymnodinium catenatum es un dinoflagelado atecado, con un flagelo transversal y otro longitudinal, que le permiten desplazarse en el medio acuático. Se encontró en los cultivos tanto como organismos solitarios, así como, en formaciones en cadena de hasta 64 organismos, siendo más comunes las formaciones de 4 y 8 organismos (Fig. 9). Se obtuvo la curva de crecimiento a 22°C y medio de cultivo GS-e: el cultivo alcanzó la fase estacionaria aproximadamente a los 25 d, con una tasa de división de 0.28 cel/d y un tiempo de generación de 2.4 d. Asimismo, mediante el ensayo ratón se obtuvo la toxicidad de la cepa al comienzo de la fase estacionaria obteniendo un valor de 51 ng equivalentes de saxitoxina/cel (Fig. 10).



Figura 9. *Gymnodinium catenatum*. Talla $31 \pm 3.3 \mu\text{m}$ de alto y $26 \pm 2.7 \mu\text{m}$ de ancho. A) Cadena de 16 organismos. B) dinoflagelado en proceso de división asexual. C) se observa la posición de los flagelos longitudinal (LF) y transversal (TF). © Yuki & Yoshimatsu (1987).

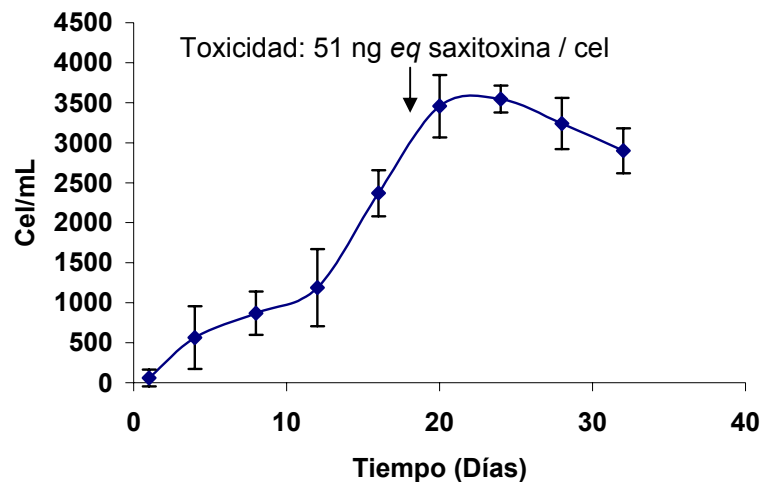


Figura 10. Curva de crecimiento de *Gymnodinium catenatum* (media \pm desviación estándar). Medio de cultivo GS-e. Tasa de división 0.28 cel/día y el tiempo de generación fue de 2.4 d, a 22°C de temperatura (N=5). La prueba de toxicidad de la cepa se realizó a los 18-20 d de crecimiento cuando se encontraba en la fase exponencial tardía, mediante el ensayo ratón de la AOAC.

Tasas de ingestión y aclaramiento de *N. subnodosus*

Se determinaron las tasas de ingestión y aclaramiento en dos tallas (2.7 ± 0.2 y 5.1 ± 0.07 cm) de juveniles de almeja mano de León (*Nodipecten subnodosus*) expuestos a diferentes concentraciones de alimento: se utilizó una concentración constante de la microalga *Isochrysis galbana*, en algunos casos (como alimento no tóxico) y diferentes concentraciones del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* como alimento tóxico, a una temperatura constante de 22°C. Estas tasas se determinaron utilizando un sistema cerrado con aireación constante, en donde se monitoreó el decremento en la densidad de células algales de *G. catenatum* por unidad de tiempo, y se utilizó a *I. galbana* como alimento control (Fig. 11).

Respecto a los organismos con un promedio de talla de 2.7 cm, se observó que las almejas alimentadas con una combinación de *I. galbana* y *G. catenatum* mostraron tasas de ingestión menores que los organismos que solo fueron alimentados con *G. catenatum* (Tabla II). Sin embargo, las tasas de aclaramiento fueron similares con las diferentes concentraciones tratadas de *G. catenatum* con o sin *I. galbana* (Tabla III). En general, no se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos con las mismas concentraciones de *G. catenatum* (con o sin *I. galbana*). Sin embargo, se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos que fueron expuestos a diferentes concentraciones de *G. catenatum*.

Los valores máximos de las tasas de ingestión y aclaramiento se obtuvieron en la concentración de partículas más altas (850 y 1650 cel/mL), sin embargo, en estas concentraciones se observó la producción de pseudoheces lo cual es indicativo de que se presentó un rechazo por parte de los organismos a una porción del alimento ofrecido. Además, a concentraciones iniciales mayores de 800 cel/mL de *G. catenatum*, después de transcurridas 2 h, todavía no habían ingerido todo el material expuesto (las valvas se mantuvieron parcialmente cerradas), siendo que con la concentración más elevada de dinoflagelados (1650 cel/mL), las almejas presentaron una inhibición en el comportamiento de alimentación a partir de 1 h de exposición, con gran producción de pseudoheces, reactivando la ingestión de células aproximadamente a las 5 h; asimismo, con la combinación de *I. galba* y *G. catenatum*, a esta concentración, aún después de transcurridas 7 h, las almejas no habían ingerido todo el material, mientras que los controles presentaron tasas de ingestión y aclaramiento, a la hora de comenzado el experimento, de *I. galbana* de 4×10^6 cel/individuo/h y 2.3 L/individuo/h, respectivamente (Tablas II y III).

Tabla II. Tasas de ingestión (media \pm desviación estándar) en juveniles de *Nodipecten subnodosus* expuestos a diferentes concentraciones de *Gymnodinium catenatum*, durante 7 h, en dos tallas: a) 2.77 ± 0.21 y b) 5.17 ± 0.53 cm. Los resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para las diferentes concentraciones, están indicados por letras en la misma columna. Letras iguales dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas (ANOVA $P > 0.05$). Las celdas vacías indican que habían consumido todo el alimento suministrado.

a					
Tratamiento	Concentración <i>G. catenatum</i> (cel/mL)	Tasas de ingestión (cel/ ind / h)			
		Tiempo de muestreo			
		(0.25 h)	(1 h)	(2.30 h)	(7 h)
1	200 *	12 \pm 6.0 ^a	26 \pm 2.1 ^a		
2	450 *	31 \pm 1.7 ^{ab}	60 \pm 9.3 ^{ab}		
3	850 *	60 \pm 6.8 ^c	128 \pm 20 ^{abc}	145 \pm 13.1 ^a	
4	1650 *	157 \pm 9.3 ^d	250 \pm 17 ^c	280 \pm 19 ^b	300 \pm 120 ^a
5	200	16 \pm 8.7 ^a	27 \pm 5.9 ^a		
6	450	29 \pm 8.3 ^{ab}	70 \pm 10.1 ^a		
7	850	80 \pm 11.5 ^{bc}	145 \pm 12.7 ^a	162 \pm 11.7 ^c	
8	1650	172 \pm 10.6 ^d	261 \pm 33.2 ^c	311 \pm 7.3 ^d	322 \pm 45 ^b
b					
9	200 *	37 \pm 2.5 ^a	57 \pm 5.1 ^a		
10	450 *	112 \pm 8.3 ^b	130 \pm 2.9 ^b		
11	800 *	232 \pm 15.5 ^c	255 \pm 14 ^c	279 \pm 13.9 ^b	
12	1650 *	397 \pm 10.4 ^d	489 \pm 4 ^d	543 \pm 22.1 ^c	

*se agregó una concentración constante de *Isochrysis galbana* (3.5×10^7 cel/L).

Tabla III. Tasas de aclaramiento (media \pm desviación estándar) en juveniles de *Nodipecten subnodosus* expuestos a diferentes concentraciones de *Gymnodinium catenatum*, durante 7 h, en dos tallas: a) 2.77 ± 0.21 y b) 5.17 ± 0.53 cm. Los resultados de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para las diferentes concentraciones, están indicados por letras en la misma columna. Letras iguales dentro de la misma columna no presentan diferencias significativas (ANOVA, $P > 0.05$). Las celdas vacías indican que habían consumido todo el alimento suministrado.

a					
Tratamiento	Concentración <i>G. catenatum</i> (cel/mL)	Tasa de aclaramiento (L/ ind / h)			
		Tiempo de muestreo			
		(0.25 h)	(1 h)	(2.30 h)	(7 h)
1	200 *	0.44 \pm 0.26 ^a	0.31 \pm 0.13 ^a		
2	450 *	0.50 \pm 0.03 ^a	0.33 \pm 0.08 ^a		
3	850 *	0.52 \pm 0.07 ^a	0.41 \pm 0.08 ^a	0.24 \pm 0.10 ^a	
4	1650 *	0.77 \pm 0.21 ^a	0.42 \pm 0.17 ^a	0.24 \pm 0.09 ^a	0.10 \pm 0.13 ^a
5	200	0.58 \pm 0.44 ^a	0.32 \pm 0.41 ^a		
6	450	0.46 \pm 0.17 ^a	0.43 \pm 0.09 ^a		
7	850	0.75 \pm 0.50 ^a	0.57 \pm 0.37 ^a	0.39 \pm 0.14 ^a	
8	1650	0.88 \pm 0.08 ^a	0.46 \pm 0.16 ^a	0.36 \pm 0.19 ^a	0.16 \pm 0.8 ^a
b					
9	200 *	1.46 \pm 0.15 ^a	1.05 \pm 0.29 ^a		
10	450 *	2.72 \pm 0.41 ^b	1.09 \pm 0.07 ^a		
11	850 *	3.41 \pm 0.57 ^c	1.24 \pm 0.22 ^a	0.91 \pm 0.35 ^a	
12	1650 *	2.55 \pm 0.13 ^b	1.19 \pm 0.03 ^a	0.93 \pm 0.55 ^a	

*se agregó una concentración de *Isochrysis galbana* (3.5×10^7 cel/L).

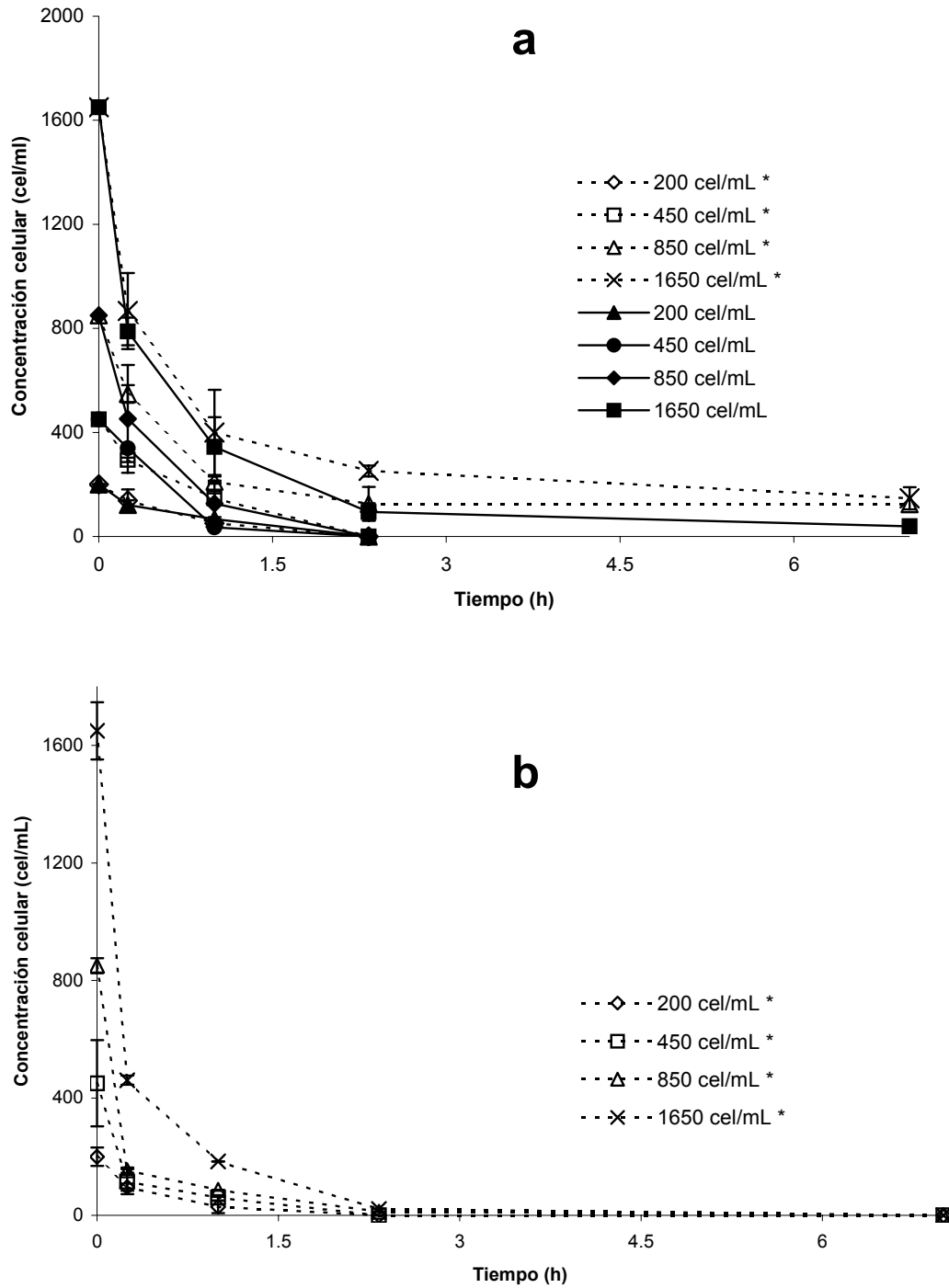


Figura 11. Ingestión de células durante 7 h (media \pm desviación estándar) en *Nodipecten subnodosus* de dos tallas: a) 2.77 ± 0.21 y b) 5.17 ± 0.53 cm. Cantidad de alimento que consumieron a lo largo del tiempo. (*) en ambas gráficas los puntos con líneas punteadas denotan que además de agregarse diferentes concentraciones de *Gymnodinium catenatum* se les agregó una concentración constante de *Isochrysis galbana* de 3.5×10^7 ce/L.

Como lo muestran las Tablas II y III, en las almejas con talla de 5.1 cm, las tasas de ingestión y aclaramiento fueron elevadas durante los primeros minutos para todas las concentraciones, no observándose producción de pseudoheces. Sin embargo, después de aproximadamente 1 h de haber comenzado el experimento, filtraron más lento, siendo que las almejas expuestas a las concentraciones menores consumieron todo el alimento aproximadamente a las 2.3 h, y a concentraciones por arriba de las 800 cel/mL consumieron todo el alimento después de aproximadamente 4-5 h (Fig. 11). El análisis de varianza muestra diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos para las tasas de ingestión, y en general no se presentaron diferencias en las tasas de aclaramiento.

Comparando el alto de ambas tallas las almejas más grandes mostraron mayor capacidad de filtración y aclaramiento de partículas, que las almejas de talla chica (Fig. 12). De acuerdo a los datos obtenidos se puede afirmar que la concentración de dinoflagelados que no genera el rechazo del alimento y por lo tanto la producción de pseudoheces, se encuentra por debajo de las 800 cel/mL para la talla de 2.7 cm y de 1650 cel/mL para la talla de 5.1 cm.

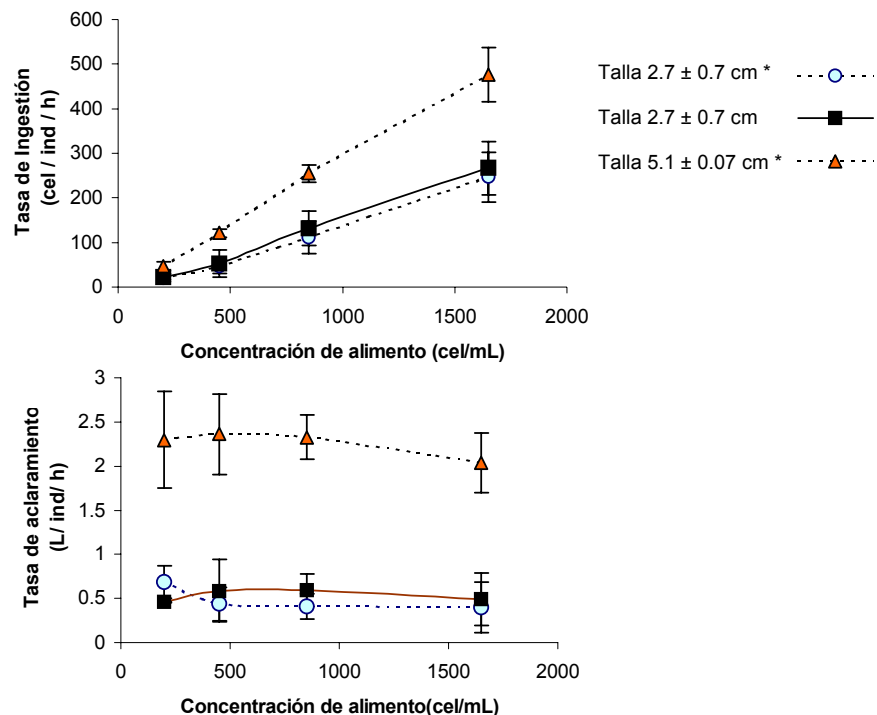


Figura 12. Media \pm desviación estándar de la relación de las tasas de ingestión y aclaramiento con las diferentes concentraciones de *Gymnodinium catenatum*, a distintos tiempos. (*) Además de las distintas concentraciones de *G. catenatum* se agregó una concentración constante de 3.5×10^7 cel/L de *Isochrysis galbana*.

Sistema de defensa en *Nodipecten subnodosus*

Experimentos cortos de alimentación (<48 h)

5 horas de exposición al dinoflagelado tóxico. Mediciones en glándula digestiva, branquia, manto y músculo.

En la Figura 13 se presentan los niveles de actividad de diversas enzimas, así como las cantidades de otras biomoléculas, en diferentes tejidos en almejas de la talla de 5.9 ± 0.39 cm, expuestas a una concentración única de 1500 cel/mL durante 5 h. Físicamente se observó el cierre parcial de las valvas durante las primeras dos horas del experimento de los organismos alimentados con el dinoflagelado tóxico. En proteínas, lípidos y carbohidratos totales de los organismos tratados, se observa una tendencia a la disminución en la cantidad de estos parámetros, aunque no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos y controles ($P > 0.05$). Con excepción de la actividad acetilcolinesterasa todas las enzimas presentaron los niveles más altos en la glándula digestiva, así como también la concentración de proteínas, lípidos, carbohidratos y peroxidación de lípidos fueron mayores en este tejido, siendo el músculo el que mostró las menores actividades enzimáticas. Cabe resaltar que las branquias de los organismos alimentados con *Gymnodinium catenatum* presentaron una elevada peroxidación de lípidos, así como elevados niveles de glutatión peroxidasa, existiendo una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

La Figura 14 muestra las enzimas detectadas con el sistema API ZYM en los tejidos de *Nodipecten subnodosus*. A excepción de la fosfatasa ácida, se encontraron las otras 18 enzimas que contiene el kit. Se observa que estas enzimas están ampliamente distribuidas en los tejidos de las almejas. Cabe señalar en branquias la presencia de tripsina, quimiotripsina y α galactosidasa en los tratamientos, enzimas que no se encontraron en los controles, así como diferencias significativas ($P < 0.05$) en fosfatasa alcalina y esterasa (C4), mostrando niveles más elevados que los controles. Asimismo, en la glándula digestiva de los organismos tratados se presentó la actividad lipasa, pero en los controles no, sin embargo la actividad α galactosidasa no estuvo presente en los tratamientos, así como la α manosidasa disminuyó significativamente en los tratamientos ($P < 0.01$). En el manto y músculo se observaron efectos marcados en varias glicosidasas ($P < 0.01$): las actividades de β glucuronidasa, α glucosidasa, α manosidasa y α fucosidasa disminuyeron en el manto de los organismos tratados, mientras que la β glucuronidasa, α manosidasa y α fucosidasa aumentaron en los organismos control en el músculo.

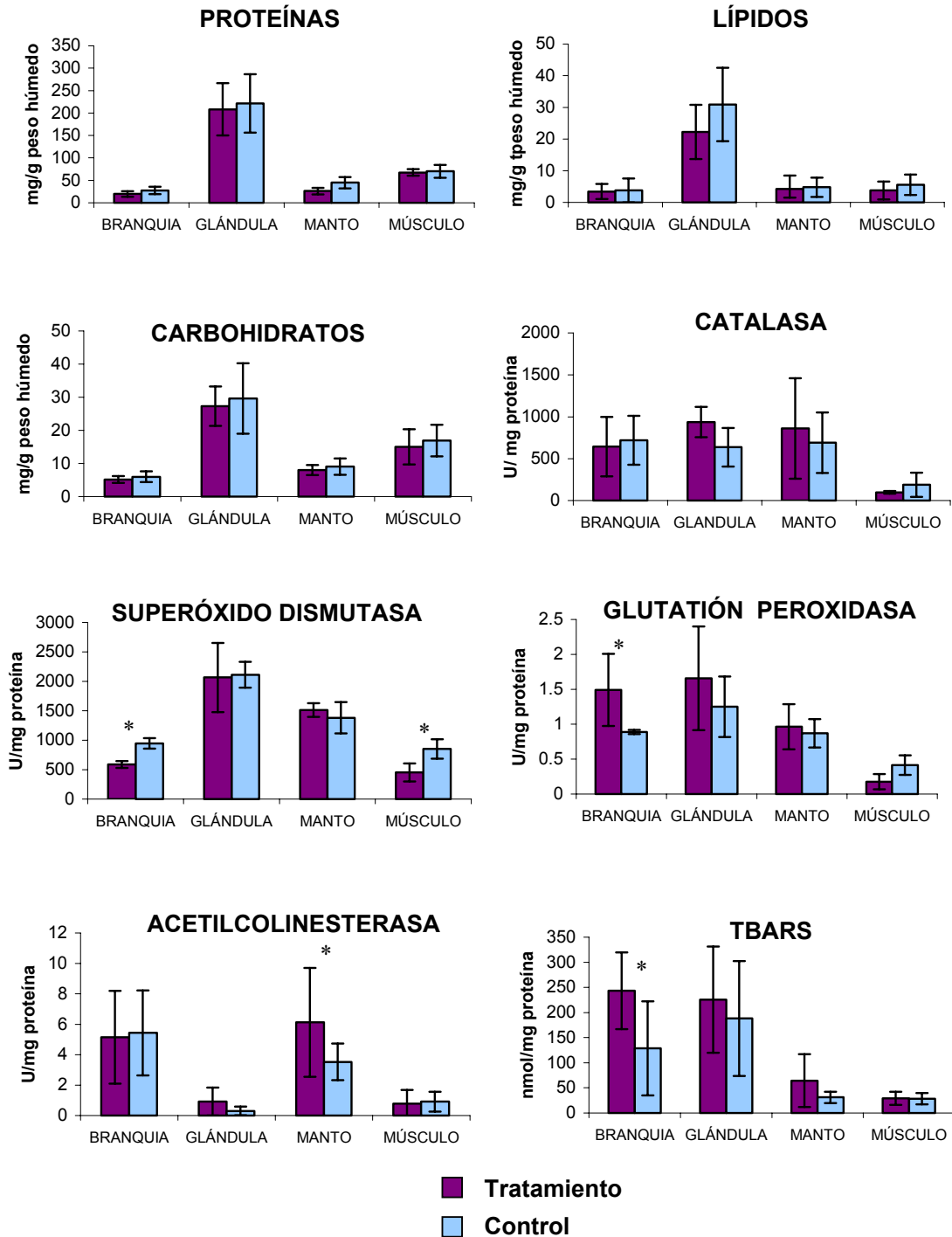


Figura 13. Se muestran las concentraciones de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como, la actividad de diversas enzimas en organismos de la especie *Nodipecten subnodosus* alimentadas con *Gymnodinium catenatum*. Talla 5.9 ± 0.39 cm. Los asteriscos (*) muestran diferencias estadísticas significativas entre controles y tratamientos ($P < 0.05$). Las unidades enzimáticas se definieron: catalasa, glutatión peroxidasa y acetilcolinesterasa $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína; superóxido dismutasa, U mg^{-1} proteína; sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), nmol malondialdehído (MDA) mg^{-1} proteína.

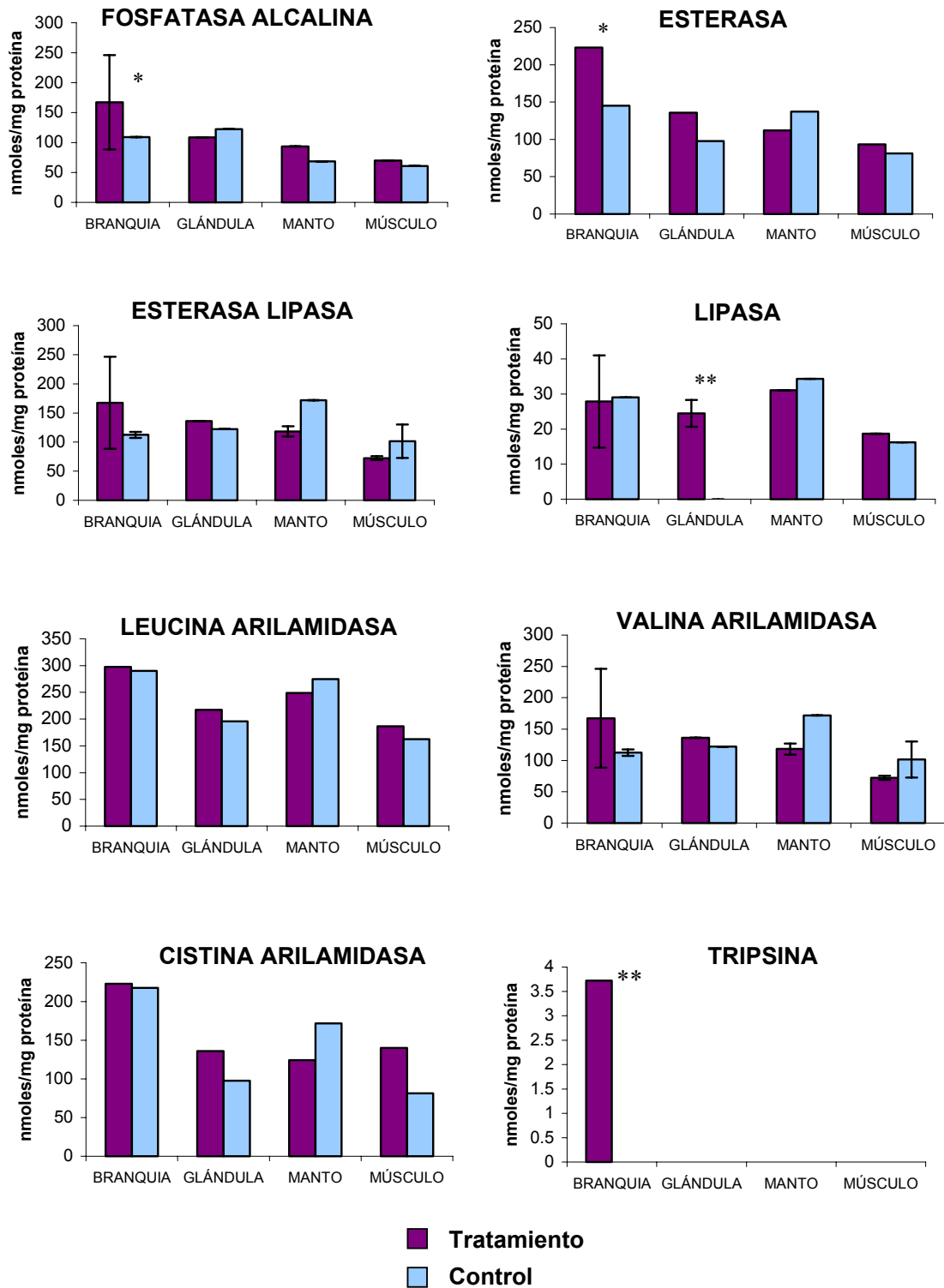


Figura 14. Actividad de enzimas hidrolíticas en los tejidos de *Nodipecten subnodosus* alimentada con *Gymnodinium catenatum*. Talla de 5.9 ± 0.39 cm. Duración del experimento 5 h. Se utilizó el sistema API ZYM (sustrato hidrolizado, nmoles mg proteína⁻¹). Los valores son la media \pm desviación estándar, de los organismos combinados por tejido, por triplicado. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas significativas entre controles y tratamientos (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

RESULTADOS

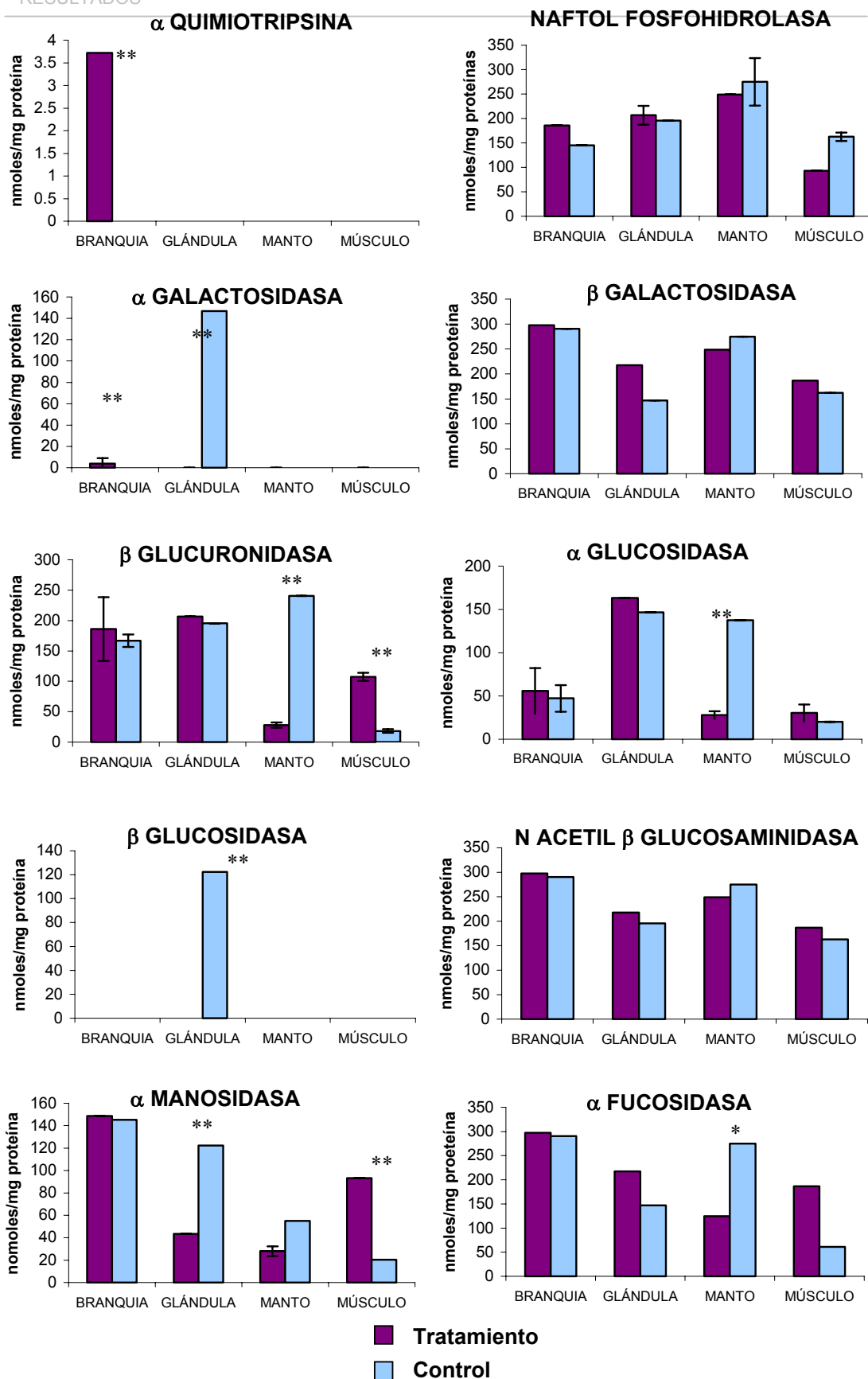


Figura 14. Continuación.

48 horas de exposición al dinoflagelado tóxico. Medición en glándula digestiva; alimentación continua y discontinua.

La Figura 15 muestra la exposición durante 48 h al dinoflagelado tóxico. Se utilizó una talla de 5.9 ± 0.39 cm. Se utilizaron dos tipos de alimentación (continua y discontinua). En la alimentación discontinua se observó la producción de pseudoheces. Se midieron diversas enzimas, así como, cantidades de otras biomoléculas en glándula digestiva. Los análisis de varianza no muestran diferencias significativas entre los tipos de alimentación excepto para carbohidratos y catalasa ($P < 0.05$). La prueba de *t*-Student mostró diferencias entre los controles y tratamientos en los lípidos totales de los organismos expuestos a una alimentación continua ($P=0.05$). En las actividades de glutatión peroxidasa, acetilcolinesterasa y peroxidación de lípidos (TBARS) se observa una tendencia al incremento en las actividades de los organismos alimentados con el dinoflagelado tóxico en la alimentación continua, así como una disminución en la alimentación discontinua. Sin embargo, en la actividad superóxido dismutasa se observa una disminución en los tejidos de los organismos que fueron expuestos al dinoflagelado en ambos tipos de alimentación, pero no se encontraron diferencias estadísticas significativas. No se observaron efectos físicos evidentes.

Experimento largo de alimentación (24 días)

24 d de exposición al dinoflagelado tóxico: 12 d de toxificación y 12 d de depuración. Medición en glándula.

Para el experimento largo de alimentación con el dinoflagelado tóxico, se utilizaron almejas de la talla de 5.9 ± 0.39 cm, el cual consistió en un periodo de toxificación de 12 d mediante alimentación con el dinoflagelado tóxico y un periodo de depuración a la toxina de 12 d donde solo se les suministró *Isochrysis galbana* como alimento no tóxico. En general se presentó un mayor grado de producción de bisco de los tratamientos respecto a los controles, y aproximadamente el 80% de los organismos alimentados con *Gymnodinium catenatum* permanecieron fijados a los recipientes experimentales a lo largo del periodo de alimentación, comparados con un 20% de los controles. Además, en algunas ocasiones se observó la producción de pseudoheces.

En la Figura 16 se observan los resultados obtenidos de la medición de diversas actividades enzimáticas, así como de otras biomoléculas en la glándula digestiva durante este experimento. El patrón general no muestra efectos significativos con excepción de algunos puntos donde se observan diferencias ($P < 0.01$) entre controles y tratamientos, como en el caso de la peroxidación de lípidos (TBARS) donde a los 8 d de exposición al dinoflagelado tóxico se observa un marcado aumento

en los organismos tratados respecto al tratamiento y a los resultados obtenidos, haciendo notar que también la superóxido dismutasa aumentó en este punto. Asimismo, los niveles de proteínas y de acetilcolinesterasa a los 12 d se vieron afectados significativamente ($P<0.05$), observándose un aumento en el contenido de proteínas totales, pero disminuyendo los niveles de acetilcolinesterasa.

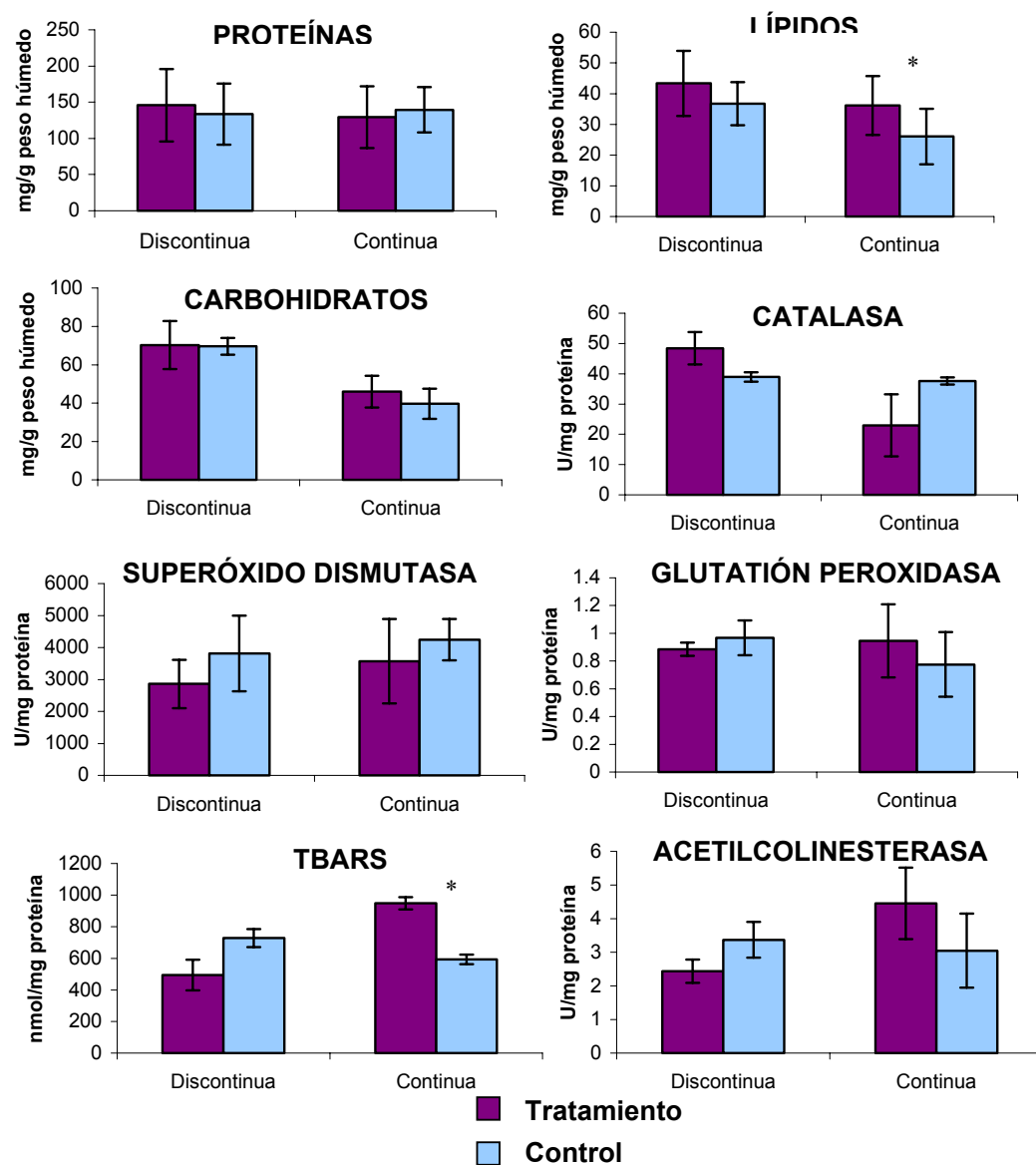


Figura 15. Se muestran las concentraciones de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como, la actividad de diversas enzimas en la glándula digestiva de organismos de la especie *Nodipecten subnodosus* expuestos mediante alimentación (continua y discontinua) a *Gymnodinium catenatum* durante 48 h. Talla 5.9 ± 0.39 cm. (*) diferencias significativas ($P < 0.05$) entre controles y tratamientos. Las unidades enzimáticas se definieron: catalasa, glutatión peroxidasa y acetilcolinesterasa $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína; superóxido dismutasa, U mg^{-1} proteína; sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), $\text{nmol malodialdehído (MDA) mg}^{-1}$ proteína.

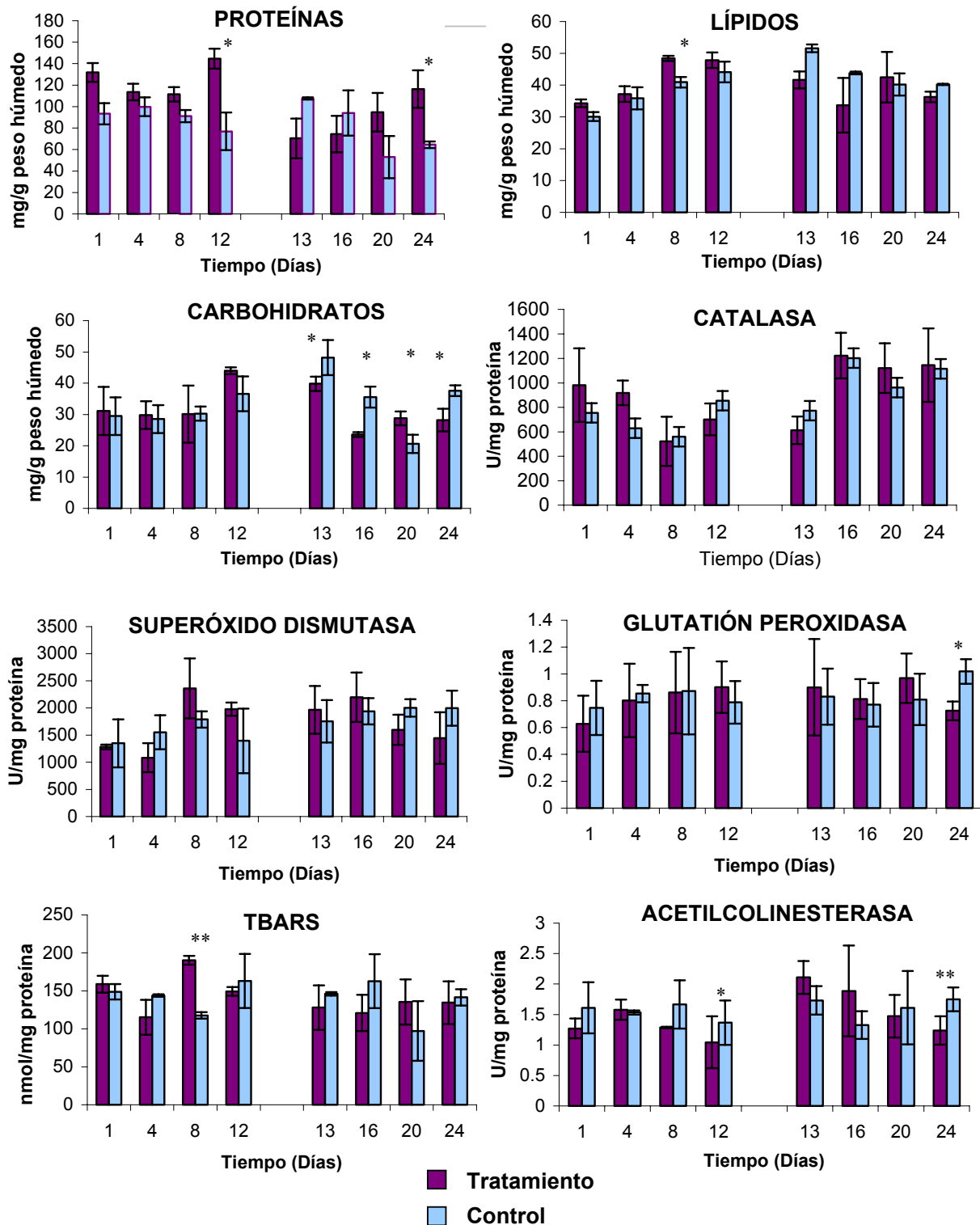


Figura 16. Se muestran los análisis en glándula digestiva de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como, la actividad de diversas enzimas en *Nodipecten subnodosus* expuestos mediante alimentación al dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum* durante 24 d. Talla 5.9 ± 0.39 cm. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas significativas entre controles y tratamientos (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Las unidades enzimáticas se definieron: catalasa, glutatión peroxidasa y acetilcolinesterasa $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína; superóxido dismutasa, U mg^{-1} proteína; sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), nmol malondialdehído (MDA) mg^{-1} proteína.

Inyección del extracto crudo del dinoflagelado tóxico en *Nodipecten subnodosus*.

Dosis Letal Media (DL₅₀) de N. subnodosus.

La DL₅₀ se obtuvo al inyectar en el músculo aductor de las almejas varias dosis del extracto crudo obtenido del dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum*, durante un periodo de 72 h. La dosis más baja de toxina se eligió como aquella que causó la muerte de los ratones en aproximadamente 5 min, la cual se probó como experimento piloto y no causó efectos en las almejas.

Se inyectaron alícuotas de 0.5 mL del extracto crudo, utilizando como blanco HCl 0.1 N (no se observaron efectos adversos al inyectar esta solución blanco). La DL₅₀ se obtuvo con una cantidad de 127.55 ng eq sax/cel, siendo que la muerte de las almejas transcurrió en un promedio de 15 h. En la Figura 17 se muestra la relación entre D (dosis) y D/T (dosis / tiempo de supervivencia), con el ajuste lineal de los datos de acuerdo a los procedimientos propuestos por Molinengo (1979) y Meier & Theakston (1986).

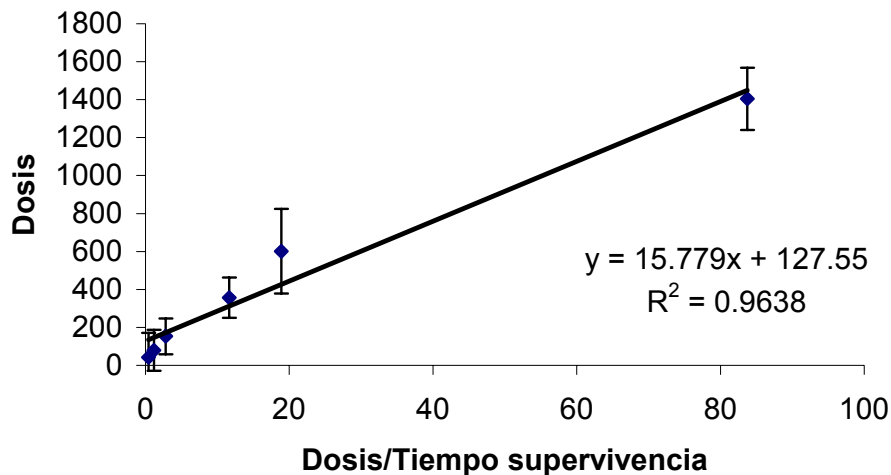


Figura 17. Dosis Letal Media (DL₅₀) en *Nodipecten subnodosus* (N=8) inyectadas con toxinas del dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum*. En el eje de las abscisas se presenta Dosis/Tiempo supervivencia (ng eq sax/cel/h), contra Dosis (ng eq sax/cel). Las constantes analíticas de la correlación lineal ($D = b + a D/T$) son: D=dosis, T=tiempo, a=donde la línea de regresión interseca la ordenada (es la dosis más pequeña del veneno que mata al 50% de los animales experimentales en un tiempo ilimitado) y b= tiempo mínimo de supervivencia. La probabilidad del resultado casual es: $a = 127.55$ ng eq sax/cel, $b = 15.77$ h y $R^2 = 0.96$.

Experimento de exposición a la toxina inyectada, durante 8 h. Medición en hemolinfa

Se empleó una dosis de 80 ng *eq sax/cel/individuo*, para llevar a cabo un experimento de exposición del extracto crudo de las toxinas de *Gymnodinium catenatum* durante 8 h, en almejas con una talla de 6.15 ± 0.61 cm. Seguida a la inyección se observaron contracciones tónico clónicas, la contracción del manto, así como una relajación muscular lo cual impedía el cierre de las valvas. Estos efectos solo se observaron en el 60% de los organismos inyectados, mientras que en el 40% no se observaron efectos evidentes.

Se realizó el conteo de hemocitos observándose un decremento en el número de estos en la hemolinfa de los organismos a los cuales se les inyectó la toxina (Fig. 18). Por otro lado, la Figura 19 muestra las cantidades de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como, los niveles de varias actividades enzimáticas en la hemolinfa de *Nodipecten subnodosus*. En la Figura 19 no se presentan los niveles de glutatión peroxidasa y peroxidación de lípidos (TBARS) ya que no se detectaron en ésta. Se puede observar que las cantidades de proteínas en los tratamientos aumentaron respecto a los controles presentándose diferencias significativas ($P < 0.05$). Asimismo, el mayor efecto se observó en las cantidades de óxido nítrico, medido indirectamente mediante nitritos y nitratos, con una disminución evidente de la cantidad de nitritos totales en la hemolinfa de los tratamientos en comparación a los controles ($P < 0.01$). La mayoría de los organismos presentaban gónadas inmaduras.

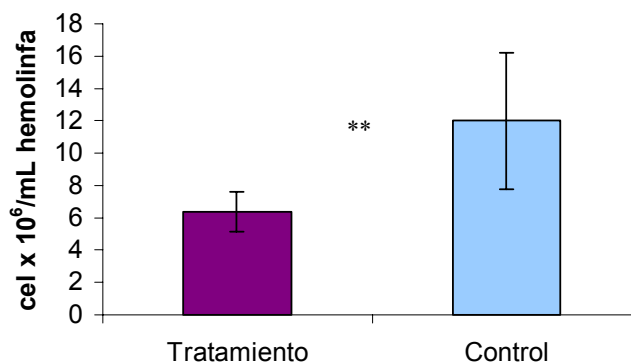


Figura 18. Conteo de hemocitos en la hemolinfa de *Nodipecten subnodosus*. Efecto del extracto crudo de las toxinas de *Gymnodinium catenatum* durante 8 h de exposición. (**) diferencia estadística significativa ($P < 0.01$).

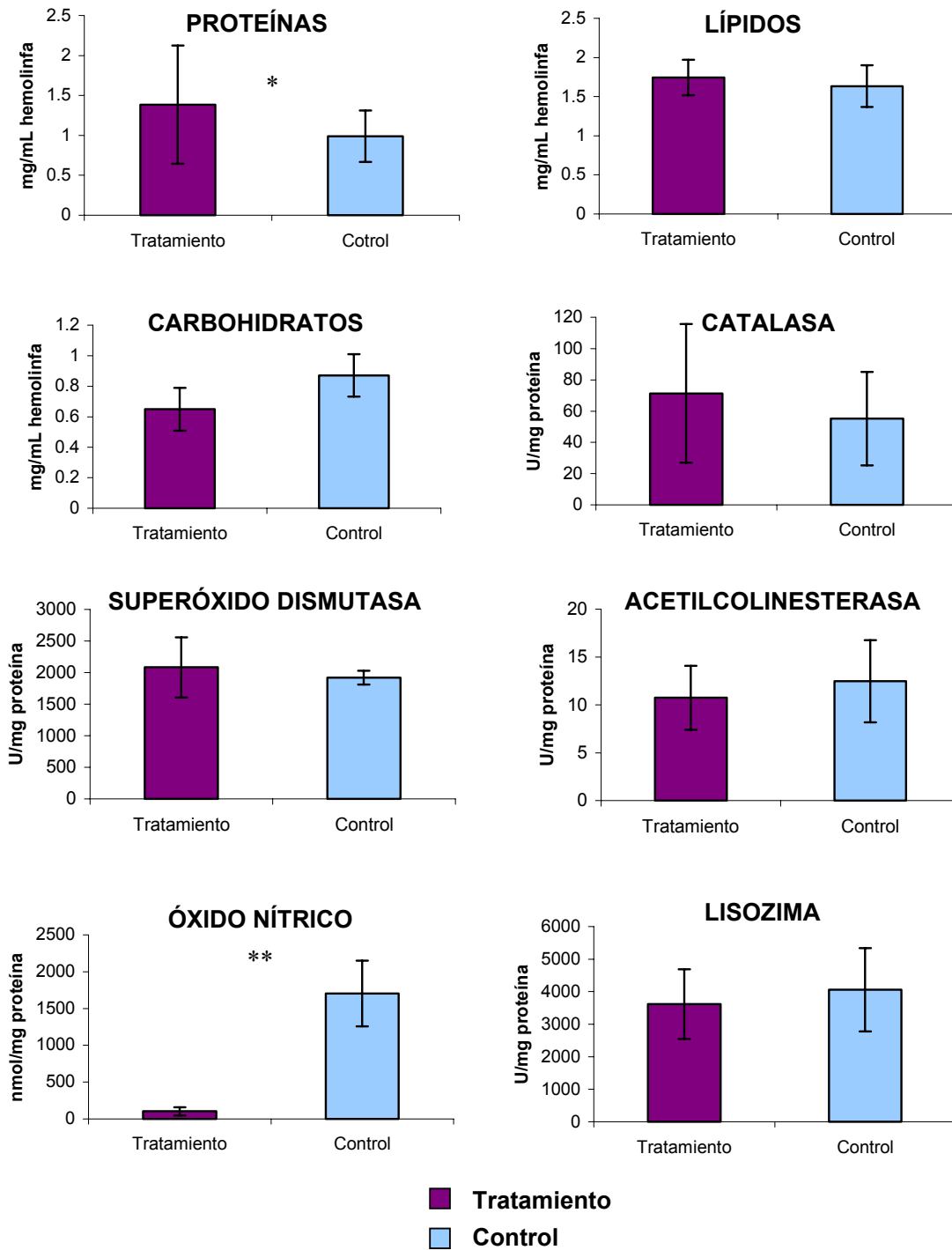


Figura 19. Se muestran las concentraciones de la hemolinfa de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como, la actividad de diversas enzimas en *Nodipecten subnodosus* expuestos mediante una inyección de las toxinas del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* durante 8 h. Talla 6.1 ± 0.61 cm. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas significativas entre controles y tratamientos (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Las unidades enzimáticas se definieron: catalasa, glutatión peroxidasa y acetilcolinesterasa $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína; superóxido dismutasa, U mg^{-1} proteína; óxido nítrico (nitritos totales), nmol mg^{-1} proteína; lisozima, U mg^{-1} proteína.

Con respecto a las enzimas hidrolíticas, se detectaron 7 de las 19 enzimas detectables con en el kit de API ZYM. Las enzimas que se encontraron fueron la esterasa (C4), esterasa lipasa (C8), leucina arilamidasa, α quimiotripsina, fosfatasa ácida, naftol AS BI fosfohidrolasa y N acetil β glucosaminidasa. Las actividades enzimáticas que presentaron diferencias significativas ($P < 0.01$) fueron la fosfatasa ácida y la N acetil β glucosaminidasa que sólo estuvieron presentes en los controles, así como la α quimiotripsina solamente estuvo presente en los tratamientos (Fig. 20).

Experimento de exposición a la toxina inyectada. Duración 5 d. Medición en hemolinfa

Se realizó un experimento de 5 d para determinar el efecto que pudieran tener las toxinas del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* en la hemolinfa de *Nodipecten subnodosus* mediante una inyección del extracto crudo en el músculo aductor. Asimismo, para este experimento al igual que el experimento de 8 h se utilizó una dosis de 80 ng eq sax/cel/individuo, en almejas de 6.1 ± 0.61 cm. La mayoría de los organismos utilizados para este experimento tenían gónadas maduras, además se observó que la hemolinfa presentaba una coloración amarillenta.

En la Figura 21 se muestra el conteo de hemocitos a lo largo del experimento. Se puede observar una reducción significativa ($P < 0.05$) en el número de hemocitos en las primeras 24 h de comenzado el experimento en los organismos a los cuales se les inyectó las toxinas del dinoflagelado tóxico. Sin embargo a las 48 h se observa un aumento significativo en el número de hemocitos en estos organismos tratados, alcanzando un nivel parecido al de los controles entre las 72-120 h. Como se muestra en la Figura 22, a las 24 h de comenzado el experimento se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), tanto en la cantidad de proteínas, así como, en las actividades de acetilcolinesterasa y lisozima. En estos casos se presentó una disminución en los tratamientos comparados con los controles, donde la enzima acetilcolinesterasa fue la que mostró un efecto mayor ($P < 0.01$). También la actividad de la lisozima a las 12 h de inyectada la toxina mostró una disminución en la actividad de los organismos tratados, así como, la óxido nítrico (nitritos totales) también disminuyó sus niveles a las 48 h.

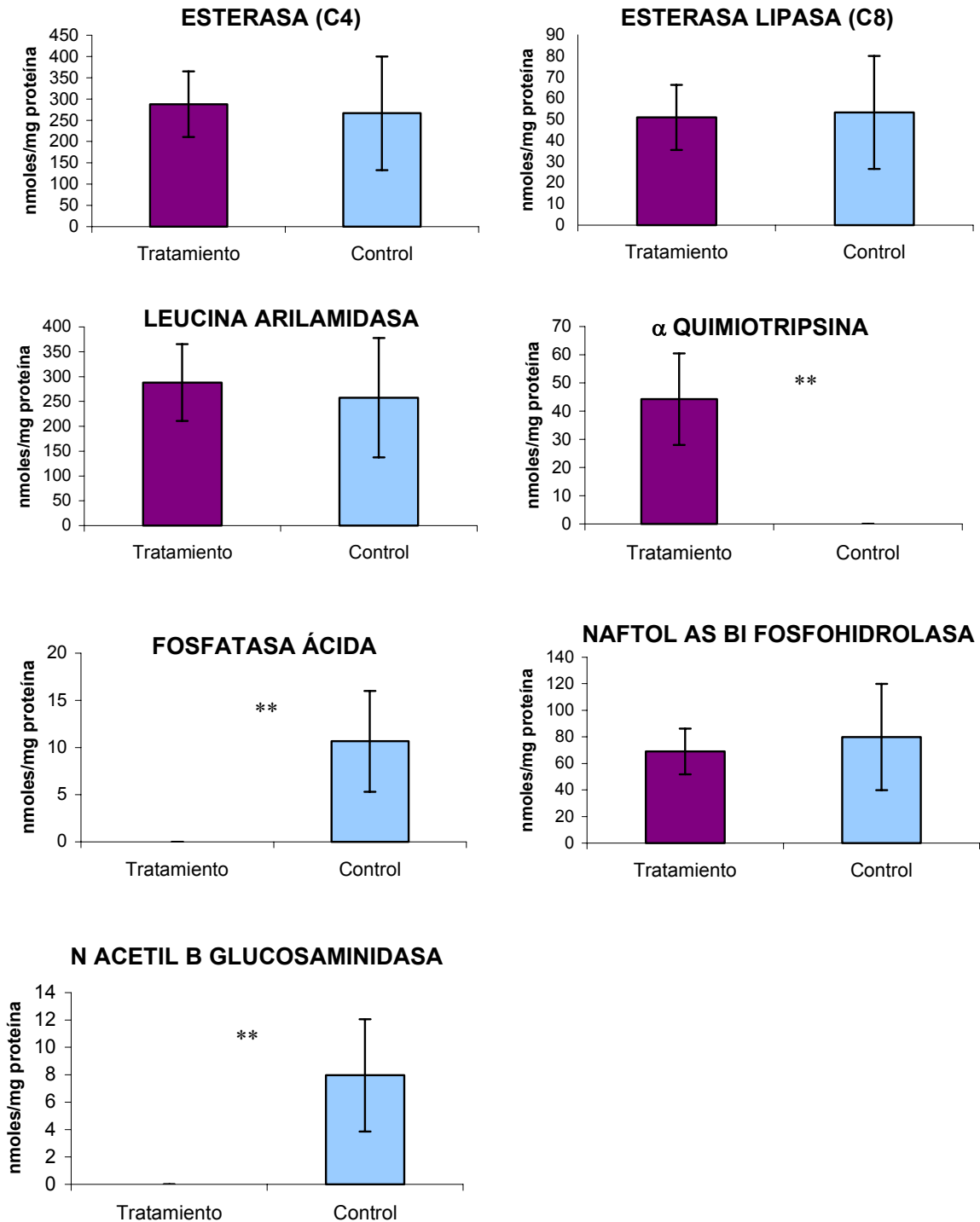


Figura 20. Actividad de enzimas hidrolíticas en la hemolinfa de *Nodipecten subnodosus* inyectada con toxinas del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* (Talla de 6.1 ± 0.61 cm). Duración del experimento 5 h. Se utilizó el sistema API ZYM (sustrato hidrolizado, nmoles mg proteína⁻¹). Los valores son la media \pm desviación estándar de la hemolinfa combinada de 10 organismos, por triplicado. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas significativas entre controles y tratamientos (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

En la Figura 23 se presentan las enzimas hidrolíticas que fueron detectadas durante el experimento de 5 días, pero las mediciones de estas enzimas solamente se llevaron a cabo en la hemolinfa de los tres primeros días. Se encontraron 16 de las 19 enzimas presentes en el kit de API ZYM. Las enzimas que mostraron los máximos valores fueron la esterasa (C4) y la leucina arilamidasa. Se puede observar que en la mayoría de las enzimas existe un decremento en las cantidades de estas a las 12 y 24 h de comenzado el experimento en la hemolinfa de los organismos inyectados con la toxina. Sin embargo, a las 48 h se observa un aumento en las cantidades de estas, así como se vuelve a presentar una disminución a las 72 h. Se observaron diferencias significativas ($P<0.01$) en varias enzimas a las 24 y 48 h a partir de que se había inyectado la toxina, como fue el caso de las glucosidasas (α manosidasa y α fucosidasa) así como de la lipasa.

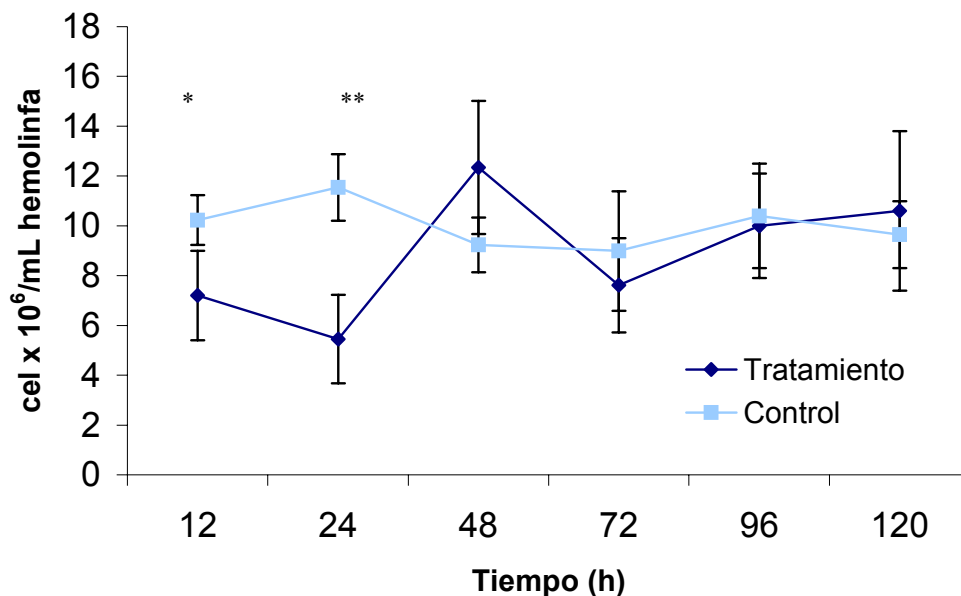


Figura 21. Conteo hemocitos de la hemolinfa de *Nodipecten subnodosus*. Efecto del extracto crudo de las toxinas de *Gymnodinium catenatum* durante 5 días de exposición. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas significativas entre controles y tratamientos (* $P<0.05$; ** $P<0.01$).

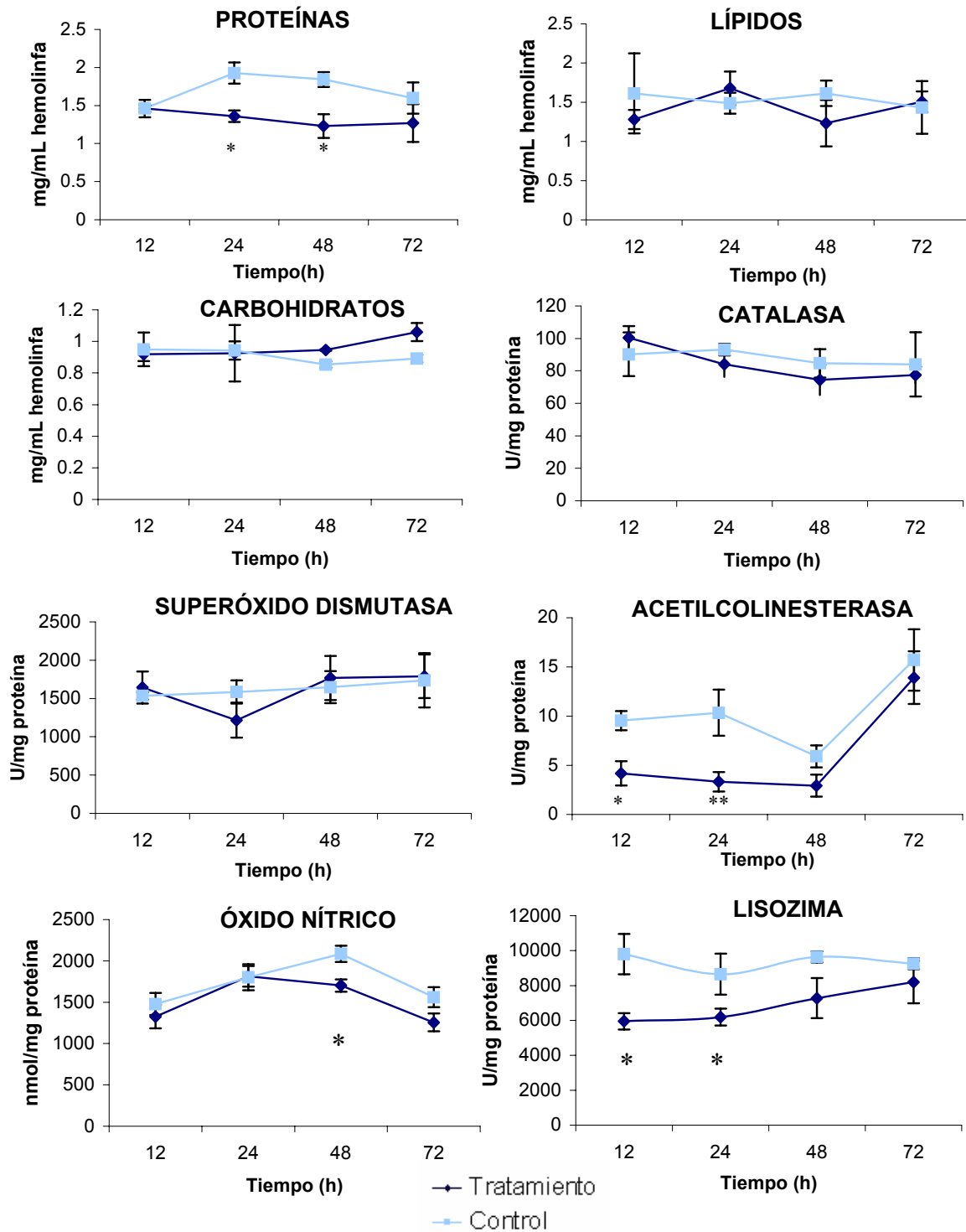


Figura 22. Se muestran las concentraciones de proteínas, lípidos y carbohidratos, así como, la actividad de diversas enzimas en la hemolinfa de *Nodipecten subnodosus* expuestos mediante una inyección de las toxinas del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* durante 3 d. hemolinfa combinada de 5 organismos, por triplicado. Talla 6.1 ± 0.61 cm. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas significativas entre controles y tratamientos (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Las unidades enzimáticas se definieron: catalasa, glutatión peroxidasa y acetilcolinesterasa $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína; superóxido dismutasa, U mg^{-1} proteína; óxido nítrico (nitritos totales), nmol mg^{-1} proteína; lisozima, U mg^{-1} proteína.

RESULTADOS

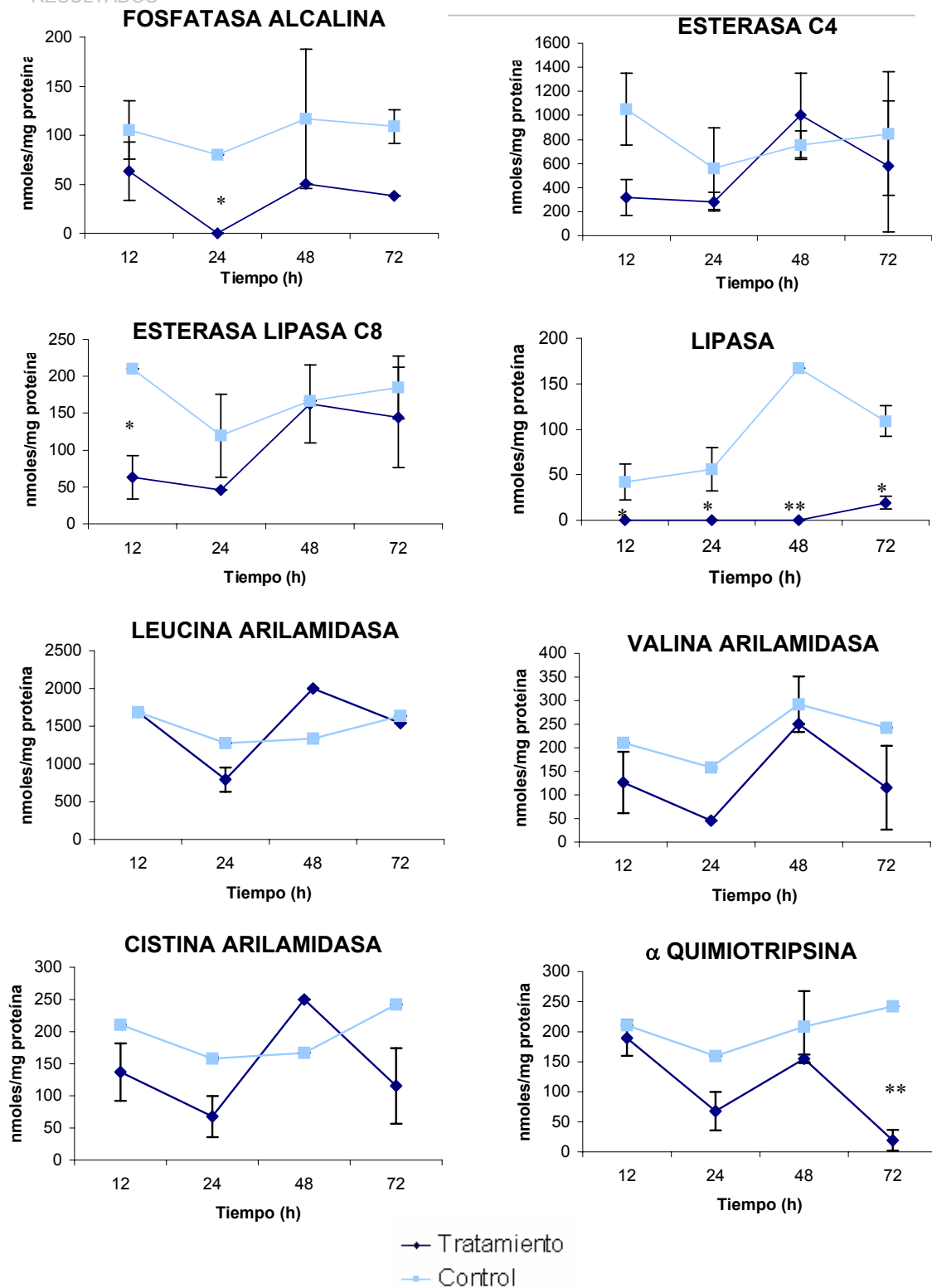


Figura 23. Actividad de enzimas hidrolíticas en la hemolinfa de la almeja *Nodipecten subnodosus* inyectada con toxinas del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum* (Talla de 6.1 ± 0.61 cm, organismos con gónadas maduras). Duración del experimento 3 d. Se utilizó el sistema API ZYM (sustrato hidrolizado, nmoles mg proteína⁻¹). Los valores son la media \pm desviación estándar de la hemolinfa combinada de 8 organismos, por triplicado. Los asteriscos muestran diferencias estadísticas significativas entre controles y tratamientos (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

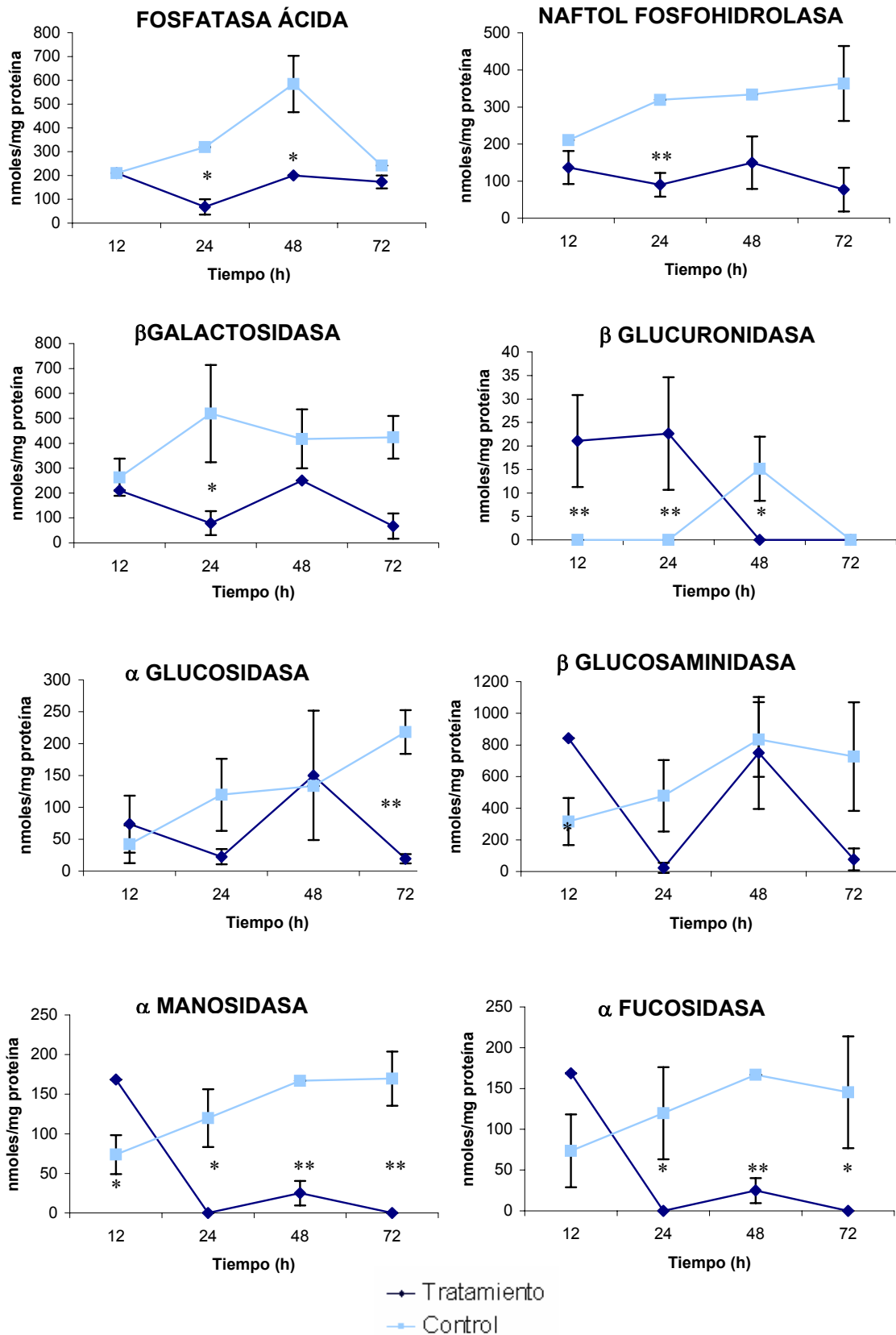


Figura 23. Continuación.

Cortes histológicos. Exposición alimentación

En la Figura 24 se muestran cortes histológicos de varios tejidos de organismos de la talla de 2.7 ± 0.7 cm, que fueron expuestos mediante alimentación con el dinoflagelado tóxico *Gymnodinium cateatum* durante 7 h. Se observan procesos de melanización en manto y branquias, así como conglomerados de los hemocitos a diferentes tejidos como glándula digestiva y branquias.

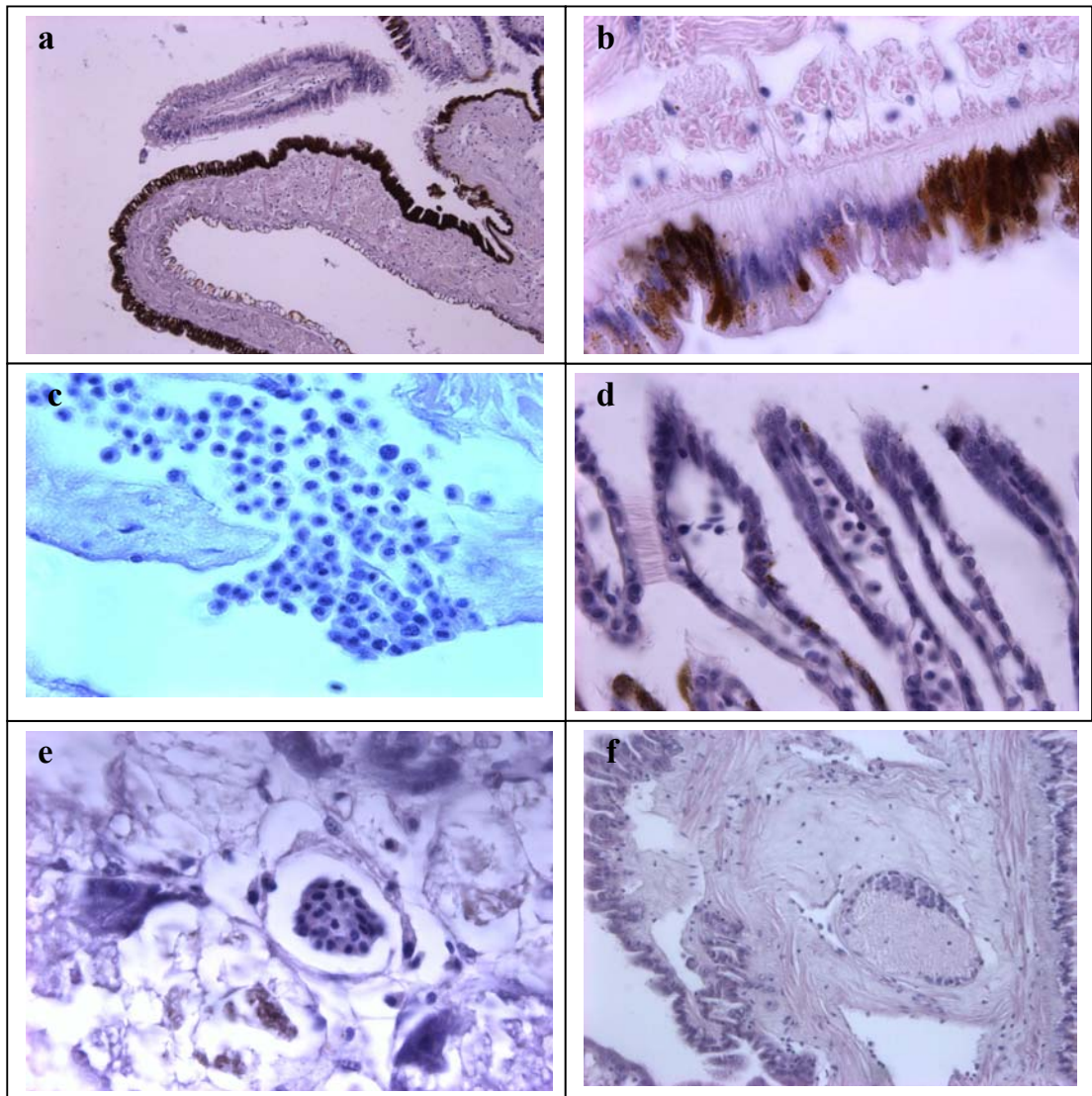


Figura 24. Cortes histológicos de *Nodipecten subnodosus* de la talla de 2.7 cm, expuestas durante 7 h al dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum*. a) melanización en manto, b) melanización en branquia, c) y d) acumulación de hemocitos en filamentos branquiales, e) hemocitos aparentemente del tipo hialino, f) ganglio nervioso en manto.

7. DISCUSIÓN

Respuesta de alimentación con el dinoflagelado tóxico

Tasas de ingestión y aclaramiento

Nodipecten subnodosus es un pectínido filtroalimentador, que al igual que la mayoría de los moluscos bivalvos, obtiene la mayor parte de su alimento de las partículas que se encuentran en suspensión, dentro de ambientes altamente dinámicos y productivos, donde las relaciones con el fitoplancton son muy estrechas. En la mayoría de los casos estas interacciones son positivas ya que el fitoplancton sirve de alimento, sin embargo el alimento que consumen puede estar integrado por organismos tóxicos, que puede hacer susceptibles a las almejas a ciertas enfermedades (Landsberg, 1990), o en otras situaciones los bivalvos en general, son considerados organismos de alto riesgo para la salud pública, ya que son capaces de acumular las toxinas y causar efectos adversos e incluso mortales al ser ingeridos por los humanos o vertebrados en general, no afectando de manera directa a las almejas (Shumway, 1989; Hallegraeff, 1993; Van Dolah, 2000).

El hecho de que el organismo tóxico sea removido del medio circundante por filtración, no implica que sea ingerido, lo anterior se debe a que la almeja puede eliminar el dinoflagelado como pseudoheces, por lo que es de suma importancia realizar experimentos que describan las tasas de alimentación, y así posteriormente poder definir si está afectando la filtración de estas toxinas a nivel fisiológico. Así, la estimación de la tasa de alimentación en *N. subnodosus* se realizó de manera indirecta midiendo la remoción de partículas del medio, para obtener las tasas de ingestión y aclaramiento. *Gymnodinium catenatum* fue utilizado en este trabajo como alimento tóxico, ya que como se ha mencionado en varios trabajos (Franca & Almeida, 1989; Hallegraeff *et al.*, 1989; Bravo *et al.*, 1990) que es un conocido productor de las llamadas toxinas parálíticas de moluscos (PSP). Posee una talla promedio de 26 μm de ancho y 31 μm de largo, puede formar cadenas de más de 60 organismos y además es un organismo que muestra niveles de toxicidad determinados por ensayo ratón de 51 ng *eq sax/cel*, con una tasa de división de 0.28 cel/d y un tiempo de generación de 2.4 d, datos similares a los reportados por Band (2003) con la misma especie y cepa. Se utilizaron organismos en la fase exponencial tardía, ya que se ha reportado una alta toxicidad en esta etapa de crecimiento (Anderson, 1990). Además los efectos producidos en ratón (debilidad en los miembros seguido de ataxia, pérdida de la coordinación motora, disnea, parálisis y muerte) obtenidos en el presente trabajo, concuerdan con los síntomas que comúnmente se producen cuando los ratones están expuestos a este tipo de toxinas.

Como se observó en los experimentos de alimentación con este dinoflagelado, y como organismo control *Isochrysis galbana*, la concentración del alimento así como la talla de las almejas, juegan un papel importante en los mecanismos de alimentación en juveniles de *N. subnodosus*. Se puede asumir que el dinoflagelado tóxico fue ingerido a concentraciones moderadas de entre 200 y 800 cel/mL en ambas tallas probadas (2.7 y 5.1 cm), debido a la presencia de heces, las cuales se producen cuando el alimento ha sido ingerido y procesado de forma eficiente. Como lo menciona Navarro (2001), cuando todo el material filtrado por las branquias es ingerido y llevado al estómago y a la glándula digestiva para su digestión, parte de este alimento es absorbido y el material restante pasa al intestino, de donde es eliminado como material con un alto grado de absorción.

En la talla de 2.7 cm a elevadas concentraciones de alimento, las tasas de ingestión y aclaramiento disminuyeron, en consecuencia, se presentó la producción de pseudoheces y el cierre parcial de las valvas. A concentraciones elevadas de alimento, los moluscos bivalvos regulan la ingestión de partículas aumentando la cantidad de material capturado pero no ingerido, por lo que este material no requerido es eliminado en forma de pseudoheces. Asimismo, como lo mencionan Wildish & Saulnier (1993), los organismos controlan el cierre de las valvas y la reducción del volumen palial para optimizar la alimentación en respuesta a la concentración de seston. Además, estos organismos pueden retener partículas diferencialmente donde la alimentación selectiva es un mecanismo importante por el cual los animales pueden maximizar la ganancia de energía, evitar alimento peligroso o tóxico, y satisfacer sus requerimientos nutricionales, logrando esto, como lo menciona Shumway *et al.* (1997), por selección de las células basadas en sus características morfológicas o probablemente por aspectos bioquímicos.

Sin embargo, en la talla de 5.1 cm no se observaron estos efectos adversos, con lo que se puede determinar que el factor de la talla de las almejas es importante ya que a tallas mayores, la almeja tendrá una mayor capacidad de filtrar alimento de gran tamaño o en concentraciones más elevadas. Además, es importante mencionar que en contraste con otros bivalvos, las características anatómicas de *N. subnodosus* y de los pectínidos en general, no permiten cerrar las valvas por prolongados periodos, lo que no les permite aislar sus tejidos de estos ambientes tóxicos. MacDonald & Ward (1994), examinaron las respuestas alimenticias de *Placopecten magellanicus* en los cambios en la calidad y cantidad de seston natural en condiciones de campo y laboratorio. Encontraron que la producción de pseudoheces aumentó ligeramente con

el incremento en la concentración de partículas, y la selección no se basó en el tamaño de las partículas, sino por la capacidad de quimiorrecepción, lo cual incrementa las tasas de ingestión y aclaramiento en respuesta a metabolitos específicos, esto debido a que fue capaz de seleccionar las partículas con alto contenido de clorofila a.

En ambas tallas, en general se determinó que a partir de concentraciones bajas de alimento, la tasa de filtración aumenta rápidamente hasta un punto donde esta se mantiene constante, así permanece hasta alcanzar la concentración de alimento en donde al parecer la máxima cantidad de alimento es ingerida, y cuando esto sucede, la tasa de filtración decrece de manera que la tasa de ingestión se mantiene constante. Parés (1996), encontró que los juveniles de *N. subnodosus* regulan su tasa de filtración en respuesta a la concentración de alimento rico en contenido orgánico y mantienen una tasa de ingestión relativamente constante a bajas concentraciones de alimento. Asimismo, Winter (1978) encontró este patrón en *Mytilus edulis* señalando la importancia de la dependencia en las concentraciones algales, con lo que menciona que las tasas alimenticias permanecen sin cambio a concentraciones moderadas, sin embargo a mayores concentraciones se llega a un punto donde se producen pseudoheces, siendo que a concentraciones más altas de alimento tanto la tasa de filtración como la de ingestión decrecen.

Así debido a que las almejas para alimentarse pasan una corriente de agua a través de sus branquias y el alimento es colectado y llevado al sistema digestivo mediante transporte ciliar, conforme la concentración de alimento se incrementa, puede llegar a excederse la capacidad de filtración de las branquias y por consiguiente decrecer las tasas de alimentación; además la glándula digestiva no es capaz de procesar y absorber todo el material que ingresa al estómago (Winter, 1978; Wildish *et al.*, 1987). A diferencia de otros bivalvos, los pectínidos se caracterizan por una escasa producción de heces y la regulación de la ingestión a altas concentraciones de partículas se logra más bien por disminución de la tasa de filtración (Farias-Molina, 2001). Sin embargo, como lo menciona González (2003), estas tasas pueden afectarse por factores intrínsecos como la edad, talla, estado reproductivo, nivel de actividad, condición fisiológica e información genética, y por factores extrínsecos como la concentración y calidad de alimento, temperatura, tensión de oxígeno, salinidad entre otros.

Dinoflagelados como alimento de bivalvos

Existen pocos trabajos relacionados con dinoflagelados como alimento de bivalvos, ya que estos tienen tasas de división y tiempos de generación menores que las microalgas utilizadas cotidianamente en acuicultura como alimento. Además una gran cantidad de dinoflagelados son productores de varios tipos de toxinas y son de tamaños mayores. *Gymnodinium catenatum* puede formar cadenas muy largas por lo que se supone tiene un menor grado de asimilación por parte de la almeja, sin embargo, en el pectínido *Zygochlamis patagonica* proveniente de Argentina, se realizó un estudio cualitativo y cuantitativo de la dieta analizando el contenido del tracto digestivo durante varios meses del año; encontraron varias especies de diatomeas, dinoflagelados y silicoflagelados, con dimensiones entre 19 y 170 μm (principalmente de 25 a 60 μm) (Schejter *et al.*, 2000). Asimismo el pectínido *Placopecten magellanicus* se ha caracterizado por ser un filtroalimentador oportunista que ingiere un amplio espectro de organismos pelágicos, bénticos, así como detritus que varían entre 10 a 350 μm (Cranford & Grant, 1990). Así, en el medio natural estos organismos pueden servir en un momento dado de alimento para los moluscos bivalvos, sobre todo cuando se presentan explosiones poblacionales de estas microalgas tóxicas, como en el caso de las mareas rojas.

En estudios previos se ha demostrado que los bivalvos presentan diversas respuestas de alimentación respecto a microalgas tóxicas lo cual puede estar relacionado con la historia de exposición a las toxinas, al contenido de toxinas y a la toxicidad del dinoflagelado tóxico. Además, la selectividad del alimento de diferentes tipos de algas, tales como dinoflagelados tóxicos y no tóxicos, no ha sido estudiado ampliamente probablemente debido a la falta de técnicas adecuadas. Shumway *et al.* (1985), utilizaron citometría de flujo para monitorear la selección algal en *Ostrea edulis* y encontraron que el dinoflagelado *Prorocentrum minimum* era seleccionado respecto a los otros tipos de microalgas que estudiaron. Otros autores refieren a que existe un efecto de reducción en las tasas de filtración y aclaramiento por la exposición a organismos altamente tóxicos del género *Alexandrium sp.*, que al igual que *G. catenatum* es un conocido productor de toxinas paralíticas (Bardouil *et al.*, 1993; Bricelj *et al.*, 1996b), sobre todo en ostiones como *Crassostrea gigas*. Matsuyama *et al.* (1999), estudiaron el efecto de afloramientos tóxicos del dinoflagelado *Gymnodinium mikimotoi* en las tasas de aclaramiento del mejillón *Mytilus galloprovincialis* y la ostra *Crassostrea gigas*. Encontraron que ambos bivalvos disminuyeron las tasas de aclaramiento.

Sin embargo, otros estudios demuestran lo contrario ya que revelan que no existe una selectividad entre los elementos tóxicos y los no tóxicos como lo demostraron con las almejas *Mercenaria mercenaria*, *Ruditapes phillipinarum*, *Spisula solidissima* y *Chlamis nobilis*, las cuales fueron alimentadas con una mezcla de dinoflagelados del género *Alexandrium* y diatomeas del género *Thalassiosira*, no encontrándose evidencias de una alimentación preferencial (Bricelj *et al.*, 1991; Bricelj *et al.* 1996b; Li *et al.*, 2001). Asimismo, Li & Wang (2001), utilizaron técnicas de marcaje radiactivo para determinar si la utilización de la misma especie de microalga con características físicas similares, pero con contenidos de toxinas diferentes, afectaba en los procesos de adquisición de dichas células. Estudiaron al mejillón *Perna viridis* y a la almeja *R. phillipinarum* expuestas a dos cepas del dinoflagelado *Alexandrium tamarense*, una cepa tóxica y otra no tóxica y demostraron que la presencia de toxinas paráliticas no tiene impacto en las tasas de alimentación de estos organismos. Wikfors & Smolowitz (1995), mencionan que las diversas respuestas de los moluscos bivalvos alimentados con dinoflagelados puede resultar en diferencias en las funciones digestivas, específicamente en el sitio en el cual los autolisosomas de los dinoflagelados son digeridos. Además, como lo mencionan Boltovskoy *et al.* (1995), la alimentación no selectiva puede ser una respuesta a la poca disponibilidad de alimento.

En los experimentos que se llevaron a cabo durante 5 y 48 h de exposición al dinoflagelado tóxico, combinadas con una cantidad constante de *Isochrysis galbana* (y a los controles se les alimentó solamente con *I. galbana*), solo se presentó el cierre parcial de las valvas durante las primeras horas, pero posteriormente se observó un estado activo de filtración. Debido a que estas almejas no habían estado previamente expuestas al dinoflagelado tóxico probablemente al ingerir material extraño entran en un proceso de reconocimiento y selección, para que una vez acopladas al proceso alimenticio se pueda seguir ingiriendo este tipo de células, o por otro lado, el hecho de cerrar parcialmente las valvas permite filtrar en pequeñas cantidades para que cuando se presenta una disminución en la cantidad de alimento en el medio, la tasa alimenticia se mantenga constante.

Asimismo, los juveniles de *N. subnodosus* no exhibieron aparentemente respuestas fisiológicas adversas durante la exposición por un largo periodo al dinoflagelado tóxico *G. catenatum*, 12 d toxicación y 12 d depuración, observándose un estado de filtración activa. Lo mismo fue reportado en el pectínido *Pecten maximus*, donde después de 15 días de alimentación con *Alexandrium tamarense* (productor del mismo tipo de toxinas PSP), no se detectaron efectos adversos (Lassus *et al.*, 1992).

Los juveniles alimentados con una mezcla de *Gymnodinium catenatum* e *Isochrysis galbana* permanecieron adheridos mediante fibras de biso, lo que indica que la producción de biso no se vio afectada por la exposición al dinoflagelado que a comparación de los controles, los cuales fueron solo alimentados con *Isochrysis galbana*, estos no presentaron fibras de biso y además no se observó una filtración activa. La producción del biso está ampliamente distribuida en los moluscos bivalvos, y se cree que es una cuestión adaptativa del estado larvario (Ruppert & Barnes, 1996). El hecho de que no se observara la producción de fibras de biso en los controles nos podría indicar que estos no se encontraban en óptimas condiciones, ya que se ha observado que la producción de biso puede dar un indicio de una condición fisiológica óptima en el animal (Ruppert & Barnes, 1996), además mientras los organismos estuvieron en etapa de aclimatación también se observó la producción de biso, cuando fueron alimentadas con una mezcla de microalgas. Sin embargo, algunos autores indican que la producción del biso puede también ser un indicador del estrés fisiológico en organismos individuales (Gainey & Shumway, 1998), así como Shumway & Cucci (1987), mencionan que la formación de biso está ampliamente asociada a la presencia de dinoflagelados tóxicos como se ha demostrado en varios mejillones del género *Mytilus*.

También, la combinación de *Isochrysis galbana* y *Gymnodinium catenatum* pudo haber influenciado estimulando el proceso de alimentación ya que se ha observado en otros bivalvos que una mezcla de varias microalgas en el alimento produce mejores resultados en los cultivos (Díaz & Martínez, 1992; Lora-Vilchis & Doktor, 2001). Asimismo, Bricelj *et al.* (1991), encontraron que la tasa de aclaramiento de *Mercenaria mercenaria* disminuyó por efecto de la alimentación con el dinoflagelado tóxico *Alexandrium fundyense*, sin embargo la tasa se recuperó cuando las almejas se alimentaron con una mezcla con adición de la diatomea *Thalassiosira weissflogii*. Además algunos autores han observado que cuando se suministra una mezcla de organismos tóxicos y no tóxicos, no se presentan diferencias en los procesos de alimentación y selección de estas partículas en ciertas especies de bivalvos (Bricelj *et al.*, 1991; Bricelj *et al.* 1996; Li *et al.*, 2001). Como lo mencionan Blanco-Pérez *et al.* (1997), *Isochrysis galbana* es una dieta adecuada para los bivalvos, gracias a que aporta un gran valor energético, pero necesita ser complementada con otra especie que mejore su calidad alimenticia, lo cual pudo ser la causa de que los controles no se encontraran en condiciones óptimas. Aunque no se midieron las tasas de alimentación durante este experimento, se observó una buena respuesta alimenticia ya que se consumía todo el alimento racionado para un día,

tomando en cuenta que se alimentó diariamente y de manera continua, observándose poca producción de pseudoheces y la presencia de heces de alto contenido calórico (caracterizadas por su forma compacta en forma de fríjol y firme). Takeda & Kurihara (1994), estudiaron mejillones de la especie *Mytilus edulis galloprovincialis* que fueron expuestos a organismos de marea roja, las cuales son conocidas por sus efectos nocivos. Concluyen que ciertas especies de plancton pertenecientes a las mareas rojas pueden servir de alimento para bivalvos filtradores, sin observarse efectos adversos.

Además, el hecho de que se observara mayor vigor en las almejas alimentadas con la combinación de microalgas puede estar relacionado con la presencia de ácidos grasos esenciales en la dieta, ya que es conocido que ellos representan un requerimiento nutritivo para los bivalvos marinos, son importantes como componentes estructurales de las membranas celulares, son fuente de energía y también proveen ácidos grasos esenciales para la síntesis de tejidos (Trider & Castell, 1979; Robinson, 1992; Berntsson *et al.*, 1997). En *Argopecten purpuratus*, cuando las microalgas fueron suplementadas con una emulsión lipídica, la actividad de alimentación fue notoriamente estimulada (Navarro *et al.*, 2000).

Los dinoflagelados contienen una gran cantidad de ácidos grasos (Mansour *et al.*, 1999; Mansour *et al.*, 1999b; Mansour *et al.*, 2003) que en un momento dado podrían servir como fuente de ácidos grasos esenciales y así estimular la actividad de filtración de estas especies mediante algún mecanismo aún desconocido. En general todas las microalgas utilizadas como alimento de filtroalimentadores contienen los mismos ácidos grasos, solo que las proporciones varían sustancialmente de un tipo de microalga a otro. Napolitano & Ackman (1993), demostraron que las variaciones estacionales en la composición de lípidos en la glándula digestiva, está relacionada al contenido de ácidos grasos polinsaturados típicamente asociados con diatomeas y dinoflagelados. Varios estudios han demostrado que la calidad de la dieta algal afecta el crecimiento y desarrollo de los moluscos como en *Pecten maximus* (Delaunay *et al.*, 1993), *Crassostrea gigas* (Knauer & Southgate, 1997), *Ostrea edulis* (Berntsson *et al.*, 1997), entre otros.

Respuestas fisiológicas a la exposición de las toxinas PSP

Como ya se mencionó el efecto más común que los dinoflagelados tóxicos producen en bivalvos es una disminución en la exposición al ambiente ya sea mediante la reducción de los procesos de filtración o incrementando el cierre de las valvas, como sucedió a elevadas concentraciones de alimento en este trabajo. Sin embargo en *Nodipecten subnodosus* cuando se inyectó en el músculo aductor con diferentes dosis del extracto crudo de las toxinas de *Gymnodinium catenatum*, en las dosis más bajas no se observaron efectos, sin embargo por encima de 30-50 ng eq sax/cel, se observaron contracciones tónico clónicas al momento de la inyección, seguidas por una pérdida de la capacidad de cerrar las valvas y la contracción del manto, y en algunos casos la muerte. En estos casos podría estar actuando la toxina directamente en ganglios nerviosos como los observados en los cortes histológicos en el manto, los cuales también están presentes en otros tejidos, aunque no se observó ningún efecto debido a la alimentación, pero las toxinas inyectadas podrían estar causando un daño a estas estructuras. Sin embargo, este efecto solo se observó en un 60% de las almejas inyectadas seguida de una recuperación aproximadamente a las 72-96 h.

Gymnodinium catenatum, posee toxinas paralíticas de moluscos (PSP), las cuales son una familia de neurotoxinas solubles en agua que están entre las toxinas más potentes conocidas; la saxitoxina (STX) y sus derivados pertenecen a esta familia. Estas bloquean el influjo de los iones de sodio (Na^+) a través de membranas excitables, interrumpiendo la señal de transmisión y causando parálisis. Como se ha demostrado en vertebrados, probablemente en invertebrados sucedan efectos similares, ya que se observó una falta de capacidad de respuesta en las fibras musculares de *N. subnodosus*, no generándose los impulsos de la contracción para el cierre de las valvas. Los grupos guanidinos de estas toxinas que están positivamente cargados interactúan con las cargas negativas de los grupos carboxilo en la boca del canal de sodio en la parte extracelular de la membrana plasmática en células nerviosas y musculares, bloqueando el flujo del sodio a través del canal, evitando así, la transmisión de los impulsos (Evans, 1975; Kao *et al.*, 1967). La STX y sus derivados, junto con la tetradotoxina (TTX, un veneno muy potente encontrado en los ovarios, hígado e intestinos de varios organismos de peces de la familia Tetrodontidae), son probablemente de las toxinas más específicas de los canales de sodio. En la mayoría de los casos la unión es reversible y de alta afinidad (Denac *et al.*, 2000), lo que podría explicar la recuperación de las almejas después de un determinado periodo de tiempo.

La retracción del manto, así como otras características fisiológicas, también se han observado en otras especies de bivalvos, como se ha descrito en el trabajo de Matsuyama *et al.* (1999), quienes estudiaron el efecto de afloramientos tóxicos del dinoflagelado *Gymnodinium mikimotoi* en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* y la ostra del Pacífico *Crassostrea gigas*, observando la retracción el manto y el cierre parcial de las valvas. Estas y otras características fisiológicas, de comportamiento y neurológicas, han servido para determinar la diferencia de sensibilidad de las especies de bivalvos a las toxinas PSP, ya que al parecer entre los moluscos bivalvos existe una gran variabilidad en las respuestas a estas toxinas. Dado que estas toxinas tienen como característica fundamental la capacidad de bloquear el canal de sodio y afectar el potencial de acción de los nervios de distintos animales, parece que los organismos con nervios más sensibles deben sufrir en mayor grado el impacto de este tipo de compuestos. Twarog & Yamaguchi (1975), estudiaron el efecto de las toxinas de dinoflagelados tóxicos y encontraron un grado de respuesta diferente dependiendo de la especie, ya que mientras en *Placopecten magellanicus*, *Mercenaria mercenaria* y *Mytilus edulis* no se observó efecto en el potencial de acción, en *Crassostrea virginica* y *Mya arenaria* si se presentó un bloqueo. Bricelj *et al.* (1996) y (2000), estudiaron la sensibilidad diferencial a las toxinas PSP en *Spisula solidissima* y *Mya arenaria* expuestas a *Alexandrium tamarense*, y analizaron la respuesta nerviosa y de comportamiento, observando que *M. arenaria* mostró una gran variabilidad en la sensibilidad a las toxinas entre individuos, mientras que *S. solidissima* fue insensible a las toxinas.

Asimismo, la variación en la sensibilidad de las toxinas PSP se ha correlacionado con las diferencias en la acumulación de las toxinas entre las especies de bivalvos. Shumway & Cembella (1993), estudiaron la acumulación y la biotransformación de ficotoxinas en almejas, lo cual indicó que las toxinas no se distribuyen uniformemente en los tejidos, siendo el manto y la glándula digestiva los tejidos en donde se concentran las toxinas en mayor proporción, las cuales pueden permanecer por largos periodos de tiempo. Además, en la mayoría de los bivalvos el manto y las branquias son los tejidos no viscerales que acumulan la mayor cantidad de toxinas. Esta acumulación de toxinas depende de la capacidad de biotransformación y/o a la selectividad de la toxina entre los diferentes tejidos, así como entre los individuos. Bricelj & Shumway (1998), estudiaron *in vitro* la respuesta de las PSP en nervios aislados y concluyen que aquellos animales que son más sensibles a la saxitoxina, no están regularmente expuestos a las toxinas o poseen reducidas tasas de filtración, lo que reduce la acumulación de la toxina (Kvitek & Baitler, 1988).

Además, se sugiere que la alta resistencia a estas toxinas en algunas especies es una característica innata más que adquirida después de una exposición a la toxina (Bricelj & Shumway, 1998). Esto puede indicar que aunque *N. subnodosus* no está expuesto comúnmente a los fenómenos de proliferaciones microalgales, posiblemente si se encuentre en contacto con este tipo de toxinas, dada su baja sensibilidad a estas.

Por otro lado, podría estar actuando un mecanismo interno en los canales de sodio que inhibe la unión de las toxinas con sus receptores específicos. De las dos especies de pectínidos probadas hasta la fecha *Placopecten magellanicus* y *Argopecten irradians*, únicamente la segunda presenta un sistema nervioso moderadamente sensible a la saxitoxina, siendo *P. magellanicus* prácticamente insensible (Twarog & Yamaguchi, 1975). Estos autores refieren que esta resistencia a las toxinas puede deberse principalmente a una propiedad de las fibras nerviosas individuales. Además, al parecer la variabilidad interespecífica en la resistencia a estas toxinas parece estar asociada con características de unión especie-específicas a los sitios receptores polipeptídicos en el canal de sodio, o a la producción de proteínas de unión a la saxitoxina como ha sido documentado en otros taxa (Twarog, 1974; Daigo *et al.*, 1988; Mahar *et al.*, 1991). Asimismo, se ha documentado variación en la sensibilidad a las toxinas PSP dentro de los individuos de la misma localidad (Bricelj & Shumway, 1998). Denac *et al.* (2000), resaltan que las diferencias entre los sitios de unión de la saxitoxina y sus derivados, se podrían deber a mutaciones en los residuos de aminoácidos en la región del poro del canal de sodio, como ha sido demostrado en ratas (Kontis & Goldin, 1993), lo que sugiere una posible base genética para las diferencias intrapoblacionales en la sensibilidad a la toxina en moluscos bivalvos.

Además, debido a que existen isoformas de los canales de sodio y a que estos poseen diferentes propiedades referentes a la sensibilidad, se han realizado estudios en vertebrados donde se ha encontrado que existen canales de sodio resistentes y sensibles, lo cual podría ser otra causa de la baja sensibilidad. En el músculo cardíaco, los canales de sodio son menos sensibles que aquellos del cerebro y músculo esquelético, siendo que los primeros requieren concentraciones micromolares (canales resistentes) en lugar de concentraciones nanomolares de saxitoxina que requieren los segundos (canales sensibles) para ser bloqueados (Denac *et al.*, 2000).

Otro punto que cabe señalar y que podría ser la causa de la baja sensibilidad a las toxinas en *N. subnodosus*, es que a corto plazo los bivalvos no se ven usualmente afectados por PSP debido a que poseen músculos y nervios que operan principalmente por canales de calcio (Kao, 1993), siendo que la STX y sus derivados bloquean solamente los canales de sodio. Como menciona Landsberg (1990), elevados niveles de STX no son considerados letales o patógenos para los bivalvos, sin embargo, los efectos de una exposición crónica a la STX y sus derivados se desconoce.

Sistema de defensa de *Nodipecten subnodosus*

El sistema de defensa en moluscos bivalvos, al igual que la mayoría de los invertebrados, es un complejo de distintos sistemas, con funciones celulares y humorales, que cooperan juntas de manera coordinada para proveer protección de los organismos invasores, o de cualquier material extraño al organismo. En general, las reacciones biológicas inducidas por agentes estresantes, como podría ser el caso de las toxinas paralíticas (PSP) son variadas e incluyen: a) inhibición de actividades enzimáticas, b) síntesis de proteínas inducidas por estrés y c) modulación de las actividades de las enzimas envueltas en la destoxificación. Esto se ha observado en una gran variedad de organismos vivos (Dhainaut & Scaps, 2001).

Efecto de la alimentación en el sistema de defensa

El hecho de que los juveniles de *Nodipecten subnodosus* consumieran al dinoflagelado tóxico sin ningún efecto aparente, y dado que los dinoflagelados pudieron servir de complemento nutricional por su gran cantidad de ácidos grasos polinsaturados, nos puede dar un indicio del estado del sistema inmune en estos organismos. Varios estudios han demostrado que la calidad de la dieta algal afecta el crecimiento, desarrollo y estado de salud de los moluscos como en *Pecten maximus* (Delaunay *et al.*, 1993), *Crassostrea gigas* (Knauer & Southgate, 1997), *Ostrea edulis* (Berntsson *et al.*, 1997), entre otros. Delaporte *et al.* (2003), dicen que la composición de lípidos polares y por consiguiente de los parámetros inmunológicos de los hemocitos se ve afectada por la calidad de la dieta. En vertebrados se ha documentado que la composición y la función de las células inmunes están influenciadas por la composición de ácidos grasos en la dieta (Peterson *et al.*, 1998; Kelley & Rudolph, 2000; Calder, 2001). Por lo que parece existir una relación entre la nutrición y el estado de salud en los bivalvos al igual que ocurre en vertebrados.

Componentes bioquímicos (proteínas, lípidos y carbohidratos)

Las proteínas, lípidos y carbohidratos en juveniles de *Nodipecten subnodosus* revelaron cambios entre tejidos, sin embargo, no afectó en las actividades de estas biomoléculas debidas a la exposición mediante alimentación con *Gymnodinium catenatum* en la talla de 5.9 cm a diferentes tiempos (48 h y 24 d). Varios autores han analizado los cambios bioquímicos en moluscos, principalmente para cuestiones de crecimiento, e incluso para analizar estrés por contaminantes (Fraser, 1989; Whyte *et al.*, 1990), sin embargo, a excepción de las proteínas, no se han analizado estos componentes en pectínidos en respuesta a una exposición a dinoflagelados tóxicos. En *N. subnodosus* la glándula digestiva es la que mostró una mayor cantidad de proteínas, lípidos y carbohidratos, seguida del músculo. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Lodeiros (2001), que estudió los cambios bioquímicos en *N. nodosus* durante el crecimiento. Dice que el músculo y la glándula digestiva son los principales tejidos de reservas energéticas en los pectínidos, como se ha señalado en otros moluscos bivalvos (Barber & Blake, 1991). Chang *et al.* (1989), mostraron que en *Patinopecten yessoensis* la glándula digestiva contiene grandes cantidades de lípidos como depósito. Este almacenamiento de lípidos no ocurre en forma de tejido adiposo, como es característico en los vertebrados, sino que se almacena en forma de gotas de aceite intracelulares contenidos en células tubulares especializadas (Robinson *et al.*, 1981; Barber & Blake, 1991). Debido a lo anterior Lodeiros (2001) sugiere que el mayor papel de la glándula digestiva en *N. nodosus* es como almacenamiento de lípidos. Sin embargo, los datos encontrados en *N. subnodosus* no son indicativos del estado fisiológico del animal debido a la exposición a las toxinas parálíticas, ya que no se observaron diferencias con los controles a los cuales no se les suministró alimento tóxico, a pesar de que se ha demostrado que la glándula es el principal tejido de acumulación de las toxinas parálíticas en otras especies (Bricelj *et al.*, 1996b). Lo mismo sucedió con los carbohidratos donde no se observaron diferencias entre controles y tratamientos en los distintos tejidos, a pesar que se han observado variaciones en los componentes de carbohidratos en algunos moluscos debido a la exposición de sustancias tóxicas.

Asimismo, en los periodos de elevada disponibilidad de alimento las almejas depositan glucógeno en músculo y lípidos en la glándula digestiva, probablemente en razón a la subsiguiente síntesis de proteína en otros tejidos (Robinson *et al.*, 1981). El papel de las proteínas en los bivalvos es principalmente como componente estructural y bajo ciertas condiciones como combustible, así como, participan activamente en los

sistemas de defensa. Además cabe señalar que en el experimento largo de 24 d, a pesar de que no se observaron diferencias significativas entre tratamientos y controles en la glándula digestiva, se presentó una tendencia en estas macromoléculas a mostrar niveles más elevados en los organismos alimentados con *G. catenatum* durante 12 d, lo cual podría ser también un indicio del estado nutricional de las almejas y por lo tanto del estado de salud.

En la hemolinfa, el extracto crudo de las toxinas de *G. catenatum* tampoco afectó de manera significativa estos componentes bioquímicos, a excepción de los niveles de proteínas en la hemolinfa, los cuales si mostraron cambios en los organismos de la talla de 6.1 cm. En estos organismos se encontraron gónadas maduras y una coloración amarillenta en la hemolinfa, así como una disminución en los niveles de proteínas en hemolinfa de los organismos a los cuales se les inyectó el extracto crudo de las toxinas de *G. catenatum*. La cantidad de proteínas al igual que otros componentes bioquímicos pueden depender del estado de maduración del organismo (Paez-Osuna *et al.*, 1993). Como lo menciona Vassallo (1973), existe evidencia experimental que demuestra el transporte hemolinfático de metabolitos de las glándulas digestivas y del músculo a las gónadas en desarrollo en moluscos, siendo las principales fuentes de tipo proteico. El color amarillento puede ser debido a algún tipo de vitelogeninas que estén participando en el proceso de maduración. Se han encontrado que varios moluscos bivalvos como en *Crassostrea gigas* y *Crassostrea virginica*, así como en *Mytilus edulis*, contienen moléculas tipo vitelogeninas en tejidos gonádicos, presumiblemente de origen estrógeno (Blaise *et al.*, 2002). La disminución en los niveles de proteínas por efecto de la inyección del extracto crudo de *G. catenatum* nos pudiera dar un indicio de cierto daño a estas moléculas probablemente debido al estrés ocasionado, así como podría indicar que las almejas con gónadas maduras pueden ser más susceptibles a este tipo de toxinas, ya que el redirigir la energía interna para funciones fisiológicas específicas, puede debilitar las defensas del animal contra patógenos.

Células inmunocompetentes. Hemocitos

En invertebrados, los mecanismos de defensa se encuentran en la hemolinfa, que incluyen factores de coagulación, inhibidores de proteasas, sustancias antibacterianas y varias moléculas asociadas con los mecanismos de defensa. La información en los hemogramas de pectínidos sobre los cambios ocasionados por la presencia de patógenos o de contaminantes ambientales es escasa a pesar de que en moluscos

bivalvos los hemocitos cumplen importantes funciones en los mecanismos de defensa innata, además participan en otros procesos tales como reparación de tejidos, digestión de nutrientes, transporte y excreción. Al parecer las toxinas PSP tienen un efecto en los hemocitos al ser inyectadas, ya que se observó una disminución en el número durante las primeras horas de haber ingresado la toxina. Sin embargo a las 48 h se presentó un aumento sustancial en el número de estos (sobrepasando los niveles de los controles de manera significativa; $P < 0.01$), volviendo a disminuir a las 72 h y recuperando los niveles aproximadamente a las 120 h.

El hecho de que *Nodipecten subnodosus* disminuyera el número de hemocitos en la hemolinfa durante las primeras 24 horas pudo ser, como lo mencionan Pipe & Coles (1995), una consecuencia de la lisis, diapédesis, influjos de agua, reclutamiento reducido o movimiento de las células en circulación dentro de los tejidos por efecto de algún agente externo. De igual manera, un aumento en el número total de hemocitos circulantes, puede resultar ya sea en la proliferación de las células, o el movimiento de las células de los tejidos dentro de la circulación. La diapédesis y los influjos de agua sustancialmente modifican el volumen de agua de toda la hemolinfa en pelecípodos acuáticos y gasterópodos, los cuales poseen sistemas circulatorios abiertos. Como resultado, el número de hemocitos, el volumen del plasma y la concentración de proteínas en plasma también fluctúan. Sin embargo, el aumento sustancial a las 48 h pudo resultar a partir de una hemapoyesis para minimizar los efectos adversos ya que el número de hemocitos sobrepasó los niveles de los controles, para posteriormente volver a reducir el número de estos y restaurar los niveles basales aproximadamente a los 4 d de administrada la inyección.

Estudios preliminares de Jones *et al.* (1995) han demostrado la reducción del número y la actividad de los hemocitos circulantes en ostras expuestas a la diatomea *Pseudonitzschia pungens*. Este tipo de relaciones han sido ampliamente discutidas por otros autores, proponiendo que la interacción entre afloramientos de fitoplancton nocivo y moluscos bivalvos desencadena mecanismos de inmunosupresión, haciendo a los moluscos susceptibles al ataque por otros organismos patógenos. Lambert *et al.* (2001) estudiaron las infecciones provocadas por bacterias del género *Vibrio* en larvas y adultos de *Pecten maximus* y mediante una inyección de *Vibrio pectenica* en adultos se observó una disminución en la actividad de los hemocitos. Cheng (1989), observó que también los metales pesados, así como otro tipo de contaminantes ambientales pueden ser letales para los hemocitos y producir efectos de inmunosupresión en el organismo receptor, efectos que se han observado en otros

grupos de invertebrados (Dhainaut & Scaps, 2001). Además, se ha encontrado que a ciertas concentraciones los metales pesados causan la inhibición de la fagocitosis, falta de estímulo para la hemapoyesis, así como, un incremento de muerte celular. Lacoste *et al.* (2002), encontró que cuando los ostiones están expuestos a estrés mecánico, los hemocitos inmunoactivos se movilizan dentro de ciertos tejidos donde el daño por el ataque del patógeno es más probable. Así, al parecer en este trabajo, las toxinas inyectadas estresaron a *N. subnodosus* de tal manera que provocaron efectos similares a los encontrados con otros agentes estresantes en moluscos bivalvos, causando una disminución en el número de hemocitos durante las primeras 24 h.

Consecuentemente, la densidad de los hemocitos puede ser un parámetro cuantificable de la respuesta de defensa de los moluscos bivalvos debido a estrés fisiológico o patológico. Asimismo, el conteo total de hemocitos en este trabajo mostró resultados similares a los obtenidos en la especie cercana *Nodipecten nodosus* con valores cercanos a los 10×10^6 cel/mL hemolinfa. El número de hemocitos presentes en la hemolinfa de estos pectínidos parece que es mucho mayor a lo reportado en otros bivalvos, como en el trabajo de Wootton *et al.* (2003) que realizaron conteos totales y diferenciales de hemocitos en *Mytilus edulis*, *Cerastoderma edule* y *Ensis siliqua*, de los cuales se obtuvieron entre 4 y 6×10^6 cel/mL de hemolinfa. Debido a que los pectínidos no presentan hemocitos granulares, la fagocitosis aparentemente es llevada a cabo por los hemocitos hialinos. Esto ha sido observado en *Pecten maximus*, donde los hemocitos hialinos son capaces de fagocitar zymosan y bacterias del género *Vibrio* (Mortensen & Glette, 1996). Además, se ha demostrado la capacidad fagocítica en los hemocitos hialinos de una gran variedad de especies, solo que de forma reducida en comparación a la que se lleva a cabo por los hemocitos granulares, como en el cangrejo *Carcinus maenas* (Bell & Smith, 1993).

Así, el hecho de carecer de hemocitos granulares, podría ser la razón del por qué se presenta un mayor número de hemocitos tanto en *N. subnodosus*, como en *N. nodosus*, como se mostró en el conteo total de estos, comparados con mejillones y ostras que contienen gran cantidad de hemocitos granulares, y menor número de hemocitos totales, donde mantener un número elevado de hemocitos hialinos, que supuestamente tienen poca o nula capacidad fagocítica, ayudaría a hacer más eficiente los procesos de fagocitosis, así como de las enzimas liberadas durante estos procesos. Aunque no se hicieron evidentes en los cortes histológicos, no se descarta la presencia de hemocitos granulares en *N. subnodosus*.

EROs, enzimas antioxidantes y peroxidación de lípidos.

La inmunidad innata es la primer línea de defensa en organismos multicelulares, y está presente tanto en invertebrados como en vertebrados (Wen-Chao *et al.*, 2000). Uno de los procesos referentes a este tipo de inmunidad es la fagocitosis. Se le considera el mecanismo predominante de defensa interna en invertebrados y de todas las especies de bivalvos, ya que las especies de bivalvos estudiadas hasta la fecha tienen actividad fagocítica. Se conoce que los hemocitos son los que cumplen esta función y que son eficientes para fagocitar materiales extraños inmediatamente después del contacto (Mortensen & Glette, 1996; Arumugam *et al.*, 2000). Esta actividad genera una variedad de moléculas citotóxicas, tal como la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs; O^2 , OH, H_2O_2 , O \cdot). Estas sustancias son altamente microbicidas y también capaces de matar los organismos ingeridos o encapsulados. Recientemente, se ha demostrado que la fagocitosis en los mejillones está asociada con la actividad lisosomal de la NADPH oxidasa en membranas y la generación de aniones superóxido (Noel *et al.*, 1993; Carballal *et al.*, 1997; Arumugam *et al.*, 2000). Sin embargo, cantidades excesivas de EROs son dañinas para las células inmunes, ya que pueden atacar componentes celulares y producir daño e incluso la muerte, mediante la oxidación de lípidos de membrana, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. Estos efectos oxidantes, pueden ser neutralizados por sistemas antioxidantes que los organismos han desarrollado. Donde juegan un papel vital en mantener las células en un ambiente reducido y en protegerlas del estrés oxidativo (De la Fuente & Victor, 2000). Entre estas enzimas antioxidantes se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX), que en condiciones basales mantienen la homeostasis en los organismos vivos (Nusetti *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando se rompe el balance entre las moléculas oxidantes y las defensas antioxidantes, se presenta la condición de estrés oxidativo, que puede generar importantes daños celulares y tisulares.

En *N. subnodosus* se observó que estas enzimas antioxidantes están presentes tanto en tejidos como en hemolinfa, lo que nos indica, que estos organismos al igual que la gran mayoría de los organismos vivos poseen este tipo de sistemas antioxidantes. Sin embargo, los niveles encontrados no mostraron diferencias significativas en los diferentes tratamientos lo que nos indica que esta producción no fue estimulada por el dinoflagelado tóxico, y que los niveles encontrados son los basales en la producción de EROs así como de enzimas antioxidantes, y esto debido a que las EROs son continuamente producidas en los sistemas biológicos como

bioproductos del metabolismo oxidativo (Gamble *et al.*, 1995). Así, los sistemas biológicos se encuentran en un constante sistema de oxido-reducción para mantener la homeostasis y el buen funcionamiento en los organismos vivos, con lo que, un balance en las enzimas oxidantes como en las antioxidantes es de gran importancia.

En la glándula digestiva de *N. subnodosus* se mostraron las mayores actividades en estas enzimas, como se ha observado en otros invertebrados marinos (Nussetti *et al.*, 2001), ya que la glándula digestiva es el sitio donde ocurre la digestión intracelular y es también el sitio de mayor captación de compuestos xenobióticos y toxinas, y es donde están localizadas la mayor parte de enzimas que destoxifican capaces de catalizar la producción de los oxiradicales (Gamble *et al.*, 1995). Asimismo, no se presentaron efectos en los tratamientos en las mediciones de glándula digestiva realizada a los distintos tiempos de exposición al dinoflagelado. Sin embargo, las branquias presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$), con un aumento en las actividades de glutatión peroxidasa (GPX) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, indicadoras de la peroxidación de lípidos) de los tratamientos respecto a los controles, en los organismos de 5.9 cm que fueron alimentados durante 5 h con *Gymnodinium catenatum*. Este aumento en la peroxidación de lípidos a las 5 h nos puede indicar algún daño de tipo celular. Los efectos mediadores de los radicales libres incluyen daño del ADN, inactivación de enzimas, peroxidación de las membranas a nivel celular o subcelular resultando en la generación de hidroperóxidos de lípidos y complejos de compuestos carbonilo, incluyendo malondialdehído. La medición del consumo de O_2 y los productos de descomposición de los hidroperóxidos lipídicos, tales como malondialdehído (MDA), son marcadores relevantes de la peroxidación de lípidos. Debido a que en la branquia se llevan procesos de intercambio gaseoso y alimentación, siendo una de las primeras barreras donde pasa el alimento, las mitocondrias en este tejido son sitios relevantes para el daño oxidativo. Aunque todas las clases de macromoléculas son susceptibles al ataque de los radicales, los ácidos grasos polinsaturados son especialmente sensibles a la oxidación debido a sus estructuras de doble enlace. Por consiguiente, el aumento en la GPX puede ser debido a que también los niveles de peroxidación de lípidos aumentaron ya que la GPX reduce eficientemente H_2O_2 y a los peróxidos de lípidos a expensas de GSH por la enzima glutatión reductasa utilizando NADPH como cosustrato (Fridovich, 1998; Nussetti *et al.*, 2001), por lo que la inducción de la actividad GPX en los tratamientos puede reflejar también un incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno endógeno. Existen varios tipos de GPX donde unas se encuentran en el espacio extracelular y otras actúan específicamente en los

hidroperóxidos de fosfolípidos. Asimismo, se observó cierta inhibición de la actividad SOD en músculo y branquias, siendo que en los fagocitos de mamíferos, la SOD participa en los sistemas de defensa innata el sustrato es un radical libre inestable que puede estar presente solo en pequeñas cantidades (McCord & Fridovich, 1969; Fridovich, 1975), lo cual pudo ser ocasionado por el probable aumento en H_2O_2 , ya que según Symonyan & Nalbandyan (1972), un aumento en H_2O_2 puede causar la reducción e inactivación de la enzima.

Asimismo, en la hemolinfa no se observó un efecto en las enzimas antioxidantes debido a la inyección del extracto crudo. La sugerencia de que la liberación de oxidoradicales por los hemocitos de bivalvos actualmente mata patógenos está en debate, ya que se ha demostrado que en algunas especies en los procesos de fagocitosis no se presenta la liberación de estos radicales (Pipe & Coles, 1995). En el presente trabajo se observó un número reducido de actividad SOD en los tratamientos durante las primeras 24 h y posteriormente un aumento, pero no se mostró un efecto significativo, aunque si se muestra una tendencia a una disminución y esto probablemente debido a la disminución del número de hemocitos que se presentó durante ese periodo de tiempo. Esto nos puede indicar que los hemocitos probablemente participen en la producción de EROs debido a un estallido respiratorio leve que pudo ser ocasionado por este tipo de toxinas tanto en la hemolinfa como en los tejidos. En algunas especies no se ha encontrado la presencia de EROs durante la fagocitosis como es el caso de *Ruditapes decussatus* (López *et al.*, 1994). Sin embargo, en las almejas *Tridacna crocea*, *Mya arenaria* y *Mercenaria mercenaria* ha sido posible inducir la producción de EROs en los hemocitos (Anderson, 1994; Nakayama & Maruyama, 1998) y se ha demostrado que en los hemocitos del pectínido *Patinopecten yessoensis* se produce H_2O_2 (Nakamura *et al.*, 1995).

Enzimas hidrolíticas: lisozima y serin proteasas.

La producción de especies reactivas de oxígeno por hemocitos fagocíticos de los bivalvos es acompañada por la liberación de enzimas degradativas para la destrucción de material extraño. Estas enzimas lisosomales ubicadas dentro de los hemocitos participan principalmente en la degradación del material fagocitado. En algunos casos, los gránulos son liberados y con ellos las enzimas mediante un proceso de degranulación de los hemocitos dentro del plasma o liberados en compartimentos extracelulares de otros tejidos, para degradar materiales extraños (López *et al.*, 1997; Hauton *et al.*, 2001). Se han descrito varias enzimas hidrolíticas, indicativas de la

presencia de lisosomas y de su contenido enzimático: lisozima, fosfatasa, esterasas, proteinasas, lipasas y glicosidasas, entre otras (Vargas-Albores & Barraco, 2001). Las enzimas lisosomales han sido detectadas en una gran variedad de moluscos bivalvos como en *Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*, *Mercenaria mercenaria*, *Mya arenaria*, *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, entre otros (López *et al.*, 1997b). El sistema API ZYM (Biomereux) permite identificar 19 enzimas hidrolíticas de enzimas lisosomales que pueden participar en la degradación intracelular (endocitosis) y extracelular (exocitosis) de materiales extraños (López *et al.*, 1997b). En este trabajo se detectaron enzimas lisosomales tanto en tejidos como en la hemolinfa mediante el sistema API ZYM.

En los tejidos se obtuvieron 18 de las 19 enzimas del kit distribuidas en cuatro tejidos: branquia, glándula, manto y músculo. Las actividades enzimáticas incluyeron fosfatasa, proteasas, esterasas, lipasas y glicosidasas, donde la mayoría de estas estuvieron presentes en los cuatro tejidos. Se presentaron algunas diferencias de los controles respecto a los tratamientos. Asimismo, en la hemolinfa se obtuvieron resultados diferentes con la talla de 5.9 y 6.1 cm. En los juveniles de 5.9 cm se encontraron 7 de las 19 enzimas, mientras que en la talla de 6.1 cm se detectaron 16, además en ambas tallas se encontró actividad lisozima, la cual mostró una importante diferencia de los controles respecto a los tratamientos. Luna-González (2003) estudió los homogeneizados de larvas y juveniles de *Crassostrea gigas* y encontró enzimas que probablemente están participando en el sistema de defensa como fosfatasa ácida, esterasa y β glucuronidasa. Boetius & Felbeck (1995) demostraron el potencial de las enzimas hidrolíticas en tejidos de invertebrados pertenecientes a las ventilas hidrotermales y en un bivalvo. Encontraron actividad fosfatasa, esterasas, β glucuronidasa y leucin-aminopeptidasa. Estas enzimas son muy importantes en los sistemas de defensa en contra de agentes patógenos en bivalvos en un gran número de invertebrados marinos. En las branquias de *Nodipecten subnodosus* se observaron diferencias significativas en la fosfatasa alcalina, esterasa C4, tripsina, α quimiotripsina y α galactosidasa, en todos los casos observándose un aumento de las actividades en los organismos alimentados con el dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum*. Asimismo en la glándula se observó un aumento en la actividad lipasa en los tratamientos, así como una disminución en las actividades α galactosidasa y α manosidasa. En el manto se observó una disminución en las actividades β glucuronidasa, α glucosidasa y β fucosidasa, así como en el músculo solo se presentaron diferencias en la α fucosidasa.

Las enzimas más notorias donde se presentaron cambios fueron las proteasas y las glicosidasas. En las branquias y en menor grado en el manto, se secreta una gran cantidad de moco que sirve en los procesos de alimentación, así como también sirve como la primera línea de defensa contra organismos patógenos y se cree que contiene actividades protectoras (Fisher, 1992; Ward *et al.*, 1994; Ward, 1996), por lo que pudiera ser la razón de que ciertas actividades como la esterasa, ciertas proteasas como la tripsina y a quimiotripsina y glicosidasas, aumentaran o disminuyeran sus actividades en presencia del dinoflagelado tóxico, con fines de protección y/o digestión, ya que como lo mencionan Brun *et al.* (2000), las proteasas y glicosidasas juegan un papel importante en la patogenicidad de organismos parásitos, así como en los mecanismos de defensa y digestión. Reid (1982) al estudiar los procesos gástricos digestivos, encontró enzimas como amilasa, tripsina, catepsina B, exopeptidasas, estereasas y fosfatasa, las cuales son secretadas en respuesta a la ingestión de comida. Los niveles de enzimas gástricas, son suficientes para lisar las membranas de las células, penetrar las paredes celulares y solubilizar parcialmente a los organismos ingeridos. Por esta razón probablemente los elevados niveles de lipasa en glándula digestiva podrían haber sido la respuesta al proceso digestivo ya que como se mencionó los dinoflagelados poseen una gran cantidad y variedad de lípidos que deben ser digeridos.

Además de la actividad presente en los tejidos, también se obtuvo la actividad de algunas enzimas hidrolíticas en la hemolinfa de *N. subnodosus*. La presencia de estas enzimas lisosomales ha sido demostrada en la hemolinfa de varios moluscos bivalvos como en los mejillones *Mytilus edulis* (Nöel, 1992; Pipe, 1990), *Mytilus galloprovincialis* (Cajaraville *et al.*, 1995; Carballal *et al.*, 1997), *Crassostrea virginica* (Cheng & Rodrick, 1975; Genthner *et al.*, 1999), *C. gigas* (Luna-González, 2003), entre otros. Los datos encontrados en la hemolinfa de *N. subnodosus* en la talla de 5.9 cm, tanto en los controles como en los tratamientos, son muy parecidos a los obtenidos por Genthner *et al.* (1999), que estudiaron los factores que influyen en la defensa contra bacterias de los hemocitos de *C. virginica*. Utilizaron el sistema API ZYM y encontraron 6 de las 19 enzimas con un promedio >5nmoles (Esterasa C4, Esterasa lipasa, leucina arilamidasa, fosfatasa ácida, naftol AS BI fosfohidrolasa y β galactosidasa). De estas 6 la C4 esterasa fue la única que mostró variación estacional en la actividad (mayor en invierno que en verano) contra las bacterias. Asimismo, la aminopeptidasa leucina arilamidasa mostró las mayores actividades. En este trabajo se encontraron 7 de las 19 siendo asimismo la leucina arilamidasa la que también mostró los mayores niveles.

Cabe señalar que tanto la fosfatasa ácida como la N acetil β glucosaminidasa se inhibieron en la hemolinfa de los organismos tratados, probablemente por el efecto de las toxinas, haciendo notar además que no estuvo presente la β glucuronidasa. La fosfatasa ácida ha sido encontrada en los hemocitos de varios bivalvos (López et al., 1997b; Wootton *et al.*, 2003). Cheng (1989), demostró un incremento en la síntesis de la β glucuronidasa seguida de una exposición al cobre en *C. virginica*, pero una mezcla de Cu y Cd inhibieron la síntesis de la fosfatasa ácida, así como otras enzimas hidrolíticas en la hemolinfa. Se dice que algunas de estas enzimas son exclusivas de los granulocitos, como la fosfatasa ácida y la β glucuronidasa, por lo que su importancia se cree radica en los sistemas de protección contra patógenos (Cheng, 1989; Cima *et al.*, 2000). Sin embargo, cabe recordar que varios autores argumentan que no existe la presencia de hemocitos granulares en pectínidos por lo cual probablemente los hemocitos hialinos cumplan todas estas funciones en pectínidos como en *N. subnodosus*.

Sin embargo, los resultados obtenidos en la talla de 6.1 cm fueron similares a los de López *et al.* (1997), quienes encontraron 18 de las 19 enzimas del kit API ZYM en la hemolinfa de *Ruditapes decussatus*, siendo la α galactosidasa la única que no encontraron y los niveles más elevados de actividad correspondieron a la fosfatasa ácida y a la leucina arilamidasa. La β glucuronidasa y la fosfatasa ácida se encontraron solamente en los granulocitos de esta especie. Estos gránulos citoplásmicos contienen una gran variedad de enzimas hidrolíticas y pueden ser consideradas como una forma de lisosoma. Los granulocitos fagocitan bacterias y las digieren en lisosomas secundarios, lo que resulta en la acumulación de cuerpos residuales citoplásmicos y glicógeno que puede ser liberado a la hemolinfa (Hine, 1999), provando que varias enzimas lisosomales de tipo glicosidasas estén actuando en el sistema, así como otros tipos de enzimas. En este trabajo esta talla de almejas presentó gónadas maduras, mientras que esto no se observó en la talla de 5.9 cm. Durante los procesos de maduración de las gónadas existe un intercambio de una gran cantidad de enzimas entre los tejidos, mediante el transporte a través de la hemolinfa principalmente, por lo cual el hecho de haber encontrado un mayor número de enzimas en esta talla está relacionado con los procesos reproductivos.

Algo que hay que hacer notar es que algunas enzimas en la hemolifa disminuyen o incrementan su contenido, de acuerdo a la tendencia mostrada por el conteo total de hemocitos, siendo que a las 24 h casi todas las enzimas redujeron sus niveles, aumentando de tal manera que las enzimas también aumentaron a las 48 h.

Esto nos podría indicar la importancia de los hemocitos en los sistemas de defensa, donde el proceso de inmunosupresión como han mencionado varios autores podría estar presente durante algunas horas haciendo susceptibles a las almejas a cualquier ataque por patógenos, pero días después recuperar sus capacidades de defensa. Además, algo importante es que en los organismos tratados se presentó actividad β glucuronidasa, así como la fosfatasa ácida lo cual nos indica que probablemente la toxina o la elevada concentración de alimento, puede inducir la liberación de ciertas enzimas presentes en los hemocitos hialinos y por consiguiente la liberación de los pocos gránulos que este tipo de hemocitos puede presentar.

Otra enzima lisosomal detectada en la hemolinfa de *N. subnodosus* fue la lisozima. La lisozima es una enzima que hidroliza las uniones β -1-4 entre los ácidos N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico de las paredes celulares de las bacterias gram positivas. Esta enzima se detecta usualmente utilizando su actividad contra *Micrococcus lysodeikticus*. Se ha encontrado en la hemolinfa de diferentes bivalvos (Cheng *et al.*, 1975; Pipe, 1990). La función biológica de la lisozima en moluscos marinos es importante como defensa contra las infecciones bacterianas. Por otra parte, también se ha sugerido una función digestiva ya que adquieren estas bacterias del medio y las utilizan como alimento (Ito *et al.*, 1999). En *N. subnodosus* no se observaron diferencias significativas en el contenido de lisozima para la talla de 5.9 cm a las 8 h de la inyección del extracto crudo en la hemolinfa. Sin embargo, en la talla de 6.1 cm si se observó un efecto a partir de las 12 horas de comenzado el experimento. Probablemente la lisozima es producida en los hemocitos y liberada al plasma cuando se necesita durante diferentes estados fisiológicos y patológicos de moluscos y una disminución en los niveles de lisozima, como lo menciona Cheng (1989), refleja una inmunodeficiencia en moluscos marinos. La respuesta de ésta enzima a la toxina y de otro tipo de estresores no tiene una acción inmediata, como se ha demostrado en otro tipo de invertebrados como en ciertos anélidos donde la intensidad de la respuesta varía de acuerdo al tipo de estresor suministrado (Dhainaut & Scaps, 2001). Al parecer estos procesos requieren ARN y la síntesis de proteína *de novo* en respuesta a las bacterias patógenas y otros estresores. Cheng (1989), estudió ciertas enzimas hidrolíticas pertenecientes al sistema inmune de *Crassostrea gigas*, exponiendo ostiones a metales pesados como Cd y Cu *in vivo*. El Cd redujo los niveles de lisozima en el plasma y el Cu redujo los niveles de fosfatasa ácida y β glucuronidasa también en plasma. Este efecto de la reducción de la actividad lisozima por metales pesados se ha observado en otros invertebrados donde la actividad se inhibe por el Cu (Goven *et al.*, 1994).

Por otra parte, la tripsina y la α quimiotripsina representaron diferencias marcadas entre controles y tratamientos, tanto en los tejidos como en hemolinfa. En las branquias, se observó actividad en los organismos tratados. Asimismo, en la hemolinfa en ambas tallas probadas se detectó la α quimiotripsina. Sin embargo en la talla de 5.9 cm no se presentó actividad en los controles, mientras que en la talla de 6.1 cm que presentaban gónadas maduras, se identificaron tanto en los tratamientos como en los controles aunque no se presentaron diferencias significativas entre ambas.

Debido a que en las branquias se secreta una gran cantidad de mucus que sirve en los procesos de alimentación y también sirve como la primera línea de defensa contra organismos patógenos, puede que la presencia de estas enzimas sea debida al reconocimiento del alimento tóxico o a la cantidad de alimento, ya sea para protección o procesos de alimentación en *N. subnodosus*, como se ha mostrado en las branquias de *Crassostrea virginica* (Fisher, 1992). La fagocitosis en moluscos parece poseer factores relacionados a las serin proteasas (Nöel *et al.*, 1993). Asimismo, estas serin proteasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han obtenido de varias fuentes tanto en vertebrados como invertebrados (Walsh & Wilcox, 1970). Como lo mencionan Krem & Di Cera (2002), la familia de las serin proteasas a la cual pertenecen la quimiotripsina y la tripsina, poseen una gran diversidad de funciones fisiológicas como los procesos digestivos y degradativos, coagulación sanguínea, inmunidad celular y humoral, fibrinólisis, fertilización, desarrollo embrionario y remodelación de tejidos. Varias de estas funciones están mediadas por proteasas organizadas en cascadas en las cuales cada proteasa es secretada como un zimogeno inactivo y es subsecuentemente activada por la proteasa siguiente. Estas constituyen respuestas normales que ocurren a tasas bajas pero constantes en gran variedad de organismos. La actividad de estas serin proteasas, si no es controlada, puede ser destructiva para la célula o al organismo por lo que necesita ser regulada por inhibidores endógenos, y así es necesario un equilibrio proteasa/anti-proteasa (Zang & Maizels, 2001).

La presencia de estas proteasas nos puede indicar que el hecho de haber alimentado a *N. subnodosus* con el dinoflagelado tóxico o el provocar un estrés severo al inyectarle la toxina, pudo haber dado lugar a la activación de una o varias cascadas, mediante equilibrios que implican serin proteasas/inhibidores de serin proteasas. Por ejemplo, se podrían activar sistemas como el que se ha demostrado en las reacciones

inmunes en otros grupos de invertebrados que implican moléculas citolíticas inactivas que son activadas por las serin proteasas que pueden actuar en procesos como los de citolisis, reacciones antibacterianas y coagulación. Este proceso se ha visto que está relacionado al sistema enzimático profenoloxidasa (proFO) en anélidos y otro organismos (Copper & Roch, 2003). Se conoce que el sistema proFO es activado por serin proteasas que en turno dan lugar a la forma activa como fenoloxidasa (FO). Estas enzimas son reguladas por inhibidores de proteasas como la alpha2-macroglobulina e inhibidores de tripsina como la pacifastina (Cheng *et al.*, 2004). La formación de melanina depende de la enzima fenoloxidasa (FO) la cual es la llave en un complejo enzimático de cascadas mediadas por serin proteasas. Las reacciones inmunes celulares tales como la formación de cápsulas y reparación de heridas están usualmente acompañadas por melanización (Barracco *et al.*, 1999). Este podría ser un sistema importante en *N. subnodosus* ya que además que se observó melanización en las branquias y manto, se ha demostrado la presencia de este sistema en juveniles de esta especie (Luna *et al.*, 2003), así como la toxina de *G. catenatum* o el estrés podrían haber generado la presencia de serin proteasas que por consiguiente, activaran estos sistemas. La activación del sistema proFO por tripsina, quimiotripsina o por otro tipo de componentes celulares de microorganismos, ha sido observada en *N. subnodosus* (Luna-González *et al.*, 2003), así como en otras dos especies de pectínidos como *Placopecten magellanicus* y *Argopecten irradians* (Deaton *et al.*, 1999). Además la actividad FO se ha detectado en hemocitos y en la hemolinfa de varios moluscos bivalvos, incluyendo pectínidos, donde se ha reportado que esta actividad es liberada por los hemocitos al plasma (Coles & Pipe, 1994; Azokan *et al.*, 1998; Carballal *et al.* 1997; López *et al.*, 1997b; Deaton *et al.*, 1999). El papel de la fenoloxidasa en la defensa de los bivalvos es incierta, sin embargo, esta puede ser más importante en otras funciones como por ejemplo la formación de fibras de biso, en el crecimiento y reparación de la concha (Deaton *et al.*, 1999), así como estas enzimas metabólicas pueden ser sensitivas a los cambios metabólicos impuestos por la reproducción (gametogénesis y desove), generando proteólisis específica, por lo que la presencia de ambas enzimas en los organismos con gónadas maduras nos podría dar un indicio de la probable participación de estas enzimas en los procesos reproductivos.

Acetilcolinesterasa (AChE)

La acetilcolina (ACh) es un conocido neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico de vertebrados e insectos, y la mayoría del conocimiento acerca de la síntesis y metabolismo han sido estudios derivados del sistema nervioso de mamíferos. La ACh se ha identificado recientemente en un gran número de tejidos no neuronales de mamíferos incluyendo linfocitos, epitelio muco-cutáneo, células epiteliales gastrointestinales, respiratorios y urogenitales, placenta y células vasculares endoteliales (Horiuchi *et al.*, 2003). Asimismo, se ha reportado la presencia de sistemas nerviosos colinérgicos en invertebrados como nemátodos (Brownlee *et al.*, 2000), moluscos (Brzin, 1975), moluscos bivalvos y equinodermos (Khotimchenko & Deridovich, 1991). La principal función de la ACh es llevar la señal de las células nerviosas a las células del músculo. Cuando las células nerviosas motoras obtienen la señal del sistema nervioso, este libera acetilcolina dentro de la sinapsis con las células musculares. Después la acetilcolina abre los receptores en las células musculares, provocando el proceso de contracción. Una vez que la señal a pasado, el neurotransmisor debe ser destruido, así prosigue a ser degradado por la acetilcolinesterasa (AChE) en las uniones neuromusculares y neuroefectoras, y por la butirilcolinesterasa (BChE) en plasma, hígado y elementos neuronales. Así, la actividad de las AChE ha sido relacionada a la transmisión de los impulsos nerviosos en los tejidos con una elevada actividad neuromuscular (Bocquené *et al.*, 1997; Najimi *et al.*, 1997).

La actividad AChE estuvo presente tanto en los tejidos como en la hemolinfa de *N. subnodosus*. En los tejidos se encontró en mayor grado en branquias y manto, sin embargo en la hemolinfa se reportaron valores mayores. Solo se observaron efectos significativos en manto, presentándose un aumento de los tratamientos respecto a los controles, debido a una exposición de alimentación con el dinoflagelado tóxico, y donde solamente se midió la actividad en glándula digestiva no se observaron efectos marcados. Sin embargo, en un estrés severo como lo fue con la inyección, se reduce la actividad, pero se restablece aproximadamente a las 48 h. No existen trabajos relacionados con el efecto de esta enzima debida a una exposición por dinoflagelados tóxicos, pero si existen una gran cantidad de trabajos relacionados con contaminantes ambientales y metales pesados en bivalvos. La técnica empleada en *N. subnodosus* identifica tanto la AChE como la BChE, por lo que probablemente la actividad encontrada en tejidos se relacione a la AChE y la encontrada en hemolinfa a la BChE, como se ha demostrado en otros grupos de organismos (Dailianis *et al.*, 2003).

Dailianis *et al.* (2003), encontraron en *Mytilus galloprovincialis* que la hemolinfa fue la que presentó mayor actividad, seguida de las branquias, glándula digestiva y los menores valores se encontraron en el manto, con lo que argumentan que existen diferencias específicas de esterasas en los tejidos. Najimi *et al.* (1997), reportaron que la actividad más alta se encontró en glándula y branquias comparado al manto y al músculo en *M. galloprovincialis*, mientras que Ozretic & Krajinovic-Ozretic (1992), encontraron en la misma especie que la máxima actividad la presentó la glándula digestiva. En *Perna perna* los valores máximos se observaron en glándula digestiva y músculo y la mínima en las branquias, mientras que en *M. edulis* la actividad máxima se reportó en las branquias (Bocquene, 1990).

El hecho de que se observó una reducción en la actividad en la hemolinfa durante las primeras 48 h debido al estrés causado por la inyección de la toxina, puede ser debida a que cuando las enzimas son bloqueadas, estas no pueden participar en la hidrólisis de la acetilcolina, con lo que se presenta una acumulación del neurotransmisor, su acción es acrecentada, y finalmente puede causar la muerte. La actividad acetilcolinesterasa (AChE) es inhibida en presencia de compuestos organofosforados y carbamatos, así como de metales pesados, como se ha demostrado en varias almejas y mejillones (Najimi *et al.*, 1997).

En *N. subnodosus* los niveles de AChE disminuyeron en la hemolinfa por efecto de la inyección de las toxinas, que al saber actúan en el sistema nervioso, y nos pueden dar un indicio de la probable presencia de nervios colinérgicos en esta especie que están siendo afectados por las toxinas paralíticas. Además de la retracción observada en manto, la falta de contracción en el músculo y la elevada actividad en branquias también pueden ser indicativas de este hecho. Sin embargo, la ACh también está presente en otras regiones donde la inhibición no afecta la viabilidad o se ha encontrado que puede cumplir funciones que no están relacionadas al impulso nervioso, como por ejemplo Hanlon *et al.* (1990), quienes sugieren la presencia de una ACh no neuronal en calamar que está envuelta en la regulación de cambios ópticos en los iridóforos activos. Asimismo, como se observó con otras enzimas de este trabajo, en este caso podría ser que las enzimas no estuvieran relacionadas al proceso de maduración de gónadas ya que como lo han reportado Owen *et al.* (2002), el hecho de haber expuesto a *Pecten ziczac* durante 15 d inhibió la actividad AChE, lo cual no estuvo relacionado a cambios bioquímicos o fisiológicos asociados con la maduración de la gónada y el desove.

La presencia de ACh en invertebrados ha sido sugerida indirectamente por estudios empleando protocolos histoquímicos o bioquímicos para examinar los componentes colinérgicos (como AChE, ChAT). Sin embargo, Horiuchi *et al.* (2003), encontraron que la ACh ha sido expresada a través de la evolución y sugieren que ha servido como un modulador de funciones celulares desde el origen de la vida, ya que encontraron que la ACh se distribuye en la mayoría de los organismos vivos incluyendo plantas, bacterias, hongos y animales.

Oxido nítrico (ON)

El ON es una molécula gaseosa, soluble en agua y lípidos que regula varias respuestas fisiológicas en el sistema cardiovascular y nervioso. La ON está envuelta en numerosos procesos fisiológicos y patológicos en mamíferos, que incluyen la regulación de la circulación, función neuronal y respuesta inmune (Toda & Okamura, 2003; Korhonen, 2002). En animales, el ON es generado enzimáticamente por la familia de enzimas óxido nítrico sintasas (ONS) a partir del aminoácido semiesencial L-arginina, con la producción simultánea de L-citrulina. Es una reacción de oxidación de cinco electrones, y es catalizada por al menos tres isoformas de la enzima ONS. La ONS comprende una familia de varias isoenzimas inducibles y constitutivas. En mamíferos estas son descritas como isoforma III (expresada en células endoteliales, ONSendotelial), isoforma II (expresada en células inducidas por citocinas, ONSinducible) e isoforma I (expresada en neuronas centrales y periféricas, ONSneuronal). La ONSn y la ONSe son constitutivas, mientras que la ONSi es inducible (Giba *et al.*, 1998; Hauslanden & Stamler, 1999; Murphy, 1999). Las reacciones de síntesis son básicamente las mismas en las tres isoformas, pero la regulación de la producción de ON difiere entre ellas. La ONSn y la ONSe se han encontrado en el sistema nervioso central y periférico, así como en el endotelio vascular, respectivamente, aunque se conoce que se expresan en varios tejidos y tipos celulares (Korhonen, 2002).

En el presente trabajo se midió la óxido nítrico de manera indirecta mediante el método de Griess de nitritos y nitratos, que son los productos estables del metabolismo de la óxido nítrico. El decremento de $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ sugiere una inhibición en la actividad ONS en la hemolinfa de *Nodipecten subnodosus*. El efecto que se mostró fue evidente por la respuesta del extracto crudo de las toxinas de *Gymnodinium catenatum* tanto en la talla de 5.9 cm y 6.1 cm. La ONSi, puede ser inducida por varios factores tales como lipopolisacáridos, citocinas proinflamatorias, hipoxia y ADN o ARN

extraño. Es expresada en varios tipos celulares incluyendo macrófagos, células epiteliales, células del músculo liso y hepatocitos (Anderson *et al.*, 1992). Una vez que la ONSi es inducida, produce grandes cantidades de ON por largos periodos de tiempo (Korhonen, 2002). Conte & Ottaviani (1995), mostraron que la actividad de la ONS en hemocitos de moluscos se incrementa por adición de LPS de bacterias a las células. Tafalla *et al.* (2003) demostraron que *Ruditapes decussatus*, es capaz de producir ON en presencia de zymosan, lipopolisacáridos o bacterias patógenas, y que la producción de ON es independiente de la fagocitosis por los hemocitos (Tafalla *et al.*, 2003).

Sin embargo, al parecer la ONSi no fue activada en el presente trabajo, sino que de las tres isoformas presentes en vertebrados probablemente las que actuaron en *N. subnodosus* son las del tipo ONSe y/o la ONSn, las cuales son constitutivas en los organismos donde se han identificado. En *N. subnodosus* se observó una inhibición del ON comparado con los controles a los cuales no se les suministró la toxina, siendo que la actividad encontrada en los controles se podría considerar como los niveles basales de estas dos isoformas constitutivas, además de que las toxinas de *G. catenatum* actúan a nivel nervioso. Además, se ha observado que los granulocitos en humanos y los tejidos nervioso e inmune en invertebrados producen niveles basales de ON y además se asume que la ON es autoregulada en la naturaleza, y puede permitir el incremento o la inhibición de las respuestas celulares (Stefano *et al.*, 2002). Ambas isoformas participan en la regulación de procesos fisiológicos en el sistema cardiovascular y nervioso, y son reguladas a nivel transcripcional. La ONSn puede ser regulada por actividad neuronal, hormonas esteroides, citocinas inflamatorias y moléculas derivadas de bacterias. Similarmente, la expresión de la ONSe se ha visto que es modulada por el estrés de la deformación de los vasos sanguíneos, crecimiento celular, factores de crecimiento e hipoxia, entre otros (Korhonen, 2002). La producción de ON por estas ONS constitutivas se regula principalmente por la actividad enzimática y producen pequeñas cantidades de ON, donde los cambios en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular juegan un papel importante en la regulación de la síntesis de la ON, con lo que además la regulación de la ONSi difiere de las otras dos isoformas en que esta no es dependiente de Ca^{2+} y se regula a nivel transcripcional, mientras que la ONS endotelial y la ONS neuronal la regulación de la actividad toma lugar a nivel postraduccional causado por concentraciones de calcio en el citosol (Weiske & Wiesner, 1999; Korhonen, 2002).

A pesar de que es un mediador de la señal intercelular nerviosa no colinérgica en tejidos y órganos inervados tanto en vertebrados como en invertebrados (Toda & Okamura, 2003), se ha demostrado que la acetilcolina en células endoteliales y glutamato en el cerebro inducen un incremento en Ca^{2+} a través de sus receptores y activan la enzima ONS y la producción de ON. Es bien conocido que la generación del potencial de acción nervioso por estímulos eléctricos envuelve el influjo transmembranal de Na^{2+} en las terminales nerviosas y la despolarización inducida abre las compuertas de los canales dependientes de Ca^{2+} , permitiendo así un influjo de iones Ca^{2+} e iniciando así la síntesis de ON (Korhonen, 2002). Con lo que podrían estar ampliamente relacionadas tanto la enzima AChE y la ONS en los efectos fisiológicos producidos por las toxinas de *G. catenatum* ya que en ambas se observó un efecto significativo debido a un estrés severo inducido por las toxinas de *G. catenatum*. Como lo mencionan Toda & Okamura (2003), la ONSn produce varias acciones además de la relajación vascular del músculo liso. En el sistema nervioso central, la ON producida y liberada de células postsinápticas controla la liberación del neurotransmisor glutamato, así como se ha demostrado un vínculo con la liberación de otros neurotransmisores, como la acetilcolina y dopamina, que se han reportado en cerebro y otros tejidos no vasculares de vertebrados. Sin embargo debido a que se han reportado respuestas adrenérgicas y colinérgicas en varios moluscos bivalvos (Lacoste *et al.*, 2001; Lacoste *et al.*, 2001b), esto nos da un indicio de que moléculas de este tipo pueden estar actuando en la respuesta neuroinmune de *N. subnodosus*, además de los efectos observados en los tejidos como la retracción del manto y la falta de capacidad para cerrar las valvas por efecto de la inyección de las toxinas, nos pueden servir como marcadores en los efectos de estas toxinas en pectínidos.

8. CONCLUSIONES

El conocimiento de los mecanismos de defensa y resistencia a enfermedades es esencial en estudios de fisiología y patología animal. Los bivalvos en general, por su característica filtroalimentadora, pueden acumular una gran variedad de compuestos tóxicos desde contaminantes hasta toxinas producidas por otros sistemas vivos, como es el caso de las toxinas que producen ciertos dinoflagelados y que los bivalvos adquieren mediante alimentación y que pueden ser nocivos para el organismo que las consume, representando una severa limitación para su cultivo, así como para la industria y salud humana. El estudio de la inmunotoxicidad en bivalvos e invertebrados en general, está en sus inicios por lo que se necesita una evaluación a fondo del potencial inmunotóxico de los factores de estrés en estos organismos. El estudio del sistema de defensa de *Nodipecten subnodosus* es importante para poder evaluar las modificaciones producidas por perturbaciones bióticas.

Varios autores argumentan que los dinoflagelados tóxicos tienen poco o casi nulo efecto en los organismos huéspedes, aunque existen otros autores que argumentan lo contrario. Los resultados del presente estudio muestran que los juveniles de *N. subnodosus* no exhibieron aparentemente respuestas fisiológicas adversas cuando se alimentaron con el dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum*. En *N. subnodosus* la talla de las almejas así como el tamaño y concentración de alimento juegan un papel importante en los procesos de alimentación, siendo las almejas pequeñas más susceptibles a la reducción en las tasas de filtración, producción de pseudoheces y al cierre parcial de las valvas a elevadas concentraciones de alimento y probablemente estas toxinas no están envueltas directamente en la inhibición de las respuestas alimenticias, ya que las tallas más grandes (>5 cm) no presentaron efectos adversos evidentes en *N. subnodosus* alimentadas con *G. catenatum* a diferentes tiempos. Al parecer la mezcla suministrada a los tratamientos de esta talla (*Isochrysis galbana* y *G. catenatum*), estimuló la actividad alimenticia lo que pudo servir como complemento alimenticio debido a la gran cantidad de ácidos grasos polinsaturados que contienen los dinoflagelados, siendo estos ácidos grasos de requerimiento esencial para el desarrollo y buen estado de salud en moluscos bivalvos. Además, fue evidente el estado activo de filtración y su permanente adhesión con el biso, indicando que la producción de biso no se vio afectada por la exposición al dinoflagelado tóxico.

Sin embargo, una inyección del extracto crudo de las toxinas de *G. catenatum*, causó un estrés severo en la mayoría de los individuos, observándose la retracción del manto y la falta de capacidad para cerrar las valvas, sugiriendo, como en la mayoría de los bivalvos, que se presenta una elevada variabilidad intrapoblacional en la sensibilidad a las toxinas PSP, las cuales se correlacionan con las diferencias en la acumulación de las toxinas y al historial de exposición a estas. Además, esta variabilidad en la sensibilidad también puede ser debido a que estas toxinas bloquean los canales de sodio, con lo que podría estar actuando un mecanismo interno en los canales de sodio que inhibe la unión de las toxinas con sus receptores específicos y varios autores resaltan que las diferencias entre los sitios de unión de la saxitoxina y sus derivados, se deben a mutaciones en los residuos de aminoácidos en la región del poro del canal de sodio. Otro punto que cabe señalar y que podría ser la causa de la baja sensibilidad a las toxinas es que a corto plazo los bivalvos no se ven usualmente afectados por PSP debido a que poseen músculos y nervios que operan principalmente por canales de calcio. Además la acción de las toxinas es reversible por lo que pudo ser la causa que las almejas se recuperaran después de aproximadamente 4-5 d de haberles causado el estrés.

El sistema de defensa en moluscos bivalvos, al igual que la mayoría de los invertebrados, es un complejo de distintos sistemas, con funciones celulares y humorales, que cooperan juntas de forma coordinada. En *N. subnodosus*, es evidente la presencia de enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, así como enzimas hidrolíticas y moléculas involucradas en los procesos neuroinmunes, y que están relacionados con una serie de componentes plasmáticos así como sistemas proteicos multiméricos. Las reacciones biológicas inducidas por *G. catenatum* son variadas e incluyen la inhibición de actividades enzimáticas, síntesis de proteínas inducidas por estrés y modulación de las actividades de las enzimas envueltas en la detoxificación. Al parecer, las enzimas antioxidantes tienen un efecto mínimo para la valoración de las respuestas causadas por las toxinas del dinoflagelado tanto en los tejidos como en la hemolinfa de *N. subnodosus*, siendo que estas se encuentran de manera constitutiva en los procesos metabólicos esenciales que experimentan los organismos debido a la exposición a un ambiente aerobio. Sin embargo, se hace evidente un daño oxidativo leve en las branquias ya que se observó cierta peroxidación de lípidos así como síntesis de glutatión peroxidasa y la disminución en los niveles de superóxido dismutasa. Además, la glándula digestiva mostró los mayores valores en estas y otras enzimas recalcando la importancia de este tejido en el sistema de defensa en *N. subnodosus*, como se ha demostrado en la mayoría de los bivalvos.

Se detectaron varias enzimas lisosomales tanto en los tejidos como en la hemolinfa de *N. subnodosus*, entre las que se encontraron lisozima, fosfatasa, esterases, proteasas, lipasas y glicosidasas. Se presentaron cambios en enzimas lisosomales cuya importancia se cree radica en los sistemas de protección contra patógenos como la lisozima, fosfatasa ácida y la β glucuronidasa en tejidos y hemolinfa. Debido a que estas enzimas hidrolíticas ayudan a proteger al huésped de los organismos invasores, la exposición *in vivo* de los dinoflagelados tóxicos así como la exposición al extracto crudo de las toxinas, puede comprometer la inmunidad humoral del huésped. Además, estas enzimas pueden ser sensibles a los cambios metabólicos impuestos por la reproducción, ya que como se observó el hecho de presentar gónadas maduras probablemente haga más susceptibles a las almejas ya que el redirigir la energía interna para funciones fisiológicas específicas, puede debilitar las defensas del animal contra patógenos concepto que está bien documentado en vertebrados. Además, enzimas como la tripsina y la α quimi tripsina, que mostraron efectos marcados nos pueden dar un indicio de la presencia de cascadas proteolíticas donde se involucran sistemas regulados por serin proteasas/inhibidores de serin proteasas como la activación de moléculas citotóxicas, así como la activación del sistema profenoloxidasa que genera como producto final la formación de melanina, el cual ha sido descrito en *N. subnodosus*, así como en el presente trabajo se hace evidente la formación de este pigmento en los tejidos.

En general estas enzimas hidrolíticas, en su mayoría siguieron un patrón de disminución a las 24 h, con un aumento sustancial a las 48 h, recuperando los niveles basales aproximadamente a las 120 h. Este hecho concuerda con la cantidad de hemocitos presentes en plasma, los cuales siguieron el mismo patrón de disminución y aumento donde no se hizo evidente la presencia de hemocitos granulares por lo que se considera la posibilidad de que los hemocitos del tipo hialino cumplan las funciones designadas para los mecanismos de defensa innata, además de que participen en otros procesos tales como reparación de tejidos, digestión de nutrientes, transporte y excreción. La disminución en la cantidad de hemocitos circulantes durante las primeras 24 h puede ser consecuencia principalmente de la lisis o movimiento de las células en circulación dentro de los tejidos, como se observó en ciertos tejidos con la infiltración de hemocitos. Similarmente, un aumento en el número total de hemocitos circulantes a las 48 h, pudo resultar debido a la proliferación de las células o al movimiento de las células de los tejidos dentro de la circulación. Esto nos indica la importancia de los hemocitos en el sistema de defensa de *N. subnodosus*, donde los bajos niveles de enzimas lisosomales, así como de hemocitos circulantes durante las

primeras horas del experimento en la hemolinfa pueden reflejar una inmunodeficiencia, como se ha demostrado en varios bivalvos expuestos a otros estresores, haciéndolos susceptibles al ataque por otros patógenos. Este tipo de relaciones han sido ampliamente discutidas por otros autores, proponiendo que la interacción entre afloramientos de fitoplancton nocivo y moluscos bivalvos desencadena mecanismos de inmunosupresión.

Además, debido a que las toxinas actúan principalmete en sistema nervioso tanto la acetilcolinesterasa como la óxido nítrico nos pueden dar una idea del estado neuroinmune del organismo. La actividad AChE y la ON estuvieron presentes en los tejidos y en la hemolinfa de *N. subnodosus*, donde se vieron afectadas de manera importante en la hemolinfa debido a la inyección de las toxinas. De las tres isoformas de la óxido nítrico sintasa presentes probablemente las que se inhibieron en *N. subnodosus* son las del tipo ONSendotelial y/o la ONSneuronal, que son constitutivas en los organismos. Además, las enzimas AChE y la ONS probablemente están relacionadas en los efectos fisiológicos producidos por las toxinas de *G. catenatum* ya que en ambas se observó un efecto significativo debido a un estrés severo. Probablemente exista la presencia de nervios colinérgicos (AChE) y nitrérgicos (ON) en *N. subnodosus* debido a la actividad presente tanto en tejidos como en hemolinfa, la cual puede ser afectada por la presencia de las toxinas de *G. catenatum*. Consecuentemente, la densidad de los hemocitos así como ciertas enzimas hidrolíticas y neuroinmunes pueden ser un parámetro cuantificable de la respuesta de inmunodefensa de los moluscos bivalvos debido a estrés fisiológico o patológico.

La gran heterogeneidad de respuestas de los bivalvos a la presencia de los dinoflagelados y la falta de información acerca de los efectos sobre la inmensa mayoría de los organismos cultivables o explotables, hace que se presente un riesgo potencial para la explotación de las poblaciones naturales y para el cultivo de los pectinidos en todo el mundo. Por lo que utilizando técnicas apropiadas, estos tipos de marcadores, pueden tener un gran potencial como herramientas del estado inmune en moluscos bivalvos. Pero se recomienda una combinación de varios biomarcadores para un uso más apropiado.

9. BIBLIOGRAFÍA

- ABELE, D., C. Tesch, P. Wencke & H.O. Poertner. 2001. How does oxidative stress relate to thermal tolerance in the Antarctic bivalve *Yoldia eightsi*? **Antarctic Science**. 13(2): 111-118.
- AEBI, H. E. 1985. Catalase. Pp. 273–286. **En:** U. Bergmeyer (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. VIII. Weinheim: Verlag Chemie.
- ANDERSON, R.S., Oliver L.M. & L.L. Brubacher. 1992. Superoxide Anion Generation by *Crassostrea virginica* hemocytes as measured by Nitroblue Tetrazolium reduction. **Journal of Invertebrate Pathology**. 59: 303-307.
- ANDERSON, R.S. 1994. Hemocyte derive reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. **Dev. Comp. Immunol.** 18: 89-96
- ANNIKOVA, L.V., I.V. Dyuzen, Y.N. Paltseva & A.A. Varaksin. 2001. Putative nitric oxide synthase containing nervous elements in male and female gonads of some marine bivalve mollusks revealed by NADPH-diaphorase histochemistry. **Invertebrate Reproduction and Development**. 40(1): 69-77.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis*. **En:** Horowitz. W (Ed.). Association of Official Analytical Chemists. E.U.A.
- ARUMUGAM, M., B. Romestand, J. Torreilles & P. Roch. 2000. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. **European Journal of Cell Biology**. 79: 513-519.
- ASAHI, M., J. Fuji, K. Suzuki, H. Geuk Seo, T. Kuzuya, M. Hori, M. Tada, S. Fujii & N. Taniguchi. 1995. Inactivation of Glutathione Peroxidase by Nitric Oxide. **The Journal of Biological Chemistry**. 270(36): 21035-21039.
- ASOKAN, R., M. Arumugam & P.Mullainadhan. 1998. Functional analysis of plasma prophenoloxidase system in the marine mussel *Perna viridis*. **Comparative Biochemical Physiology**. 120A(4): 753-762.
- BACHERÉ, E., D. Hervio & E. Mialhe. 1991. Luminol-Dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 11: 173-180.
- BALECH, E. 1964. El plancton de Mar de Plata durante el periodo 1961-1962. **Bol. Inst. Biología Marina, U. Nat. Buenos Aires, Mar de Plata**. 4: 1-42.
- BAND, C.J. 2003. Ciclo de vida, crecimiento y toxicidad de los dinoflagelados subtropicales: *Alexandrium affine* y *Gymnodinium catenatum*. **Tesis de Doctorado**. 48 pp.
- BARBER, B.J. & N.J. Blake. 1991. Reproductive Physiology. Pp 377-428. **En:** Shumway, S.E. (Ed.). *Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture*. Elsevier, Amsterdam.
- BARDOUIL, M., M. Bohec, M. Cormerais, S. Bougrier & P. Lassus. 1993. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. **Journal of Shellfish Research**. 12: 417-422.
- BARNES, H. & J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for 'total' lipids. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 12: 103-118.

- BARRACCO, M.A., I.D. Medeiros & F.M. Moreira. 1999. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. **Fish & Shellfish Immunology**. 9: 387-404.
- BARRIOS, D. J. Chávez & C. Cáceres. 2003. Growth of *Nodipecten subnodosus* (Bivalvia: Pectinidae) in La Paz Bay, México. **Aquaculture Research**. 34: 633-639.
- BAUDER, A.G., A.D. Cembella, M.A. Quilliam & N. Ross. 1996. Kinetics of diarrhetic shellfish toxins in the bay scallop, *Argopecten irradians*. Pp. 104-107. **En**: Periney, R.W. (ed.) Proceedings of the fifth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae.
- BAUDER, A.G. & A.D. Cembella. 2000. Viability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* following ingestion and gut passage in the bay scallop *Argopecten irradians*. **Journal of Shellfish Research**. 19(1): 321-324.
- BAUDER, A.G., A.D. Cembella, V.M. Bricelj & M.A. Quilliam. 2001. Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. **Marine Ecology Progress Series**. 3: 39-52.
- BELL, K.L. & V.J. Smith. 1993. In vitro superoxide production by hialine cells of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). **Developmental and Comparative Immunology**. 17: 211-219.
- BERNTSSON, K.M., P.R. Jonsson, S.A. Wanberg & A.S. Carlsson. 1997. Effects of broodstock diets on fatty acid composition, survival and growth rates in larvae of the european flat oyster, *Ostrea edulis*. **Aquaculture**. 154: 139-153.
- BLACKBURN, S.I., G.M. Hallegraef & C.J.S. Bolch. 1989. Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania, Australia. **Journal of Phycology**. 25:577-590.
- BLAISE, C., F. Gagné, J. Pellerin, P.D. Hansen & S. Trottier. 2002. Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft shell clam, *Mya arenaria*. **Environmental Toxicology** 17: 170-186.
- BLANCO-PÉREZ, J. 2001. Episodios nocivos por fitoplancton. Pp. 285-324. **En**: Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. A.N. Maeda (ed.), Limusa. México.
- BLANCO-PÉREZ, J., A. Morono, J. Franco & M.I. Reyero. 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**. 158: 165-175.
- BLUM, J. & I. Fridovich. 1984. Enzymatic defenses against oxygen toxicity in the hydrothermal vent animals *Rifta pachyptila* and *Calyptogena magnifica*. **Arch. Biochem. Biophys.** 228: 617-620.
- BOCQUENE, G., F. Galgani & P. Truquet. 1990. Characterization and assay conditions for the use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**. 30: 75-89.
- BOCQUENE, G. 1997. Cholinesterase activity in the common scallop and the queen scallop from the Bay of Brest (France): a tool for the detection of effects of organophosphorus and carbamate insecticides. **Annales del Institut Oceanographique**. 73(1): 59-68.
- BOCQUENE, G., A. Roig & D. Fournier. 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. **Federation of European Biochemical Societies** letters. 464: 153-158.
- BOETIUS, A. & H. Felbeck. 1995. Digestive enzymes in marine invertebrates from hydrothermal vents and other reducing environments. **Marine Biology**. 122: 105-113

- BOLTOVSKOY, D., I. Izaguirre & N. Correa. Feeding selectivity of *Corbicula fluminea* (Bivalvia) on natural phytoplankton. **Hidrobiologia**. 312(3): 171-182.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**: 72:24-254.
- BRAVO, I., B. Reguera, A. Martínez & S. Fraga. 1990. First report of *Gymnodinium catenatum* Graham on the Spanish Mediterranean Coast (shellfish poisoning). Pp. 449-452. **En**: Graneli, E., B. Sundstroem, L. Edler, D.M. Anderson (eds.). Toxic Marine Phytoplankton.
- BRICELJ, V.M., J.H. Lee & A.D. Cembella. 1991. Influence of dinoflagellate cell toxicity on uptake and loss of paralytic shellfish toxins in the northern quahog *Mercenaria mercenaria*. **Marine Ecology Progress Series**. 74: 33-46.
- BRICELJ, V.M. & S.E. Shumway. 1998. Paralytic Shellfish Toxins in Bivalve Molluscs: Occurrence, Transfer Kinetics, and Biotransformation. **Reviews in Fisheries Science**. 6(4): 315-383.
- BRICELJ, V.M., D. Laby & A.D. Cembella. 1996. Differential sensitivity and PSP toxin accumulation in two clam species, *Spisula solidissima* and *Mya arenaria*. **Journal of Shellfish Research**. 15(2): 502.
- BRICELJ, V.M., A. D. Cembella, D. Lavy, S.E. Shumway & T.L. Cucci. 1996b. Comparative physiological and behavioral responses to PSP toxins in two bivalve molluscs, the softshell clam, *Mya arenaria*, and surfclam, *Spisula solidissima*. Pp. 405-408. **En**: Yasumoto, T., Y. Oshima & Y. Fukuyo (eds.). Harmful and Toxic Algal Blooms. UNESCO. París, Francia.
- BRICELJ, V.M., B.M. Twarog, S.P. MacQuarrie, P. Chang & V.L. Trainer. 2000. Does the history of toxin exposure influence bivalve population responses to PSP toxins in *Mya arenaria*? 1) burrowing and nerve responses. **Journal of Shellfish Research**. 19(1): 635.
- BROWNLEE, D., L. Holden-Dye & R. Walker. 2000. The range and biological activity of FMRF amide-related peptides and classical neurotransmitters in nematodes. **Advances in Parasitology**. 45: 109-180.
- BRUN, N.T., N.W. Ross & A.D. Boghen. 2000. Changes in electrophoretic profiles of gill mucus proteases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in response to infection by the turbellarian *Urostoma cyprine*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 75: 163-170.
- BRZIN, M., V.M. Tennyson & W.D. Dettbarn. 1975. Cytochemical localization of cholinesterase activity at the giant synapse of the squid. **Histochemistry**. 43: 305-311.
- CAJARAVILLE, M.P., S.G. Pal & Y. Robledo. 1995. Light and electron microscopical localization of lysosomal acid hydrolases in bivalve haemocytes by enzyme cytochemistry. **Acta Histochem Cytochem**. 28: 409-416.
- CALDER, P.C. 2001. N-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale? **Nutr. Res**. 21: 309-341.
- CAMPA, A.I. 2002. Determinación de moléculas que intervienen en el sistema inmune del camarón blanco (*Penaeus vannamei*) en respuesta al uso de inmunoestimulantes. **Tesis Doctorado**. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). México. 45 pp.

- CARBALLAL, M.J., C. López, C. Azevedo & A. Villalba. 1997. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 70: 96-105.
- CAVALETTO, M., A. Ghezzi, B. Burlando, V. Evangelisti, N. Ceratto & A. Vierengo. 2002. Effect of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. **Comparative Biochemical Physiology**. 131(4): 447-455.
- CEMBELLA, A.D., N.I. Lewis & S.E. Shumway. 1993. An interspecific comparison of paralytic shellfish poisons in marine bivalves: anatomical and spatio-temporal variation in toxin composition. **Journal of Shellfish Research**. 12(1): 141.
- CEMBELLA, A.D., S.E. Shumway & N.I. Lewis. 1993b. Anatomical distribution and spatio-temporal variation in paralytic shellfish toxin composition in two bivalve species from the Gulf of Maine. **Journal of Shellfish Research**. 12(2): 389-403.
- CEMBELLA, A.D., S.E. Shumway & R. Larocque. 1994. Sequestering and putative biotransformation of paralytic shellfish toxins by the sea scallop *Placopecten magellanicus*: Seasonal and spatial scales in natural populations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 180(1): 1-22.
- CERÓN, O.A. 2000. Evaluación de tres mezclas de microalgas sobre el crecimiento de la almeja mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus*. **Tesis de maestría**. Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, México. 79 pp.
- CHANG, Y.J., Y. Sugawara & T. Nomura. 1989. Structure and function of digestive diverticula in the scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay). **Tohoku. J. Agr. Res.** 39: 81-93.
- CHAUVAUD, L., G. Thouzeau & Y.M. Paulet. 1998. Effects of environmental factors on the daily growth rate of *Pecten maximus* juveniles in the Bay of Brest (France). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 227(1): 83-111.
- CHENG, T.C. 1989. Immunodeficiency diseases in marine mollusks: measurements of some variables. **Journal of Aquatic Animal Health**. 1: 209-216
- CHENG, T.C. & E. Rifkin. 1970. Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. **American Fisheries Society Special Publication**. 5: 443-496.
- CHENG, T.C. & G.E. Rodrick. 1975. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crasostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. **Comparative Biochemical Physiology**. B.52(3): 443-447.
- CHENG, W. CH Li & JC, Chen. 2004. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture**. 232: 103-115.
- CIMA, F., V. Matozzo, M. Marin & L. Ballarin. 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. **Fish and Shellfish Immunology**. 10(8): 677-693.
- CLADOUHOS, J.W. 1997. Paralytic Shellfish poisoning reported in Alaska. **Environmental Health**. 39(4): 256-257.
- COLES, J.A. & R.K. Pipe. 1994. Phenoloxidase activity in the hemolymph and hemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. **Fish & Shellfish Immunology**. 4: 337-352.
- CONTE, A & E. Ottaviani. 1995. Nitric Oxide Synthase activity in molluscan hemocytes. **FEBS Lett.** 365: 120-124.

- COOPER, E.L. & P. Roche. 2003. Earthworm immunity: a model of immune competence. *Pedobiologia*. **The 7th international symposium on earthworm ecology** · Cardiff · Wales · 2002
- CORREA, F. 2001. Estructura genética, biogeografía y morfometría de *Nodipecten subnodosus* y *N. arthriticus* del Pacífico oriental tropical, y de *Lyropecten nodosus* del Atlántico tropical (Mollusca: Bivalvia). P. 53. **En:** Cultivo de los pectinidos gigantes del género *Nodipecten*: problemas y perspectivas. CITED. Consulta técnica del proyecto Il6. Florianapolis, Brasil.
- COUGHLAN, J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspension. **Marine Biology**. 2: 356-358.
- CRANFORD, P.J. & J. Grant. 1990. Particle clearance and absorption of phytoplankton and detritus by the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 137: 105-121.
- DAIGO, K., P. Noguchi, A. Migwa, N. Kawai & K. Hasimoto. 1988. Resistance of nerves for certain toxic crabs to paralytic shellfish poison and tetrodotoxin. **Toxicon**. 26: 485-490.
- DAILIANIS, S., G.P. Domouhtsidou, E. Raftopoulou, M. Kalotianni & V.K. Dimitriadis. 2003. Evaluation of neutral red retention assay micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. **Marine Environmental Research**. 56: 443-470.
- DEATON, L.E., P.J. Jordan & J.R. Dankert. 1999. Phenoloxidase activity in the hemolymph of bivalve mollusks. **Journal of Shellfish Research**. 18(1): 223-226.
- DE LA FUENTE, M & V.M. Victor. 2000. Anti-oxidants as modulators of immune function. **Immunology and Cell Biology**. 78: 49-54.
- DELAPORTE, M., P. Soundant, J. Moal, C. Lambert, C. Quéré, P. Miner, G. Choquet, C. Paillard & J.F. Samain. 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species: *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. **The Journal of Experimental Biology**. 206: 3053-3064.
- DELAUNAY, F., Y. Marti, J. Moal & J.F. Samain. 1993. The effect of monoespecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 173: 163-179.
- DENAC, H., M. Mevissen & G. Scholtysik. 2000. Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. **Arch. Pharmacol.** 362: 453-479.
- DHAINAUT, A. & P. Scaps. 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. **Canadian Journal of Zoology**. 79:233-253.
- DIAZ, M.A. & G. Martínez. 1992. Efecto de diferentes dietas sobre el balance energético en juveniles de *Argopecten purpuratus* L. **Rev. Biol. Mar. Valparaiso**. 27(2): 163-173.
- DYUIZEN, I.V., L.V. Annikova & P.A. Motavkin. 1999. NO-Synthase localization in the Central Nervous System of the bivalve mollusks *Mizuhopecten yessoensis* and *Modiolus kurilensis*. **Russian Journal of Marine Biology**. 25(3): 277-279.
- ELUMALAI, M., C. Antunes & L. Guilhermino. 2002. Effects of single metals and their mixtures on selected enzymes of *Carcinus maenas*. **Water, Air and Soil Pollution**. 141: 273-280.
- EVANS, M.H. 1965. Cause of death in experimental paralytic shellfish poisoning. **British Journal of Experimental Pathology**. 46: 245-253.

- FARIAS-MOLINA, A. 2001. Nutrición en moluscos bivalvos. Pp. 89-104 **En:** A.N. Maeda (ed.). Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Limusa. México.
- FDA. 2001. Natural Toxins. **En:** Fish and fisheries products hazards and control guidance. 3a Ed. Pp. 73-82. Food and Drug Administration, center for Food Safety and Applied Nutrition. E.U.A.
- FISHER, W.S. 1992. Ocurrance of agglutinins in the pallial cavity mucus of oysters. **Journal of Experimental Marine Biology Ecology.** 162: 1-13.
- FORD, S.E. & K.A. Alkcox. 1993. A comparision of methods for identifying molluscan hemocytes. **Journal of Shellfish Research.** 12(1): 154.
- FRANCA, S. & J.F. Almeida 1989. Paralytic shellfish poisons in bivalve molluscs on the Portuguese coast caused by a bloom of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. Pp. 93-96. **En:** T. Okaichi, D.M. Anderson & T. Nemoto (eds.), Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology, Elsevier, New York.
- FRANCHINI, A., P. Fintanili & E. Ottaviani. 1995. Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. **Comparative Biochemical Physioly.** 110B: 403-407.
- FRASER, A. 1989. Tryacylglycerol content as a condition index for fish, bivalve and crustacean larvae. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science.** 46: 1868-1872.
- FRIDOVICH, I. 1975. Superoxide Dismutases. **Annu. Rev. Biochem.** 44: 147-159.
- FRIDOVICH, I. 1998. Oxygen Toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology.** 201: 1203-1209.
- FUKUYO, Y., M. Kodama, T. Ogata, T. Ishimaru, K. Matsuoka, T. Okaichi, A.M. Maala & J.A. Ordonez. 1993. Occurrence of *Gymnodinium catenatum* in Manila Bay, the Philippines. Pp. 875-880. **En:** T.J. Smayda & Y. Shimizu (eds.), Toxic Phytoplankton in the Sea, Elsevier, Amsterdam.
- GAINEY, L.F. & S.E. Shumway. 1988. A compendium of the responses of bivalve mollusks to toxic dinoflagellates. **Journal of Shellfish Research.** 7: 623-628.
- GALGANI, F., G. Bocquene, P. Turquet, T. Burgeot, J. Chiffolleau & D. Claisse. 1992. Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the french coasts. **Oceanol. Acta.** 15(4):355-364.
- GALLOWAY, T.S., N. Millward, M.A. Browne & M.H. Deplege. 2002. Rapid assessment of organophosphorus/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activity as biomarkers. **Aquatic Toxicology.** 61(3-4): 169-180.
- GAMBLE, S.C., P.S. Goldfarb, C. Porte & D.R. Livingstone. 1995. Glutathione peroxidase and other antioxidant Enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*). **Marine Environmental Research.** 39: 191-195.
- GARCÍA, E., G. Parés & L. García. 2000. Efecto de la velocidad de flujo y concentración de alimento sobre el crecimiento de juveniles de la escalopa *Nodipecten subnodosus*. **Ciencias Marinas.** 26: 621-641.
- GARCÍA, L., F. García, B. Chi, G. Parés, J. García, O. Medina & F. Núñez. 1994. desarrollo de tecnología para el cultivo integral de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus*. Resúmenes del Primer Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar. San Carlos Guaymas, Sonora (17 al 19 de Nov). **SEP/SEIT, Unidad de Ciencia y Tecnología del Mar** (México). 31 pp.

- GARRETT, R.H & C.M.Grisham. 1995. **Biochemistry**. Saunders College. E.U.A.446-451.
- GENTHNER, F.J., A.K. Volety, L.M. Oliver & W.S. Fisher. Factors Influencing in vitro killing of bacteria by hemocytes of the *Eastern oyster (Crassostrea virginica)*. 1999. **Applied and Environmental Microbiology**. 65(7): 3015-3020.
- GERET, F. A. Serafim, L. Barreira & M.J. Bebianno. 2002. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. **Marine Environmental Reserach**.54(3-5):413-417,
- GHARAVI, N. & O.S.E. El-Kadi.2003. Measurement of nitric oxide in murine Hepatoma Hepa1c1c7 cells by reversed phase HPLC with fluorescent detction. **Journal of Pharmacy Pharmaceutic Sciences**. 6(2): 302-307.
- GIACOBBE, M.G., F. Oliva, R. La Ferla, A. Puglisi, E. Crisafi & G. Maimone. 1995. Potentially toxic dinoflagellates in Mediterranean waters (Sicily) and related hydrobiological conditions. **Aquat. Microb. Ecol**. 9: 3-68.
- GIAMBERINI, L. M. Aufret & J.C. Pihan. 1996. Haemocytes of the frshwater mussel, *Dreissena polymorpha* Pallas: Cytology, cytochemistry and X-ray microanalysis. **Journal of Molluscan Studies**. 62(3): 367-379.
- GIBA, Z., S. Todorovic, D. Grubisic & R. Konjevic. 1998. Occurrence and regulatory roles of superoxide anion radical and nitric oxide in plants. **Pharmacological Acta**. 34: 447-461.
- GONZÁLEZ, F. 2003. Temperaturas letales y temperatura óptima para crecimiento en una población de almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835). **Tesis de maestría**. Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste, La Paz B.C.S., México. 90 pp.
- GONZÁLEZ, M. & G. Arenas. 2002. Caracterización de la respuesta inmune en el ostión del Norte *Argopecten purpuratus* (Iamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia). **Ciencias Marinas**. 28(3): 247-255.
- GONZÁLEZ, R., P. García, B. Chi, P. García & H. Medina. 1997. Larval settlement of the scallop *Lyropecten subnodosus* in downwullers. 118-119 pp. **En: Book of Abstracts**. 11th International Pectinid Workshop (11-15 abril). La Paz, B.C.S., México.
- GOURDON, I., M.C. Guérin, J. Torreilles & P. Roche. 2001. Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel (*Mytilus galloprovincialis*). **Nitric Oxide**. 5(1): 1-6.
- GOVEN A.J., L.C. Fitzpatrick & B.J. Venables. 1994. Chemical toxicity and host defense in earthworms: an invertebrate model. **Ann. New York Acad. Sci**. 712: 280-300.
- GRAHAM, H.W. 1943. *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. **Trans. Am. Microsc. Soc**. 62:2597ndash;261.
- GRIZEL, H., L. Barille & N. Besnard. 2003. An atlas of histology and cytology of marine bivalve molluscs. **Plouzane-France Ifremer**. 201 pp.
- GUILLARD, R.R.L. 1973. Division Rates. Pp. 289-312. **En: J.K. Stein (ed.)**. Handbook of phycological methods. Culture methods and Growth measurement. University Press Cambridge.
- HALL, S., G. Strichartz, E. Moczydlowski, A. Ravindran & P.B. Reichardt. 1990. The saxitoxins: sources, chemistry and pharmacology. Pp. 29-65. **En: Hall S, Strichartz GR (eds)**. Marine Toxins. ACS Symposium Series 418, Washington, DC. American Chemical Society

- HALLEGRAEFF, G.M., S.O. Stanley, C.J. Bolch & C.I. Blackburn. 1989. *Gymnodinium catenatum* blooms and shellfish toxicity in Southern Tasmania, Australia. Pp. 77-80. **En:** Red tides: Biology, Environmental Science and Toxicology. Okaichi, T., D.M. Anderson & T. Nemoto (eds.). Elsevier. E.U.A.
- HALLEGRAEFF, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. **Phycologia**. 32: 79-99.
- HAMZA, A., M. Romero, M. Gnassia & A. El-Abed. 1998. Effect of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. 61(3): 397-404.
- HANLON, R.T., K.M. Cooper, B.U. Budelmann & T.C. Pappas. 1990. Physiological color change in squid iridophores. I. Behavior, morphology and pharmacology in *Lolliguncula brevis*. **Cell and Tissue Research**. 259: 3-14.
- HAUSLADEN, A. & J.S. Stamler. 1999. Nitrosative Stress. **Methods Enzymology**. 300: 389-395.
- HAUTON, C., L.E. Hawkins & S. Hutchinson. 2001. Response of haemocytes lysosomes to bacterial inoculation in the oysters *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* (Thunberg) and the scallop *Pecten maximus* (L) **Fish & Shellfish Immunology**. 11(2): 143-153.
- HERMES-LIMA, M., J.M. Story & K.B. Storey. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comparative Biochemical Physiology**. Part B 120: 437-448.
- HINE, P.M. 1999. The inter-relationships of bivalve hemocytes. **Fish & Shellfish Immunology**. 9(5): 367-385.
- HORIUCHI, Y., R. Kimura, N. Kato, T. Fujii, M. Seki, T. Endo, T. Kato & K. Kawashima. 2003. Evolutional study on acetylcholine expression. **Life Sciences**. 72: 1745-1756.
- IKEDA, T., S. Matsumoto, S. Sato, T. Ogata, M. Kodama, Y. Fukuyo & H. Takayama. 1989. First Report on Paralytic Shellfish Poisoning caused by *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae) in Japan. Pp. 411-414. **En:** Red tides: Biology, Environmental Science and Toxicology. Okaichi, T., D.M. Anderson & T. Nemoto (eds.). Elsevier. E.U.A.
- ITO, Y., A. Yoshikawa, T. Hotani, S. Fukuda, K. Sugimura & T. Imoto. 1999. Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family. **Eur. J. Biochem**. 259: 456-461.
- JONES, T.O., J.N. Whyte, N.G. Ginther, L.D. Townsend & G.K. Iwama. 1995. Haemocyte changes in the pacific oyster *Crassostrea gigas*, caused by exposure to domoic acid in the diatom *Pseudonitzschia pungens* F. *multiseriis*. **Toxicon**. 14(3): 347-353.
- JUNQUEIRA, L.C. 1988. **Histología básica**. Salvat. 3ª Edición. México, 3-6 pp.
- KAO, C.Y., C.Y. Suzuki, T. Kleinahus & M.J. Siegman. 1967. Vasomotor and respiratory depressant actions of tetrodotoxin and saxitoxin. **Archives International Pharmacodynamics**. 165: 438-450.
- KAO, C.Y. 1993. Paralytic Shellfish Posioning. Pp. 75-86. **En:** Algal toxins in seafood and drinking water. I.R. Falconer (Ed.). Academic Press. E.U.A.

- KORHONEN, R. 2002. Regulation of inducible Nitric Oxide Production in activated macrophages. **Disertación académica**. Medical School of University of Tampere. 90 pp.
- KELLEY, D & I.L. Rudolph. 2000. Effect of individual fatty acids of w-6 and w-3 type on human immune status and role of eicosanoids. **Nutrition**. 16: 143-145.
- KHOTIMCHENKO, Y.S. & I.I. Deridovich. 1991. Monoaminergic and cholinergic mechanisms of reproduction control in marine bivalve mollusks and echinoderms: a review. **Comparative Biochemical Physiology**. 100C: 311-317.
- KNAUER J. & P.C. South. 1997. Growth and fatty acid composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat fed a spray-dried freshwater microalga (*Spongiococcum excentricum*) and microencapsulated lipids. **Aquaculture**. 154: 293-303.
- KONTIS, K.J. & A.L. Goldin. 1993. Site-direct mutagenesis of the putative pore region of the rat IIA sodium channel. **Molecular Pharmacology**. 43: 635-644.
- KREM, M.M. & E. Di Cera. 2002. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. **Trends in Biochemical Sciences**. 27(2): 67-74.
- KVITEK , R.G. & M.K. Beitler. 1988. A case for sequestering of paralytic shellfish toxins as a chemical defense. **Journal of Shellfish Research**. 7(4):629-636.
- LABIB, G.W. 1998. Occurrence of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* along the Mediterranean costa of Alexandria (egypt). **Chemistry and Ecology**. 14(2): 133-141.
- LA BARBERA-SÁNCHEZ, A. & J.F. Gamboa-Maruez. 2001. Distribution of *Gymnodinium catenatum* Graham and shellfish toxicity on the coast of Sucre state, Venezuela, from 1989 to 1998. **Journal of Shellfish Research**. 20(3): 1257-1261.
- LACOSTE, A., F. Jalabert, S.K. Malham, A. Cueff & S.A. Poulet. 2001. Stress and Stress-Induced Neuroendocrine Changes Increase the Susceptibility of Juvenile Oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. **Applied and Environmental Microbiology**. 67: 2304-2309.
- LACOSTE, A., S.K. Malham, A. Cueff & Poulet S.A. 2001. Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a beta-adrenergic receptor-cAMP signaling pathway. **Gen. Comp. Endocrinol.** 122(3): 252-259.
- LACOSTE, A., S.K. Malham, F. Gelebart, A. Cueff & S.A. Poulet. 2002. Stress-induced immune changes in the oyster *Crassostrea gigas*. **Developmental and Comparative Immunology**. 26: 1-9..
- LAMBERT, C. & J.L. Nicolas. 1998. Specific inhibition of chemiluminiscent activity by pathogenic vibrios in hemocytes of two marine bivalves, *Pecten maximus* and *Crassostrea gigas*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 71: 53-63.
- LAMBERT, C., J.L. Nicolas & V. Bultel. 2001. Toxicity to Bivalve hemocytes of pathogenic *Vibrio* cytoplasmic extract. **Journal of Invertebrate Pathology**. 77: 165-172.
- LANDSBERG, J.H. 1990. Neoplasia and biotoxins in bivalves: is there a conection?. **Journal of Shellfish Research**. 15(2): 203-230.
- LANDSBERG, J.H. 1997. The role of harmful algal blooms in shellfish deseases. **Journal of Shellfish Research**. 16(1): 350.
- LASSUS, P., M. Bardouil, M. Ledoux, I. Murail, M. Bohec, P. Truquet, J.M. Fremy & V. Romer. 1992. Paralytic phycotoxin uptake by scallops (*Pecten maximus*). **Aquatic Living Resources**. 5: 319-324.

- LASSUS, P., M. Bardouil, M. Ledoux, M. Bohec, I. Murail & J.M. Fremy. 1996. Role of kidneys in bioaccumulation of paralytic toxins by scallop (*Pecten maximus*) tissues. **Journal of Natural Toxins**. 5(1): 107-115.
- LAU, P.S. & H.L Wong. 2003. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. **Marine Pollution Bulletin**. 46(12): 1563-1572.
- LEGALL, G., E. Bachere & E. Mialhe. 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of the *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific Rickettsiales-like organisms. **Diseases of Aquatic Organisms**. 11: 181-186.
- LESSER, M. & S. Shumway. 1993. Effects of toxic dinoflagellates on clearance rates and survival in juvenile bivalve molluscs. **Journal of Shellfish Research**. 12(2): 377-381
- LI, S.C., W.X. Wang & D.P.H.Hsieh. 2001. Feeding and absorption of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* by two marine bivalves from the South China Sea. **Marine Biology**. 139(4): 617-624.
- LI, S.C. & W.X. Wang. 2001. Radiotracer studies on the feeding of two marine bivalves on the toxic and nontoxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 263(1): 65-75.
- LIE, O., M. Syed & H. Solbu. 1986. Improved agar plate assays of bovine lysozyme and haemolytic complement activity. **Acta. Vet. Scand.** 27: 23-32.
- LODEIROS, C.J., J. Rengel, H. Guderley, O. Nusseti & J. Himmelman. 2001. Changes in biochemical composition of the tropical scallop *Lyropecten (Nodipecten) nodosus* during growth in suspended culture at three depths. **Aquaculture**. 199: 63-72.
- LÓPEZ, C, A. Villalba & E. Bachere. 1994. Absence of generation of active oxygen radicals coupled with phagocytosis by the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). **Journal of Invertebrate Pathology**. 64: 188-192.
- LÓPEZ, C.A., M.J. Carballal, C. Azevedo & A. Villalba. 1997. Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). **Diseases of Aquatic Organisms**. 30(3): 209-215.
- LÓPEZ, C.A., M.J. Carballal, C. Azevedo & A. Villalba. 1997b. Enzyme characterization of the circulating haemocytes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). **Fish & Shellfish Immunology**. 7: 595-608.
- LÓPEZ, J.A. 2003. Tasa de filtración y aclaramiento en la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835) a dos tallas en función de la temperatura y cantidad de alimento. **Tesis de Maestría**. CIBNOR. 85 pp.
- LORA-VILCHIS, M.C. & N. Doktor. 2001. Evaluation of seven algal diets for spat of the Pacific scallop *Argopecten ventricosus*. **Journal of the World Aquaculture Society**. 32(2): 228-235.
- LU, Y.H. & D.F. Hwang. 2002. Effects of toxic dinoflagellates and toxin biotransformation in bivalves. **Journal of Natural Toxins**. 11(4): 315-22
- LUNA-GONZÁLEZ, A. 2003. Susceptibilidad a *Vibrio alginolyticus* y mecanismos de defensa de moluscos bivalvos. **Tesis Doctorado**. CIBNOR. México. 107 pp.
- LUNA-GONZÁLEZ, A., A. Maeda, J.C. Sainz & F. Ascencio. 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. **Disease Aquatic Organisms**. 49: 221-226.

- LUNA-GONZÁLEZ, A., A. Maeda, F. Vargas, F. Ascencio & M. Robles. 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. **Fish & Shellfish Immunology**. 15(4): 275-282.
- MacDONALD B.A. & J.E. Ward. 1994. Variation in food quality and particle selectivity in the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia). **Marine Ecology Progress Series**. 108: 251-264.
- MAEDA-MARTINEZ, A.N., A. Abarca, M. Avendaño, M. Barracco, J. Blanco, J. Caceres-Martínez, M. Cantillanez, L. Freites, A.M. Ibarra, C. Lodeiros, G. Merino, J. Mendoza, M. Narvarte, F. Vargas-Albores, J. Peña, G. Román, W. Stotz, I. Uriarte y E. von Brand. 2001. Líneas futuras de investigación científica y tecnología sobre los moluscos pectínidos de Iberoamérica. Pp 569-476 **En: Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**. A.N. Maeda (ed.), Limusa. México.
- MAEDA-MARTÍNEZ, A.N., P. Lombeida, L. Freites, C. Lodeiros y M.T. Sicard. 2001b. Cutivo de pectínidos en fondo y en estanques. Pp 213-231 **En: Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**. A.N. Maeda (ed.), Limusa. México.
- MAHAR, J., G.L. Lukacs, Y. Li, S. Hall & E. Moczydowski. 1991. Pharmacological and biochemical properties of saxiphilin, a soluble saxitoxin binding protein from the bullfrog (*Rana catesbiana*). **Toxicon**. 29: 53-71.
- MALDONADO, R. 2003. Poliploidia en moluscos de importancia comercial (Almeja catarina *Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842; Almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835; y abulón rojo *Haliotis rufescens* Swainso 1822). **Tesis de Doctorado**. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S.: México. 200 pp.
- MANSOUR, M.P., J.K. Volkman, A.E. Jackson & S.I. Blackburn. 1999. The fatty acid and sterol composition of five marine dinoflagellates. **Journal of Phycology**. 35: 710-720.
- MANSOUR, M.P., J.K. Volkman, D.G. Holdworth, A.E. Jackson & S.I. Blackburn. 1999b. Very-Long-chain (C28) highly unsaturated fatty acids in marine dinoflagellates. **Phytochemistry**. 50: 541-548.
- MANSOUR, M.P., J.K. Volkman & S.I. Blackburn. 2003. The effect of growth phase on the lipid class, fatty acid and sterol composition in the marine dinoflagellate, *Gymnodinium* sp. In batch culture. **Phytochemistry**. 63: 145-153.
- MARKS, G.W. & K.L. Fox. 1937. Studies on catalase from the California mussel. Pp. 297-310. **En: McEwen G.F., E.G. Moberg, F.B. Summer & T.W. Vaughan (eds.)**. Scripps Institution of Oceanography Technical Series Bulletin. No. 3. Univ. California Berkley Press, Berkley, CA.
- MATSUYAMA, Y., T. Uchida & T. Honjo. 1999. Effects of harmful dinoflagellates, *Gymnodinium mikimotoi* y *Heterocapsa circularisquama*, red-tide on filtering rate of bivalve molluscs. **Fisheries Science**. 65(2): 248-253.
- McCORD, J.M. & I. Fridovich. 1969. Superoxide Dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocytoblast). **The Journal of Biological Chemistry**. 244 (22): 6049-6055.
- MEE, L.D., M. Espinoza & G. Díaz. 1986. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific Coast of Mexico. **Marine and Environmental Research**. 19: 77-92.
- MEIER J. & R.D.G. Theakston. 1986. Aproximate LD₅₀ determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. **Toxicon**. 24(4): 395-401.

- MOLINENGO, L. 1979. The curve doses vs. survival time in the evaluation of acute toxicity. **Journal Pharm. Pharmac.** 31:343.
- MONCADA, S., R.M. Palmer & E.A. Higgs. 1991. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Phar. Rev.** 43: 109-142.
- MOREY-GAINES, G. 1982. *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae): morphology and affinities with armoured forms. **Phycologia.** 21(2): 154-163.
- MORTENSEN, S.H. & J. Glette. 1996. Phagocytic activity of scallop (*Pecten maximus*) haemocytes maintained *in vitro*. **Fish & Shellfish Immunology.** 6: 111-121.
- MURPHY, M.P. Nitric oxide and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1411: 401-414.
- MUSGRAVE, M.A., S.P. Gould & R.F. Albert. 1987. Enzymic lipid peroxidation in the gonadal and hepatopancreatic microsomal fraction of cultivated mussels (*Mytilus edulis* L.). **Journal of Food Science.** 52: 609-612.
- NAGANO, T. 1999. Practical methods for detection of nitric oxide. **Luminescence.** 14:2833-290.
- NAJIMI, S., S. Bouhaimi, M. Daubeze, A. Zekhnini, J. Pellerin, J.F. Narbonne & A. Moukrim. 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution of Agadir marine bay (South Marocco). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.** 58: 901-912.
- NAKAMURA, M., K. Mori, S. Inooka & T. Nomura. 1995. In vitro production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay). **Developmental and Comparative Immunology.** 9: 407-417.
- NAKAYAMA, K. & T. Maruyama. 1998. Differential production of active oxygen species in photosymbiotic and non-symbiotic bivalves. **Developmental and Comparative Immunology.** 22: 151-159.
- NAPOLITANO, G.E. & R.G. Ackman. 1993. Fatty acid dynamics in sea scallops *Placopecten magellanicus* (Gmelin 1971) from Georges Bank, Nova Scotia. **Journal of Shellfish Research.** 12(2): 267-277.
- NAVARRO, J.M. 2001. Fisiología energética de pectínidos iberoamericanos. Pp 61-76 **En:** Los moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. A.N. Maeda (ed.), Limusa. México.
- NÖEL, D., V. Boulo, D. Chagot, E. Mialhe, F. Paolucci, C. Clavies, E. Hervaud & R. Elston. 1991. Preparation and characterization of monoclonal-antibodies against neoplastic hemocytes of *Mytilus edulis* (Bivalvia). **Diseases of Aquatic Organisms.** 10: 51-58.
- NÖEL, D. 1992. Etude des hemocytes et d'une neoplasie hemocytaire chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus trossulus* (Mollusca: Bivalvia). **Tesis Doctorado.** Université de Bordeaux . Francia.
- NÖEL, D., E. Bachere & E. Mialhe. 1993. Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocyte in *Mytilus edulis* (Bivalvia). **Developmental and Comparative Immunology.** 17: 483-493.
- NUSETTI, O., M. Escaplés, G. Salazar, S. Nusetti & S. Pulido. 2001. Biomarkers of oxidative stress in the polychaete *Eurythoe complanata* (Amphinomidae) under short term copper exposure. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 66: 576-581.
- OCAÑO, V.M., R. Pacheco & A.N. Maeda. 2001. Pp. 405-430. **En:** Maeda A.N. (ed.). Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Limusa, México.

- OSHIMA, Y., K. Sugino, H. Itakura, M. Irota & T. Yasumoto. 1990. Pp. 391-396. **En:** Graneli, E., B. Sundstroem, L. Edler, D.M. Anderson (eds.). Toxic Marine Phytoplankton.
- OSHIMA, Y. 1991. Fate of paralytic shellfish toxins (PSP) during acumulation and depuration of shellfish. P. 11. **En:** Freymy J.M. (ed.). Proceedings of symposium on marine biotoxins. Paris.
- OSHIMA, Y. 1995. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organism. Pp. 475-480. **En:** P. Iassus, G. Arzul, E. Erard-Le-Dunn, P. Gentien y C. Marquillou-Le-Baut (eds.) Harmful Marine Algal Blooms. Technique et Documentation. Lavoisier, Paris.
- ORTIZ, C. P. García, B. Chi, P. García y H. Medina. 1997. Food ration and culture density effect on the larval development of the scallop *Lyropecten subnodosus* (Sowerby, 1835). Pp. 164-165 **En:** Book of Abstracts. 11th International Pectinid Workshop (11-15 abril). La Paz, B.C.S., México.
- OTTAVIANNI, E., L.R. Paemen & G.B. Stefano. 1993. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bactericidal agent by invertebrate immunocytes. **European Journal of Pharmacology**. 248: 319-324.
- OTTER. A. 2001. Native Bivalve Aquaculture in Bahía Magdalena B.C.S. The effect of cultivation density on the growth rates and mortality of Lion's paw scallop (*Lyropecten subnodosus*). University of California, Santa Barbara, E.U.A. (**In press**).
- OWEN, G. 1974. Feeding and digestion in the bivalvia. **Advances in Comparative Physiology and Biochemistry**. 5: 1-35.
- OWEN, R., L. Buxton, S. Sarkis, M. Toasperm, A. Knap & M. Depledge. 2002. An evaluation of hemolymph cholinesterase activities in the tropical scallop, *Euvola (Pecten) ziczac*, for the rapid assesment of pesticide exposure. **Marine Pollution Bulletin**. 44(10): 1010-1017.
- OZRETIC, B. & M. Krajcinovic-Ozretic. 1992. Esterase heterogeneity in mussels *Mytilus galloprovincialis*: effects of organophosphate and carbamate pesticides in vitro. **Comparative Biochemical Physiology**. 103C: 221-225.
- PAEZ.-OSUNA, F. H.M. Zazueta-Padilla & J.I. Osuna-López. 1993. Biochemical composition of the oysters *Crassostrea gigas* Hanley and *Crassostrea corteziensis* Hertlein in the NorthWest cost of Mexico: seasonal changes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 170: 1-9.
- PAN, Y., A.D. Cembella & M.A. Quilliam. 1999. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. **Marine Biology**. 134: 541-549.
- PARES, G. 1996. Efecto del flujo y la concentración de alimento sobre el crecimiento, peso y tasa de filtración de escalopas juveniles (*Lyropecten subnodosus*). **Tesis de maestría**. Universidad Autónoma de Baja California, México. 80 pp.
- PERSKY, A.M., P.S. Green, L. Stublely, C.O. Howell, L. Zaulayanov, G.A. Brazeau & J.W. Simpkins. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle *in vivo* and *in vitro*. **Society of Experimental Biology and Medicine**. 223: 59-66.
- PETERSON, L.D., N.M. Jeffery, F. Thies, P. Sanderson, E.A. Newsholme & P.C. Calder. 1998. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocytes fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell mediate immunity. **Lipids**. 33: 171-180.

- PHILLIPS, D.C. 1967. The hen egg-white lysozyme molecule. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 57: 484-495
- PIPE, R.K. 1990. Hydrolitic enzymes associated with the granular haemocytes of the marione mussel *Mytilus edulis*. **Histochemical Journal.** 22: 595-603.
- PIPE R.K. & J.A. Coles. 1995. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. **Fish & Shellfish Immunology.** 5: 581-595.
- PIPE, R.K. 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. **Developmental and Comparative Immunology.** 16: 11-122
- PIPE, R.K., J.A. Coles, M.E. Thomas, V.U. Fossato & A.L. Pulsford. 1995. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. **Aquatic Toxicology.** 32:59-73
- POLLERO, R.J. & H. Heras. 1989. Inter-organ hemolymphatic transport of free fatty acids, triacylglycerols and phospholipids in the freshwater bivalve, *Diplodon delodontus*. **Comparative Biochemical Physiology.** 93A: 673-676.
- PRAKASH, N.T. & K.S. Rao. 1995. Modulations in antioxidant enzymes in different tissues of marine bivalve *Perna viridis* during heavy metal exposure. **Mol. Cell. Biochem.** 146(2): 107-113.
- RACOTTA, I., J.L. Ramírez, A.M. Ibarra, M. Rodríguez, D. Carreño & E. Palacios. 2003. Growth and gemetogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. **Aquaculture.** 217(1-4): 335-349.
- RAINERI, M. 1995. Is a mollusc an evolved bent metatrocophore? A histochemical investigation of neurogenesis in *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). **Journal of Marine Biology Association U.K.** 75(3): 571-592.
- RAMOS-MARTINEZ, J.I., T.R. Bartolome & R.V. Pedernas. 1983. Purification and properties of glutathione reductasa from hepatopancreas of *Mytilus edulis*. **Comparative Biochemical Physioly.** 75B: 689-692.
- REGOLI, F., M. Nigro, E. Bertoli, G. Principato & E. Orlando. 1997. Defenses against oxidative stress in the Antarctic scallop *Adamusium colbecki* and effects of acute exposure to metals. **Hydrobiologia.** 335(1-3): 139-144.
- REID, R.G.B. 1982. Aspects of bivalve feeding and digestion relevant to aquaculture nutrition. **Proceedings of the second international conference on aquaculture nutrition.** World Mariculture Society, Baton Rouge, LA, E.U.A. Publication No. 2: 231-251.
- RENAULT, T., Q.G. XUE & S. Chilmonczyk. 2001. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using monoclonal antibody specific for granulocytes. **Fish & Shellfish Immunology.** 11(3): 269-274.
- RINGWOOD, A.M., D.E. Conners, C.J. Keppler & A.A. Dinovo. 1999. Biomarker studies with juvenile oysters (*Crassostrea virginica*) deployed *in-situ*. **Biomarkers.** 4(6): 400-414.
- RIQUELME, R. 1999. Determinación de niveles de poliploidia en *Argopecten purpuratus* mediante la medición del diámetro nuclear como método alternativo al conteo cromosómico. **Tesis Biólogo Marino.** Universidad Católica del Norte. Coquimbo, Chile. 60 pp.
- ROBILLARD, S., G. Beauchamp & M. Laulier. 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity In the fresh water mussel *Anodonta cygnea* at three different expusure sites. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** 135(1): 49-59.

- ROBINSON, W.E., W.E. Wehling, M.P. Morse & C.G. McLeod. 1981. Seasonal changes in soft body component indices and energy reserves in the Atlantic deep sea scallop, *Placopecten magellanicus*. **Fish. Bull.** 79: 449-458.
- ROBINSON, A. 1992. Dietary supplements for the reproductive conditioning of *Crassostrea gigas* kumamoto (Thunberg). II Effects on glycogen, lipid and fatty acid content of broodstock oysters and eggs. **Journal of Shellfish Research**. 11: 433-447.
- ROCH, P. 1999. Defense mechanism and disease prevention in farmed marine invertebrates. **Aquaculture**. 172: 125-145.
- RODRICK, G.E. & T.C. Cheng. 1974. Kinetic properties of lysozyme from the hemolymph of *Crassostrea virginica*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 24:41-48.
- RUPPERT, E.E. & R.D. Barnes. 1996. **Zoología de los Invertebrados**. McGraw-Hill Interamericana. México.
- SCARRATT, A.M., D.J. Scarratt & M.G. Scarratt. 1993. Survival of live *Alexandrium tamarense* cells in mussel and scallop spat under simulated transfer conditions. **Journal of Shellfish Research**. 12(2): 383-388.
- SCHEJTER, L., C.S. Bremec, R. Akselman, D. Hernandez & E.D. Spivak. Annual feeding cycle of the Patagonian scallop *Zygochlamys patagonica* (King and Broderip, 1832) in Reclutas bed (39S-55°W), Argentine Sea. **Journal of Shellfish Research**. 21(2): 549.
- SCHUMACHER, M., S. Camp, Y. Maulet, N. Newton, K. MacPhee, S.S. Taylor, T. Friedmann & P. Taylor. 1986. Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. **Nature**. 319: 407-409.
- SEKIGUCHI, K., S. Sato, T. Ogata, S. Kaga & M. Kodama. 2001. Accumulation and depuration kinetics of paralytic shellfish toxins in the scallop *Patinopecten yessoensis* fed *Alexandrium tamarense*. **Marine Ecology Progress Series**. 220: 213-218.
- SHEEHAN, D. & A. Power. 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. **Comparative Biochemical Physiology**. 123C(3): 193-199.
- SHUMWAY, S.E. 1989. Toxic algae: a serious threat to shellfish aquaculture. **World Aquaculture**. 20:65-74.
- SHUMWAY, S.E. 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. **J. World Aquaculture Society** 21:65-104.
- SHUMWAY, S.E. 1991. **Scallops: Biology, Ecology and Aquaculture**. Elsevier. E.U.A. 1095 pp.
- SHUMWAY, S.E., T.L. Cucci, R.C. Newell & C.M. Yentsch. 1985. Particle selection, ingestion, and absorption in filter feeding bivalves. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 91: 77-92.
- SHUMWAY, S.E. & T.L. Cucci. 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve mollusc. **Aquatic Toxicology** 10; 9-27.
- SHUMWAY S.E. & A.D. Cembella. 1993. The impact of toxic algae on scallop culture and fisheries. **Reviews in Fisheries Science**. 1(2): 121-150.
- SHUMWAY, S.E., T.L. Cucci, M.P. Lesser, N. Bourne & B. Bunting. 1997. Particle clearance and selection in three species of juvenile scallops. **Aquac. Int.** 5: 89-99.

- SINDERMANN, C.J. 1990. **Principal Diseases of Marine Fish and Shellfish**. Vol. 2. Academic Press, Inc. E.U.A. 516 pp.
- SOLE, M., C. Porte & J. Albaiges. 1994. Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant body burdens. **Aquatic Toxicology**. 30(3):271-283.
- STEFANO, G.B., M. Salzet & H.I. Magazine. 2002. Cyclic nitric oxide by human granulocytes, and invertebrate ganglia and immunocytes: nano-technological enhancement of amperometric nitric oxide determination. **Med. Sci. Monit.** 8(6): BR199-204.
- STEFANO, G.B., E. Kim, Y. Liu, W. Zhu, F. Casares, K. Mantione, D.A. Jones & P. Cadet. 2004. Nitric Oxide modulates microglial activation. **Med. Sci. Monit.** 10(2): BR17-22.
- STRICKLAND, J.D.H. & T.R. Parsons. 1972. **A practical handbook of seawater analysis**. Fisheries research board of Canada. Ottawa, Canada. 310 pp.
- SVENSSON, S. & L. Förlin. 1998. Intracellular effects of okadaic acid in the blue mussel *Mytilus edulis*, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Marine Environmental Research**. 46(1-5): 449-452.
- SYMONYAN, M. & R. Nalbandyan. 1972. Interaction of Hydrogen Peroxide with Superoxide Dismutase from Erythrocytes. **FEBS Lett.** 28(1): 22-24.
- TAFALLA, C., B. Gómez-León, B. Novoa & A. Figueras. 2003. Nitric Oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. **Developmental and Comparative Immunology**. 27: 197-205.
- TAKEDA, S. & Y. Kurihara. 1994. Preliminary study of management of red tide water by the filter feeder *Mytilus edulis galloprovincialis*. **Mar. Pollut. Bull.** 28(11): 662-667.
- TALEB, H., P. Vale, E. Jaime & M. Blaghen. 2001. Study of paralytic shellfish poisoning toxin profile in shellfish from the Mediterranean shore of Morocco. **Toxicon**. 39(12): 1855-1861.
- TALESA, V., R. Romani, C. Antognelli, E. Giovannini & G. Rosi. 2002. Different expressions of organophosphate-resistant acetylcholinesterases in the bivalve mollusk *Scapharca inaequivalvis* living in three different habitats. **Environ. Toxicol. Chem.** 21(1): 102-108.
- TODA, N. & T. Okamura. 2003. The pharmacology of nitric oxide in the peripheral nervous system of blood vessels. **Pharmacological Reviews**. 55: 271-324.
- TORRES, M.A., C.P. Testa, C. Gaspari, M.B. Masutti, C.M.N. Panitz, R. Curi, E.A. DeAlmeida, P. Di.Mascio & D.W. Filho. 2002. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. 44(9): 923-932.
- TRIDER, D.J. & J.D. CASTELL. 1979. Effect of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). **Journal of Nutrition**. 110: 1303-1309.
- TWAROG, B.M. 1974. "Immunity" to paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs. Proceedings of the Second International Symposium on Coral Reefs Vol. 1. Cameron. **En**: A.M. et al. (eds.). Brisbane Australia. The Great Barrier Reef Committee.
- TWAROG, B.M., T. Hidaka & H. Yamaguchi. 1972. Resistance to tetrodotoxin and saxitoxin in nerves of bivalve mollusc. A possible correlation with paralytic shellfish poisoning. **Toxicon**. 10(3): 273-278.

- TWAROG, B.M. & H. Tamaguchi. 1975. Resistance to paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs. 532 p. **En:** . LoCicero, V.R. (ed.). Proceedings of the first international conference on toxic dinoflagellate Blooms. Wakefield, MA-USA MSTF.
- VALDEZ, M.E. 2001. Estudios sobre la biología reproductiva de *Nodipecten subnododus*. 39-41 Pp. **En:** Cultivo de los pectínidos gigantes del género *Nodipecten*: problemas y perspectivas. CITEDConsulta técnica del proyecto II.6. Florianapolis, Brasil.
- VAN DOLAH, F.M. 2000. Marine algal toxins: origins, health effects and their increase occurrence. **Environ. Health. Persp.** 108: 133-141.
- VARGAS-ALBORES, F. & M.A. Barracco. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectinidos. Pp 127-146 **En:** A.N. Maeda (ed.). Los moluscos Pectinidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Limusa. México.
- VASSALLO, M.T. 1973. Lipid storage and transfer in the scallop *Chlamys hericia* Gould. **Comparative Biochemical Physiology.** 44A: 1169-1175.
- VELASCO, B.G. 1997. Cultivo larvario a nivel piloto del callo de hacha *Atrina maura* Sowerby y de la almeja mano de león *Lyropecten subnododus* Sowerby con dos especies de microalgas. **Tesis de Maestría.** Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada, México. 70 pp.
- VIARENGO, A., L. Canesi, P. García, L.D. Peters & D.R. Livingston. 1995. Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). **Comparative Biochemical Physiology.** 111B(2): 317-377.
- VILLAVICENCIO, G. 1997. Acondicionamiento gonadal, desarrollo embrionario y cultivo de larvas de la almeja mano de león *Lyropecten subnododus* (Sowerby, 1833), alimentadas con cuatro especies de microalgas. **Tesis de Licenciatura.** Instituto Tecnológico del Mar, Guaymas. 93 pp.
- VIQUEZ, R. & P.E. Hargraves. 1995. Annual cycle of potentially harmful dinoflagellates in the Golfo de Nicoya, Costa Rica. **Bulletin of Marine Science** 57(2): 467-475
- VOLETY A.K., L.M. Oliver, F.J. Genthener y W.S. Fisher. 1999. A rapid tetrazolium dye reduction assay to assess the bactericidal activity of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes against *Vibrio parahaemolyticus*. **Aquaculture.** 172: 205-22.
- Von BRAND, E., R.A. Riquelme & K. Lohrmann. 1999. Preliminary description of hemocytes of the northern Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. **En:** Book of Abstracts. 11th International Pectinid Workshop (11-15 abril). La Paz, B.C.S., México.
- WALKER, C.H. & H.M. Thompson. 1991. Phylogenetic distribution of cholinesterases and related esterases. Pp. 1-17. **En:** Mineau, P. (ed.). Cholinesterases inhibiting insecticides. Elsevier, Amsterdam.
- WALSH, K.A. & P.E. Wicox. 1970. Serine proteases. Pp. 31-11. **En:** Perlman G.E. & L. Lonrad (eds.). Meth. Enzymol. Academic Press. E.U.A.
- WARD, J.E. 1996. Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing and fate. **Journal of Invertebrate Biology.** 115(3): 218-231.
- WARD, J.E., R.I.E. Newell, R.J. Thompson & B.A. McDonald. 1994. In vivo studies of suspension feeding processes in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Biol. Bull.** 186: 221-240.
- WEISKE, J. & A. Wiesner. 1999. Stimulation of NO synthase activity in the immune-competent lepidopteran *Estigmene acrea* hemocyte line. **Nitric Oxide.** 3(2): 123-131.

- WEN-CHAO, S., M.R. Sarrias & J.D. Lambris. 2000. Complement and innate immunity. **Immunopharmacology**. 49: 187-198.
- WHITE, A.W., S.E. Shumway, J. Nassif & D.K. Whittaker. 1993. Variation in levels of paralytic shellfish toxins among individual shellfish. Pp. 441-446. **En:** Smayda T.J. & Y. Shimizu (eds.). Toxic Phytoplankton blooms in the sea. Elsevier. Amsterdam-Netherlands.
- WHYTE, J., N.Bourne & N. Ghinter. 1990. Biochemical and energy changes during embryo genesis in the rock scallop *Crassodoma gigantea*. **Marine Biology**. 106: 239-244.
- WIKFORS, G.H. & R.M. Smolowitz. 1995. Do differences in dinoflagellate damage depend upon digestion?. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, LA (EUA). Book of Abstracts.
- WIKFORS, G.H., J.H. Alix, S.E. Shumway, S. Barcia, J. Cullum & R.M. Smolowits. 2000. Experimental exposures of bay scallops to cultures of suspected harmful microalgae. **Journal of Shellfish Research**. 19(1): 639.
- WILDISH, D.J. & A.M. Saunier. 1992. The effect of velocity and flow direction on the growth of juvenile and adult giant scallops. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 115: 133-143.
- WILDISH, D.J., D.D. Kristmanson, R.L. Hoar, A.M. Decoste S.D. McCormick & A.W. White. 1987. Giant scallop feeding and responses to flow. **Journal of Marine Biology and Ecology** 113: 207-220.
- WINSTON, G.W. & R.T. DiGiulio. 1991. Prooxidants and oxidant mechanisms in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**. 19: 137-161.
- WINSTON, G.W., D.R. Livingston & F. Lips. 1990. Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel *Mytilus edulis*. **Journal of Experimental Zoology**. 255: 296-308.
- WINTER, J.E. 1978. The filtration rate of *Mytilus edulis* and its dependence on algal concentration, measure by a continuous automatic recording apparatus. **Marine Biology**. 22: 317-328.
- WINTER, J.E. 1978b. A review on the knowledge of suspension-feeding in lamellibranchiate bivalves, with special reference to artificial aquaculture systems. **Aquaculture**. 13: 1-33.
- WOOTTON, E.C., E.A. Dyrinda & N.A. Ratcliffe. 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edula*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). **Fish and Shellfish Immunology**. 15: 195-210.
- XUE, Q & T. Renault. 2001. Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. **Developmental and Comparative Immunology**. 25: 187-194.
- YUKI, K. & S. Yoshimatsu. 1987. Morphology of the athecate dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in culture. **Bull. Plankton Soc. Jap.** 34, 109-117
- ZANG, X. & R.M. Maizels. 2001. Serin proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. **Trends in Biochemical Sciences**. 26(3): 191-197.

ANEXOS

Técnicas

Proteínas

Determinación de proteínas por el método de Bradford en microplaca

Curva estándar

-Preparar una solución stock de albúmina sérica bovina (Sigma A 9430) a una concentración de $1 \text{ mg/mL} = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

-Preparar una curva patrón que se utiliza como referencia para calcular la concentración de proteína de la muestra problema.

Preparación de la curva patrón para la cuantificación de proteínas

Tubo	μl de solución estándar	μl de agua desionizada	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
1	160	Aforar a 2 mL	80
2	1000 del tubo 1	1000	40
3	1000 del tubo 2	1000	20
4	1000 del tubo 3	1000	10
5	1000 del tubo 4	1000	5
6	1000 del tubo 5	1000	2.5
7	1000 del tubo 6	1000	1.250
8	1000 del tubo 7	1000	0.3125
9	1000 del tubo 8	1000	0.15625
10	1000 del tubo 9	1000	0.078125

PROCEDIMIENTO

Las muestras a probar se diluyen 1:100



Pipetear $160 \mu\text{l}$ de la muestra y de cada una de las concentraciones de la solución estándar en una microplaca



Añadir $40 \mu\text{l}$ de reactivo de Bradford (BioRad 500-0006) concentrado, mezclar bien.



Incubar a temperatura ambiente al menos 5 min,
no se deben incubar por más de una hora



Registrar la absorbancia a 595 nm

Calculos de la concentración de proteína

Graficar

X = concentración ($\mu\text{g/mL}$)

Y = absorbancia 595 nm

Calcular: Ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación

Tomar en cuenta las diluciones realizadas para el cálculo de la concentración final

Lípidos totales

Solución 1

Ácido sulfúrico concentrado (Sigma S 1526)

Solución 2

Vainillina (Sigma V-2375) 0.2 g + 80 mL de H₃PO₄ + 20 mL H₂O_d Reposar 24 h.

Curva estándar

-Preparar una solución stock de lípidos a partir de 10 mg/mL=10µg/µl (Merck Lípidos Totales: 3221) o a partir del estándar de lípidos totales de Boehringer Mannheim (325099).

-Preparar una curva patrón que se utiliza como referencia para calcular la concentración de proteína de la muestra problema.

PROCEDIMIENTO

Agregar 25 µl de muestra en tubos eppendorf, incorporar los estándares. Añadir 250 µl de sol. 1



Se calienta en baño maría 85-90°C durante 10 min.
Se enfría en baño de hielo



Añadir 20 µl en pozos de microplaca. Agregar 200 µl de sol. 2



Incubar durante 40 min. Leer a 540 nm

Calculos de la concentración de lípidos

Graficar

X = concentración (µg/mL)

Y = absorbancia 620 nm

Calcular: Ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación

Tomar en cuenta las diluciones realizadas para el cálculo de la concentración final

Carbohidratos

Solución 1

TCA (ácido tricloroacético) 20% (Sigma T6399-500G)

Solución 2

Antrona (Sigma A- 1631) 0.001 g / 1 mL de H₂SO₄ 76%

Curva estándar

-Preparar una solución stock de dextrosa (Sigma G8270) en TCA 10% a una concentración de 2 mg/mL.=2μg/μl

-Preparar una curva patrón que se utiliza como referencia para calcular la concentración de proteína de la muestra problema.

Preparación de las curvas estándar a partir de una solución stock de 10 mg/mL

Tubo	μl de solución estándar	μl de agua desionizada	Concentración (μg/mL)
1	0	1000	0
2	20	980	40
3	40	960	80
4	60	940	120
5	80	920	160
6	100	900	200
7	150	850	300
8	200	800	400
9	250	750	500
10	500	500	1000

PROCEDIMIENTO

Desproteínizar con **sol. 1** (100 μl muestra:100 μl **sol. 1**)
Centrifugar 4000 g por 10 min. Se recupera sobrenadante.



Colocar 100 μl del sobrenadante en tubo eppendorf (o los estándares).
Se agrega 1 mL de **sol.2**.
Se calienta en baño maría 85-90°C durante 5 min.



Se enfría en baño de hielo
Se agregan 250 μl en pozos de microplaca y se lee a 620 nm

Cálculos de la concentración de carbohidratos

Graficar

X = concentración (μg/mL)

Y = absorbancia 620 nm

Calcular: Ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación

Tomar en cuenta las diluciones realizadas para el cálculo de la concentración final

Catalasa (CAT, EC. 1.11.1.6)

Mezcla de reacción:

Solución 1

-Amortiguador de fosfatos 50 mM ph 7.0 (KH_2PO_4 – KHPO_4) (Sigma P 5379 y P 8281)

Solución 2

-8mM de peróxido de hidrógeno (Sigma H 0904) en la solución 1. Ajustar la concentración de peróxido en el espectrofotómetro a una absorbancia de 0.5 ± 0.01 a 240nm.

PROCEDIMIENTO

Calibrar el espectrofotómetro en 240 nm con la **sol. 1**



Agregar a una celda de cuarzo 1ml de **sol. 2** + 20 μl de muestra, agitar y graficar $\Delta A/\text{min}$.

- Los valores negativos de la pendiente $\Delta A/\text{min}$ indican actividad de la catalasa.
- Coeficiente de extinción del H_2O_2 $40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.
- Como control positivo utilizar catalasa comercial de hígado de bovino (Sigma C9284).

Glutación peroxidasa (GPx, EC. 1.11.1.9)

Mezcla de reacción

Solución 1

- 800 μ l buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.5 ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{KHPO}_4$) (Sigma P 5379 y P 8281)
- 25 μ l azida de sodio 1 mM
- 5 μ l glutatióna reductasa 1 U
- 50 μ l NADPH 0.12 mM
- 20 μ l H_2O_2 2 mM o hidroperóxido de cumeno 6 mM

Solución 2

- Glutatióna (GSH) 2 mM

PROCEDIMIENTO

Calibrar el espectrofotómetro con celdas de plástico y agua destilada a una longitud de onda de 340 nm.



Agregar a una celda 1ml de **sol. 1** (en el orden de la mezcla de reacción) + 50 μ l del extracto enzimático. Medir la absorbancia a 340 nm debido a la actividad endógena



Luego se inicia la reacción por adición de 30 μ L de GSH 67 mM y se registra el cambio de absorbancia durante 1 a 2 minutos aproximadamente.

Agitar y graficar $\Delta A/\text{min}$.

- Los valores negativos de la pendiente $\Delta A/\text{min}$ indican actividad glutatión peroxidasa.
- Coeficiente de extinción del NADPH coeficiente de extinción $6,2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Como control positivo utilizar glutatión peroxidasa comercial

Superoxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1)

Mezcla de reacción:

Solución 1

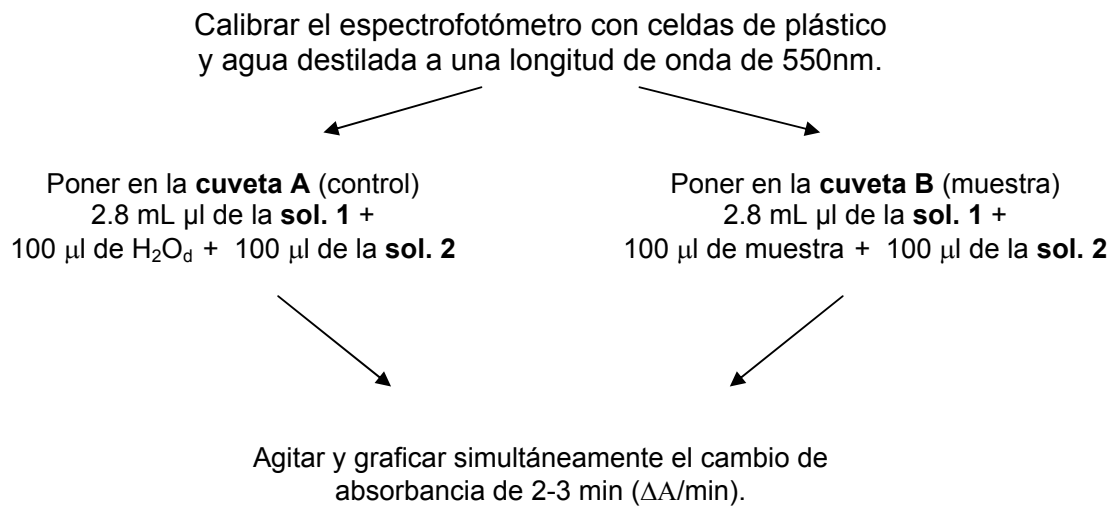
- Buffer fosfatos 50mM pH 7.8 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) (Sigma P 5379 y P 8281)
- EDTA (Sigma E 5134) 10.7 mM
- Citocromo C (Sigma C 2506) 1.1 mM
- Xantina (Sigma X 4002) 0.108 mM

Mezclar: 25 mL de a
 1 mL de b
 1 mL de c
 50 mL de d

Solución 2

-Xantina oxidasa (Sigma X 4500), preparada antes de usar en agua deionizada fría con aproximadamente 0.05 unidades.

PROCEDIMIENTO



-El $\Delta A/\text{min}$ de la cuveta A deberá estar entre 0.025 ± 0.005 , si no es así ajustar la concentración de xantina oxidasa.

-Los valores positivos de la pendiente dA/min indican actividad SOD.

-Como control positivo utilizar superóxido dismutasa de eritrocitos de bovino (Sigma S2515).

Cálculo de la actividad de la muestra :

$$\% \text{ de inhibición} = A-B / A * 100$$

$$U/\text{ml} = \% \text{ de inhibición} / (50\%) (\text{ml de la muestra})$$

$$U/\text{mg} = (\text{Unidades/ml}) / \text{mg/ml de proteína en la muestra}$$

Una unidad (U) se define como la cantidad necesaria de muestra para inhibir en un 50% la reducción del citocromo c.

PEROXIDACION DE LIPIDOS

Determinación de TBARS (Thiobarbituric acid positive substances)

Soluciones

Solución 1

Salina

0.9% NaCl pH 7

NOTA: para invertebrados utilizar solución isotónica

Solución 2

Stop mix

0.8 M HCl (Sigma 920-1) en

12.5 % ácido tricloroacético (TCA) (Sigma T6399)

Solución 3

Ácido tiobarbitúrico al 1% (**1% TBA**) (Sigma T5500)

Solución 4

TEP= 1,1,3,3-tetraethoxipropane (aka malondialdehyde bis (diethylacetal)) (Sigma T9889)

227µL TEP en 100 mL etanol

Curva estándar

Stock A= 227µL de **TEP** en 100mL de etanol (10µmole/mL)

Stock B= 100µL de **Stock A** en 10 mL de etanol (100 nomoles/mL)

Stock C= 25µL de **Stock A** en 10mL de etanol (25nmoles/mL)

Tubo	Stock (µL)	Sol. Salina (µL)	Concentración (nmoles/250µL)
1	0	250	0
2	10 de C	240	0.25
3	20 de C	230	0.5
4	50 de C	200	1.25
5	25 de B	225	2.5
6	50 de B	200	5

Cálculos:

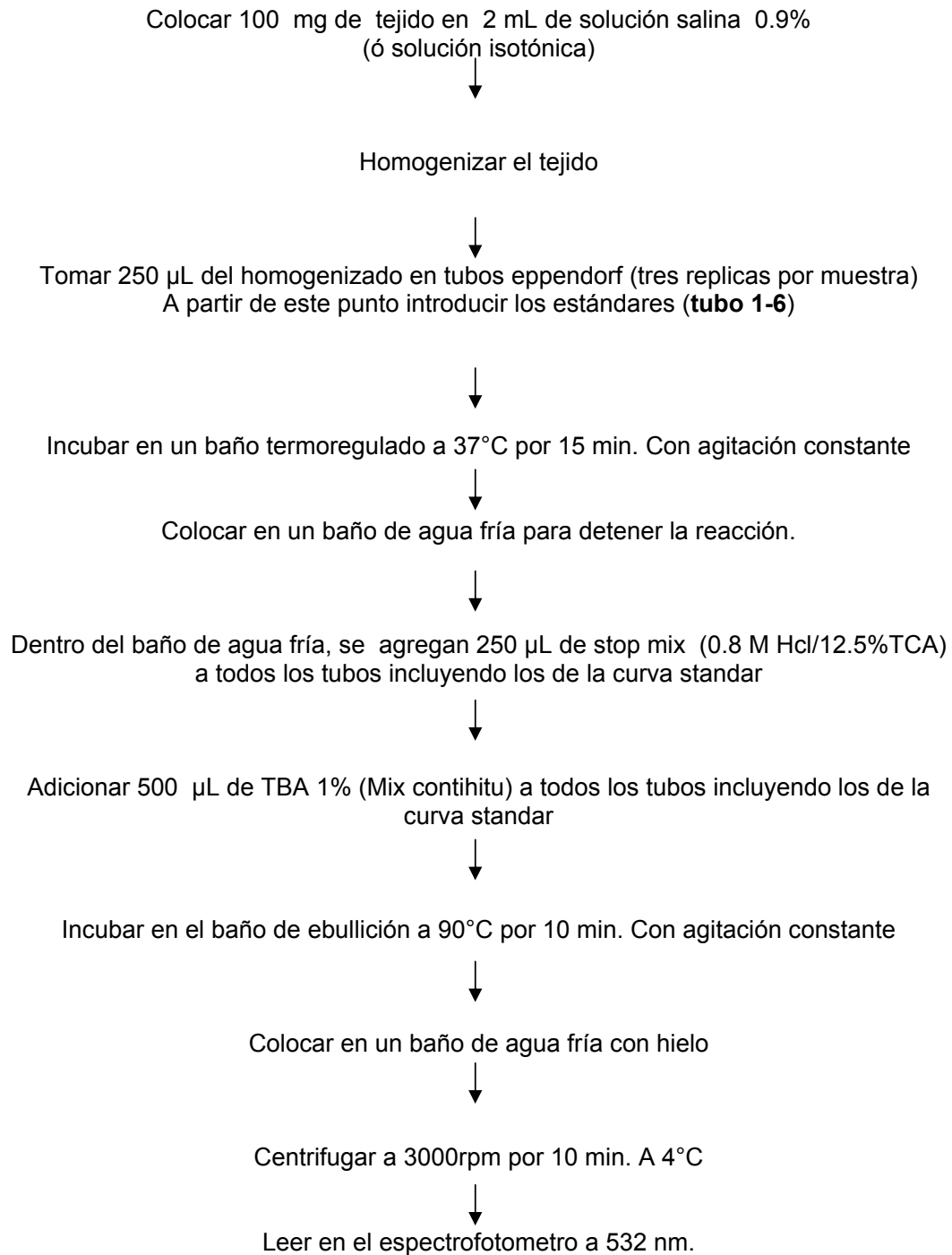
(1) Regresión lineal X = Absorbancia, Y = Concentración del estándar, incluye la constante

(2) Concentración = constante + (pendiente * Absorbancia)

(3) Corrección para la cantidad de tejido en el homogeneizado:

concentración / (mg tejido * (0.250/ ml buffer)) = nmol TBARS / mg

PROCEDIMIENTO



-Determinar la concentración de proteínas totales en el sobrenadante

-La concentración de lípoperóxidos se expresa en nmoles de TBARS por miligramo de proteína.

Acetilcolinesterasa (AChE, E.C. 3.1.1.7)

Mezcla de reacción:

Solución 1

Buffer fosfatos 100 mM pH 7.8 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$) (Sigma S 9638 y S 9763)

Solución 2

DNTB (5,5-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico) 6 mM (Sigma D 8130)

Solución 3

Yoduro de Acetilcolina 15 mM (Sigma A 5751)

PROCEDIMIENTO

Adicionar en pozos de microplaca, en el siguiente orden:
180 μl de **sol. 1** + 10 μl de muestra (ó buffer como blanco) + 10 μl de **sol. 2**



Homogeneizar e incubar por 10 min



Agregar 50 μl de sol. 1 por pozo + 50 μl de sol. 3



Homogeneizar y graficar el cambio de absorbancia durante 30 min ($\Delta A/\text{min}$) a 412 nm.

- Los valores positivos de la pendiente $\Delta A/\text{min}$ indican actividad AChE.
- Como control positivo utilizar acetilcolinesterasa comercial (Sigma C 2629)
- Coeficiente de extinción molar del 5-tio-2-ácido nitrobenzoico TNB ($1.36 \times 10^4 \text{ mL/M cm}$)

Lisozima (E.C. 3.2.1.17)

Placa agarosa

-Preparar buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 5.2 con 1% de agarosa (Sigma A 9539).

-4 mg de *Micrococcus lysodeykticus* (Sigma M 3770) se añaden a 15 mL del buffer.

-Se utilizan cajas Petri de 13.5 cm de diámetro, y se añaden 15 ml de la solución anterior, y una vez solidificada, se hacen pozos de aproximadamente 3 mm de diámetro.

-Se añade a cada pozo 20 μ l de la muestra por triplicado.

-Como control positivo se utiliza lisozima comercial de huevo de gallina (Sigma L 6876), preparada en agua desionizada. Como control negativo se utilizó agua desionizada.

-Después de 24-72 horas de incubación a 37°C, el diámetro de la zona clara se mide en escala métrica. Este diámetro de la zona clara se expresa en unidades (0.1 mm = 1 unidad) menos el diámetro del pozo multiplicado por los mg de proteína (U mg proteína⁻¹).

Ensayo enzimático

Solución 1

-Buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7 (KH₂PO₄ – KHPO₄) (Sigma P 5379 y P 8281)

-Solución 2

9 mg de *Micrococcus lysodeykticus* en 30 mL de **sol. 1**

PROCEDIMIENTO

Calibrar el espectrofotómetro en 450 nm con la **sol.1**



Agregar a una celda de vidrio 2.9 ml de **sol. 1** + 100 μ l de muestra, agitar y graficar el cambio de absorbancia de 2-3 min (ΔA /min).

-Los valores negativos de la pendiente ΔA /min indican actividad lisozima. La ΔA_{450} /min deberá estar entre 0.015-0.040.

-Como control positivo utilizar lisozima comercial de huevo de gallina (Sigma S2515).

Cálculos

$$\text{Unidades / mL} = \frac{\Delta A_{450} \times 1000}{\text{mg de enzima en la mezcla de reacción}}$$

$$\text{mgProteína / mL} = A_{280} \times 0.39$$

Oxido Nitrico

Determinación nitritos

Para determinar la actividad de óxido nítrico se realiza mediante el análisis de NO_2^- / NO_3^- . Preparar una curva patrón que se utiliza como referencia para calcular la concentración de nitritos de la muestra problema con NaNO_2 (0.03-2 μmol / mL). Se agregan 150 μl de muestra (o blanco) y 50 μl del reactivo de Griess (Sigma C 4410), a una microplaca, por triplicado. Se incuba durante 10 min y se mide la densidad óptica de las muestras en un lector de placas a 490 nm.

Determinación nitratos

Para la determinación de nitratos se toman 160 μl de la muestra y se incuba en tubos con cadmio (100 mg / tubo) durante 3 horas, por triplicado. Se centrifugó a 3600 g durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se colocaron 150 μl de muestra en una microplaca, por triplicado, y a cada pozo se le agregaron 50 μl de reactivo de Griess. Preparar una curva patrón que se utiliza como referencia para calcular la concentración de nitratos de la muestra problema con NaNO_3 (0.03-2 μmol / mL). Se mide la densidad óptica de las muestras en un lector de placas a 490 nm.

Preparación de los tubos con cadmio

En tubos eppendorff se colocan 100 mg de cadmio. Se haran dos lavados con agua desionizada, dos lavados con HCl 0.1 N, 2 lavados con NH_4OH pH 9.6 y por último 2 lavados con agua desionizada. En cada uno de los lavados se desecho el sobrenadante y se centrifugó a 12000 g por 10 min.

Preparación de las curvas estándar a partir de una solución stock de 2 $\mu\text{mol/mL}$

Tubo	μl de solución estándar	μl de agua desionizada	Concetración (nmol/mL)
1	0	1000	0
2	20	980	40
3	40	960	80
4	60	940	120
5	80	920	160
6	100	900	200
7	150	850	300
8	200	800	400
9	250	750	500
10	500	500	1000

Cálculos**Graficar**

X = concentración ($\mu\text{g/mL}$)

Y = absorbancia 490 nm

Calcular: Ordenada al origen, pendiente y coeficiente de correlación

Tomar en cuenta las diluciones realizadas para el cálculo de la concentración final

Cálculos de la actividad enzimática

La determinación cuantitativa de la actividad de un sistema enzimático por métodos espectrofotométricos se fundamenta en el hecho de que cuando una radiación electromagnética con diferentes longitudes de onda se hace pasar a través de una sustancia, parte de ella puede ser absorbida y el resto puede ser transmitida o reflejada. La magnitud de absorción es directamente proporcional a la concentración de las moléculas absorbentes y está matemáticamente expresada por la ley de Lambert-Beer:

$$D.O = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Donde:

D.O: Densidad óptica o absorbancia

ϵ : Coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

d: Distancia del recorrido de la luz a través de la cubeta (generalmente 1 cm)

c: Concentración en moles/mL.

La concentración de soluto, por lo general, se expresa en moles/L. Sin embargo, es conveniente usar moles/mL porque esta unidad de volumen se usa con frecuencia en espectrofotometría. Cuando la luz ha recorrido una distancia (d) de 1 cm en la cubeta, la densidad de 1 mL de solución es registrada por el espectrofotómetro, no obstante esta lectura es independiente del volumen, si hay suficiente solución en la cubeta.

Para determinar cuantitativamente la actividad de una enzima, se requiere de la siguiente información:

- a) Valor de la velocidad inicial de reacción (V_i), expresada en términos del cambio de absorbancia de la sustancia absorbente por unidad de tiempo a una longitud de onda (nm) específica:

$$V_i = \Delta A / \Delta t; \quad t: \text{Usualmente se expresa en minutos}$$

- b) Coeficiente de extinción molar de la sustancia absorbente a una longitud de onda de máxima absorción.
- c) Volumen de la mezcla de reacción en la cubeta experimental
- d) Concentración de la muestra enzimática (mg proteínas/mL o masa del tejido húmedo en g/mL).

EJEMPLO

Para ilustrar el cálculo de la actividad de un sistema enzimático, supongamos un ensayo espectrofotométrico para determinar la actividad de la enzima glutatona reductasa (GR) en un homogeneizado de una muestra de tejido (proporción P/V = 0,1 g/mL).

Reacción:



Volumen final de la mezcla de reacción (Vf) en la cubeta experimental = 1 mL.

Volumen del extracto enzimático = 0,1 mL

Distancia del paso de luz a través de la cubeta = 1 cm

Coefficiente de extinción molar del NADH a 340 nm = $6,22 \times 10^3 \cdot \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Vi = 0,207 (cambio de absorbancia en función del tiempo, min.)

0,207/min

$$\text{C. NADPH (moles/mL)} = \frac{0,207/\text{min}}{6,22 \times 10^3 \text{ mol} \times 10^3 \times 1 \text{ mL} \times 1 \text{ cm}}$$

$$\text{C. NADPH } (\mu\text{moles/mL}) = \frac{0,207/\text{min}}{6,22 \times 10^6} \times 10^6 = 0,033 \mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$$

La cantidad de tejido homogenizado en la alícuota usada en la mezcla de reacción es de 0,01 g; por lo tanto, la actividad específica de LDH en esa muestra será:

$$\text{Act. Específica} = \frac{0,033 \text{ U}}{0,01 \text{ g}} = 3,3 \text{ U/g}\cdot\text{p.h}$$

Prueba de toxicidad. Ensayo ratón

Para probar la toxicidad de la cepa, se utilizaron ratones CD-1 de 19-21 g de acuerdo al método de la AOAC. A partir de la toxina extraída se inoculó 1 mL del extracto ácido a cada ratón (entre 3 y 5 ratones) vía intraperitoneal. Se observó al ratón cuidadosamente y se registró el tiempo de muerte. Si el tiempo de muerte o el tiempo medio de muerte de varios ratones era <5 min, se hicieron diluciones para obtener tiempos de muerte de entre 5-7 min que es lo óptimo. Se determinaron los tiempos medios de muerte y de acuerdo a la Tabla de Sommer (Tabla IV) se obtuvieron las unidades ratón (UR), obteniendo la media. Si los ratones pesaban < 19 g o > 21 g, se hizo la corrección para cada ratón multiplicando las unidades ratón correspondientes al tiempo de muerte de cada ratón por el factor de corrección de peso por medio de la Tabla V.

$$\mu\text{g eq STX} / 1\text{g} = (\text{PUR} \times \text{FC} \times \text{FD} \times 200) / 100$$

PUR = promedio de las unidades ratón

FC = factor corrección

FD = factor de dilución

UR = unidad ratón

Conociendo que,

$$1\text{UR} = 0.2 \mu\text{g eq STX} \quad \text{UR} / \text{mL} = (\mu\text{g eq STX} / 1 \text{g}) / 0.2 \mu\text{g eq STX}$$

$$\text{Toxicidad} (\mu\text{g eq STX} / \text{cel}) = (\text{UR}/\text{mL}) / (\text{cel dinoflagelado} / \text{mL})$$

Tabla IV. Tabla de Sommer que muestra la relación tiempo de muerte: unidad ratón para las toxinas paralíticas de moluscos (PSP).

Tiempo muerte	Unidades ratón	Tiempo muerte	Unidades ratón
1:00	100	5:00	1.92
10	66.2	05	1.89
15	38.3	10	1.86
20	26.4	15	1.83
25	20.7	20	1.80
30	16.5	30	1.74
35	13.9	40	1.69
40	11.9	45	1.67
45	10.4	50	1.64
50	9.33		
55	8.42	6:00	1.60
		15	1.54
2:00	7.67	30	1.48
05	7.04	45	1.43
10	6.52		
15	6.06	7:00	1.39
20	5.66	15	1.35
25	5.32	30	1.31
30	5.00	45	1.28
35	4.73		
40	4.48	8:00	1.25
45	4.26	15	1.22
50	4.06	30	1.20
55	3.88	45	1.18
3.00	3.70	9:00	1.16
05	3.57	30	1.13
10	3.43	10:00	1.11
15	3.31	30	1.09
20	3.19		
25	3.08	11:00	1.075
30	2.98	30	1.06
35	2.88		
40	2.79	12:00	1.05
45	2.71	13	1.03
50	2.63	14	1.015
55	2.56	15	1.000
		16	0.99
4:00	2.50	17	0.98
05	2.44	18	0.972
10	2.38	19	0.965
15	2.32	20	0.96
20	2.26	21	0.954
25	2.21	22	0.948
30	2.16	23	0.942
35	2.12	24	0.937
40	2.08	25	0.934
45	2.04	30	0.917
50	2.00	40	0.898
55	1.96	60	0.875

Tabla V. Tabla de corrección para los pesos de los ratones.

Peso del ratón	Unidades ratón
10	0.50
10.5	0.53
11	0.56
11.5	0.59
12	0.62
12.5	0.65
13	0.675
13.5	0.70
14	0.73
14.5	0.76
15	0.785
15.5	0.81
16	0.84
16.5	0.86
17	0.88
17.5	0.905
18	0.93
18.5	0.95
19	0.97
19.5	0.985
20	1.000
20.5	1.015
21	1.03
21.5	1.04
22	1.05
22.5	1.06
23	1.07