



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



TOXINAS PARALIZANTES TIPO BENZOIL EN EL
DINOFLAGELADO *Gymnodinium catenatum*
GRAHAM Y MODELO TEÓRICO DE
INTERACCIÓN CON EL CANAL DE SODIO

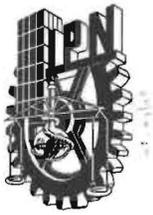
TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

PRESENTA

LORENA MARÍA DURÁN RIVEROLL

LA PAZ, B.C.S., DICIEMBRE DE 2014



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 4 del mes de Noviembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"TOXINAS PARALIZANTES TIPO BENZOIL EN EL DINOFLAGELADO *Gymnodinium catenatum*
GRAHAM Y MODELO TEÓRICO DE INTERACCIÓN CON EL CANAL DE SODIO"

Presentada por el alumno:

<u>DURÁN</u> Apellido paterno	<u>RIVEROLL</u> materno	<u>LORENA MARÍA</u> nombre(s)
Con registro:		
A	1	1
0	4	9
3		

Aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

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

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis



DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT
Directora de Tesis



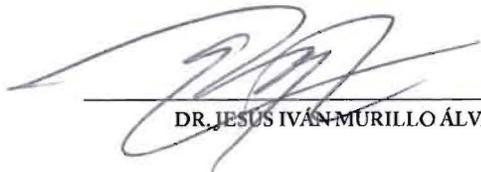
DR. JOSE BUSTILLOS GUZMAN
2º. Director de Tesis



DR. EVGUENI CHOUMILINE NIKOLAYEVICH

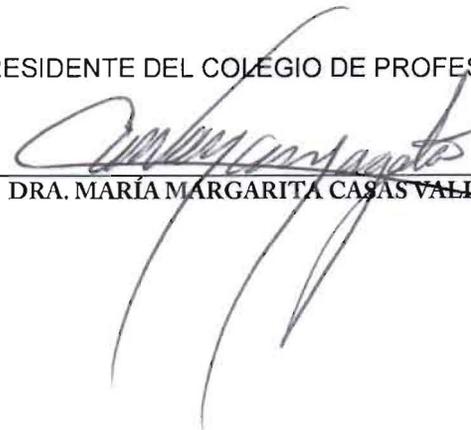


DR. RENATO PEÑA MARTÍNEZ



DR. JESUS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ



IPN
CICIMAR
DIRECCION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 05 del mes Noviembre del año 2014
el (la) que suscribe MC. LORENA MARÍA DURÁN RIVEROLL alumno(a) del
Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS
con número de registro A110493 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS
manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:
DRA. CHRISTINE JOHANNA BAND SCHMIDT y DR. JOSÉ BUSTILLOS GUZMÁN
y cede los derechos del trabajo titulado:

"TOXINAS PARALIZANTES TIPO BENZOIL EN EL DINOFLAGELADO *Gymnodinium catenatum*
GRAHAM Y MODELO TEÓRICO DE INTERACCIÓN CON EL CANAL DE SODIO"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: ojo_naupliar@hotmail.com - cjband@yahoo.com - cbands@ipn.mx - jose04@cibnor.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MC. LORENA MARÍA DURÁN RIVEROLL

nombre y firma

Para Esteban, mi motor, mi inspiración y mi paraíso.

Para Fernando, por su amor incondicional y su infinita paciencia.

Para quienes me llenan de fantasía.

Para todos los que me rodean
de cariño, porque yo soy el resultado de todo y de todos. Porque éste es el resultado
de todos.

Y no habría podido hacerlo sin ustedes.

Contenido

Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Anexos	xiv
Agradecimientos académicos.....	xv
Agradecimientos personales	xvi
Abreviaturas	xvii
Resumen	18
Abstract	19
Introducción.....	20
1. Antecedentes	22
1.1 Toxinas paralizantes.....	24
1.2 Análogos de la saxitoxina	25
1.3 Mecanismo de acción de la saxitoxina y sus análogos.....	29
1.4 Efectos de las toxinas paralizantes en organismos marinos	31
1.5 Métodos de análisis, identificación y cuantificación	32
1.6 Investigación sobre <i>Gymnodinium catenatum</i> y las toxinas paralizantes en México.....	35
1.7 Herramientas computacionales	37
2. Hipótesis	39
3. Objetivo general	39
4. Objetivos específicos	39
5. Materiales y métodos	41
5.1 Cultivos de <i>Gymnodinium catenatum</i>	41
5.1.1 Cultivos para determinación de toxinas tipo benzoil por medios espectroscópicos	41
5.1.2 Cultivos para el análisis de las curvas de crecimiento, tasas de crecimiento, formación de cadenas y análisis de toxinas.....	41
5.1.3 Cultivos para purificación de toxinas tipo benzoil	42
5.2 Curvas de crecimiento, tasas de crecimiento y formación de cadenas	42

5.2.1	Análisis estadísticos	43
5.3	Extracción de toxinas.....	43
5.3.1	Filtros.....	43
5.3.2	Biomasa	43
5.4	Determinación de la presencia de toxinas tipo benzoil por ¹ H-RMN y espectroscopía UV	44
5.4.1	Fraccionamiento del extracto	44
5.4.2	Espectroscopía por ¹ H-RMN	45
5.4.3	Espectroscopía por UV.....	45
5.5	Determinación toxinas por cromatografía de líquidos.....	45
5.5.1	Fraccionamiento del extracto	45
5.5.2	Análisis de toxinas hidrofílicas por HPLC-FLD	45
5.5.3	Análisis de toxinas tipo benzoil por HPLC-FLD	47
5.5.4	Análisis de toxinas tipo benzoil por HILIC-MS/MS.....	50
5.5.5	Análisis de datos	52
5.6	Aislamiento de toxinas tipo benzoil.....	53
5.6.1	Pre-purificación por cromatografía en columna	53
5.6.2	Análisis de las fracciones pre-purificadas por HILIC-MS/MS	53
5.6.3	Fraccionamiento por HILIC preparativa guiado por HILIC-MS/MS	53
5.6.4	Espectroscopía de las fracciones por ¹ H-RMN.....	55
5.7	Análisis del modo teórico de unión de los análogos de STX en el en canal de sodio regulado por voltaje	55
5.7.1	Modelo del canal de sodio regulado por voltaje Na _v 1.4.....	55
5.7.2	Docking	56
6.	Resultados	61
6.1	Curvas de crecimiento, tasas de crecimiento y formación de cadenas	61
6.1.1	Curvas y tasas de crecimiento.....	61
6.1.2	Formación de cadenas de células.....	67
6.2	Perfil de toxinas y toxicidad	74
6.2.1	Perfiles de toxinas hidrofílicas durante el ciclo de cultivo	74

6.2.2	Comparación de los perfiles de toxinas entre aislados y medios en tres puntos de la etapa de crecimiento exponencial	79
6.2.3	Toxicidad	82
6.3	Identificación de toxinas tipo benzoil por ¹ H-RMN y UV	85
6.4	Análisis y variación de toxinas tipo benzoil por cromatografía de líquidos	87
6.4.1	Toxina GC1b	88
6.4.2	Toxina GC2b	89
6.4.3	Toxinas GC1/2.....	90
6.4.4	Toxina GC3	91
6.4.5	Análisis de las toxinas tipo benzoil por HILIC-MS/MS	92
6.4.6	Variación de las toxinas tipo benzoil de los cuatro aislados	94
6.4.7	Relaciones entre las toxinas tipo benzoil.....	95
6.5	Relación de las toxinas decarbamoil y las toxinas tipo benzoil.....	102
6.6	Aislamiento de las toxinas tipo benzoil	111
6.6.1	Pre-purificación en columna y rendimientos obtenidos	111
6.6.2	Análisis de las fracciones por HILIC-MS/MS	111
6.6.3	Fraccionamiento por HILIC preparativa guiado por HILIC-MS/MS	114
6.6.4	Espectroscopía por resonancia magnética nuclear de protón de las fracciones.....	120
6.7	Modo teórico de unión de los análogos de STX en el en canal de sodio regulado por voltaje Na _v 1.4	121
6.7.1	Energía libre de unión	127
7.	Discusión.....	128
7.1	Curvas, tasas de crecimiento y formación de cadenas.....	128
7.2	Perfil de toxinas	134
7.3	Toxicidad	137
7.4	Toxinas tipo benzoil identificadas por resonancia magnética nuclear de protón y espectroscopía ultravioleta	139
7.5	Variaciones y relaciones de las toxinas tipo benzoil.....	142
7.6	Relación de las toxinas decarbamoil y las toxinas tipo benzoil.....	144

7.7	Aislamiento de las toxinas tipo benzoil	146
7.8	Modo teórico de unión de los análogos de STX en el en canal de sodio regulado por voltaje	149
8.	Conclusiones.....	154
9.	Perspectivas de estudio	157
10.	Literatura citada	159
11.	Anexos	169
12.	Publicaciones	178

Lista de tablas

Tabla 1. Gradiente de H ₂ O y MetOH utilizado para el fraccionamiento de las toxinas tipo benzoil.	44
Tabla 2. Características del equipo utilizado para el análisis de toxinas hidrofílicas.	46
Tabla 3. Método utilizado para el análisis de toxinas hidrofílicas por HPLC-FLD (Hummert et al., 1997, modificado por Yu et al., 1998).....	46
Tabla 4. Características del equipo utilizado para el análisis de toxinas tipo benzoil por HPLC-FLD. .	48
Tabla 5. Método utilizado para el análisis de toxinas tipo benzoil por HPLC-FLD (Vale, 2008b).	48
Tabla 6. Características del equipo utilizado para la detección de toxinas tipo benzoil por HILIC-MS/MS.	50
Tabla 7. Gradiente usado en el método de Diener et al. (2007) para el análisis de toxinas tipo benzoil por HILIC-MS/MS.	50
Tabla 8. Transiciones seleccionadas para identificar las toxinas.	51
Tabla 9. Características del equipo de cromatografía preparativa.	54
Tabla 10. Secuencia de aminoácidos de los P-loops del Na _v 1.4 del modelo utilizado en el docking. .	56
Tabla 11. Promedios de los datos de crecimiento de los aislados en los dos medios de cultivo.....	64
Tabla 12. Porcentaje promedio de cadenas y día de cultivo	68
Tabla 13. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil en los cuatro aislados, en los dos medios de cultivo.....	96
Tabla 14. Relaciones analizadas y encontradas entre toxinas tipo benzoil y toxinas decarbamoil. ...	102
Tabla 15. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil y toxinas decarbamoil.....	110
Tabla 16. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y toxinas decarbamoil.	110
Tabla 17. Pesos y rendimientos (con respecto al extracto crudo) de las fracciones obtenidas para el aislamiento de toxinas GC.....	111
Tabla 18. Toxinas GC encontradas en la fracción F2 (20% MeOH) por HILIC-MS/MS.	112
Tabla 19. Toxinas GC identificadas en la fracción F3 (100% MeOH) por HILIC-MS/MS.....	112
Tabla 20. Aislados de <i>Gymnodinium catenatum</i> en distintas locaciones en el Pacífico Mexicano.....	169
Tabla 21. Medio de cultivo GSe.	170
Tabla 22. Diferencias (en concentración µM) entre los medios f/2 y GSe.....	174
Tabla 23. Pesos moleculares y factores de toxicidad relativa.	177

Lista de figuras

Fig. 1. Distribución global de <i>G. catenatum</i>	23
Fig. 2. Estructura química de la saxitoxina y los análogos producidos por <i>Gymnodinium catenatum</i> . .	28
Fig. 3. Representación en dos dimensiones del sitio 1 del Na _v , receptor de la STX y sus análogos....	30
Fig. 4. Áreas costeras de México donde se ha registrado <i>Gymnodinium catenatum</i>	37
Fig. 5. Cromatogramas típicos (a y b) de las muestras analizadas por Bustillos-Guzmán et al. (2011) y las de este estudio (c).....	49
Fig. 6. Modelo tridimensional del canal Na _v 1.4 utilizado en este estudio (de Choudhary et al., 2007).	56
Fig. 7. Estructuras químicas de las 36 toxinas utilizadas en este estudio:	60
Fig. 8. Curvas de crecimiento del aislado BAPAZ5 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en dos medios de cultivo.....	61
Fig. 9. Curvas de crecimiento del aislado BAPAZ7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en dos medios de cultivo.....	62
Fig. 10. Curvas de crecimiento del aislado GCCV7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en dos medios de cultivo.	62
Fig. 11. Curvas de crecimiento del aislado 62L de <i>Gymnodinium catenatum</i> en dos medios de cultivo.	63
Fig. 12. Tasa de crecimiento de los aislados de <i>Gymnodinium catenatum</i>	65
Fig. 13. Tiempo de división (días) de los aislados de <i>Gymnodinium catenatum</i>	66
Fig. 14. Densidad máxima (cel·mL ⁻¹) de los aislados de <i>Gymnodinium catenatum</i>	66
Fig. 15. Curvas de crecimiento de los cuatro aislados de <i>Gymnodinium catenatum</i>	67
Fig. 16. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado BAPAZ5 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio f/2.	69
Fig. 17. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado BAPAZ5 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio GSe.....	69
Fig. 18. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado BAPAZ7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio f/2.	70
Fig. 19. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado BAPAZ7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio GSe.....	71
Fig. 20. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado GCCV7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio f/2.	71
Fig. 21. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado GCCV7 de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio GSe.....	72
Fig. 22. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado 62L de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio f/2.	73

Fig. 23. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado 62L de <i>Gymnodinium catenatum</i> en medio GSe.....	74
Fig. 24. Perfiles de toxinas del aislado BAPAZ5 de <i>G. catenatum</i> durante todas las etapas del cultivo, por toxina.....	75
Fig. 25. Perfiles de toxinas del aislado BAPAZ5 de <i>G. catenatum</i> durante todas las etapas del cultivo, por grupo de toxinas.....	76
Fig. 26. Perfiles de toxinas del aislado BAPAZ7 de <i>G. catenatum</i> durante todas las etapas del cultivo, por toxina.....	77
Fig. 27. Perfiles de toxinas del aislado BAPAZ7 de <i>G. catenatum</i> durante todas las etapas del cultivo, por grupo de toxinas.....	77
Fig. 28. Perfiles de toxinas del aislado 62L de <i>G. catenatum</i> durante todas las etapas del cultivo.....	78
Fig. 29. Perfiles de toxinas del aislado 62L de <i>G. catenatum</i> durante todas las etapas del cultivo, por grupo de toxinas.....	79
Fig. 30. Comparación de perfiles de toxinas de tres aislados de <i>G. catenatum</i> en dos medios de cultivo al inicio del crecimiento exponencial.....	80
Fig. 31. Comparación de perfiles de toxinas de tres aislados de <i>G. catenatum</i> en dos medios de cultivo a la mitad del crecimiento exponencial.....	81
Fig. 32. Comparación de perfiles de toxinas de tres aislados de <i>G. catenatum</i> en dos medios de cultivo al final del crecimiento exponencial.....	82
Fig. 33. Toxicidad (pg STXeq-cel ⁻¹) al inicio (I), mitad (M) y al final (F) de la etapa de crecimiento exponencial de los tres aislados de <i>G. catenatum</i> en medio f/2 y GSe.....	83
Fig. 34. Variación de la toxicidad (pg STXeq ⁻¹) durante el ciclo de cultivo en BAPAZ5.....	84
Fig. 35. Variación de la toxicidad (pg STX eq ⁻¹) durante el ciclo de cultivo en BAPAZ7.....	84
Fig. 36. Variación de la toxicidad (pg STX eq ⁻¹) durante el ciclo de cultivo en 62L.....	85
Fig. 37. 1H-RMN de la fracción 2 de <i>Gymnodinium catenatum</i> (aislado G7), obtenida con 10% MeOH.....	86
Fig. 38. UV-VIS de la fracción 2 de <i>G. catenatum</i> (aislado G7), obtenida con 10% MeOH.....	87
Fig. 39. Toxina GC1b en los cuatro aislados de <i>Gymnodinium catenatum</i> en el medio GSe y f/2.....	89
Fig. 40. Toxina GC2b en los cuatro aislados de <i>Gymnodinium catenatum</i> en el medio GSe y f/2.....	90
Fig. 41. Toxinas GC1/2 en los cuatro aislados de <i>Gymnodinium catenatum</i> en el medio GSe y f/2. ...	91
Fig. 42. Toxina GC3 en los cuatro aislados de <i>Gymnodinium catenatum</i> en el medio GSe y f/2.....	92
Fig. 43. Toxinas tipo benzoil en el aislado 62L en medio f/2, identificadas por HILIC-MS/MS.....	93
Fig. 44. Toxinas tipo benzoil en el aislado 62L en medio GSe, identificadas por HILIC-MS/MS.....	93
Fig. 45. Variaciones de la toxina GC1b en los cuatro aislados.....	94
Fig. 46. Variaciones de la toxina GC2b en los cuatro aislados.....	94
Fig. 47. Variaciones de las toxinas GC1/2 en los cuatro aislados.....	95

Fig. 48. Variaciones de la toxina GC3 en los cuatro aislados.....	95
Fig. 49. Relación directa entre toxinas tipo benzoil en BAPAZ5 en medio f/2.....	97
Fig. 50. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil en BAPAZ5 en medio GSe.....	97
Fig. 51. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil en BAPAZ7 en medio f/2.....	98
Fig. 52. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil en BAPAZ7 en medio GSe.....	99
Fig. 53. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil en GCCV7 en medio GSe.....	99
Fig. 54. Relación directa entre toxinas tipo benzoil en 62L en medio f/2.....	100
Fig. 55. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil en 62L en medio GSe.....	101
Fig. 56. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil en BAPAZ5 en medio f/2.....	101
Fig. 57. Relación directa entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en BAPAZ5 en medio f/2.....	103
Fig. 58. Relaciones directa entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en BAPAZ5 en medio GSe.....	104
Fig. 59. Relaciones directa entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en BAPAZ7 en medio GSe.....	104
Fig. 60. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en BAPAZ5 en medio f/2.....	105
Fig. 61. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en BAPAZ7 en medio f/2.....	106
Fig. 62. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en BAPAZ7 en medio GSe.....	106
Fig. 63. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en 62L en medio f/2.....	107
Fig. 64. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en 62L en medio GSe.....	109
Fig. 65. Cromatograma de la fracción F2 (20% MeOH) por HILIC-MS/MS de monitoreo de reacción seleccionada (SRM) en modo de ion positivo.....	113
Fig. 66. Cromatograma de la fracción F3 (100% MeOH) por HILIC-MS/MS de monitoreo de reacción seleccionada (SRM) en modo de ion positivo.....	114
Fig. 67a. Fraccionamiento de F2 y F3 por cromatografía preparativa.....	117
Fig. 67b. Continuación.....	118
Fig. 67c. Continuación.....	119
Fig. 68. Espectro de ¹ H-RMN de F3(F5+6+7+8(F2)) con presaturación.....	120
Fig. 69. Espectro de ¹ H-RMN de F4(F5+6+7+8(F2)) con presaturación.....	121
Fig. 70. Residuos involucrados en las interacciones con la STX y sus análogos.....	122
Fig. 71. Residuos y P-loops involucrados en las interacciones con la STX y sus análogos.....	122
Fig. 72. Unión de la STX y algunos de sus análogos con los residuos del Na _v 1.4.....	126
Fig. 73. Energía libre de unión (ΔG , kcal·mol ⁻¹) de las toxinas sometidas a las simulaciones.....	127

Anexos

I.	Datos de los aislamientos de <i>Gymnodinium catenatum</i>	169
II.	Medio de cultivo GSe (Blackburn et al., 2001)	170
III.	Extracto de suelo	171
IV.	Medio de cultivo f/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975)	172
V.	Diferencias en la composición de los medios f/2 y GSe	174
VI.	Método de oxidación de muestras con peróxido de hidrógeno para análisis por HPLC-FLD (AOAC, 2006)	175
VII.	Hidrólisis de toxinas paralizantes	176
VIII.	Peso molecular y factor de toxicidad de las toxinas hidrofílicas	177

Agradecimientos académicos

A mis directores de tesis, Dra. Christine J. Band Schmidt y Dr. José J. Bustillos Guzmán.

Al comité de tesis, Dr. Evgeny Choumiline, Dr. Paulo Vale, Dr. J. Iván Murillo Álvarez, Dr. Renato Peña Martínez, Dra. Claudia Hernández Guerrero.

Al Dr. Francisco E. Hernández Sandoval, por la realización de los análisis cromatográficos.

A los investigadores que amablemente me recibieron en las estancias de investigación realizadas: Dr. Javier Peralta Cruz (ENCB-IPN, México, D.F., del 4 al 18 de diciembre de 2011), Dr. José Correa Basurto (ESM-IPN, México, D.F., del 22 de octubre al 15 de diciembre de 2013), Dr. Bernd Krock (AWI, Bremerhaven, Alemania, del 02 de mayo al 31 de julio de 2014).

A los investigadores que realizaron los aislamientos de los organismos utilizados en el desarrollo de este trabajo: Dra. Christine J. Band Schmidt, Dra. Mónica C. Rodríguez Palacio, Dra. Sonia Quijano Scheggia.

Al Dr. Robert French, del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Calgary por la donación del modelo del canal $Na_v 1.4$.

A las instituciones y apoyos económicos recibidos por mí y por los investigadores involucrados en la realización de este trabajo, para manutención, estancias de investigación y asistencia a congresos y cursos:

En México: CONACyT (beca 65354, proyecto CONACyT-SEP 132353), BEIFI-IPN, SIP-IPN (proyectos 2011-0590, 2012-1152, 2012-1448, 2013-0942, 2014-1469, 2014-0252), CYTED (beca 214RT0482), CIBNOR (beca PC0.10 y PC0.11), CONACyT-PNPC, COFAA-IPN, EDI-IPN.

En Alemania: Al proyecto PACES II Theme Coast within Workpackage 3: Evolution and Adaptation to Climate Change and Anthropogenic Stress in Coastal and Shelf

Systems through the Alfred-Wegener-Institut en Bremerhaven, y al Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD).

Internacional: FAO, International Society for the Study of Harmful Algae (ISSHA-IOC-UNESCO).

Agradecimientos personales

Porque aprendí algunas cosas en estos cuatro años. Pero lo que más aprendí fue que no hay proyecto que pueda llevarse a cabo por una sola persona. Este es el resultado del esfuerzo de mucha gente y estoy profundamente agradecida con todos.

Agradezco a todas las personas que se relacionaron de manera directa o indirecta en el desarrollo de este trabajo: Fernando Sánchez, Esteban Sánchez, Alfonso Durán, Victoria Riveroll, Claudia Durán, Paola Durán, Mónica Rivera, Dulce Valeria Ramírez, Alejandra Arreola, Juan Pablo Santiago, Valeria Olachea, Inés Marrón, Hugo Pérez, Edgar Peña.

A los investigadores y compañeros cuyo apoyo recibí constantemente:

CICIMAR-IPN: Dra. Christine Band Schmidt, Dra. Claudia Hernández Guerrero, Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, M.C. Dora Luz Arvizu Higuera, M.C. Y. Elizabeth Rodríguez Montesinos, Dra. Griselda M. Rodríguez Figueroa, M.C. Tanos Grayeb del Álamo, Dra. Bárbara González Acosta, Dr. René Funes Rodríguez, Dr. Arturo Tripp Quezada, Xchel G. Moreno Sánchez, M.C. Sonia Futema Jiménez, Norma P. Orozco García.

CIBNOR: Dra. Bertha O. Arredondo Vega, M.C. Laura Carreón Palau.

AWI: Dr. Bernd Krock, Dr. Allan Cembella, Dr. Urban Tillman, Tec. Annegret Müller, Tec. Wolfgang Drebing.

Y a todos los que me ha faltado nombrar por falta de memoria.

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos (Official Association of Analytical Chemists)
EM	Espectrometría de masas
CC	Cromatografía en columna
DD H₂O	Agua destilada y desionizada
FAN	Florecimientos algales nocivos
GTX	Gonyautoxinas
HILIC-MS/MS	Cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (Hydrophylic Interaction Liquid Chromatography) acoplada a detector de masas en tándem.
HPLC-FLD	Cromatografía de líquidos de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography) acoplada a un detector de fluorescencia
LC	Cromatografía de líquidos (liquid chromatography)
LD₅₀	Dosis letal media; muerte del 50% de los organismos durante una prueba de toxicidad en un tiempo definido
MBA	Bioensayo en ratón (mouse bioassay)
MetOH	Metanol (CH ₃ OH)
Na_v	Canal de sodio regulado por voltaje
NEO	Neosaxitoxina
PSP	Intoxicación por toxinas paralizantes (Paralytic Shellfish Poisoning)
¹H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
std	Estándar de referencia (National Research Council, Canadá).
SRM	Monitoreo de reacción seleccionada (Selected Reaction Monitoring)
STX	Saxitoxina
THF	Tetrahidrofurano
Toxinas GC	Toxinas tipo benzoil
TP	Toxinas paralizantes
TR	Tiempo de retención (min)
TTX	Tetrodotoxina
UV	Ultravioleta. Se hace referencia a la técnica espectroscópica.

Resumen

En este estudio se analizaron extractos de *G. catenatum* para estudiar la composición y variación de sus toxinas, incluyendo los análogos tipo benzoil, por diferentes técnicas cromatográficas y espectroscópicas, como LC-FLD, HILIC-MS/MS, ¹H RMN y espectroscopia UV. También se sometió a la molécula de saxitoxina y 34 análogos a estudios de docking sobre el modelo del canal de sodio regulado por voltaje Na_v 1.4 para conocer las interacciones sobre su molécula blanco. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de estas toxinas en los cinco aislados analizados y durante todas las etapas de cultivo, lo que indica que se producen de manera constante. Se observaron variaciones en todas las toxinas relacionadas con el medio de cultivo y el aislado, y las toxinas tipo benzoil no fueron una excepción. Se encontraron diferencias biológicas y en el perfil de toxinas entre aislados, debidas a la variabilidad intraespecífica. Las toxinas paralizantes exhiben diferentes modos de unión con energías similares en el canal de sodio regulado por voltaje, y las toxinas tipo benzoil exhiben una toxicidad teórica digna de estudiar más a fondo. La simulación *in silico* llevada a cabo en este estudio es la primera con estas toxinas, y provee un acercamiento hacia un mejor entendimiento del modo de acción de la saxitoxina y sus análogos. Los análogos tipo benzoil han sido poco estudiados y el reporte de su existencia en aislados mexicanos es de gran importancia porque podrían representar un riesgo para la salud pública, pero también su conocimiento genera la oportunidad de continuar su investigación, una tarea necesaria en un futuro muy próximo.

Palabras clave: Toxinas tipo benzoil, *Gymnodinium catenatum*, canal de sodio regulado por voltaje, LC-FLD, HILIC-MS/MS, ¹H-RMN.

Abstract

In this study, we analyzed *Gymnodinium catenatum* extracts to investigate their toxin composition, including the benzoyl analogs, by different chromatographic and spectroscopic techniques, such as LC-FLD, HILIC-MS/MS, ¹H NMR, and UV spectroscopy. We also submitted STX and 34 analogs to a docking study on the tri-dimensional channel Na_v 1.4. The results showed media and isolate related variations in all toxins, and benzoyl toxins were not an exception. We were capable to demonstrate the presence of these toxins in all the analyzed isolates and during all culture stages, and found many biological and toxin profile differences between isolates due to intraspecific variability. We demonstrate that these toxins exhibit different binding modes with similar free binding energies, and that these alternative binding modes are equally probable. Our simulation constitutes the first *in silico* modeling study on benzoyl-type paralytic toxins and provides an approach towards a better understanding of the mode of action of STX and its analogs. We propose that the principal binding that governs ligand recognition is mediated by electrostatic interactions. Benzoyl analogs have been poorly studied and the report on their existence in Mexican isolates is of great importance because they could represent a public health risk, but in the other hand, their existence generates the opportunity to continue its research, a necessary task in the future.

Keywords: Benzoil type toxins, *Gymnodinium catenatum*, voltaje-gated sodium cannel, LC-FLD, HILIC-MS/MS, ¹H-RMN.

Introducción

El dinoflagelado desnudo *Gymnodinium catenatum* es productor de saxitoxina (STX) y varios de sus análogos. Este organismo fue descrito a partir de material colectado en el Golfo de California (Graham, 1943) y su presencia en México ha sido reportada a lo largo de la costa del Pacífico y Golfo de California. Se ha asociado a intoxicaciones y muertes humanas en los estados de Sinaloa (Mee et al., 1986) y Oaxaca (Saldate-Castañeda et al., 1991).

Entre las toxinas producidas por esta especie se encuentran la STX, gonyautoxinas 1-4 (GTX 1-4), toxinas C 1-4, B 1-2, neosaxitoxina (NEO) y los análogos decarbamoil en los que la cadena lateral ha sido reemplazada por un grupo hidroxilo, dcSTX, dcGTX 1-4, dcNEO. Sin embargo, en el año 2003, Negri y colaboradores describieron tres nuevas toxinas producidas exclusivamente por esta especie, las cuales fueron nombradas toxinas GC1-3 (Negri et al., 2003). En éstas, la cadena lateral ha sido sustituida por un grupo para-hidroxi benzoil. Posteriormente, Vale (2008b) determinó nuevos análogos de las toxinas benzoil (toxinas GC) a través de cromatografía de líquidos acoplada a detección de fluorescencia y a espectrometría de masas, los cuales incluyen al grupo benzoil para-hidroxilado, di-hidroxilado y sulfatado (GC4-6, GC1a-6a y GC1b-6b, respectivamente). La falta de estándares de estos análogos ha limitado su investigación (Vale, 2011) y hasta la fecha no se conoce su toxicidad ni la variación en su producción durante las etapas de crecimiento del organismo productor, *G. catenatum*.

El presente trabajo se ha enfocado al estudio de estas toxinas; a su identificación en aislados del Golfo de California (Bahía Concepción y Bahía de La Paz, en Baja California Sur) y del Pacífico mexicano (Manzanillo, Colima y Puerto Lázaro Cárdenas, Michoacán) y a lo largo de las fases de crecimiento en dos medios de cultivo. Se comparó la tasa de crecimiento y producción de cadenas de los aislados en ambos medios, así como la biomasa máxima. Los análisis de toxinas, tanto hidrofílicas como las tipo benzoil se llevaron a cabo en muestras tomadas cada

cuatro días por HPLC-FLD, y el aislado de Lázaro Cárdenas fue analizado también por HILIC-MS/MS con fines de comparación. El aislado de Manzanillo fue utilizado para determinar la existencia de un anillo benzoil en la estructura base de la STX por medio de $^1\text{H-RMN}$. Se cultivaron algunos de estos aislados en mayores volúmenes para obtener biomasa con el fin de aislar las toxinas por medio de cromatografía preparativa. Finalmente, se realizó un estudio *in silico* para analizar la unión de los análogos tipo benzoil en el canal de sodio regulado por voltaje ($\text{Na}_v 1.4$) para obtener mayor información sobre la toxicidad teórica utilizando la técnica de docking.

1. Antecedentes

En la primavera de 1939, durante un crucero de investigación oceanográfica en el Golfo de California, se observó un dinoflagelado planctónico formador de cadenas que se reportó como *Gonyaulax catenella* (*Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech), sin embargo, observaciones posteriores realizadas por Herbert W. Graham llevaron a la descripción de una nueva especie: *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943).

Este organismo es un dinoflagelado gymnodinoide desnudo, relacionado con la formación de florecimientos algales nocivos (FAN), y conocido por la producción de toxinas paralizantes (TP). Sus florecimientos han causado intoxicaciones en humanos y en organismos marinos (Morey-Gaynes, 1982). Actualmente existen reportes de su presencia en ambos hemisferios, y se han realizado estudios sobre algunas relaciones biogeográficas basados en los perfiles de toxinas y en la secuencia genética sobre la subunidad larga no codificante del RNA ribosomal eucariótico (Hallegraef et al., 2012) (Fig. 1). En México, su distribución se ha reportado en varios lugares a lo largo de la costa del Pacífico (Band-Schmidt et al., 2006).

Esta especie permaneció prácticamente desconocida, siendo reportada sólo dos veces entre 1940 y 1967 (Balech, 1964; Hada, 1967). Posteriormente no hubo reportes sino hasta 1976, y de ese año hasta el 2010 se ha registrado un aumento en su frecuencia, con más de 60 reportes en 23 países, incluyendo México (Band-Schmidt et al., 2010; Hallegraeff et al., 2012; Quijano-Scheggia et al., 2012). Es probable que el aumento en la frecuencia de los reportes esté relacionado con el aumento en el interés científico sobre estos fenómenos y su distribución, sin embargo no se puede ignorar que, al menos en ciertas regiones, su aparición ha incrementado en respuesta a un aumento en la cantidad de nutrientes en el mar debido a surgencias costeras, traslado entre áreas en aguas de lastre o incluso al cambio climático (Hallegraef y Gollasch, 2006; Bolch y de Salas, 2007), aunque las

causas exactas y la manera en que las actividades humanas han influenciado estos fenómenos aún generan debate (Masó y Garcés, 2006).



Fig. 1. Distribución global de *G. catenatum*. Los puntos negros muestran los lugares en donde esta especie ha sido detectada. (Modificada de Hallegraeff et al., 2012).

La asociación de *G. catenatum* con episodios de intoxicación por toxinas paralizantes (síndrome conocido como PSP por sus siglas en inglés, Paralytic Shellfish Poisoning) se dio por primera vez en 1976 en el noroeste de España (Estrada et al., 1984) y posteriormente en Sinaloa en 1979 (Cortés-Altamirano, 1981; Morey-Gaines, 1982; De La Garza Aguilar, 1983; Mee et al., 1986).

A partir de esa fecha, prácticamente año con año se ha reportado la presencia de *G. catenatum* en diversos lugares del mundo (para mayor referencia, ver Hallegraeff et al., 2012). Anualmente se reportan a nivel mundial alrededor de 2000 casos de PSP, con una tasa de mortalidad de 15% (Van Dolah, 2000), sin embargo, la

implementación de los programas de monitoreo en muchos países ha contribuido a minimizar los riesgos sanitarios y reducir las pérdidas humanas (Etheridge, 2010).

1.1 Toxinas paralizantes

Se ha reportado que cerca de 300 especies de fitoplancton (7% de las 3400 – 4100 especies estimadas) producen FAN, y entre ellas se incluyen diatomeas, dinoflagelados, silicoflagelados, prymnesiofitas y rafidofitas (Sournia, 1995). Sin considerar las diatomeas, la cantidad decrece hasta menos de 200 especies y la mayoría de los organismos productores de FAN no son tóxicos. Únicamente 60 – 80 especies de estos taxa son consideradas dañinas o tóxicas, como resultado de la producción de biotoxinas, daños físicos en los organismos, anoxia, reducción de la irradiación solar, etc. Dentro de este grupo, los flagelados constituyen el 90%, y entre los flagelados, los dinoflagelados sobresalen por ser un grupo particularmente nocivo. Los dinoflagelados representan el 75% (40 – 60 taxa) de las especies formadoras de FAN. La importancia de los dinoflagelados es más evidente por su prominencia entre las especies principales responsables de la actual expansión y propagación de estos fenómenos en el mar (Anderson et al., 1989; Smayda, 1989; Hallegraeff, 1993).

Gymnodinium catenatum es el único dinoflagelado gymnodinioide que produce ficotoxinas (del griego *phykos*, alga; y *toxikon*, toxina: compuestos químicos producidos por algas eucariotas y procariotas). Además de *G. catenatum*, las TP son producidas por varias especies del género *Alexandrium*, y una especie del género *Pyrodinium* (*P. bahamense*) (Hallegraeff y Fraga, 1998; Cembella, 1998; Landsberg, 2002). Las toxinas pueden ser transferidas en la red trófica por organismos vectores, los cuales las acumulan al alimentarse de los dinoflagelados, sin daño aparente. Estos incluyen invertebrados filtradores como moluscos y crustáceos, pero también vectores no tradicionales, como gastrópodos y peces planctívoros (Wiese et al., 2010). Altas concentraciones de TP en organismos de consumo humano inducen problemas neurológicos en el consumidor, causando PSP. Esta intoxicación puede

ser fatal en algunas circunstancias debido a la parálisis respiratoria progresiva, lo que ha atraído la atención a su estudio científico desde el inicio del siglo XX (Vale, 2010).

La atribución del PSP a un principio químico se llevó a cabo a inicios del siglo pasado (Sommer, 1981), y se estableció la conexión con la acumulación de toxina en moluscos filtradores durante eventos de FAN. En los siguientes años, el hecho de que su toxicidad era medida a través de la inhibición de la entrada de iones de sodio (Na^+) en las células que dependen de una diferencia en el potencial transmembránico contribuyó al descubrimiento del canal de Na^+ regulado por voltaje (Na_v), localizado en la membrana celular (Hille, 1975). Posteriormente contribuyó también a la definición de sus modelos estructurales (Lipkind y Fozzard, 2000). La mayoría de los Na_v en mamíferos son sensibles a la saxitoxina (STX) y por lo tanto, las células nerviosas en humanos y otros tejidos son susceptibles a su acción. Actualmente se sabe que también bloquean canales de calcio y potasio, los cuales se encuentran en células excitables (Llewellyn, 2006).

La estructura de la STX se obtuvo en 1975, cuando dos grupos independientes reportaron su estructura cristalina (Bordner et al., 1975; Schantz et al., 1975). El reporte de su síntesis química en 1977 disparó su reconocimiento como un arma química potencial (Llewellyn, 2006), ya que las TP son neurotoxinas potentes; la STX tiene una dosis letal media (LD_{50}) en ratones (vía intraperitoneal) de $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (comparada con la LD_{50} del cianuro de sodio de $10 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) (Landsberg, 2002).

1.2 Análogos de la saxitoxina

Desde el descubrimiento de la STX en 1957 se han identificado al menos 57 análogos de ocurrencia natural en diversos organismos (Yotsu-Yamashita et al., 2004; Wiese et al., 2010), lo cual es interesante desde el punto de vista de la divergencia taxonómica, al tratarse de un metabolito secundario (Llewellyn, 2006).

La STX y sus análogos son compuestos solubles en agua y termoestables. La fórmula molecular de la STX es $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_4$, y su peso molecular es de 299. Esta molécula contiene un sistema tricíclico y dos grupos guanidino que se encuentran

cargados positivamente a pH fisiológico (Fig. 2), las cuales son las responsables de su polaridad y solubilidad en agua (Llewellyn, 2006). Para su estudio, los diversos análogos se han agrupado en “hidrofilicos” e “hidrofóbicos”, sin embargo esta separación no es adecuada, ya que, al conocer con más detalle las características químicas de los considerados “hidrofóbicos” (toxinas tipo benzoil) se ha encontrado que poseen una hidrofilicidad similar a la de varias de las toxinas “hidrofilicas”. Más adecuadamente, han sido divididos en función del grupo sustituyente en la cadena lateral, en carbamoil, decarbamoil, N-sulfocarbamoil y benzoil. Estos últimos se han subdividido en *para*-hidroxibenzoil, di-hidroxibenzoil y sulfobenzoil (Fig. 2).

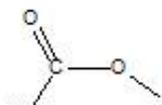
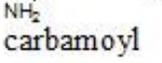
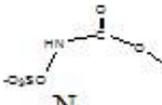
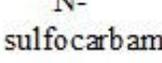
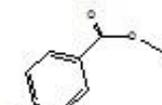
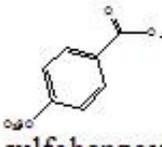
Los análogos más estudiados en *G. catenatum* son los análogos carbamoil (STX, NEO, GTX1-4), decarbamoil (dcSTX, dcNEO, dcGTX1-4) y N-sulfocarbamoil (B1-2 y C1-4), lo que da un total de 18 análogos llamados hidrofilicos. Se ha determinado en diversos estudios que su presencia, ausencia y proporción varía constantemente entre aislados y poblaciones, y a la fecha no se conoce un aislado o cepa de *G. catenatum* que produzca todos los análogos, aunque típicamente todos los aislados sintetizan más de uno (Cembella, 1998). También se han reportado variaciones dentro de las mismas poblaciones y diferencias en las proporciones de los análogos en función de factores físicos y nutricionales (Camino-Ordás et al., 2004; Band-Schmidt et al., 2004, 2006, 2014; Gárate-Lizárraga et al., 2005; Oh et al., 2010; Bustillos-Guzmán et al., 2012). *Gymnodinium catenatum* se distingue por producir una gran proporción de las toxinas N-sulfocarbamoil, principalmente toxinas C1-4, lo que constituye una característica típica de la especie, con muy pocas excepciones (Camino-Ordás et al., 2004; Mohammad-Noor, 2010; Hallegraeff et al., 2012).

Sin embargo, el aumento en los esfuerzos de búsqueda de análogos, junto con mejores técnicas de detección y determinación estructural ha contribuido al descubrimiento de otros análogos de STX. Por ejemplo, Negri y colaboradores (2001) detectaron picos cromatográficos de fluorescencia “similares a los de las toxinas”. Estos compuestos además mostraron actividad en los ensayos de unión a la saxifilina y fueron designados toxinas C5 y C6, con estructuras moleculares hasta ese momento desconocidas. Los nuevos análogos estaban presentes en cepas de 5

de los 6 países estudiados (Australia, Portugal, España, Uruguay y China, siendo en cepas originarias de Japón las únicas de los 6 países en donde no se detectaron) (Negri et al., 2001). Poco después, Camino-Ordás et al. (2004) también reportaron estos análogos desconocidos en las costas de España. Investigaciones posteriores revelaron que estos compuestos no eran toxinas sulfocarboxil tipo C, y además se encontró un tercero. Los tres nuevos compuestos fueron nombrados toxinas GC1, GC2 y GC3, y sus estructuras fueron caracterizadas por espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Negri et al., 2003). Así, ahora se sabe que GC3 es el derivado 4-hidroxibenzoato de la dcSTX, mientras que GC1 y GC2 son el par epimérico C11-sulfatado de GC3, aumentando así el número de análogos de STX conocidos.

Los análogos tipo benzoil (GC1-6, *para*-hidroxibenzoil; GC1a-6a, di-hidroxibenzoil; GC1b-6b, sulfobenzoil, un total de 18 análogos), han sido identificados exclusivamente en *G. catenatum* y reportados en diversas cepas de esta especie (Negri et al., 2001; 2003; 2007; Camino-Ordás et al., 2004; Vale, 2008b; Bustillos-Guzmán et al., 2011; Durán-Riveroll et al., 2013, Gu et al., 2013). Negri y colaboradores (2003) enfatizaron que la naturaleza menos polar de estas nuevas toxinas podría significar un mayor potencial para su bioacumulación en el tejido graso de los organismos.

La identificación de los análogos benzoil se ha visto restringida principalmente por la falta de estándares (Vale, 2008a; 2008b; 2011). Para ello, se han determinado estructuras probables utilizando espectrometría de masas (EM) (Vale, 2008b), y hasta el momento, su toxicidad en mamíferos se desconoce, aunque los estudios realizados *in vitro* (Llewellyn et al., 2004) y en modelos *in silico* (Durán-Riveroll et al., sometido) con algunos de ellos, han mostrado una fuerte unión con el canal de sodio regulado por voltaje (Na_v).

Toxin	R1	R2	R3	R4
STX	H	H	H	
NEO	OH	H	H	
GTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	 carbamoyl
GTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	
GTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	
GTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	
B1	H	H	H	
B2	OH	H	H	
C1	H	H	OSO ₃ ⁻	N-  sulfocarbamoyl
C2	H	OSO ₃ ⁻	H	
C3	OH	H	OSO ₃ ⁻	
C4	OH	OSO ₃ ⁻	H	
dcSTX	H	H	H	
dcNEO	OH	H	H	
dcGTX1	OH	H	OSO ₃ ⁻	decarbamoyl
dcGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	
dcGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	
dcGTX4	OH	OSO ₃ ⁻	H	
GC1	H	H	OSO ₃ ⁻	
GC2	H	OSO ₃ ⁻	H	 <i>p</i> - hydroxybenzoyl
GC3	H	H	H	
GC4*	OH	H	OSO ₃ ⁻	
GC5*	OH	OSO ₃ ⁻	H	
GC6*	OH	H	H	
GC1a*	H	H	OSO ₃ ⁻	
GC2a*	H	OSO ₃ ⁻	H	
GC3a*	H	H	H	
GC4a*	OH	H	OSO ₃ ⁻	
GC5a*	OH	OSO ₃ ⁻	H	
GC6a*	OH	H	H	
GC1b*	H	H	OSO ₃ ⁻	 sulfobenzoyl
GC2b*	H	OSO ₃ ⁻	H	
GC3b*	H	H	H	
GC4b*	OH	H	OSO ₃ ⁻	
GC5b*	OH	OSO ₃ ⁻	H	
GC6b*	OH	H	H	

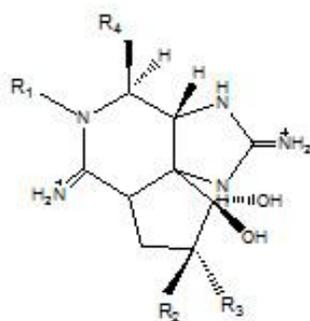


Fig. 2. Estructura química de la saxitoxina y los análogos producidos por *Gymnodinium catenatum*. Las toxinas señaladas con (*) no han sido caracterizadas aún, pero su estructura probable ha sido inferida con base en análisis por espectrometría de masas por Vale, 2008b.

1.3 Mecanismo de acción de la saxitoxina y sus análogos

Muchas ficotoxinas interactúan con los canales iónicos regulados por voltaje. Estas proteínas son los blancos moleculares para un amplio rango de potentes neurotoxinas, las cuales alteran las funciones del canal al unirse a sitios receptores específicos. Las toxinas hidrofílicas de baja masa molecular, como la saxitoxina y sus análogos, bloquean físicamente el poro del canal de sodio regulado por voltaje, e impiden la conductancia de iones Na^+ (Wang, 2008).

El primer modelo del mecanismo de acción de estas toxinas fue propuesto en 1975 y postulaba una unión tipo enchufe por la STX en el canal de Na_v (Hille, 1975). Más adelante surgieron nuevos modelos que involucraban a los grupos guanidino (Kao y Walker, 1982) y el grupo hidroxilo del carbono 12 (C-12) (Shimizu, 1982). Con la clonación del canal de Na_v se obtuvo información más detallada del modo de unión de la toxina, y a partir de estudios moleculares, su entendimiento ha mejorado. Ahora se sabe que las TP son agentes bloqueadores que reducen el número de canales de Na_v funcionales al ocupar un sitio cerca de la apertura externa con una afinidad 1:1 en el sitio de unión 1 del canal (Fig. 3). Esta unión no permite el paso de los iones Na^+ a través de la membrana, lo que interfiere con la transmisión de señales. El bloqueo generalizado impide la generación de impulsos en los nervios periféricos y músculo esquelético. La STX también afecta directamente al músculo esquelético al bloquear el potencial de acción muscular, lo que suprime la conducción nerviosa periférica (Catterall et al., 2007). Todos los análogos se unen al mismo sitio, aunque con diferentes afinidades (Tubaro et al., 2012). Es interesante mencionar que la mayoría de los conocimientos sobre los canales de Na_v y los sitios de unión de éstas y otras toxinas que lo afectan han sido posibles gracias al estudio de la STX y la tetrodotoxina (TTX), otra toxina guanidínica, con características farmacológicas y mecanismo de acción sobre los canales de Na_v prácticamente idénticos a los de la STX.

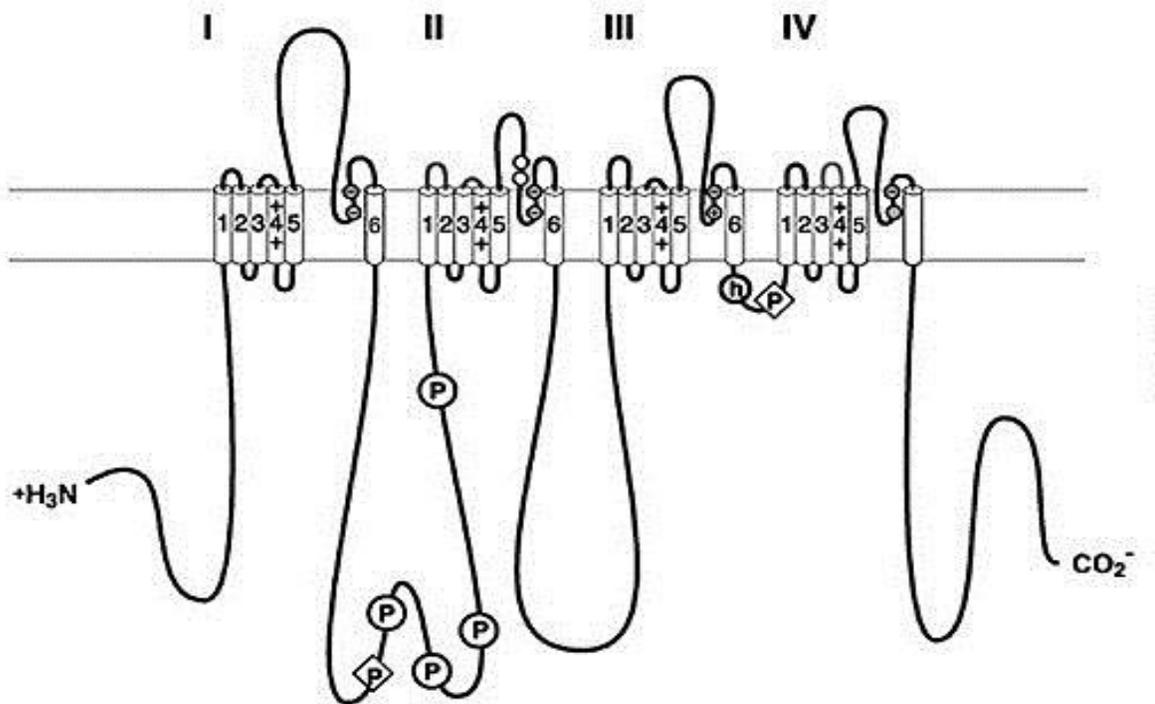


Fig. 3. Representación en dos dimensiones del sitio 1 del Na_v , receptor de la STX y sus análogos. I, II, III y IV indican los dominios que forman el canal. Los cilindros representan los segmentos probables de las hélices. La P indica la fosforilación de la proteína por quinasas (círculos = quinasa A, rombos = quinasa C). El círculo con la letra h indica el sitio de inactivación. Los anillos externos (*P-loops*) forman el filtro de selectividad iónica y los círculos grises en el poro del canal indican el sitio de unión de la STX y la TTX (modificado de Caterall et al., 2005).

Tanto la STX como la TTX se han convertido en herramientas químicas importantes en las neurociencias por su especificidad para bloquear los canales de Na_v ; gracias a ellas fueron descubiertos los canales iónicos regulados por voltaje, y estudios posteriores mostraron que existen tres grandes familias de ellos: los canales de sodio regulados por voltaje (Na_v), canales de calcio regulados por voltaje (Ca_v) y canales de potasio regulados por voltaje (K_v) (revisado por Catterall et al., 2007). Adicionalmente, estas toxinas han sido utilizadas en estudios médicos para entender sus modos de acción y evaluar su potencial terapéutico. Tanto la STX como la TTX son consideradas anestésicos efectivos de larga duración y seguros cuando son aplicados tópicamente para cirugías oftálmicas (Schwartz et al., 1998; Duncan et al., 2001) y en tratamientos de fisuras anales crónicas (Garrido et al., 2006).

Aunque el mecanismo de acción de la STX es conocido a nivel molecular, se sabe poco acerca de su absorción, distribución, biotransformación y eliminación en los diversos tejidos. Debido a que estas toxinas generalmente tienen carga positiva, hipotéticamente serían malos candidatos para ser disponibles oralmente, pero su absorción en el intestino ocurre pocos minutos después de la ingesta y sólo se eliminan por la orina (Tubaro et al., 2012). De acuerdo con Llewellyn (2006), los pocos estudios existentes sugieren que son metabolizadas a nivel gastrointestinal y/o hepático. Debe considerarse que su transformación en el tracto digestivo de los mamíferos puede deberse al metabolismo bioquímico así como a las condiciones a las que las toxinas están expuestas, como los jugos gástricos, los cuales pueden convertir pequeñas cantidades de las toxinas N-sulfocarbamoil menos potentes en compuestos más potentes.

1.4 Efectos de las toxinas paralizantes en organismos marinos

Si bien los datos toxicológicos de las TP se han centrado en los efectos en la salud humana, existen diversos estudios en varios organismos marinos, los cuales a su vez pueden sufrir daños en tejidos y fungir como reservorios de toxinas, incluso en aquellos que no han sido claramente reportados como vectores hacia humanos, aves, mamíferos marinos u otros organismos que se alimentan de ellos. El transporte de toxinas a través de la trama alimenticia ha sido visible por la mortandad de una gran variedad de organismos marinos, como ballenas, delfines, focas, aves, peces, moluscos, y crustáceos, y los reportes de la afectación en esos organismos son numerosos (Anderson y White, 1992; Landsberg, 2002; Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003; Cortés-Altamirano et al., 2006; Palomares-García et al., 2006; Estrada et al., 2007; Costa et al., 2010; Núñez-Vázquez et al., 2011).

Las actividades acuícolas también se han visto afectadas; se ha reportado mortalidad masiva de nauplios, postlarvas y camarones adultos en cultivo en Sinaloa, México, relacionados con florecimientos de *G. catenatum* (Cortés-Altamirano y Alonso-Rodríguez, 1997; Gárate-Lizárraga et al., 2002). Pérez-Linares et al. (2008) reportaron daños por TP en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, el cual es

ampliamente cultivado en México. Estos estudios sugieren que la presencia de florecimientos de *G. catenatum* en sitios de pesca o cultivo de este crustáceo puede significar un riesgo para la industria camaronícola e incluso ser un vector hacia la población humana (Pérez-Linares et al., 2008).

Por otro lado, algunos organismos fitoplanctívoros aparentemente no son afectados por las toxinas cuando se alimentan de *G. catenatum*, como lo demuestra el estudio realizado por Palomares-García et al. (2006), en el que no se encontró efecto alguno en tiempos cortos en el estado físico y la fecundidad del copépodo *Acartia clausi*. Otros estudios con el mismo crustáceo, pero alimentado con el dinoflagelado productor de TP *Alexandrium lusitanicum*, reportaron un efecto a mediano plazo en la fecundidad y viabilidad de los huevos del copépodo, lo que sugiere esta especie podría tener un umbral en su capacidad de asimilación de toxinas (Dutz, 1998). El hecho de que algunos organismos que se alimentan del fitoplancton no sean afectados por las toxinas de *G. catenatum* y otras microalgas tóxicas, puede jugar un papel importante en la dinámica de los FAN, como es el caso del dinoflagelado heterótrofo *Noctiluca scintillans* (Alonso-Rodríguez et al., 2005; Escalera et al., 2007; Bustillos-Guzmán et al., 2013). De acuerdo con Granéli et al. (1989), la inmunidad de algunos organismos a la STX y sus análogos parece deberse a mutaciones en la cadena de aminoácidos de las proteínas que forman el canal.

1.5 Métodos de análisis, identificación y cuantificación

Debido a la frecuencia de las intoxicaciones por consumo de mariscos y pescado, en muchos países las instituciones gubernamentales y la industria pesquera han establecido métodos de control para evitar que lleguen al consumidor los alimentos contaminados con ficotoxinas. El primer paso para lograrlo ha sido el establecimiento de programas de monitoreo de los FAN, seguidos de restricciones en la cosecha de bivalvos en las áreas afectadas (Christian y Luckas, 2008). En algunos países se cuenta con la tecnología necesaria para monitorear los florecimientos en tiempo real con instrumentos de percepción remota, técnica que ha mostrado ser útil no sólo

para la seguridad alimentaria, sino para el manejo de las pesquerías y la seguridad del turismo (Gallardo-Rodríguez et al., 2012; Tubaro et al., 2012).

En la actualidad existen decenas de métodos biológicos y químicos para la determinación de las toxinas marinas, sin embargo pocos de ellos han sido validados y establecidos como métodos oficiales. El desarrollo de estas pruebas no ha sido sencillo por muchas razones, entre las que destacan la falta de toxinas puras y estándares certificados, lo que se debe principalmente a la dificultad de obtención en cantidad y pureza suficientes.

Debido a que las matrices en las que se encuentran las toxinas (algas, mariscos, fluidos corporales y agua de mar) son diversas y complejas, los métodos actuales de análisis son laboriosos y en muchos casos imprecisos, requiriendo varios pasos de extracción y purificación parcial (Naar et al., 2002). Los perfiles de las toxinas pueden cambiar con las condiciones ambientales y con el estadio y la edad del florecimiento (Baden et al., 2005), lo que puede producir diferentes resultados en función del método utilizado para la extracción y detección. La aplicación de los diferentes métodos no sólo depende de su sensibilidad y especificidad, sino de la extracción efectiva y procedimientos de limpieza (*clean up*), necesarios en la preparación de las muestras. Finalmente, al seleccionar un método para determinar estas toxinas es necesario considerar el propósito de su aplicación: seguridad de los alimentos, investigación o diagnóstico (Caillaud et al., 2010; Chinain et al., 2010; Dickey y Plakas, 2010).

Existen métodos de identificación y análisis aceptados por los organismos nacionales e internacionales, prácticamente para cada toxina conocida causante de los síndromes de intoxicación comunes (Caillaud et al., 2010). Actualmente, entre los métodos más utilizados a nivel mundial, después del bioensayo en ratón, se encuentran los métodos químicos, basados principalmente en análisis cromatográficos. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es uno de los métodos más utilizados para el monitoreo, la determinación, análisis y cuantificación de numerosas ficotoxinas, mientras que los métodos de aislamiento y purificación de las toxinas han sido perfeccionados (Dickey, 2008).

El HPLC se utiliza en combinación con otras técnicas para la determinación de las ficotoxinas, y el tipo de técnica utilizada depende de las características químicas de la toxina en cuestión. Este sistema se puede acoplar a detector de luz ultravioleta (HPLC-UV) o detector de fluorescencia (HPLC-FLD), sin embargo, uno de los problemas de la técnica es que requiere las sustancias puras (estándares) para su identificación (por tiempos de retención, coelución, espectros de absorción-emisión, etc.) cuantificación (factor de respuesta), y no existen estándares para todos los análogos, particularmente para los análogos benzoil. Además tiene limitaciones debido a que las toxinas pueden coeluir con otras moléculas y mostrar absorciones similares a éstas, sin serlo (Luckas 1990; Baker et al. 2003; Martins et al. 2003; Krock et al. 2007).

La cromatografía de líquidos, al ser utilizada junto con la espectrometría de masas (HPLC-MS y HPLC-MS/MS) proporciona una identificación prácticamente definitiva de las moléculas eluidas. De acuerdo con Watkins y colaboradores (2008), el HPLC-MS es empleado cada vez con mayor frecuencia en muestras de agua y aire para documentar y cuantificar la presencia de toxinas y sus concentraciones relativas, sin embargo, sólo funciona con los análogos conocidos, y es necesario contar con el equipo, que es costoso en su adquisición y en su mantenimiento.

En el caso de las toxinas paralizantes, la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (Association of Official Analytical Chemists, AOAC) ha validado el uso de HPLC-FLD con oxidación pre y post-columna; estos métodos han sido aprobados oficialmente como AOAC 2005 2005.06 y AOAC 2011.02, como una alternativa al bioensayo en ratón (MBA) en programas de monitoreo, ya que cubren prácticamente todos los análogos de STX encontrados en los moluscos, con excepción de la B2, la dcNEO (Tubaro et al., 2012) y las toxinas tipo benzoil. Estos análisis se encuentra en uso en varios países europeos en donde ha sido abandonado el MBA para la identificación y el monitoreo de las TP como Alemania, Noruega y más recientemente, Francia.

En México, el organismo gubernamental encargado de la seguridad alimentaria, la Secretaría de Salud, ha publicado la Norma Oficial Mexicana vigente (NOM-242-SSA1-2009) que regula los productos de pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. En el apartado 7.1.7 de esta NOM, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 10 de febrero de 2011 que ha entrado en funciones a partir de esta fecha, se establecen las especificaciones sanitarias y métodos de prueba para las biotoxinas marinas, que incluyen a la STX, con un límite máximo de $800 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de carne, utilizando como método de prueba el bioensayo en ratón.

1.6 Investigación sobre Gymnodinium catenatum y las toxinas paralizantes en México

En México los FAN son eventos comunes, tanto en la costa Pacífica como del Golfo de México y el Caribe. Los reportes sobre este tema se han incrementado sustancialmente en los últimos 20 años, en parte por el mayor número de investigadores trabajando en él, lo que permite ampliar el número de registros y zonas de estudio, pero también por los cambios en los ecosistemas de origen natural y/o antropogénico (eutrofización, cambio climático, transporte de organismos, deterioro del ambiente costero, incremento de actividades acuícolas, uso de fertilizantes para la agricultura, etc.) (Band-Schmidt et al., 2011). En el Golfo de California se han asociado los FAN con la mortalidad masiva de organismos marinos desde 1943 (Osorio-Tafall, 1943), y a partir de ese momento, se han documentado afectaciones en varios grupos de organismos como aves, peces y mamíferos marinos causadas por diferentes grupos de toxinas (revisado por Sierra-Beltrán et al., 1997 y por Núñez-Vázquez et al., 2011). El estudio continuo de estos fenómenos comenzó en 1979, cuando ocurrieron las primeras intoxicaciones por PSP en la Bahía de Mazatlán (De la Garza-Aguilar, 1983; Mee et al., 1986); antes de este suceso no se cuenta con información en las costas mexicanas, excepto por los registros anecdóticos de los españoles durante la colonización y evangelización, como el del padre jesuita Miguel Venegas (1757), donde hace referencia del Golfo de California como el Mar Bermejo o Mar Rojo, presuntamente debido a la presencia

de FAN. El primer evento documentado, con consecuencias en la población humana, fue caso de PSP en Bahía de Mazatlán en 1979, en el que se intoxicaron 19 personas y se reportaron 3 casos fatales por ingestión de ostiones y pequeñas almejas de la localidad (De la Garza-Aguilar, 1983; Mee et al., 1986). Posteriormente, en 1981, se reportó una sola intoxicación y en 1988 se registraron 10 personas hospitalizadas sin casos fatales. El registro anual de estos fenómenos ha hecho posible dar avisos oportunos a las autoridades para evitar intoxicaciones masivas (Cortés-Altamirano et al., 2002).

A partir del primer registro de *G. catenatum*, en 1939 (Graham, 1943) y hasta 2010, se han publicado al menos 60 reportes de FAN causados por esta especie en nuestro país, afectando los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Jalisco, Nayarit, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Fig. 4) (para referencias de 1939 a 2008 ver Band-Schmidt et al., 2010; referencia posterior, Quijano-Scheggia et al., 2012).

En México se han realizado una cantidad importante de estudios sobre las características ambientales de los sitios donde ocurren FAN de esta especie (Bravo et al., 1994; Cortés-Altamirano y Núñez Pastén, 1991; Alonso-Rodríguez y Ochoa, 2004; Quijano-Scheggia et al., 2012), sobre el perfil de toxinas y la toxicidad, tanto en el ambiente natural como en cultivos en laboratorio bajo diversas condiciones (Band-Schmidt et al., 2004, 2005, 2006, 2014; Gárate-Lizárraga 2002, 2005; Hernández-Sandoval, 2010), sobre los efectos en diversos organismos (Band-Schmidt et al., 2005; Bustillos-Guzmán et al., 2013; Palomares-García et al., 2006, Pérez-Linares et al., 2008), así como acerca de las recientemente descubiertas toxinas tipo benzoil (Bustillos-Guzmán et al., 2011; Durán-Riveroll et al., 2013; Durán-Riveroll et al., sometido), por nombrar sólo algunos.

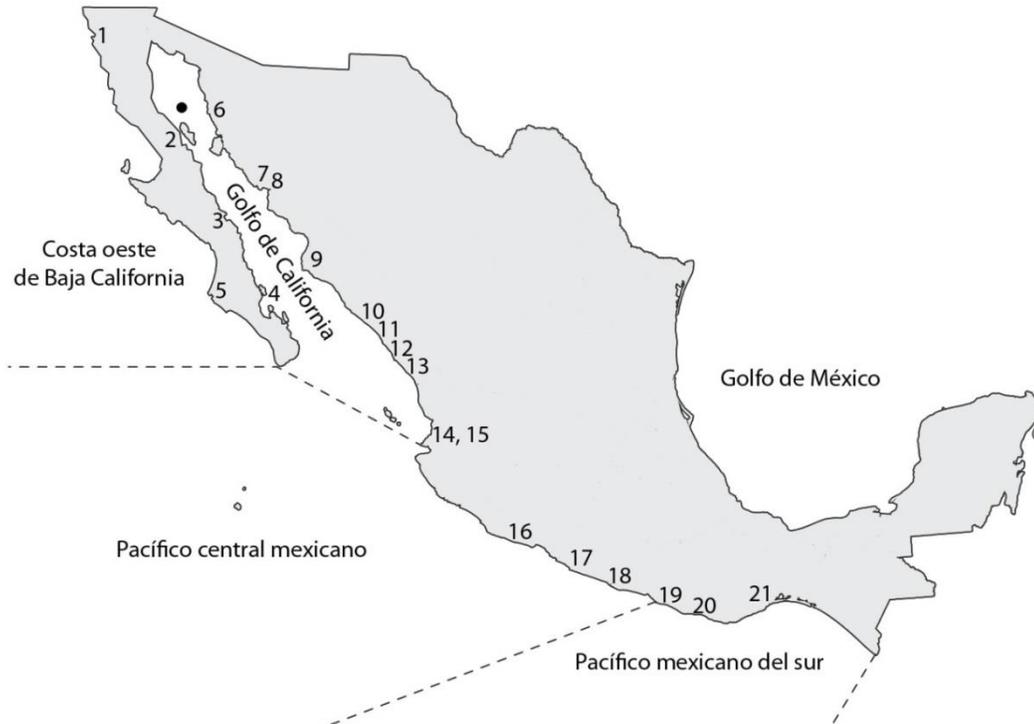


Fig. 4. Áreas costeras de México donde se ha registrado *Gymnodinium catenatum*. Círculo negro: primer reporte. (1) Punta Colnett; (2) Bahía de Los Ángeles; (3) Bahía Concepción; (4) Bahía de La Paz; (5) Bahía Magdalena-Almejas; (6) Puerto Libertad; (7) Bahía Kun Kaak; (8) Bahía Bacoichampo; (9) Laguna de Macapule; (10) Cruz de Elota; (11) Punta Piaxtla; (12) Bahía de Mazatlán; (13) Teacapan; (14–15) Bahía Banderas and Puerto Vallarta; (16) Bahía de Manzanillo; (17) Lázaro Cárdenas; (18) Bahía de Acapulco; (19) Laguna Corralero-Alotengo; (20) Puerto Escondido; (21) Salina Cruz. (Modificado de Band-Schmidt et al., 2010).

Es evidente que en nuestro país la investigación sobre *G. catenatum* es extensa, sin embargo, aún falta mucho por conocer sobre esta especie, las condiciones que favorecen sus florecimientos, las toxinas que produce y sus consecuencias en todos los niveles tróficos.

1.7 Herramientas computacionales

Se han desarrollado una gran variedad de técnicas para el estudio de las ficotoxinas, sin embargo algunas técnicas utilizadas en farmacología y en el estudio de otros metabolitos secundarios que ejercen su acción sobre moléculas conocidas,

principalmente proteínas, no han sido del todo exploradas. Tal es el caso de las herramientas computacionales.

El modelado por computadora puede reproducir la mayoría de los experimentos observables (Nadendla, 2004), como la afinidad de unión y la especificidad de los ligandos (es decir, moléculas que se unen a la estructura blanco; en este caso los ligandos son las toxinas) en varias subfamilias de canales iónicos. Es posible obtener información importante acerca de la toxicidad y el modo de acción a través del uso de estas técnicas en la investigación de ficotoxinas, incluso con toxinas que no han sido aún probadas *in vivo* o *in vitro*. El docking molecular es una de varias herramientas utilizadas para entender y explorar la complementariedad estérica y electrostática entre un receptor (o molécula blanco) y un ligando (Brooijmans, 2009). Adicionalmente, y tal vez más importante, el modelado por computadora tiene el potencial de revelar en detalle las interacciones, mecanismos y contactos estructurales involucrados en la unión, lo cual es importante porque toda esa información no es fácil de deducir con experimentos electrofisiológicos (Gordon et al., 2013).

La energía libre de un complejo es tal vez la cantidad teórica más importante a considerar cuando se está determinando computacionalmente la efectividad de un ligando en un canal (Gordon et al., 2013). Los valores de energía libre de unión (ΔG , kcal·mol⁻¹) son el resultado de las interacciones del ligando con los residuos de la proteína, es un indicador de afinidad intermolecular. Estos valores son la suma de interacciones no covalentes y de los ángulos planos y diedros, los cuales hacen la contribución energética más importante. Valores menores de ΔG indican mayores afinidades entre el ligando y la proteína (Durán-Riveroll et al., sometido).

2. Hipótesis

Se comprobará la producción de toxinas tipo benzoil en los aislados del Golfo de California y del Pacífico mexicano, tal como han sido comprobados en aislados de diversos sitios geográficos a nivel mundial. Estas toxinas se encontrarán durante todas las etapas de cultivo.

Dado que las proporciones de toxinas hidrofílicas muestran una variación en función del medio de cultivo y la etapa de crecimiento, en las toxinas tipo benzoil también se observarán diferencias en función de estas variables, presentando, al igual que las toxinas hidrofílicas, una mayor proporción durante la etapa de crecimiento exponencial y en medio GSe en comparación con el medio f/2.

Se observará una relación inversa de la proporción de las toxinas decarbamoil y las toxinas tipo benzoil.

Debido a que el grupo benzoil impide la completa unión de la toxina con el canal de sodio, éstas mostrarán una menor afinidad teórica (mayor energía libre de unión [ΔG]) en el canal de sodio regulado por voltaje 1.4.

3. Objetivo general

Estudiar la producción de toxinas tipo benzoil en cuatro aislados de *Gymnodinium catenatum* del Pacífico mexicano y establecer los modelos teóricos de unión de los análogos producidos por esta especie en el canal de sodio.

4. Objetivos específicos

Evaluar el efecto de dos medios de cultivo en el crecimiento de *G. catenatum* a través del análisis de las curvas de crecimiento, tasas de crecimiento y formación de cadenas en cuatro aislados de esta especie.

Determinar la presencia de toxinas tipo benzoil en *G. catenatum* por métodos espectroscópicos ($^1\text{H-RMN}$ y UV).

Establecer la variación en la producción de las toxinas hidrofílicas y tipo benzoil y su relación durante las fases de crecimiento en *G. catenatum* en dos medios de cultivo, por HPLC-FLD e HILIC-MS/MS.

Purificar extractos de cultivos de *G. catenatum* para obtener toxinas puras.

Analizar el modo teórico de unión de los análogos tipo benzoil en el canal de sodio regulado por voltaje Na_v 1.4.

5. Materiales y métodos

5.1 Cultivos de *Gymnodinium catenatum*

Se realizaron cultivos de cinco aislados de *G. catenatum* (G7, BAPAZ5, BAPAZ7, GCCV7 y 62L) del Pacífico mexicano y del Golfo de California (datos de aislamientos y medios de cultivo en anexo).

5.1.1 Cultivos para determinación de toxinas tipo benzoil por medios espectroscópicos

El aislado G7, de Manzanillo, Colima, fue inoculado a una densidad inicial de 500 cel mL⁻¹ en un volumen de 1000 mL de medio GSe modificado (Blackburn et al., 2001; sustituyendo en extracto de suelo por extracto de composta con lombrices) en matraces Erlenmeyer de 2000 mL por triplicado. El cultivo se mantuvo a una temperatura de 24 ± 1 °C, en un régimen luz-oscuridad de 12:12 h, y con una intensidad luminosa de 150 μmolE m⁻²s⁻¹. El medio de cultivo se preparó con agua de mar esterilizada por filtración (0.22 μm), a una salinidad de 34 ± 1. Las vitaminas se esterilizaron por filtración y el resto de los nutrientes por calor húmedo (121 °C, 15 lb de presión por 15 min).

Se cosecharon 50 mL de cultivo durante la etapa exponencial tardía (día 15), utilizando filtros de fibra de vidrio de 0.47 μm de tamaño de poro (Whatman GF/F, 24 mm). Las muestras se conservaron a -20 °C en ácido acético al 1% (v/v) hasta el momento de la extracción de las toxinas.

5.1.2 Cultivos para el análisis de las curvas de crecimiento, tasas de crecimiento, formación de cadenas y análisis de toxinas

Se realizaron cultivos de cuatro aislados de *G. catenatum*: BAPAZ5, BAPAZ7, GCCV7 y 62L. Cada aislado fue inoculado a una densidad media de 500 cel mL⁻¹ en volúmenes de 1500 mL de medio de cultivo, en matraces Erlenmeyer de 2000 mL, por triplicado. Con fines de comparación, se utilizaron los medios f/2 modificado

(Guillard, 1975; Anderson et al., 1984) y GSe con las características mencionadas anteriormente. Los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones reportadas en el apartado 5.1.1 y los nutrientes fueron preparados de igual manera.

Cada segundo día se cosecharon entre 25 y 50 mL de cultivo (en función de la densidad), utilizando filtros de fibra de vidrio de 0.47 μm de tamaño de poro (Whatman GF/F de 24 mm). Las muestras se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en ácido acético al 1% (v/v) hasta el momento de la extracción de las toxinas.

5.1.3 Cultivos para purificación de toxinas tipo benzoil

Se realizaron cultivos de los aislados BAPAZ5, GCCV7 y 62L en medio GSe en matraces de 4,000 mL, frascos de vidrio y envases de PET de 3,789 mL (1 gal), con un volumen de cultivo de 2.5 a 3 L. Estos cultivos se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada a $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en un régimen luz-oscuridad de 12:12, con lámparas de luz blanca de 200 W. El medio se preparó con agua de mar esterilizada químicamente con una preparación comercial de hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) al 90%, utilizando 0.017 g de esta preparación por cada litro de agua de mar utilizada, a una salinidad de 33 ± 1 (concentración final de $\text{Ca}(\text{ClO})_2 = 0.0153\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Los nutrientes se prepararon de la manera reportada en el apartado 4.1.1.

Los cultivos fueron cosechados en función de la densidad celular observada, aproximadamente cada 15 días, utilizando un tamiz de 20 μm . La biomasa obtenida fue colocada en tubos para centrífuga de 15 mL, centrifugada y el sobrenadante fue eliminado. La biomasa se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de las toxinas. Se cultivaron un total de 300 L durante dos años.

5.2 Curvas de crecimiento, tasas de crecimiento y formación de cadenas

Las curvas de crecimiento se estimaron mediante conteos celulares. Se tomaron 2 mL de cultivo cada segundo día hasta la fase de decaimiento y se fijaron con lugol ácido (Thronsen, 1979). Los conteos se realizaron en una cámara de Sedgwick-

Rafter de 1 mL bajo un microscopio óptico invertido (Carl Zeiss Axiovert 100). Se registró el número y largo de las cadenas en todos los casos.

Las tasas de crecimiento se calcularon mediante la ecuación:

$$\mu = \ln X_2 - \ln X_1 / t_2 - t_1$$

donde: X = número de células y t_1 y t_2 = tiempos de inicio y fin de la fase exponencial de crecimiento (días) (Guillard, 1973).

Se calculó el tiempo de división t_g a partir de la tasa de crecimiento mediante la ecuación:

$$t_g = 0.6931/\mu \text{ (Guillard, 1973).}$$

5.2.1 *Análisis estadísticos*

Para establecer las diferencias entre los aislados y medios de cultivo se realizaron pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnoff, ANDEVA de dos vías y prueba *a posteriori* de Tuckey, con el programa STATISTICA 8.0.

5.3 **Extracción de toxinas**

5.3.1 *Filtros*

Los filtros fueron descongelados y sometidos a un baño ultrasónico (3510 Branson Ultrasonic Cleaner) por 10 minutos. Posteriormente se congelaron nuevamente por 24 horas y se repitió el proceso para asegurar el rompimiento celular. El sobrenadante se filtró con acrodiscos de fibra de vidrio (Whatman 3.0 mm GD/X). En todos los casos, el extracto se conservó a -20 °C hasta su fraccionamiento y posteriores análisis.

5.3.2 *Biomasa*

La biomasa se descongeló a temperatura ambiente y se agregaron 2 mL de ácido acético al 1% (v/v) a cada tubo (76 tubos). Posteriormente fueron homogeneizados

en un agitador tipo vórtex, y congelados a -20°C. Después de 24 horas se descongelaron nuevamente, se homogeneizaron y centrifugaron. El sobrenadante (extracto) fue colocado en tubos para centrífuga de 50 mL. El proceso se llevó a cabo una segunda vez con todos los tubos, y una tercera vez en aquellos en que el sobrenadante se observaba coloreado.

El extracto fue filtrado con filtros de fibra de vidrio de 0.47 µm de tamaño de poro (Whatman GF/F de 24 mm), colocado en tubos de 50 mL y congelado a -20°C. Posteriormente se secó por liofilización.

5.4 Determinación de la presencia de toxinas tipo benzoil por ¹H-RMN y espectroscopía UV

5.4.1 Fraccionamiento del extracto

Se utilizaron cartuchos SPE LC18 (Honeywell Burdick & Jackson C-18) de 2.0 g, acondicionados con 6.0 mL de metanol (MeOH) y 6.0 mL de agua destilada y desionizada. Se agregó 1.0 mL del extracto y se eluyó con un gradiente ascendente de MeOH, de 0 a 100% (v/v) en pasos de 10% (5.0 mL cada uno). Posterior a la fracción obtenida con 100% MeOH, se colectó una última fracción con 9:1 MeOH:ácido acético 1M (Vale, 2008b). De esta manera se obtuvieron las 12 fracciones (Tabla 1), las cuales fueron liofilizadas y conservadas a -20°C.

Tabla 1. Gradiente de H₂O y MetOH utilizado para el fraccionamiento de las toxinas tipo benzoil.

Eluyente	Gradiente	Cantidad (mL)	Fracción
H ₂ O	100%	5	1
H ₂ O:MetOH	9:1	5	2
H ₂ O:MetOH	8:2	5	3
H ₂ O:MetOH	7:3	5	4
H ₂ O:MetOH	6:4	5	5
H ₂ O:MetOH	5:5	5	6
H ₂ O:MetOH	4:6	5	7
H ₂ O:MetOH	3:7	5	8
H ₂ O:MetOH	2:8	5	9
H ₂ O:MetOH	1:9	5	10
MetOH	100%	5	11
MetOH:Ác.acético 1%	9:1	5	12

5.4.2 Espectroscopía por ^1H -RMN

El análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) fue realizado en un espectrómetro VARIAN 500-MR, a 20°C, utilizando agua deuterada como disolvente.

5.4.3 Espectroscopía por UV

Los espectros por luz ultravioleta (UV) se obtuvieron con un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS, en un intervalo de 200 a 500 nm.

5.5 Determinación toxinas por cromatografía de líquidos

5.5.1 Fraccionamiento del extracto

Se utilizaron cartuchos SPE LC18 (Honeywell Burdick & Jackson C-18) de 2.0 g, acondicionados con 6.0 mL de MeOH y 6.0 mL de agua destilada y desionizada (DD H₂O). Se agregó 1.0 mL del extracto y se eluyó con 2 mL de DD H₂O. De esta manera se obtuvo la fracción acuosa con las toxinas hidrofílicas. Posteriormente se eluyó con 3 mL de una mezcla MeOH – DD H₂O al 20% (v/v), obteniéndose la fracción 20% MeOH, que presumiblemente contenía las toxinas tipo benzoil. Finalmente, se realizó un lavado del cartucho con metanol al 100%. Los cartuchos fueron reutilizados.

La fracción acuosa no fue analizada. La fracción 20% MeOH fue secada por liofilización para eliminar los residuos metanólicos, ya que interfieren con la detección, y se conservó a -20°C hasta su análisis.

5.5.2 Análisis de toxinas hidrofílicas por HPLC-FLD

En este trabajo se denominaron “toxinas hidrofílicas” a las toxinas comúnmente analizadas, es decir, los análogos que no tienen al grupo benzoil en la cadena lateral. Aunque se ha establecido previamente que la hidrofiliidad de las toxinas es similar

en algunos casos, se utilizó este término para establecer la diferencia, a falta de un término más adecuado hasta el momento.

Para el análisis de toxinas hidrofílicas se utilizó extracto crudo (sin *clean-up*) de cada muestra.

Los análisis fueron realizados en el CIBNOR, en un equipo Agilent HP 1100, utilizando una columna Luna C-18 Phenomenex 125 x 4.5 mm y 5 μm , a temperatura ambiente, con oxidación post-columna con ácido periódico, utilizando el método reportado por Hummert et al (1997) modificado por Yu et al. (1998). La detección se realizó con una λ de excitación de 333 nm y λ de emisión de 390 nm. Las características del equipo y el método utilizado se detallan en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Características del equipo utilizado para el análisis de toxinas hidrofílicas.

Características		HPLC-FLD CIBNOR para toxinas hidrofílicas
Equipo		Agilent HP 1100 con automuestreador, degasificador, bomba cuaternaria, reactor postcolumna, dos bombas binarias para derivatización post columna.
Columna		Phenomenex Luna C-18 125 x 4.5. 5 μm .
Temperatura de columna		Ambiente (25 °C)
Detector		Agilent HP-FLD G1321A. λ excitación = 333 nm λ emisión = 390 nm.
Método		Hummert et al. (1997) modificado por Yu et al. (1998)
Oxidación		Post-columna, automatizado, con ácido periódico.
Flujo		1 mL \cdot min ⁻¹
Inyección		20 μL
Fases móviles	A	98.8% de ácido octanesulfónico 11 mM y ácido fosfórico 40 mM. Ajustar pH a 6.9 con amonio.
	B	83.5% de ácido octanesulfónico 11 mM y 40 mM de ácido fosfórico, ajustar pH a 6.9 con amonio, 15% de acetonitrilo y 1.5% tetrahidrofurano.
Tiempo de corrida (min)		59

Tabla 3. Método utilizado para el análisis de toxinas hidrofílicas por HPLC-FLD (Hummert et al., 1997, modificado por Yu et al., 1998).

Tiempo (minutos)	% Sol. A	% Sol. B
0-20 (equilibrio)	80	20
0-5	65	35
5-20	60	40
20-24	55	45
25	55	45

Se realizó la hidrólisis de 150 µL de cada muestra de extracto crudo con ácido clorhídrico (ver método en anexos) para convertir las toxinas N-sulfocarbamatadas (toxinas B y C) en sus análogos carbamatados: B1 → STX; B2 → NEO; C1 → GTX2; C2 → GTX3; C3 → GTX1; C4 → GTX4. La cuantificación de estas toxinas se realizó mediante el cálculo de la diferencia en el incremento del pico máximo en relación con las toxinas carbamoil, producto de la hidrólisis. La identificación se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención (TR) y coelución de las muestras con estándares comerciales de saxitoxina (STX), neosaxitoxina (NEO), gonyautoxinas 1 a 4 (GTX 1-4), decarbamoilsaxitoxina (dcSTX), decarbamoilgonyautoxina 2 y 3 (dcGTX 2-3) y N-sulfocarbamoil-11 sulfato (C 1 y 2). Los estándares fueron adquiridos en el National Research Council, Halifax, N.S., Canadá. Las muestras hidrolizadas y no hidrolizadas de cada aislado fueron inyectadas en el sistema en corridas independientes.

5.5.3 *Análisis de toxinas tipo benzoil por HPLC-FLD*

Las toxinas tipo benzoil se analizaron en la fracción 20% MeOH obtenida en el proceso de *clean-up*. Los análisis fueron realizados en el CIBNOR, en un equipo Agilent HP 1100, utilizando una columna Luna C-18 Phenomenex 125 x 4.5 mm y 5 µm, a temperatura ambiente, con oxidación pre-columna con peróxido de hidrógeno (AOAC, 2006, ver anexo), utilizando el método reportado por Vale (2008b). La detección se realizó con una λ de excitación de 333 nm y λ de emisión de 390 nm. Las características del equipo y el método utilizado se detallan en las Tablas 4 y 5.

Tabla 4. Características del equipo utilizado para el análisis de toxinas tipo benzoil por HPLC-FLD.

Características	HPLC-FLD CIBNOR para toxinas tipo benzoil
Equipo	Agilent 1100 con automuestreador, degasificador, bomba cuaternaria, reactor postcolumna, dos bombas binarias
Columna	Luna C-18 125 x 4.60. 5 μ , Phenomenex
Temperatura de columna	Ambiente (25-30°C)
Detector	Agilent Mod. 1200. λ excitación = 333 nm λ emisión = 390 nm.
Método	Vale 2008b
Flujo	0.5 mL min ⁻¹
Oxidación	Pre-columna, manual, con peróxido de hidrógeno.
Inyección	20 μ L
Fases móviles	A Acetonitrilo (ACN). B 20 mM de formato de amonio + 1 mM de ácido acético.
Tiempo de corrida (min)	30

Tabla 5. Método utilizado para el análisis de toxinas tipo benzoil por HPLC-FLD (Vale, 2008b).

Tiempo (minutos)	% Sol. A	% Sol. B
0 – 5	0 – 2	100 – 98
5 – 10	2 – 8	98 – 92
10 – 20	8 – 80	92 – 20
20 - 30	80	20

Para el análisis y la identificación de estas toxinas se utilizó la técnica de HPLC-FLD con el método de Vale (2008b) por comparación de los tiempos de retención y formas de los picos de los cromatogramas obtenidos y los reportados por Bustillos-Guzmán y colaboradores (2011) (Fig. 5).

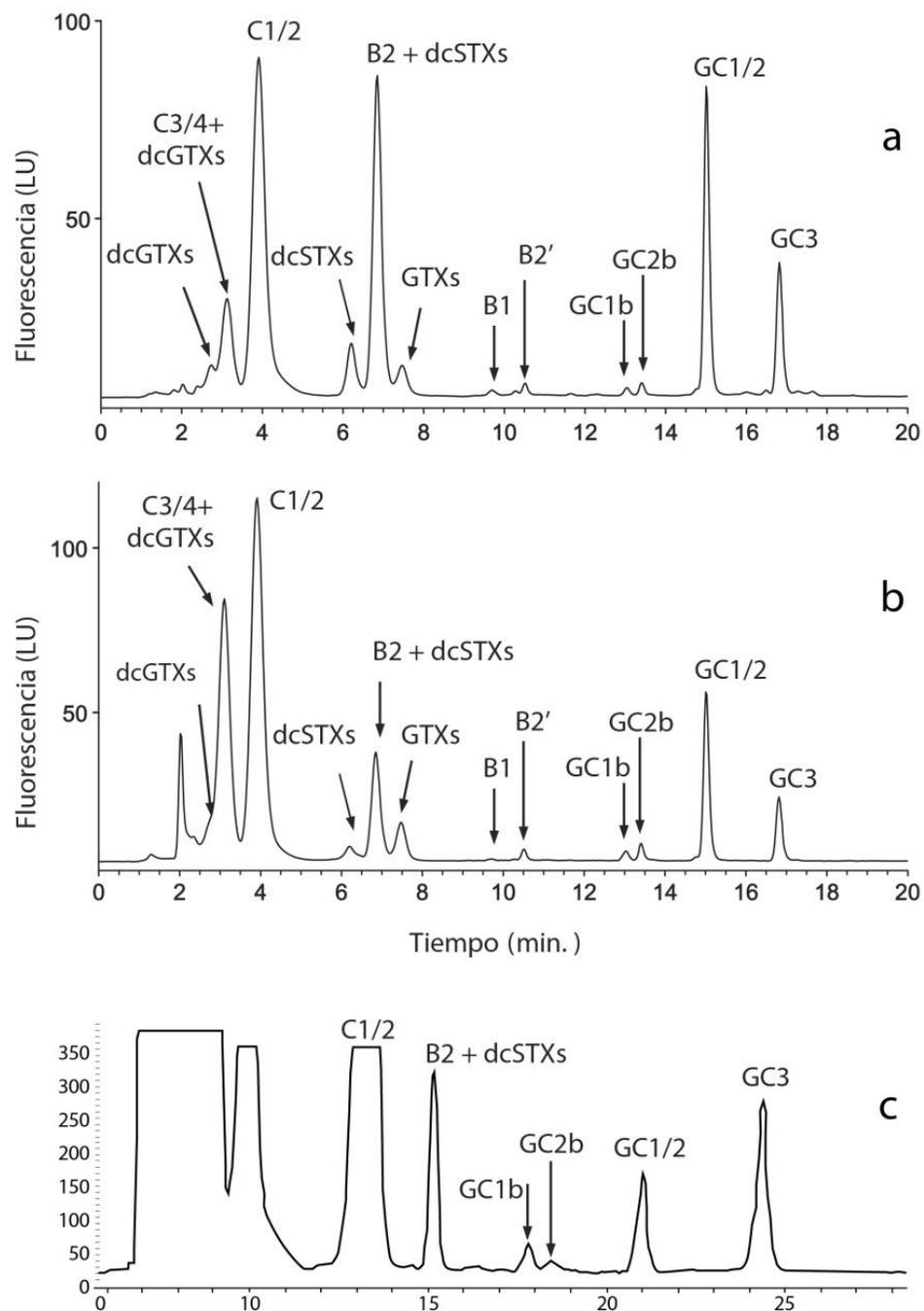


Fig. 5. Cromatogramas típicos (a y b) de las muestras analizadas por Bustillos-Guzmán et al. (2011) y las de este estudio (c).

Los cromatogramas a y b fueron la base para la identificación de las toxinas tipo benzoil en el presente trabajo. El cromatograma c corresponde al aislado BAPAZ5, fracción 20% metanol.

5.5.4 Análisis de toxinas tipo benzoil por HILIC-MS/MS

Se analizó un juego de toxinas tipo benzoil en el Alfred Wegener Institut (AWI), en Bremerhaven, Alemania, por HILIC-MS/MS, en la fracción 20% MeOH obtenida en el proceso de *clean-up*. Los análisis fueron realizados en un equipo Agilent HP 1100, utilizando una columna SeQuant ZIC-HILIC 150 x 4.6 mm, 5 μ m, a 35°C sin oxidación, utilizando el método reportado por Diener et al. (2007). La detección se realizó con un espectrómetro de masas API 400 QTrap de triple cuadrupolo, equipado con interfaz TurboSpray. Las características del equipo y el método utilizado se detallan en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Características del equipo utilizado para la detección de toxinas tipo benzoil por HILIC-MS/MS.

Características		HILIC-MS/MS AWI para toxinas tipo benzoil
Equipo		Agilent 1100 con degasificador en línea, bomba binaria, automuestreador refrigerado y horno con temperatura controlada para columna.
Columna		SeQuant ZIC-HILIC 150 x 4.6 mm (Haltern, Alemania)
Temperatura de columna		35°C
Detector		Espectrómetro de masas API 400 QTrap, de triple cuadrupolo, equipado con interfaz TurboSpray.
Método		Diener et al. (2007).
Flujo		0.7 mL min ⁻¹
Inyección		5 μ L
Fases móviles	A	2 mM ácido fórmico y 5 mM formato de amonio en acetonitrilo / agua (80:20 v/v);
	B	10 mM ácido fórmico y 10 mM formato de amonio en agua.
Tiempo de corrida (min)		45

Tabla 7. Gradiente usado en el método de Diener et al. (2007) para el análisis de toxinas tipo benzoil por HILIC-MS/MS.

Tiempo (minutos)	% Sol. A	% Sol. B
0-20 (equilibrio)	80	20
0-5	65	35
5-20	60	40
20-24	55	45
25	55	45

Tabla 8. Transiciones seleccionadas para identificar las toxinas.

Toxina	Cadena lateral	N1	C-11 SO ₄	PM	Ion precursor > fragmentos	
STX		H	-	301	300 > 282 300 > 204	
NEO		OH	-	317	316 > 298 316 > 196	
GTX1	CO – NH ₂ Carbamoil	OH	α	412	412 > 332 412 > 314	
GTX4		OH	β	412	412 > 332 412 > 314	
GTX2		H	α	396	396 > 316 396 > 298	
GTX3		H	β	396	396 > 316 396 > 298	
C1			H	α	476	396 > 316 396 > 298
C2			H	β	476	396 > 316 396 > 298
C3	CO – NH – SO ₃ N-sulfocarbamoil	OH	α	492	412 > 332 412 > 314	
C4		OH	β	492	412 > 332 412 > 314	
B1		H	-	380	380 > 300 380 > 282	
B2		OH	-	396	396 > 316 396 > 298	
dc-STX		H	-	258	257 > 196 257 > 156	
dc-NEO	H Decarbamoil	OH	-	274	273 > 255	
dc-GTX1		OH	α	369	369 > 289	
dc-GTX4		OH	β	369	369 > 289	
dc-GTX2		H	α	353	353 > 273	
dc-GTX3		H	β	353	353 > 273	
GC1	p-hidroxi-benzoil	H	α	473	473 > 455 > 393 > 375	
GC2		H	β	473	473 > 455 > 393 > 375	
GC3		H	-	377	377 > 359 > 257	
GC4		OH	α	489	489 > 471 > 409 > 391	
GC5		OH	β	489	489 > 471 > 409 > 391	
GC6		OH	-	393	393 > 375 > 273	
GC1a	di-hidroxi-benzoil	H	α	489	489 > 471 > 409	
GC2a		H	β	489	489 > 471 > 409	
GC3a		H	-	393	393 > 375 > 257	
GC4a		OH	α	505	505 > 487 > 425	
GC5a		OH	β	505	505 > 487 > 425	
GC6a		OH	-	409	409 > 391 > 273	
GC1b	Sulfo-benzoil	H	α	553	553 > 393	
GC2b		H	β	553	553 > 393	
GC3b		H	-	457	457 > 377	
GC4b		OH	α	569	569 > 409	
GC5b		OH	β	569	569 > 409	
GC6b		OH	-	473	473 > 393	

N1: Nitrógeno 1; C-11: Carbono 11; PM: peso molecular.

Los experimentos de monitoreo de reacción seleccionada (SRM, Selected Reaction Monitoring) se llevaron a cabo en modo de ion positivo, seleccionando las transiciones mostradas en la Tabla 8. Se utilizaron tiempos de residencia de 100 – 200 ms para cada transición. Para estos estudios se utilizaron los siguientes parámetros: cortina de gas: 30 psi, temperatura, 650°C, voltaje del spray de iones: 5000 V, gas 1 y 2: 70 psi, calentador de interfase: encendido, gas de colisión: alto, potencial de desagrupación: 66 V, potencial de entrada: 10 V, energía de colisión: 30 V y potencial de salida de la celda de colisión: 12 V.

Los reactivos fueron adquiridos en Merck (Darmstadt, Alemania). Los estándares certificados de toxinas (std) se obtuvieron en el Instituto de Biociencias Marinas (IMB), CRM Program, National Research Council of Canada, Halifax, Nova Scotia, Canadá.

5.5.5 *Análisis de datos*

Para determinar los perfiles de toxinas hidrofílicas se analizaron los datos considerando las áreas de los picos de cada toxina en función de los ng / inyección de cada estándar que dan un área = 1, los μL inyectados de cada muestra, el volumen de extracción, el volumen filtrado y la cantidad de células por mililitro en cada día de muestreo, con la siguiente ecuación:

$$\text{pg de toxina} \cdot \text{cel}^{-1} = ([\text{área} * \text{ng} / \text{inyección de estándar certificado (std)} = 1] / [\mu\text{L inyectados} * 1000 * \text{vol. de extracción}] / \text{vol. filtrado}) / \text{células} / \text{mL}$$

Para determinar la toxicidad en función de las toxinas hidrofílicas, se consideró el área de los picos de cada toxina, los ng / inyección de cada estándar que dan un área = 1, los μL de cada muestra, el volumen de extracción, el volumen filtrado, el factor de toxicidad de cada toxina, y la cantidad de células por mililitro en cada día de muestreo, con la siguiente ecuación:

$\text{pg STX eq} \cdot \text{cel}^{-1} = ([\text{área} \cdot \text{ng} / \text{inyección std} = 1] / [\mu\text{L inyectados} \cdot 1000 \cdot \text{vol. de extracción}] / \text{vol. filtrado} \cdot \text{factor de toxicidad}) / \text{células} / \text{mL}$

La determinación de las cantidades relativas de toxinas tipo benzoil se realizó dividiendo las áreas de los picos obtenidos de cada toxina en los cromatogramas entre la cantidad de células analizadas.

Para el análisis de las posibles relaciones entre las toxinas decarbamoil y las toxinas tipo benzoil, se analizaron todos los datos de manera similar, dividiendo el área obtenida en los cromatogramas entre el número de células analizadas.

5.6 Aislamiento de toxinas tipo benzoil

5.6.1 Pre-purificación por cromatografía en columna

El extracto crudo se suspendió en 13 mL de DD H₂O y se filtró con filtros de fibra de vidrio para jeringa (Whatman, 0.47 μm , 25 mm). El primer fraccionamiento (pre-purificación) se realizó en una columna cromatográfica (CC) de vidrio (70 x 4.5 cm de diámetro interno) empacada con silica gel a granel (bulk) en MeOH:H₂O (1:1).

Como eluyentes se utilizaron DD H₂O, MeOH al 20% y MeOH al 100% para obtener tres fracciones, cada una con 1 L de eluyente. Las tres fracciones fueron secadas por rotaevaporación y liofilización.

5.6.2 Análisis de las fracciones pre-purificadas por HILIC-MS/MS

Se utilizó el equipo y el método reportado anteriormente (Tablas 6 y 7).

Únicamente se analizaron las fracciones F2 (20% MeOH) y F3 (100% MeOH) debido a que presumiblemente en estas fracciones se encontraban las toxinas tipo benzoil.

5.6.3 Fraccionamiento por HILIC preparativa guiado por HILIC-MS/MS

Se utilizó cromatografía preparativa seguida de análisis por HILIC-MS/MS en cada paso para comprobar la composición de las fracciones obtenidas.

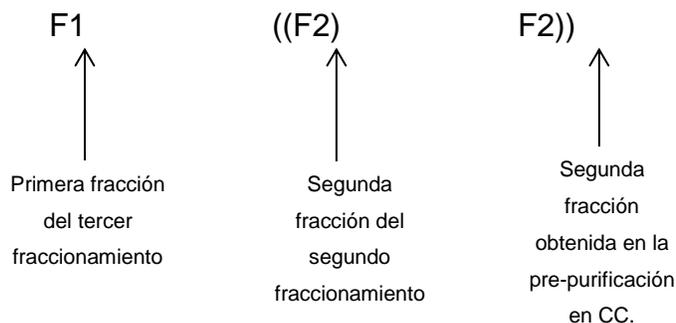
Para la cromatografía preparativa se utilizó un equipo Knauer con bomba de 10 mL y cámara de mezclado, con una columna SeQuant ZIC-HILIC de 150 x 4.6 mm, a temperatura ambiente, utilizando el método reportado por Diener et al. (2007), utilizado para el análisis por HILIC-MS/MS. Las fracciones se colectaron con un colector Gilson Fraction Collector. Las características del equipo se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9. Características del equipo de cromatografía preparativa.

Característica	Equipo
Equipo	Knauer, Berlín, Alemania. Módulo: bomba Knauer 10 mL Nr. 43680; válvula de intercambio Smartline Valve Drive Nr. 99158, degasificador Smartline Manager 5000, 10 mL E4320V2, bomba Smartline Pump 1000,EA4300.
Cámara de mezclado	Dynamic Mixing Chamber Nr. 102055
Colector de fracciones	Gilson Fraction Collector 202 150G5001 mit Fraction Controller 201-202
Columna	SeQuant ZIC-HILIC 150 x 4.6 mm (Haltern, Alemania)
Temperatura de columna	Ambiente (~20°C).
Detector	UV Detector 2500 Basic Model E4310
Método	Diener et al. (2007).
Flujo	0.7 mL min ⁻¹
Inyección	50 µL
Fases móviles	A 2 mM ácido fórmico y 5 mM formato de amonio en acetonitrilo / agua (80:20 v/v); B 10 mM ácido fórmico y 10 mM formato de amonio en agua.
Tiempo de corrida (min)	45

Las fracciones fueron nombradas en función de la fracción en cuestión seguida de la pre-purificación en CC (F2, obtenida con 20% MeOH, o F3, obtenida con 100% MeOH), por ejemplo:

F1((F2)F2):



Cada fracción obtenida en cada fraccionamiento fue secada por liofilización y analizada por HILIC-MS/MS para conocer la composición específica de toxinas tipo benzoil.

5.6.4 Espectroscopía de las fracciones por ^1H -RMN

Se analizaron las fracciones F3 (F5+6+7+8(F2)) y F4 (F5+6+7+8(F2)) por ^1H -RMN. Los experimentos se llevaron a cabo en un espectrómetro Varian 500 con 200 transientes para cada experimento. El espectro de protón con pre-saturación se obtuvo al irradiar la señal de 4.57 ppm para eliminarla.

5.7 Análisis del modo teórico de unión de los análogos de STX en el en canal de sodio regulado por voltaje

5.7.1 Modelo del canal de sodio regulado por voltaje Na_v 1.4

Para este análisis se utilizó el modelo del canal de sodio regulado por voltaje Na_v 1.4, donado por el Dr. Robert J. French (Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Calgary, Canadá). Este modelo homólogo fue validado con el reconocimiento de TTX, STX y μ -conotoxinas en el sitio de unión 1, el cual está localizado en la subunidad α del canal (Choudhary et al., 2007).

El modelo fue generado a partir de los reportes de Lipkind y Fozzard (2000) para la construcción de canales utilizando las coordenadas de la columna vertebral de S5 y S6 y las hélices del poro del bien conocido canal bacteriano de potasio KcsA, sustentado con datos biofísicos funcionales (Choudhary et al., 2007) (Tabla 10, Fig. 6).

Tabla 10. Secuencia de aminoácidos de los P-loops del Na_v 1.4 del modelo utilizado en el docking. (Donado por el Dr. Robert J. French, Department of Physiology & Pharmacology, University of Calgary, Canada).

Nav <i>P-loops</i>			
P-loop I	385	TFSWAFLALFRLMTQ QDYWENLF QLT	409
P-loop II	740	DFFHSFLIVFRILCGEW IE TMWDCMD	765
P-loop III	1222	NVGLGYLSLLQVATF KGWMDI MYAA	1246
P-loop IV	1514	TFGNSIICLFEITTSAGW DGLLN	1536

Los números de la secuencia se muestran para el anillo de selectividad DEKA. El filtro de selectividad (residuos numerados) y el anillo externo con cargas negativas se muestran en negritas (Tomado de Choudhary et al., 2007).

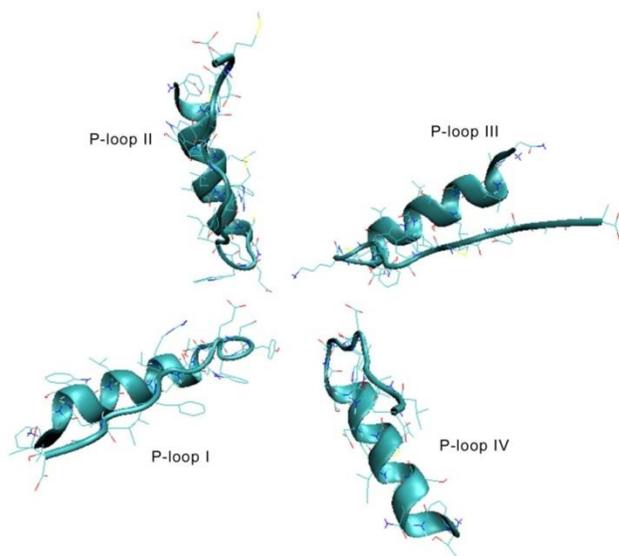


Fig. 6. Modelo tridimensional del canal Na_v1.4 utilizado en este estudio (de Choudhary et al., 2007).

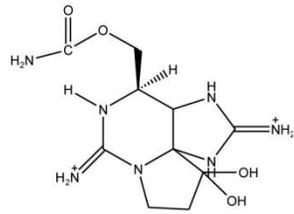
5.7.2 Docking

Se dibujaron las moléculas de STX y 35 análogos, utilizando el programa CHEMDRAW ULTRA 7.0.1. (Fig. 7). Todas las moléculas se representaron manteniendo la estereoquímica reportada por Vale (2010).

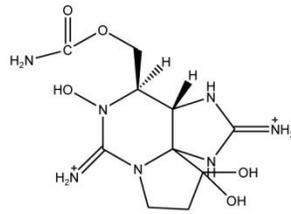
Las estructuras tridimensionales de las toxinas se obtuvieron con el programa GAUSSVIEW 5.0. (Dennington et al., 2009). La conformación asociada con el estado de menor energía y con la mayor estabilidad se obtuvo con la optimización estructural al nivel semiempírico AM1, utilizando el programa GAUSSIAN 3.0. (Frisch et al., 2004). Las simulaciones se realizaron con el programa Autodock 4.0.1. (Morris et al., 1998). En estos análisis, la proteína se mantuvo rígida y los ligandos (toxinas) se consideraron flexibles. La retícula (grid box) se definió con dimensiones de 60 x 60 x 60 Å y se centró en el orificio del canal, considerando el vestíbulo externo de la subunidad α del Na_v1.4, donde se encuentra el sitio 1 de unión (Catterall et al., 2007). Se seleccionó el algoritmo Genético Lamarkiano para la mejor conformación del ligando y se consideró un juego de 100 conformaciones para cada ligando. Las simulaciones se llevaron a cabo por triplicado, en tres diferentes computadoras. Se realizaron 300 simulaciones para cada toxina (10,500 simulaciones en total). Se obtuvieron los promedios de los tres valores más bajos de energía libre de unión (ΔG) por toxina.

Los resultados de las simulaciones fueron analizados con el programa AUTODOCK TOOLS 1.5.6. y las figuras se realizaron con el programa VMD 1.9.1. (Humphrey et al., 1996).

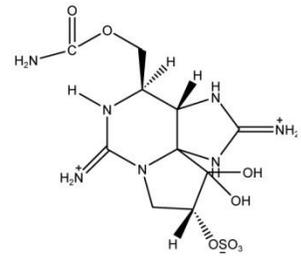
1



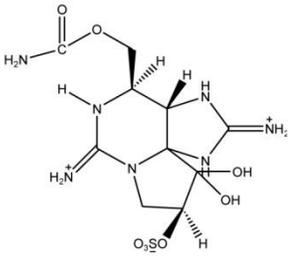
2



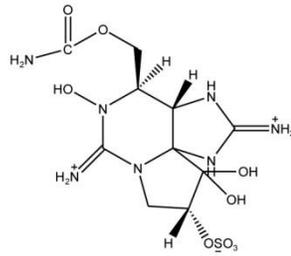
3



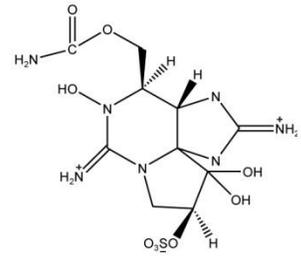
4



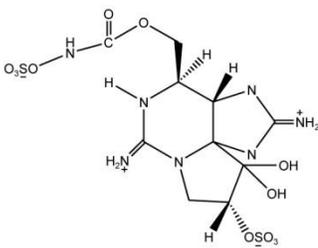
5



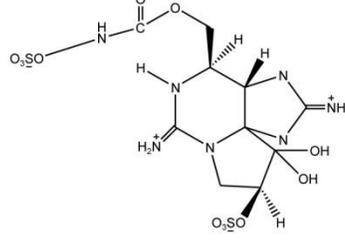
6



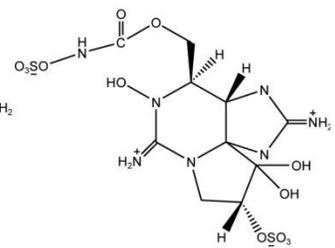
7



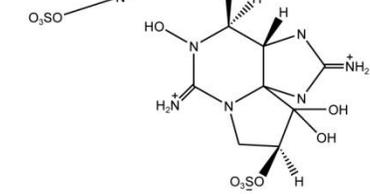
8



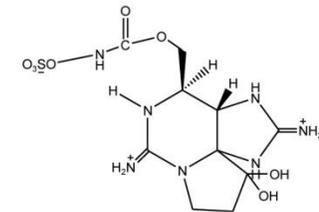
9



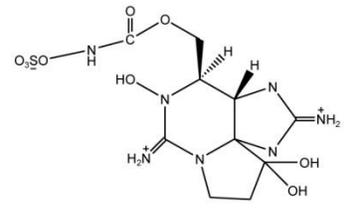
10



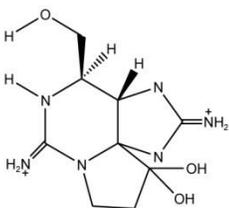
11



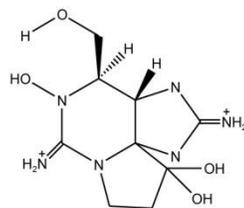
12



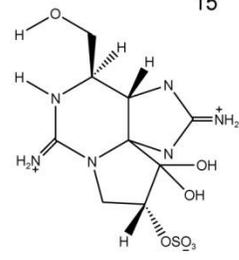
13



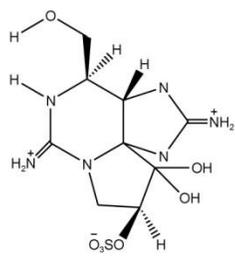
14



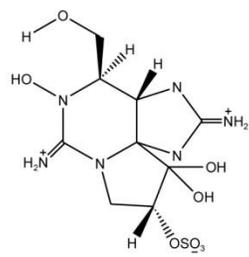
15



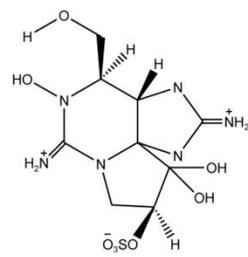
16



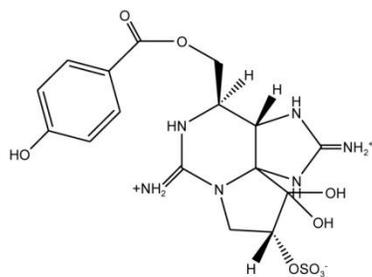
17



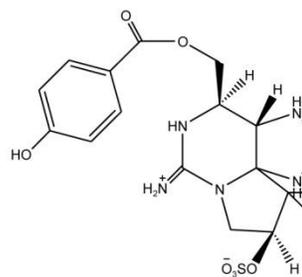
18



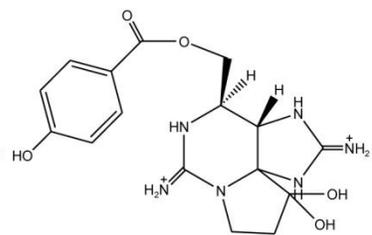
19



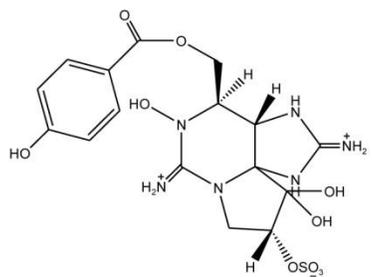
20



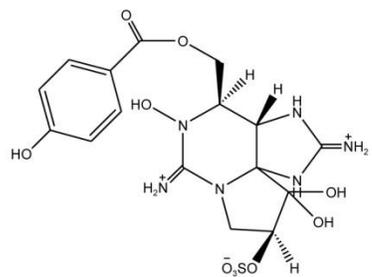
21



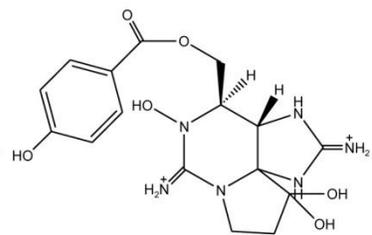
22



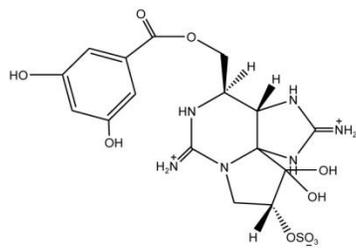
23



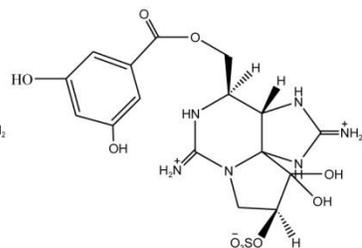
24



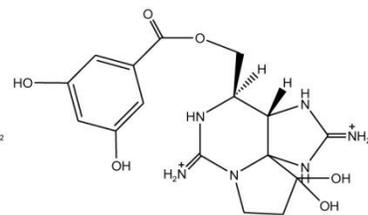
25



26



27



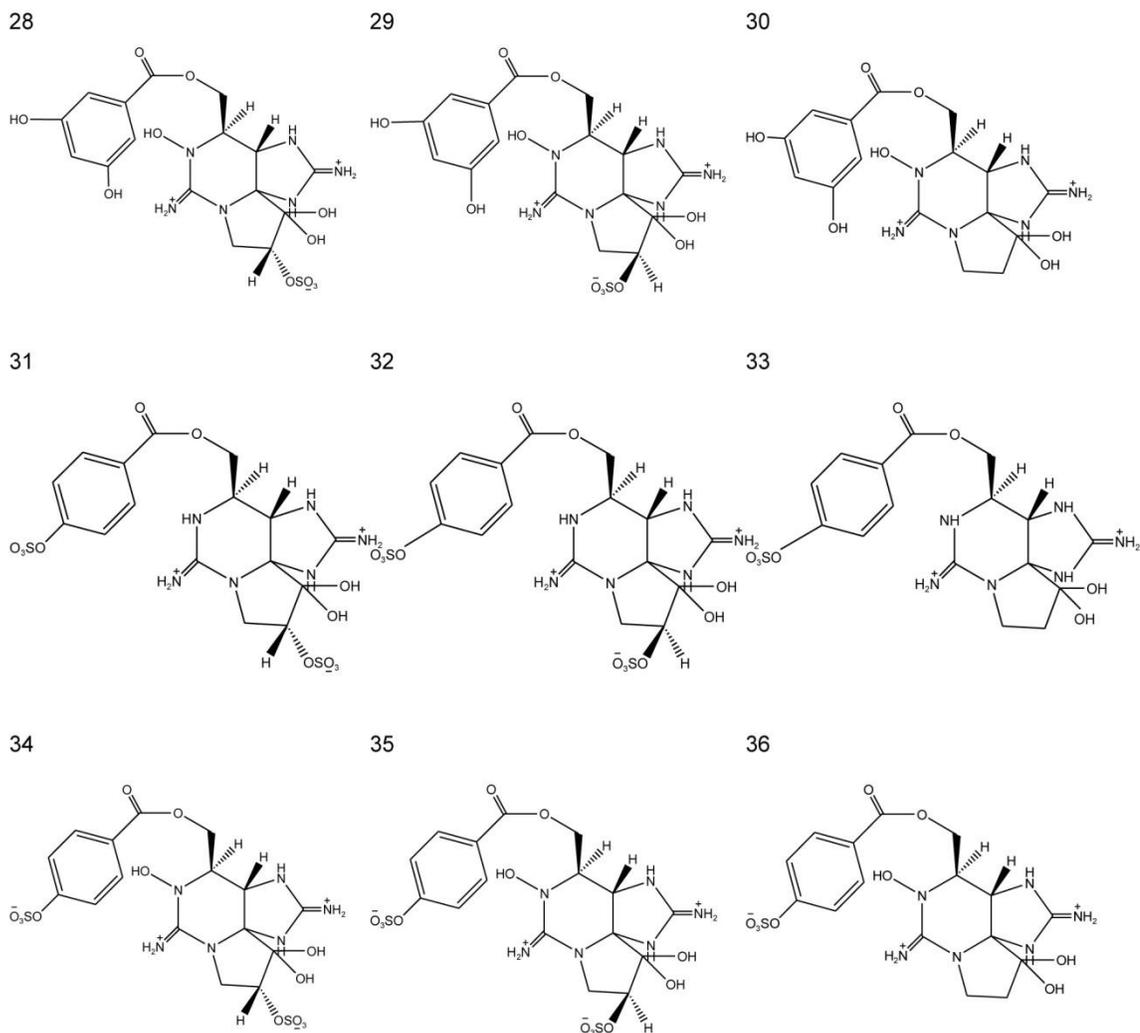


Fig. 7. Estructuras químicas de las 36 toxinas utilizadas en este estudio:

1) Saxitoxina. **2)** Neosaxitoxina. **3)** Gonyautoxina 2. **4)** Gonyautoxina 3. **5)** Gonyautoxina 1. **6)** Gonyautoxina 4. **7)** C1. **8)** C2. **9)** C3. **10)** C4. **11)** B1. **12)** B2. **13)** Decarbamoil saxitoxina. **14)** Decarbamoil neosaxitoxina. **15)** Decarbamoil gonyautoxina 2. **16)** Decarbamoil gonyautoxina 3. **17)** Decarbamoil gonyautoxina 1. **18)** Decarbamoil gonyautoxina 4. **19)** GC1. **20)** GC2. **21)** GC3. **22)** GC4. **23)** GC5. **24)** GC6. **25)** GC1a. **26)** GC2a. **27)** GC3a. **28)** GC4a. **29)** GC5a. **30)** GC6a. **31)** GC1b. **32)** GC2b. **33)** GC3b. **34)** GC4b. **35)** GC5b. **36)** GC6b.

6. Resultados

6.1 Curvas de crecimiento, tasas de crecimiento y formación de cadenas

6.1.1 Curvas y tasas de crecimiento

Las curvas de crecimiento muestran que el aislado BAPAZ5 fue el que tuvo menor crecimiento en ambos medios y alcanzó la etapa de decaimiento en menor tiempo que el resto de los aislados, con una biomasa máxima de 1554 ± 434 y 2464 ± 370 $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ en medio f/2 y GSe, respectivamente. El aislado GCCV7 en medio GSe fue el que mostró la mayor densidad, con un máximo de 8730 ± 846 $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, sin embargo, el mismo aislado en medio f/2 tuvo una densidad considerablemente menor, de 3918 ± 388 $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$. Los aislados BAPAZ7 y 62L tuvieron densidades máximas similares que se encontraron entre 6123 ± 116 y 5598 ± 284 $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las curvas de crecimiento variaron, desde un mínimo de 26 días (BAPAZ5 en ambos medios y BAPAZ7 en medio GSe) hasta un máximo de 38 días (GCCV7 y 62L, ambos en medio GSe). En general, se obtuvo una mayor densidad celular y un ciclo más prolongado en medio GSe, con excepción del aislado BAPAZ7 (Fig. 8 – 11 y Tabla 11).

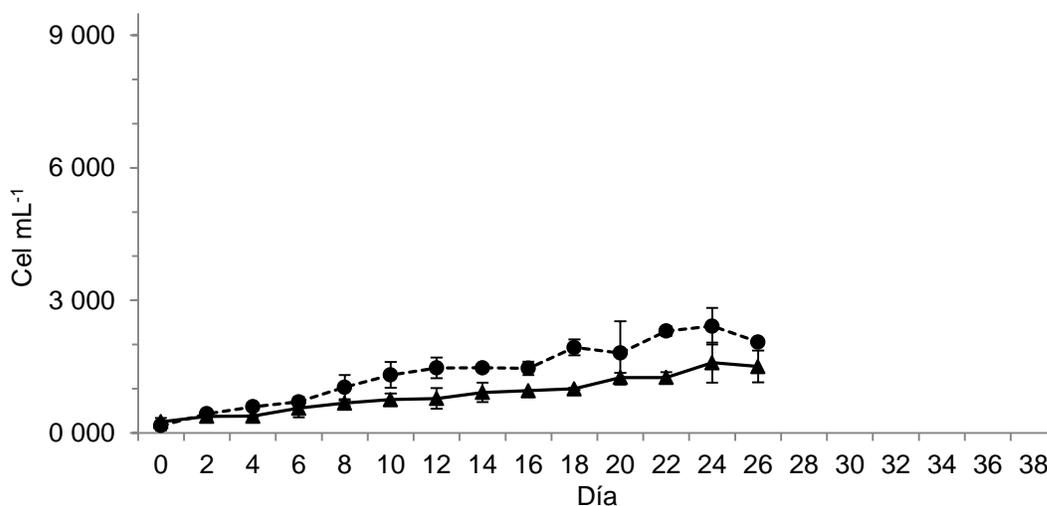


Fig. 8. Curvas de crecimiento del aislado BAPAZ5 de *Gymnodinium catenatum* en dos medios de cultivo. Triángulos: f/2. Círculos: GSe. Líneas verticales: desviación estándar.

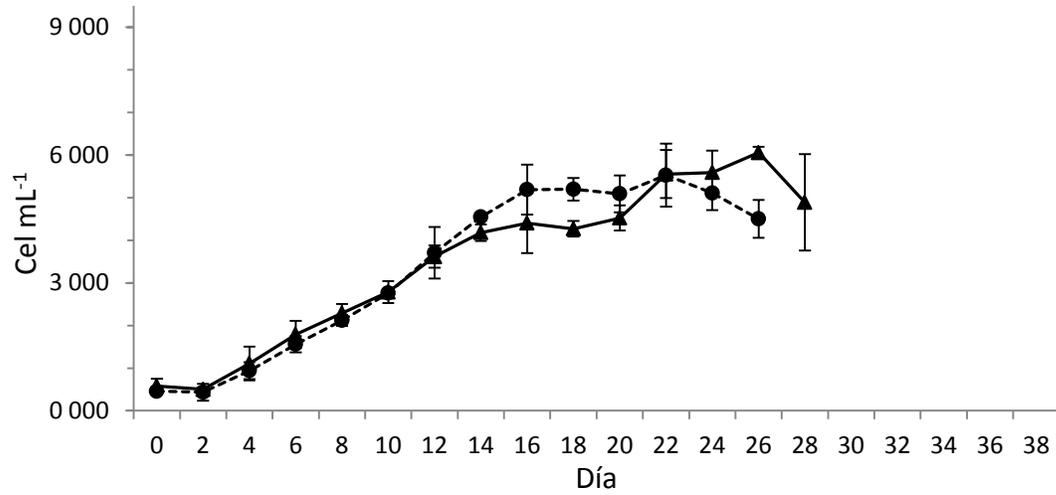


Fig. 9. Curvas de crecimiento del aislado BAPAZ7 de *Gymnodinium catenatum* en dos medios de cultivo. Triángulos: f/2. Círculos: GSe. Líneas verticales: desviación estándar.

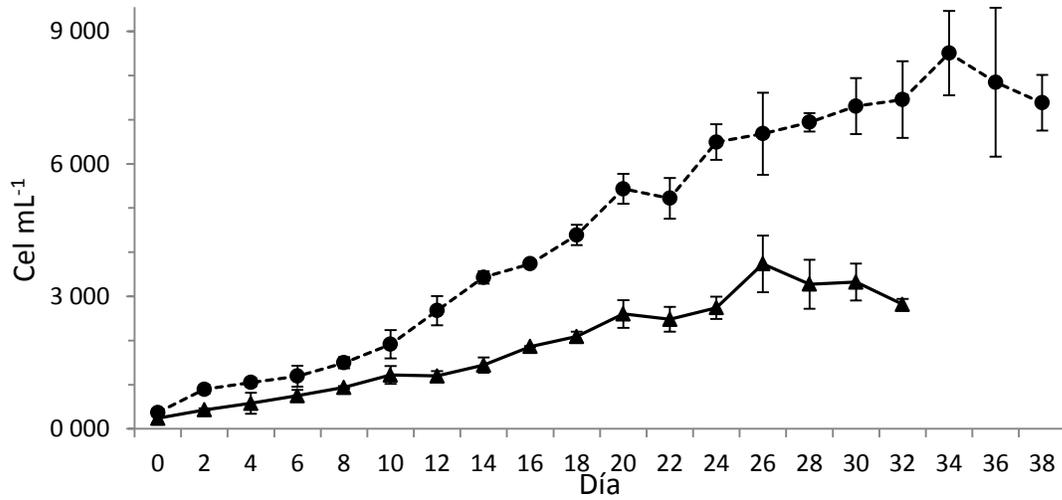


Fig. 10. Curvas de crecimiento del aislado GCCV7 de *Gymnodinium catenatum* en dos medios de cultivo. Triángulos: f/2. Círculos: GSe. Líneas verticales: desviación estándar.

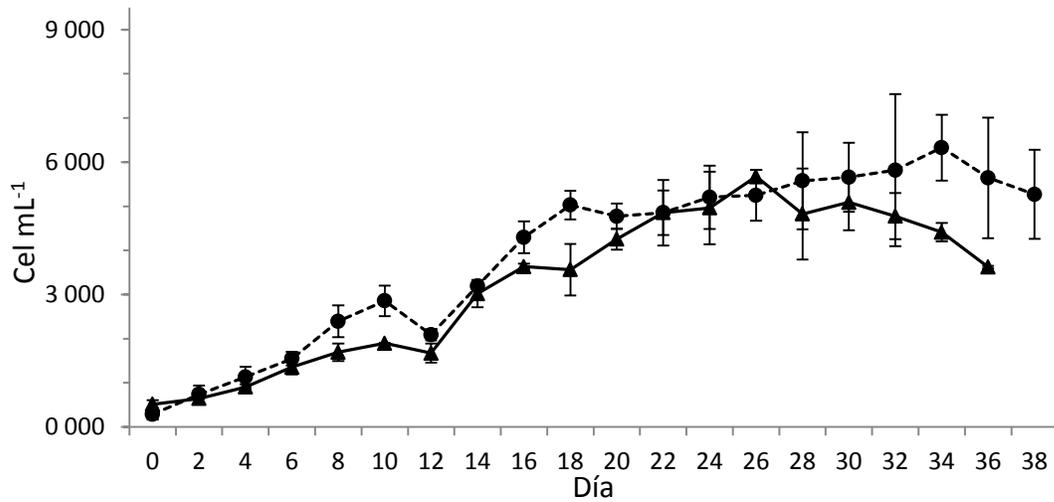


Fig. 11. Curvas de crecimiento del aislado 62L de *Gymnodinium catenatum* en dos medios de cultivo. Triángulos: f/2. Círculos: GSe. Líneas verticales: desviación estándar.

La fase de crecimiento exponencial en todos los aislados y medios inició entre el día 2 y el día 4 de cultivo, y finalizó entre los días 22 (± 3.46) y 34 (± 2.31). La biomasa máxima se alcanzó entre los días 21 (± 2.31) y 32 (± 5.29) (Tabla 11).

Tabla 11. Promedios de los datos de crecimiento de los aislados en los dos medios de cultivo.

Aislado	Medio de cultivo	Inicio de fase exponencial (día)	Fin de fase exponencial (día)	Tasa de crecimiento (div-día ⁻¹)	Tiempo de división (días)	Biomasa máxima (cel·mL ⁻¹)	Tiempo en alcanzar la biomasa máxima (días)
BAPAZ5	f/2	2	22.0 ±3.5	0.07 ±0.01	9.9 ±1.0	1554 ±434	21.3 ±2.3
	GSe	2	22.7 ±1.2	0.08 ±0.01	8.3 ±0.6	2464 ±370	22.7 ±1.2
BAPAZ7	f/2	4	24.7 ±2.3	0.08 ±0.01	8.3 ±1.3	6123 ±116	24.7 ±2.3
	GSe	2	22.7 ±1.2	0.13 ±0.03	5.5 ±1.4	5728 ±393	22.7 ±1.2
GCCV7	f/2	2	27.3 ±2.3	0.09 ±0.01	8.0 ±1.3	3918 ±388	27.3 ±2.3
	GSe	2	32.0 ±5.3	0.09 ±0.01	8.2 ±1.2	8730 ±846	32.0 ±5.3
62L	f/2	2	28.7 ±2.3	0.08 ±0.01	8.6 ±0.9	5598 ±284	27.3 ±2.3
	GSe	2	34.7 ±2.3	0.08 ±0.01	9.0 ±1.1	5946 ±759	32.0 ±5.3

La tasa de crecimiento varió entre 0.07 (± 0.01) y 0.13 (± 0.03) div·día⁻¹, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) únicamente para BAPAZ7 en GSe y GCCV7 en f/2 (Fig. 12).

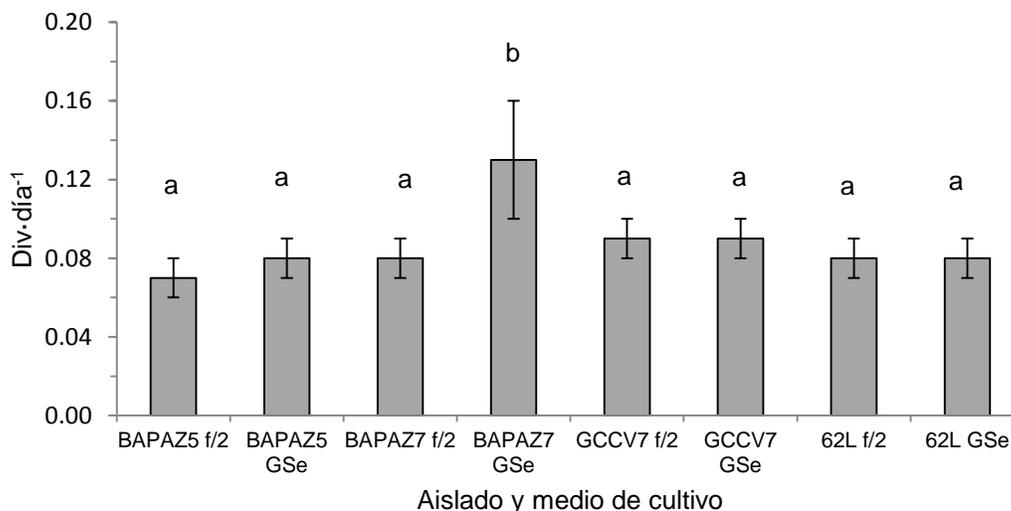


Fig. 12. Tasa de crecimiento de los aislados de *Gymnodinium catenatum* cultivados en medio f/2 y GSe a 24°C, 34 ups, ciclo luz:oscuridad 12:12. Las letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

El tiempo de división entre aislados y medios varió entre 5.57 (± 1.44) y 9.87 (± 1.04) días y mostró diferencias significativas ($p < 0.05$), entre tratamientos, observándose 4 grupos con características similares (Fig. 13).

En cuanto a la diferencia entre las biomásas máximas, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$), observándose también 4 grupos con características similares, siendo BAPAZ5 en ambos medios el que presentó la biomasa menor (1554 ± 434 y 2464 ± 370 cel·mL⁻¹ en medio f/2 y GSe, respectivamente) y el aislado GCCV7 en medio GSe con la biomasa mayor (8730 ± 846 cel·mL⁻¹) (Fig. 14).

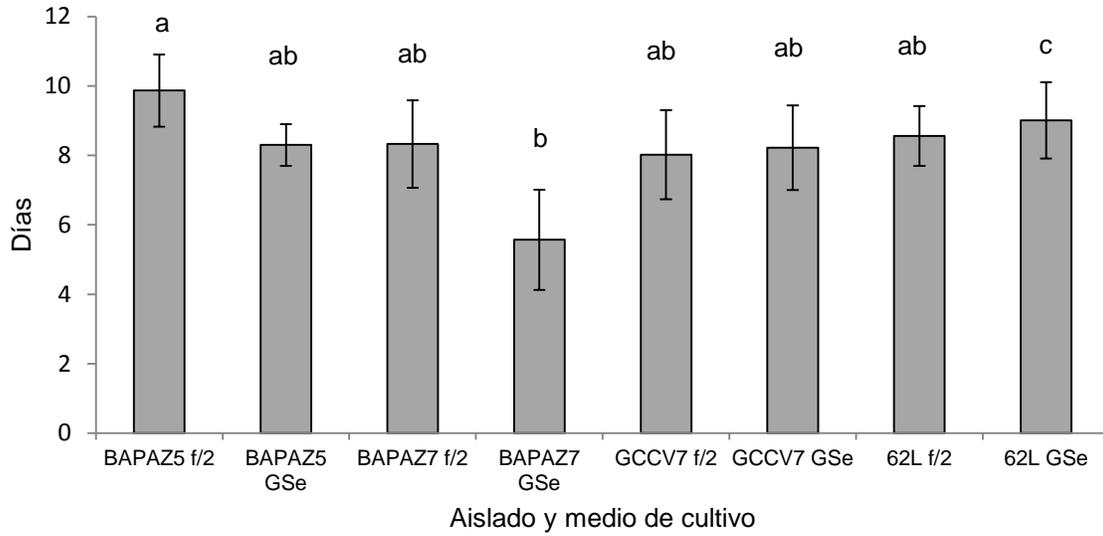


Fig. 13. Tiempo de división (días) de los aislados de *Gymnodinium catenatum* cultivados en medio f/2 y GSe a 24°C, 34 ups, ciclo luz:oscuridad 12:12. Las letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

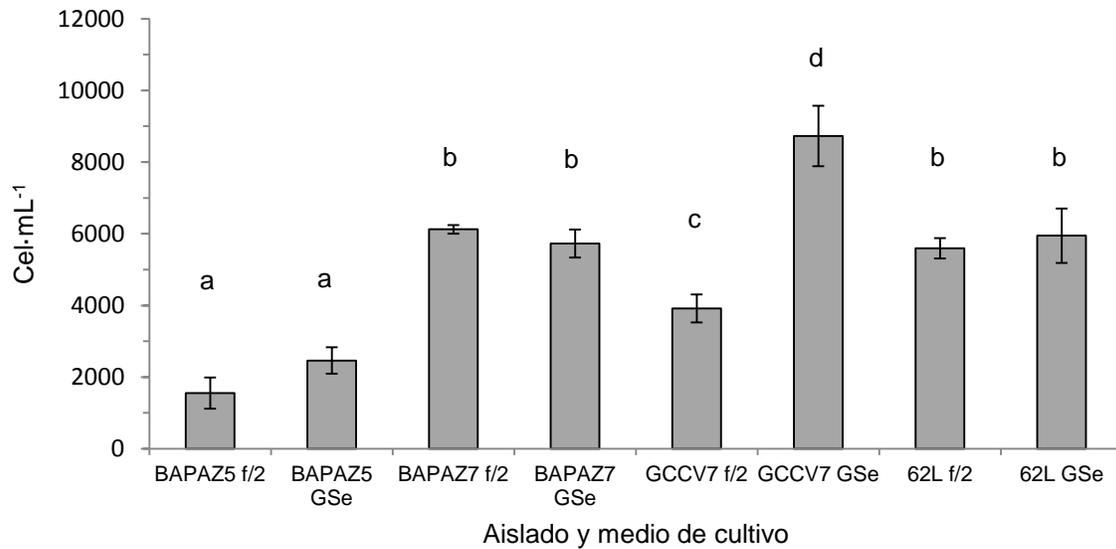


Fig. 14. Densidad máxima (cel·mL⁻¹) de los aislados de *Gymnodinium catenatum* cultivados en medio f/2 y GSe a 24°C, 34 ups, ciclo luz:oscuridad 12:12. Las letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la figura 15 se muestran los cuatro aislados en cada medio de cultivo con fines de comparación entre aislados.

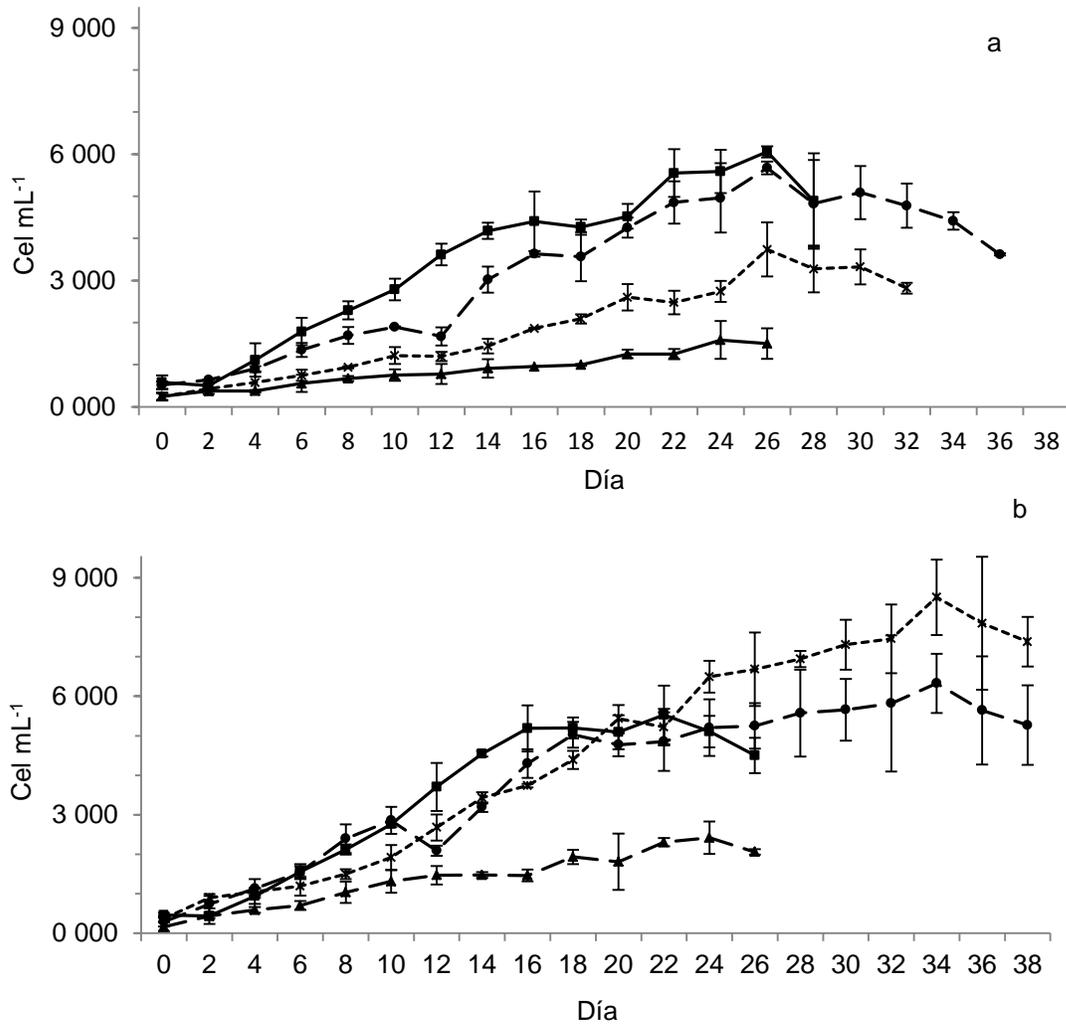


Fig. 15. Curvas de crecimiento de los cuatro aislados de *Gymnodinium catenatum*. a) en medio f/2; b) en medio GSe. Triángulos: BAPAZ5. Cuadros: BAPAZ7. Cruces: GCCV7. Círculos: 62L. Líneas verticales: desviación estándar.

6.1.2 Formación de cadenas de células

Se observó la formación de cadenas de células en todos los aislados y en ambos medios de cultivo.

En general, en medio f/2 se encontró una mayor proporción de células individuales ($41.9 \pm 16.6\%$) que en medio GSe ($29.7 \pm 12.5\%$), y en medio GSe se encontró una mayor proporción de cadenas de 2-4 células que en medio f/2 ($66.5 \pm 10.1\%$ y $57.6 \pm 16.3\%$, respectivamente). El medio GSe fue el que favoreció una mayor producción de cadenas de 8 células y mayores en dos aislados (GCCV7 y 62L), aunque en proporciones que en general no superaban el 2.9%. La excepción fue el aislado 62L en medio GSe, en donde se obtuvo un promedio de $9.6 \pm 6.7\%$ de cadenas de esta longitud, aunque en ambos medios se observaron cadenas de más de 4 células (Tabla 12).

Tabla 12. Porcentaje promedio de cadenas y día de cultivo con mayor proporción de cadenas de 8 células y mayores en *Gymnodinium catenatum*. Se señalan en negritas los valores mayores en cada categoría.

Aislado	Medio de cultivo	Células individuales	%			Mayor proporción de cadenas ≥ 8 células (% / día / fase)
			Cadenas 2-4	Cadenas 5-7	Cadenas ≥ 8 células	
BAPAZ5	f/2	43 \pm 7	57 \pm 7	0.0	0.1	0.8% / 22 / fin exponencial
	GSe	41 \pm 11	59 \pm 11	0.0	0.0	-
BAPAZ7	f/2	26 \pm 4	74 \pm 4	0.0	0.1	0.6% / 12 / exponencial
	GSe	23 \pm 8	77 \pm 8	0.04	0.0	-
GCCV7	f/2	64 \pm 7	36 \pm 7	0.0	0.0	-
	GSe	39 \pm 14	57 \pm 12	1.0	2.9	12.9% / 0 / siembra
62L	f/2	33 \pm 11	64 \pm 10	1.0	1.1	2.3% / 24 / fin exponencial
	GSe	15 \pm 4	73 \pm 8	2 \pm 1	10 \pm 1	24.5% / 14 / exponencial

En BAPAZ5 en f/2 se observó en todo el ciclo un promedio de 43.4% de células individuales, 56.6% de cadenas de 2-4 células y 0.1% de cadenas de 8 células o más. Las cadenas de más de 8 células sólo se observaron en el día 22 en un porcentaje bajo (0.8%), al final de la fase de crecimiento exponencial (Fig. 16).

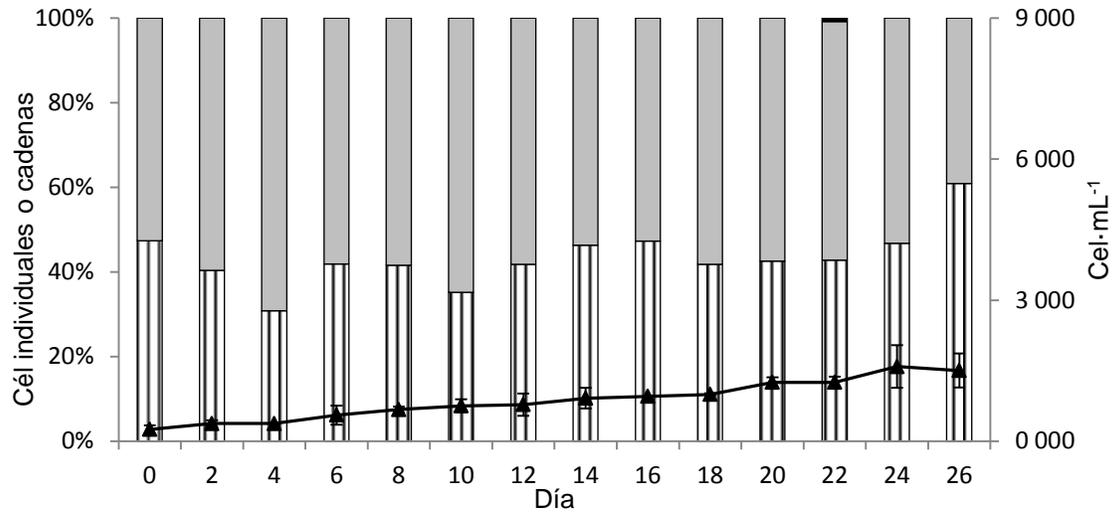


Fig. 16. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado BAPAZ5 de *Gymnodinium catenatum* en medio f/2.

Rayas: células individuales; gris: cadenas de 2-4 células; negro: cadenas de 8 células y mayores. La línea continua con triángulos representa la variación del número de células·mL⁻¹ (curva de crecimiento).

En el mismo aislado, pero en medio GSe se observó un promedio de 41.3% de células individuales y 58.7% de cadenas de 2-4 células a lo largo del ciclo. No se observaron cadenas de mayor longitud (Fig. 17).

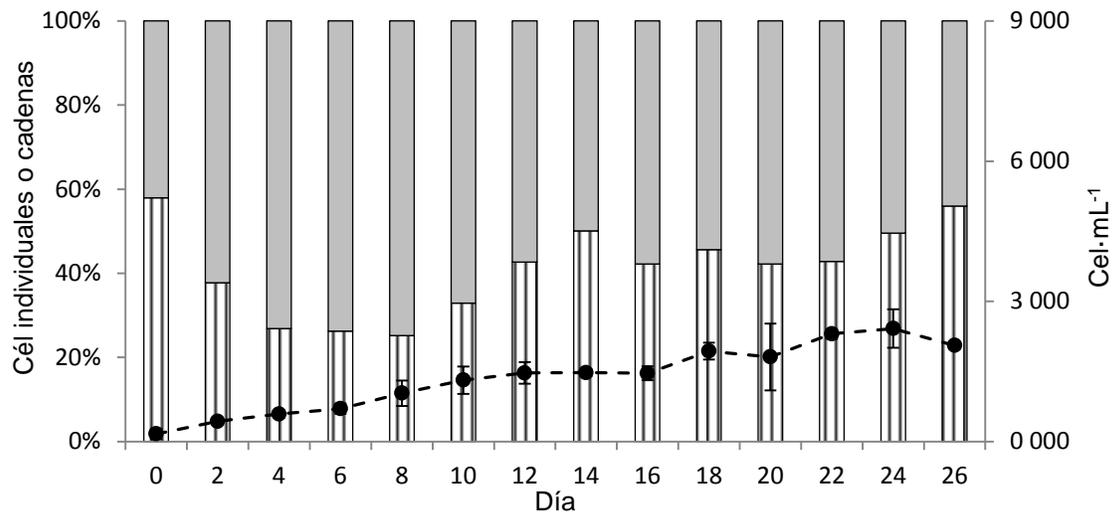


Fig. 17. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado BAPAZ5 de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe. Rayas: células individuales. Gris: cadenas de 2-4 células. La línea punteada con círculos representa la variación del número de células·mL⁻¹ (curva de crecimiento).

En el aislamiento BAPAZ7 en medio f/2 se obtuvo un promedio de 26.1% de células individuales, 73.8% de cadenas de 2-4 células y 0.1 % de cadenas de 8 células y mayores. El día en que se observó la mayor proporción de cadenas más largas fue el día 12 del cultivo, a mitad de la fase de crecimiento exponencial (Fig. 18).

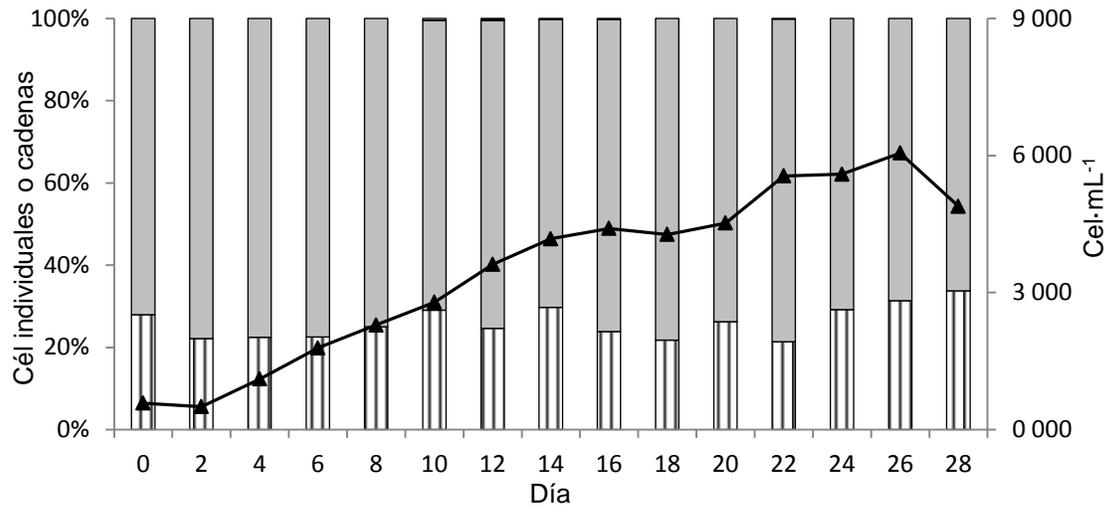


Fig. 18. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado BAPAZ7 de *Gymnodinium catenatum* en medio f/2. Rayas: células individuales. Gris: cadenas de 2-4 células. Negro: cadenas de 8 células y mayores. La línea continua con triángulos representa la variación del número de células·mL⁻¹ (curva de crecimiento).

En el aislamiento BAPAZ7 en medio GSe se observó un promedio de 23.0% de células individuales, 76.9% de cadenas de 2-4 células y 0.04% de cadenas de 5-7 células. No se observaron cadenas mayores (Fig. 19).

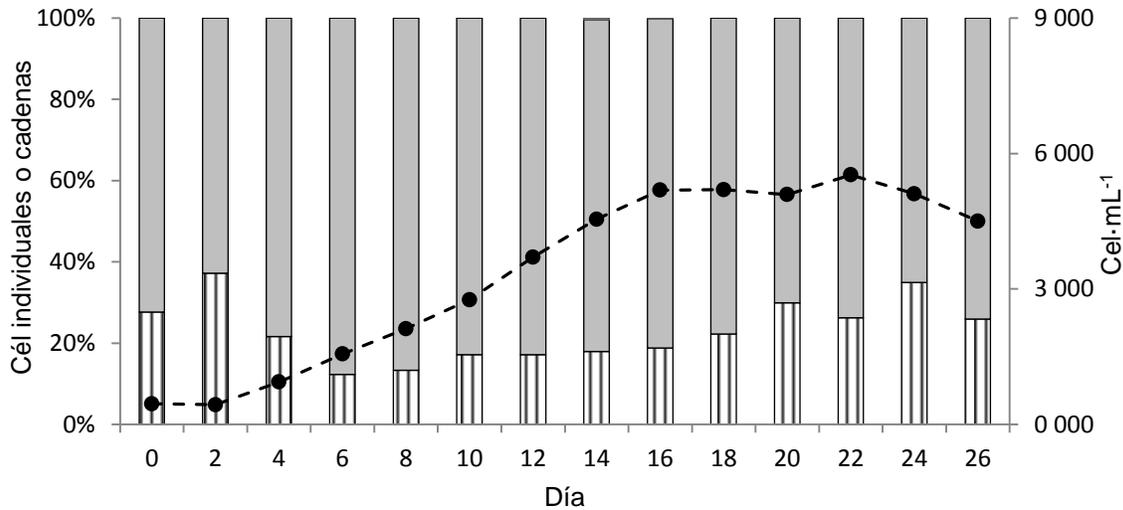


Fig. 19. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado BAPAZ7 de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe. Rayas: células individuales. Gris: cadenas de 2-4 células. La línea punteada con círculos representa la variación del número de células·mL⁻¹ (curva de crecimiento).

En el aislado GCCV7 en medio f/2 se observó la mayor proporción de células individuales, siendo en promedio de 64.4% durante todo el ciclo. Las cadenas de 2-4 células se observaron en 35.6% en promedio, sin presentar cadenas mayores a 4 células (Fig. 20).

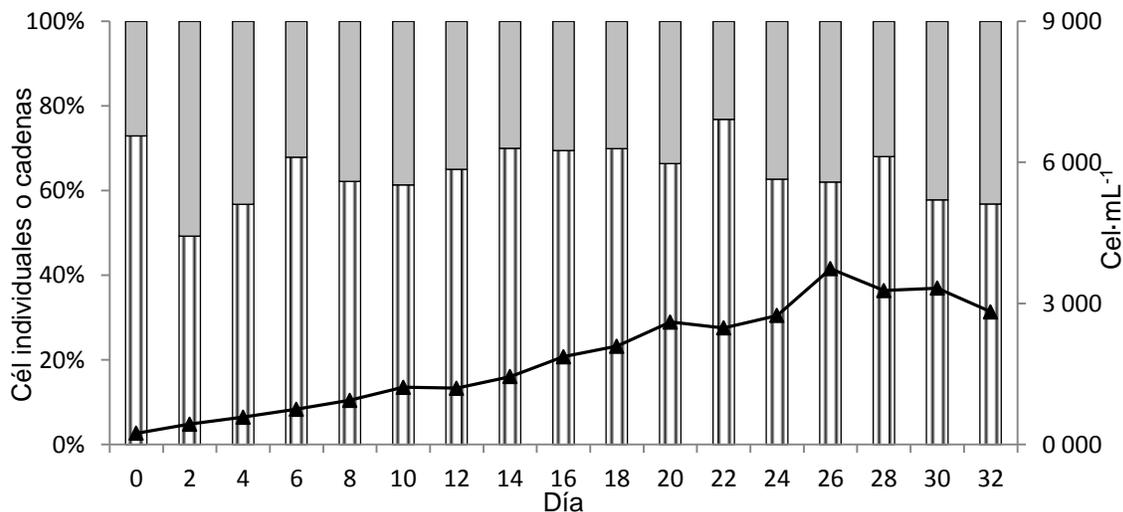


Fig. 20. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado GCCV7 de *Gymnodinium catenatum* en medio f/2. Rayas: células individuales. Gris: cadenas de 2-4 células. La línea continua con triángulos representa la variación del número de células·mL⁻¹ (curva de crecimiento).

En el mismo aislado en medio GSe se observaron características totalmente diferentes; un promedio de 39.0% de células individuales, 57.1% de cadenas de 2-4 células, 1% de cadenas de 5-7 células y 2.9% de cadenas de 8 células y más, con un máximo de 12.9% de este tipo de cadenas el día de siembra (día 0) y 6.7% el día en que se presentó biomasa máxima (Fig. 21).

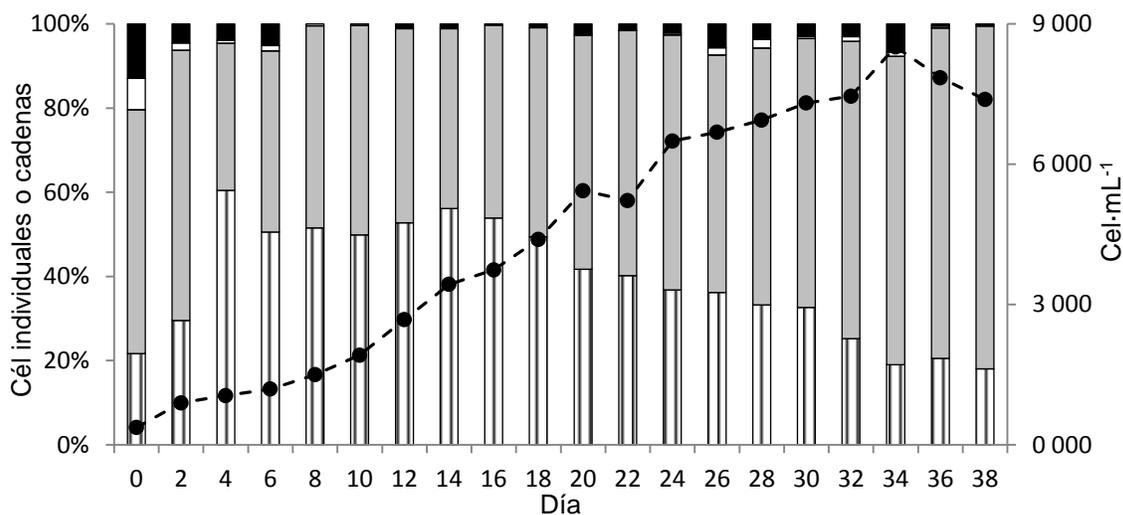


Fig. 21. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado GCCV7 de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe. Rayas: células individuales. Gris: cadenas de 2-4 células. Blanco: cadenas de 5-7 células. Negro: cadenas de 8 células y mayores. La línea punteada con círculos representa la variación del número de células·mL⁻¹ (curva de crecimiento).

En el aislado 62L en medio f/2 se obtuvo a lo largo del ciclo un 33.6% de células individuales, 64.4% de cadenas de 2-4 células, 1% de 5-7 células y 1.1% de cadenas de 8 células y más. La mayor proporción de las cadenas más largas fue de 2.3% el día 24 del cultivo, al final de la fase de crecimiento exponencial (Fig. 22).

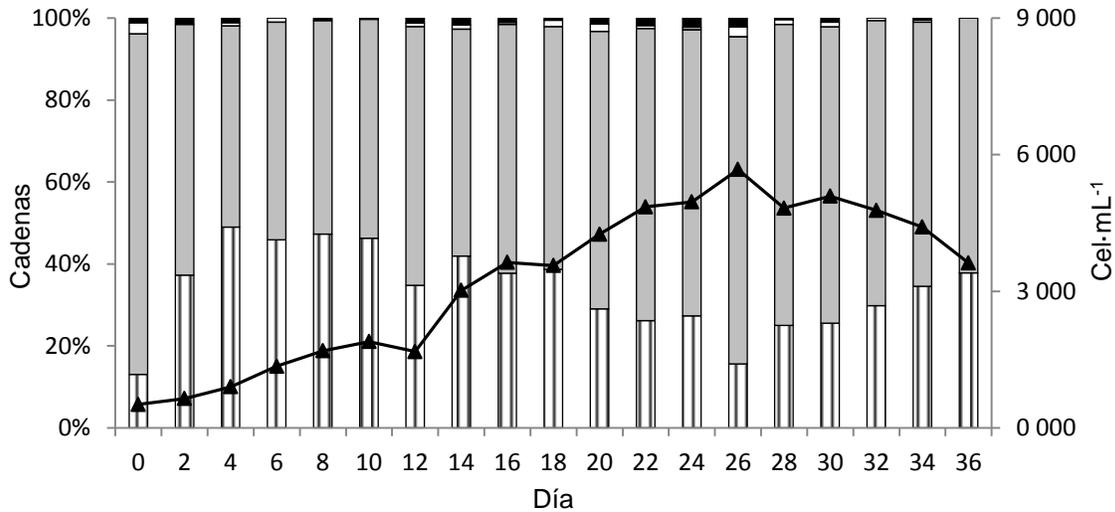


Fig. 22. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado 62L de *Gymnodinium catenatum* en medio f/2. Rayas: células individuales. Gris: cadenas de 2-4 células. Blanco: cadenas de 5-7 células. Negro: cadenas de 8 células y mayores. La línea continua con triángulos representa la variación del número de células·mL⁻¹ (curva de crecimiento).

Finalmente, en el mismo aislado, en medio GSe se observó un 15.5% de células individuales, 73.3% de cadenas de 2-4 células, 1.6% de 5-7 células y 9.6% de cadenas de 8 células y más, siendo éste el mayor porcentaje de cadenas de esta longitud, encontrándose en mayor proporción el día 14 del cultivo, a mitad de la fase de crecimiento exponencial, con 24.5% de ellas (Fig. 23).

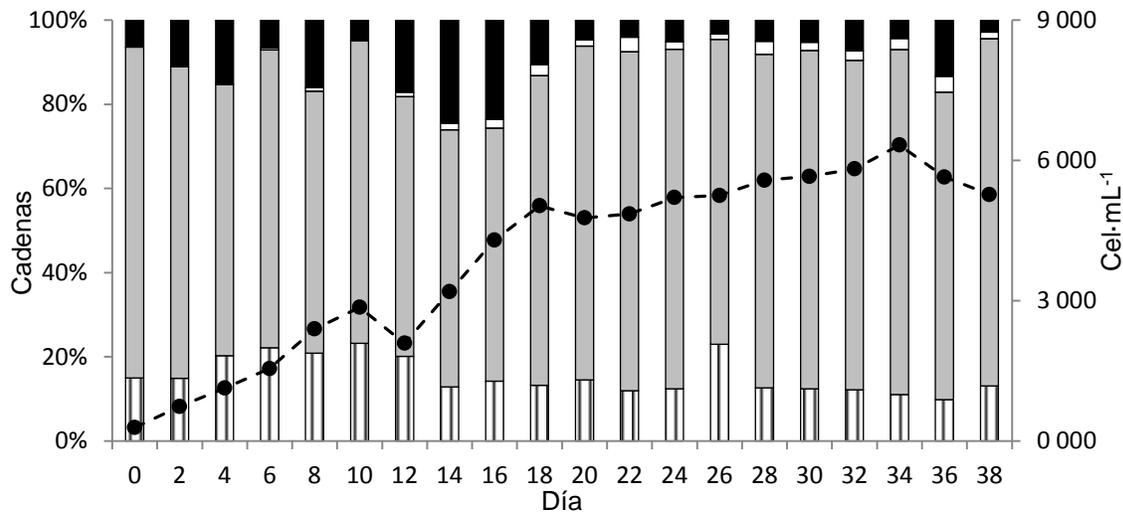


Fig. 23. Formación de cadenas durante la curva de crecimiento del aislado 62L de *Gymnodinium catenatum* en medio GSe. Rayas: células individuales. Gris: cadenas de 2-4 células. Blanco: cadenas de 5-7 células. Negro: cadenas de 8 células y mayores. La línea punteada con círculos representa la variación del número de células·mL⁻¹ (curva de crecimiento).

6.2 Perfil de toxinas y toxicidad

Con fines comparativos entre las toxinas comúnmente analizadas (N-sulfocarbamoil [toxinas C y B], decarbamoil [dcSTX, dcNEO, dcGTX] y carbamoil [STX, NEO, GTX]) y las toxinas tipo benzoil, en este trabajo las primeras se denominan “toxinas hidrofílicas”, aunque la diferencia en hidrofiliidad no es suficiente para establecer un criterio diferencial entre ellas.

6.2.1 Perfiles de toxinas hidrofílicas durante el ciclo de cultivo

En los análisis de los tres aislados (BAPAZ5, BAPAZ7 y 62L) se identificaron 10 toxinas: las N-sulfocarbamoil C1/2 y B1/2; las decarbamoil dcNEO, dcSTX y dcGTX2/3 y las carbamoil GTX2/3. Los pares enantioméricos se expresan como sumatorias, ya que se epimerizan con facilidad bajo las condiciones de extracción y análisis. Aunque pueden ser determinados de manera individual, las cantidades no reflejan necesariamente la composición original en las células. No se observó STX ni

NEO. En todos los casos se observaron variaciones en las proporciones de toxinas en función del tiempo y el medio de cultivo.

En BAPAZ5 en medio f/2 (%pg-cel⁻¹), las toxinas C1/2 fueron las más abundantes, encontrándose en una proporción superior al 60% durante todo el ciclo de cultivo (61.9 - 80.1%). El segundo lugar en abundancia fue de dcNEO (6.2 - 19.9%), y en tercer lugar las toxinas B1/2 (7.7 - 13.9%). Durante el ciclo se aprecian variaciones en el perfil de toxinas; básicamente cuando aumenta la proporción de toxinas C disminuyen las proporciones de dcNEO y B1/2, y viceversa, con excepción del día 20, en el que aumenta la proporción de C1/2 y B1/2 con una clara disminución en dcNEO. El resto de las toxinas (dcSTX, dcGTX2/3 y GTX2/3) se encuentran en proporciones bajas durante todo el ciclo (1.6 - 5.5%, en total) (Fig. 24a).

El mismo aislado, en medio GSe las toxinas C1/2 iniciaron con una abundancia relativa < 40% aumentando su proporción constantemente hasta el fin del ciclo de cultivo (mín. 38.1%, máx. 76.0%), mientras que se observó lo contrario en las toxinas B1/2, que iniciaron con una proporción inusualmente alta al inicio (>60%) y disminuyeron su proporción conforme la edad del cultivo avanzaba (9.7 - 60.4%). La toxina dcNEO inició con una baja proporción y a partir del día 8 se mantuvo por arriba del 10%, con un pico máximo >20% (0.6 - 21.8%) El resto de las toxinas se encontraron en una proporción muy baja (0.9 – 4.4%, en total) (Fig. 24b).

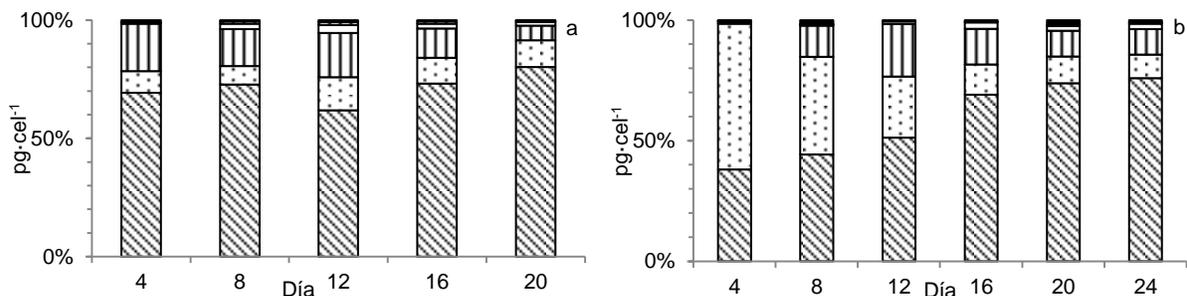


Fig. 24. Perfiles de toxinas del aislado BAPAZ5 de *G. catenatum* durante todas las etapas del cultivo, por toxina. a) medio f/2; b) medio GSe. Líneas inclinadas: C1/2; puntos: B1/2, líneas verticales: dcNEO; blanco: dcGTX2/3; cuadros: dcSTX; negro: GTX2/3.

Este aislado presentó la mayor proporción de toxina dcNEO en más de 10% en comparación con BAPAZ7 y 62L en ambos medios.

Por grupo de toxinas (N-sulfocarbamoil, decarbamoil y carbamoil) se observa que las toxinas N-sulfocarbamoil corresponden en todos los casos a >70% en ambos medios a lo largo del ciclo de cultivo (76 – 91% en f/2 y 77-98% en GSe), seguidas de las toxinas decarbamoil (8 – 23% en f/2 y 1.2 – 23% en GSe) y finalmente la menor proporción se encontró en las toxinas carbamoil (0.37 – 1.01% - 0.27 – 2.02%) (Figs. 25 a y b).

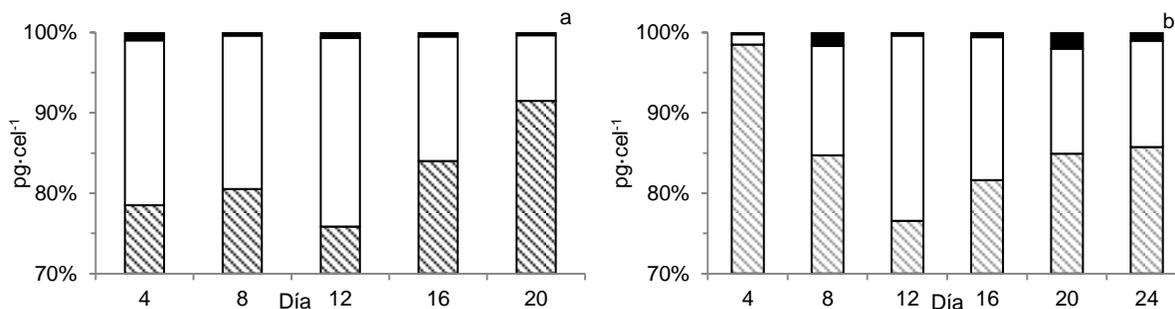


Fig. 25. Perfiles de toxinas del aislado BAPAZ5 de *G. catenatum* durante todas las etapas del cultivo, por grupo de toxinas. a) medio f/2; b) medio GSe. Líneas inclinadas: toxinas N-sulfocarbamoil (C1/2, B1/2); blanco: toxinas decarbamoil (dcNEO, dc STX, dcGTX2/3); negro: toxinas carbamoil (GTX2/3).

En BAPAZ7 en medio f/2 también las toxinas C1/2 fueron las más abundantes, con una proporción > 60% durante todo el ciclo (61.6 – 95.7%), iniciando con >90% pero con una disminución conforme aumentaba la edad del cultivo. Las toxinas B1/2 fueron las segundas en abundancia (0.0 – 25.5%), mostrando un comportamiento contrario a las toxinas C1/2, ya que éstas aumentaron conforme aumentaba la edad del cultivo. En tercer lugar se encontró dcNEO pero con una proporción baja en comparación con BAPAZ5 (0.0 – 6.0%). El resto de las toxinas (dcSTX, dcGTX1/2 y GTX1/2) se encontraron en muy baja proporción (2.6 – 6.9% en total) (Fig. 26a)

En medio GSe se encontró el mismo comportamiento: las toxinas C1/2 fueron las más abundantes (67.4 – 93.1%), iniciando con la mayor proporción y disminuyendo a lo largo del ciclo. De la misma manera, las toxinas B1/2 (0.0 – 23.7%) aumentaron conforme aumentó la edad del cultivo. En este medio, dcNEO (0.0 – 6.2%) también se encontró en muy baja proporción <4%, con excepción del día 20 de cultivo. El

resto de las toxinas presentaron baja proporción durante todo el ciclo (1.7 – 7.3%, en total) (Fig. 26b).

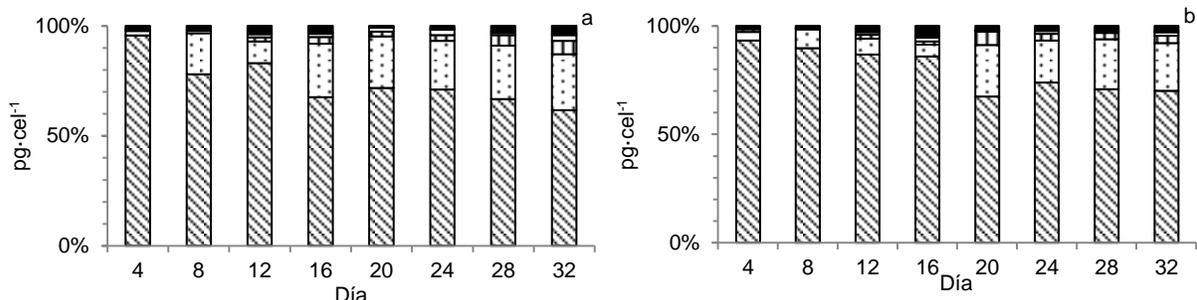


Fig. 26. Perfiles de toxinas del aislado BAPAZ7 de *G. catenatum* durante todas las etapas del cultivo, por toxina. a) medio f/2; b) medio GSe. Líneas inclinadas: C1/2; puntos: B1/2, líneas verticales: dcNEO; blanco: dcGTX2/3; cuadros: dcSTX; negro: GTX2/3.

Por grupo de toxinas se observa que las N-sulfocarbamoil representan una proporción relativa >80% en medio f/2 (87.1 – 96.6%) y >90% en medio GSe (91.1 – 98.3%), seguidas de las toxinas decarbamoil, que fueron ligeramente superiores en medio f/2 (1.5 – 9.4% en f/2 y 0.6 – 6.8% en GSe) y finalmente las carbamoil, las cuales fueron inferiores al resto prácticamente en todos los días analizados (0.5 – 3.5% en f/2 y 1.2 – 4.8% en GSe) (Figs. 27 a y b).

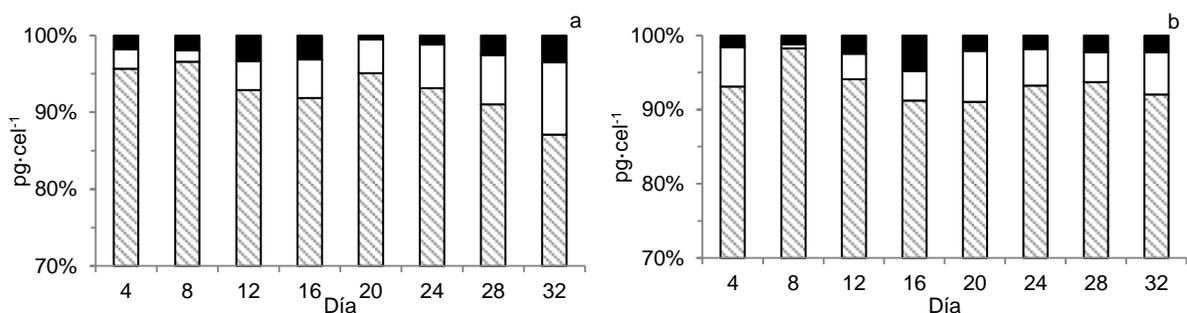


Fig. 27. Perfiles de toxinas del aislado BAPAZ7 de *G. catenatum* durante todas las etapas del cultivo, por grupo de toxinas. a) medio f/2; b) medio GSe. Líneas inclinadas: toxinas N-sulfocarbamoil (C1/2, B1/2); blanco: toxinas decarbamoil (dcNEO, dcSTX, dcGTX2/3); negro: toxinas carbamoil (GTX2/3).

Este aislado presentó la mayor proporción de toxinas C1/2, superior al 10% en comparación con BAPAZ5 y 62L.

El aislado 62L en medio f/2 la proporción relativa de toxinas C1/2 fue >60% a lo largo del ciclo (64.1 – 84.8%), mostrando variaciones de incremento y disminución sin un patrón claro. Las toxinas B1/2 fueron las segundas en abundancia (13.1 – 27.9%) con el mismo tipo de variación. La toxina dcNEO fue la tercera en abundancia (1.0 – 4.1%) y el resto de las toxinas se presentaron en muy baja proporción (1.2 – 5.1% en total (Fig. 28a)

En medio GSe la proporción de toxinas C1/2 fue ligeramente mayor que en medio f/2, siendo >70% a lo largo del ciclo (72.5 – 85.1%), seguidas de las toxinas B1/2 (12.2 – 23.1%), mostrando también variaciones de incremento y disminución sin un patrón claro. Las terceras en abundancia fueron las toxinas dcNEO (0.4 – 1.9%) y GTX2/3 (0.4 – 1.9%). Ésta es el único aislado / medio en el que las toxinas GTX2/3 se encontraron en igual proporción que la dcNEO. El resto de las toxinas (dcSTX y dcGTX2/3) se encontraron en baja proporción relativa (0.3 – 2.0%) (Fig. 28b).

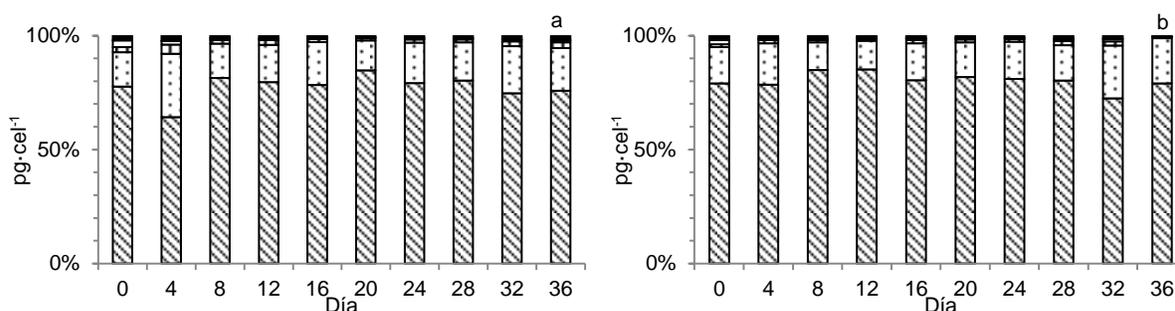


Fig. 28. Perfiles de toxinas del aislado 62L de *G. catenatum* durante todas las etapas del cultivo. a) medio f/2; b) medio GSe. Líneas inclinadas: C1/2; puntos: B1/2, líneas verticales: dcNEO; blanco: dcGTX2/3; cuadros: dcSTX; negro: GTX2/3.

Por grupo de toxinas, las N-sulfocarbamoil representaron una proporción relativa >90% en ambos medios (92.0 – 97.8% en f/2 y 94.9 – 98.9% en GSe), seguidas de las toxinas decarbamoil (1.4 – 5.7% en f/2 y 0.7 – 3.2% en GSe) y finalmente las toxinas carbamoil (0.8 – 2.3% en f/2 y 0.4 – 1.9% en GSe) (Figs. 29 a y b).

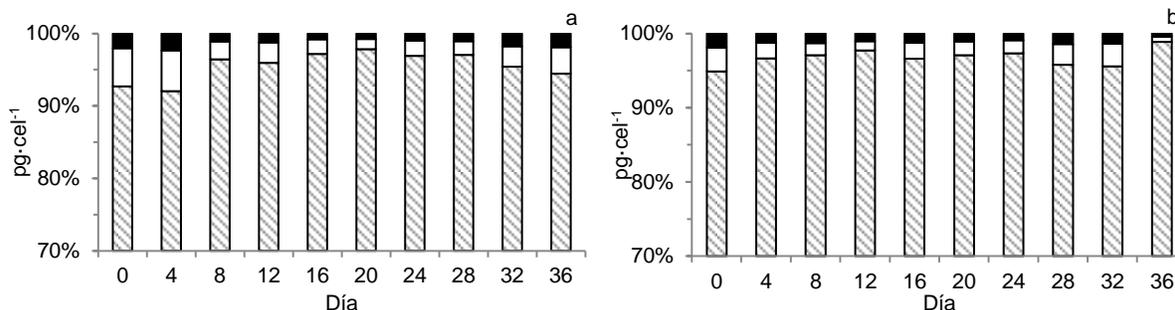


Fig. 29. Perfiles de toxinas del aislado 62L de *G. catenatum* durante todas las etapas del cultivo, por grupo de toxinas. a) medio f/2; b) medio GSe. Líneas inclinadas: toxinas N-sulfocarbamoil (C1/2, B1/2); blanco: toxinas decarbamoil (dcNEO, dc STX, dcGTX2/3); negro: toxinas carbamoil (GTX2/3).

6.2.2 Comparación de los perfiles de toxinas entre aislados y medios en tres puntos de la etapa de crecimiento exponencial

Al inicio del crecimiento exponencial se observa una diferencia importante en BAPAZ5 en los diferentes medios; en f/2 las toxinas C1/2 representan >65%, mientras que en GSe no llegan al 35% y son las toxinas B1/2 las que se encuentran en mayor proporción (60%), mientras que dcNEO se encuentra en una proporción mucho mayor en medio f/2 que en medio GSe (19.9 vs 0.6%, respectivamente). BAPAZ7 posee perfiles similares en ambos medios: las toxinas C1/2 muestran una proporción relativa >90% y no se detectaron las toxinas B1/2 ni dcNEO. 62L también muestra diferencias, principalmente en las toxinas C1/2, B1/2 y dcNEO, encontrándose una mayor proporción de las primeras en medio GSe y de las segundas y la tercera en medio f/2 (Fig. 30).

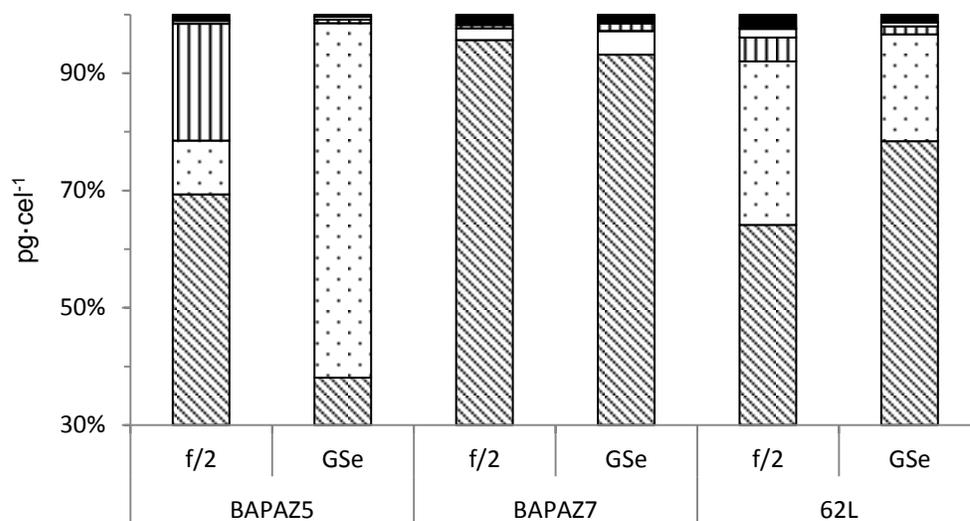


Fig. 30. Comparación de perfiles de toxinas de tres aislados de *G. catenatum* en dos medios de cultivo al inicio del crecimiento exponencial.
 Líneas inclinadas: C1/2; puntos: B1/2, líneas verticales: dcNEO; blanco: dcGTx2/3; cuadrícula: dcSTx; negro: GTX2/3.

A la mitad de la fase de crecimiento exponencial se observa en BAPAZ5 en ambos medios una proporción mucho mayor de dcNEO que el resto de los aislados / medios, siendo de 18.7% y 21.8% en f/2 y GSe, respectivamente, mientras que en el resto no supera el 3.0%. La proporción de las toxinas C1/2 en todos los casos es >60%, con excepción de BAPAZ5 en medio GSe (51.3%). En esta etapa, en el aislado BAPAZ7 ya se detectan las toxinas B1/2 y dcNEO, y se muestra la mayor proporción relativa de toxinas GTX2/3 (3.1 y 2.4% en medio f/2 y GSe, respectivamente), superior al resto de los aislados / medios, que no superan el 1.1% (Fig. 31).

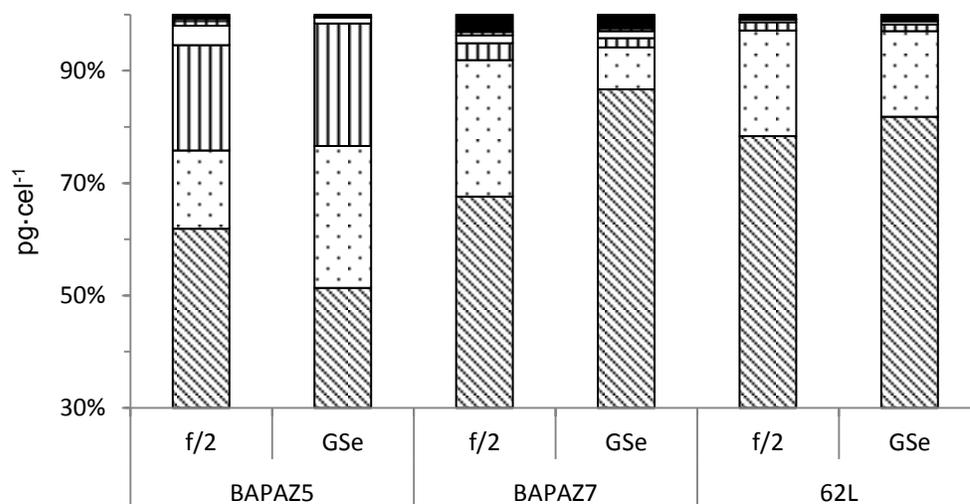


Fig. 31. Comparación de perfiles de toxinas de tres aislados de *G. catenatum* en dos medios de cultivo a la mitad del crecimiento exponencial. Líneas inclinadas: C1/2; puntos: B1/2, líneas verticales: dcNEO; blanco: dcGTX2/3; cuadrícula: dcSTX; negro: GTX2/3.

Al final de la fase de crecimiento exponencial, el aislado BAPAZ5 aún muestra una proporción relativa de dcNEO superior al resto (6.2 y 10.5% en medio f/2 y GSe, respectivamente) y B1/2 inferior al resto (11.4 y 9.7% en medio f/2 y GSe, respectivamente, en comparación con 16.8 a 23.1% en el resto de los aislados y medios). La proporción de las toxinas C1/2 en todos los casos es superior al 70% (Fig. 32).

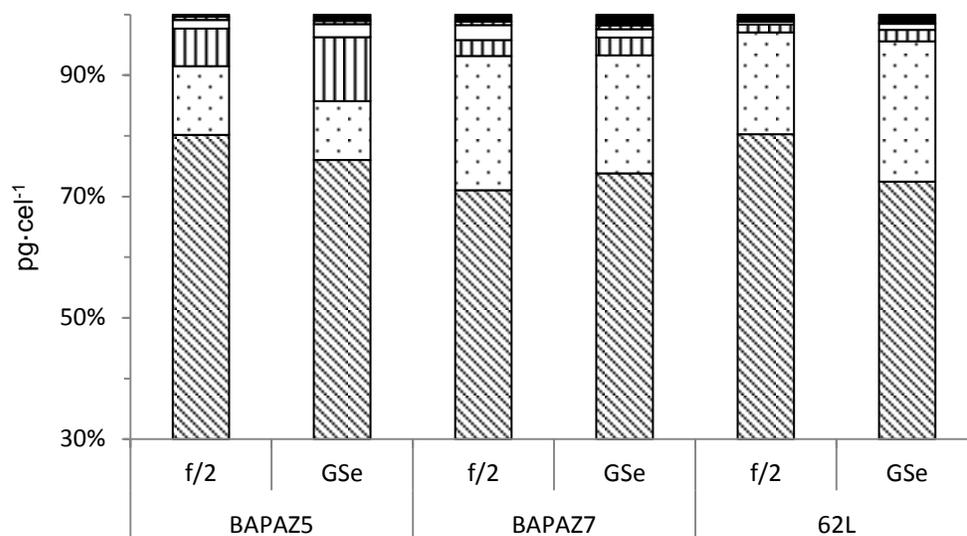


Fig. 32. Comparación de perfiles de toxinas de tres aislados de *G. catenatum* en dos medios de cultivo al final del crecimiento exponencial. Líneas inclinadas: C1/2; puntos: B1/2, líneas verticales: dcNEO; blanco: dcGTX2/3; cuadrícula: dcSTX; negro: GTX2/3.

6.2.3 Toxicidad

La toxicidad total (definida como equivalentes de STX·cel⁻¹) también mostró variaciones en función del aislado, del medio y del tiempo del cultivo. BAPAZ5 en ambos medios fue el aislado de mayor toxicidad, y tanto la máxima como la mínima se presentaron en el medio GSe (máx. 28.0 ± 5.1; mín. 10.3 ± 3.0 pg STX eq·cel⁻¹). El aislado BAPAZ7 presentó la toxicidad máxima y mínima en medio f/2 (máx. 4.5 ± 2.0; mín. 1.2 ± 0.3 pg STX eq·cel⁻¹). El aislado 62L presentó la toxicidad máxima en medio GSe y la mínima en medio f/2 (máx. 8.6 ± 0.3; mín. 1.4 ± 0.8 pg STX eq·cel⁻¹). Como se observa, las toxicidades máximas, tanto de BAPAZ7 como de 62L son incluso menores que la toxicidad mínima de BAPAZ5.

Al inicio de la fase exponencial, el aislado BAPAZ5 mostró la mayor toxicidad en medio f/2, seguido del mismo aislado en medio GSe, sin embargo, tanto en BAPAZ7 como en 62L, se registraron valores de toxicidad superiores en este último medio. Durante la etapa media del crecimiento exponencial, en todos los casos la toxicidad

fue superior en el medio GSe y en esta etapa BAPAZ7 fue el aislado menos tóxico. Al final de esta etapa, nuevamente fue BAPAZ5 en medio f/2 la que mostró la mayor toxicidad, seguida por el mismo aislado en medio GSe; posteriormente 62L en medio f/2, 62L GSe, BAPAZ7 GSe y el valor más bajo se encontró en BAPAZ7 en medio f/2 (Fig. 33).

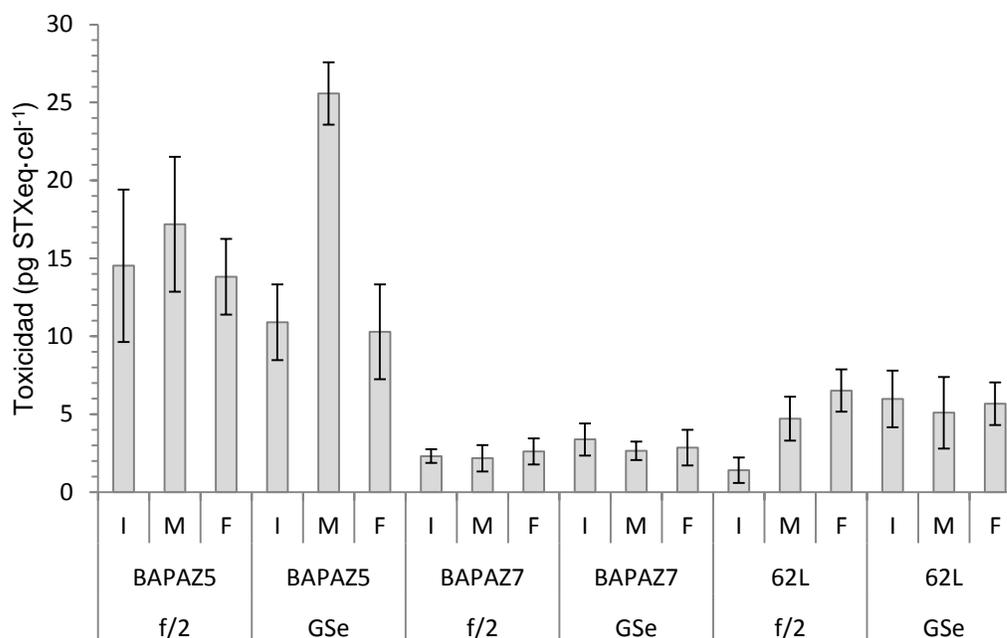


Fig. 33. Toxicidad (pg STXeq·cel⁻¹) al inicio (I), mitad (M) y al final (F) de la etapa de crecimiento exponencial de los tres aislados de *G. catenatum* en medio f/2 y GSe.

Variación de la toxicidad durante el cultivo

Se observaron variaciones de la toxicidad durante el ciclo de cultivo en todos los aislados y medios. En BAPAZ5 en ambos medios la toxicidad fue >10 pg STXeq⁻¹ durante todo el ciclo, pero no se observó una tendencia de estas variaciones a aumentar o disminuir en función de la edad del cultivo, sino variaciones constantes en cada día analizado ($r^2 = 0.06$ y 0.02 en medio f/2 y GSe, respectivamente) (Fig. 34).

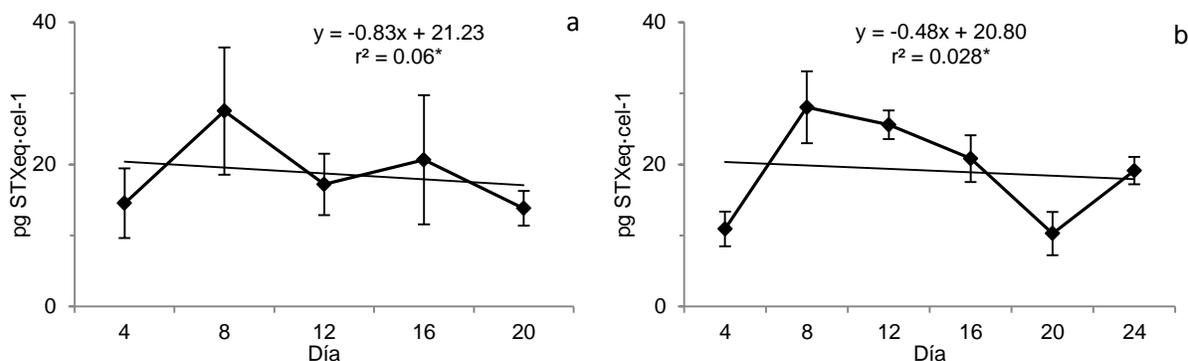


Fig. 34. Variación de la toxicidad (pg STXeq⁻¹) durante el ciclo de cultivo en BAPAZ5. a) medio f/2. b) medio GSe. * Relación no significativa ($\alpha = 0.05$).

El aislado BAPAZ7 en medio f/2 sí mostró una ligera tendencia a aumentar conforme aumentaba la edad del cultivo ($r^2 = 0.62$), con una toxicidad inicial y final de 2.3 ± 0.4 y 4.5 ± 2.0 pg STX eq⁻¹, respectivamente. En medio GSe no se observó una tendencia ($r^2 = 0.04$) (Fig. 35).

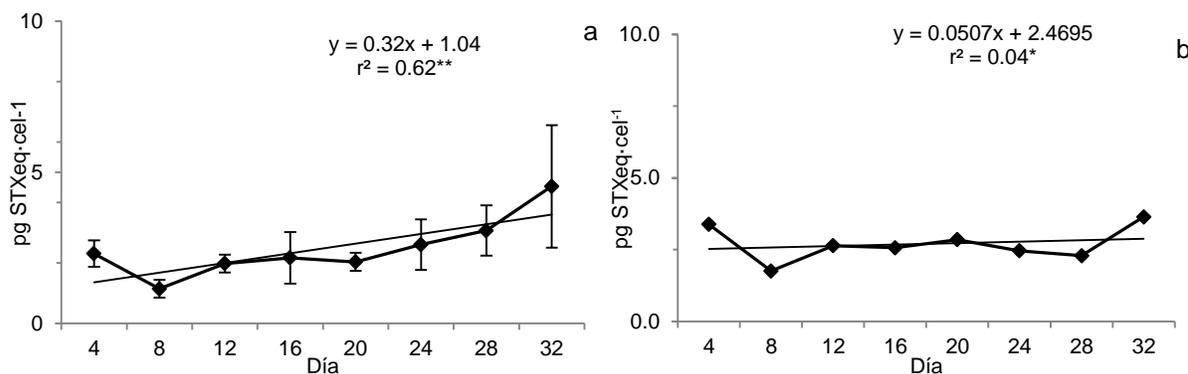


Fig. 35. Variación de la toxicidad (pg STX eq⁻¹) durante el ciclo de cultivo en BAPAZ7. a) medio f/2. b) medio GSe. * Relación no significativa; ** relación significativa.

En el aislado 62L, la toxicidad también mostró una tendencia hacia el aumento conforme aumentó la edad del cultivo en medio f/2 ($r^2 = 0.71$), con toxicidad inicial y final de 2.6 ± 0.4 y 7.0 ± 1.5 pg STX eq⁻¹, respectivamente, mientras que en GSe nuevamente no se observa una tendencia ($r^2 = 0.02$) (Fig. 36).

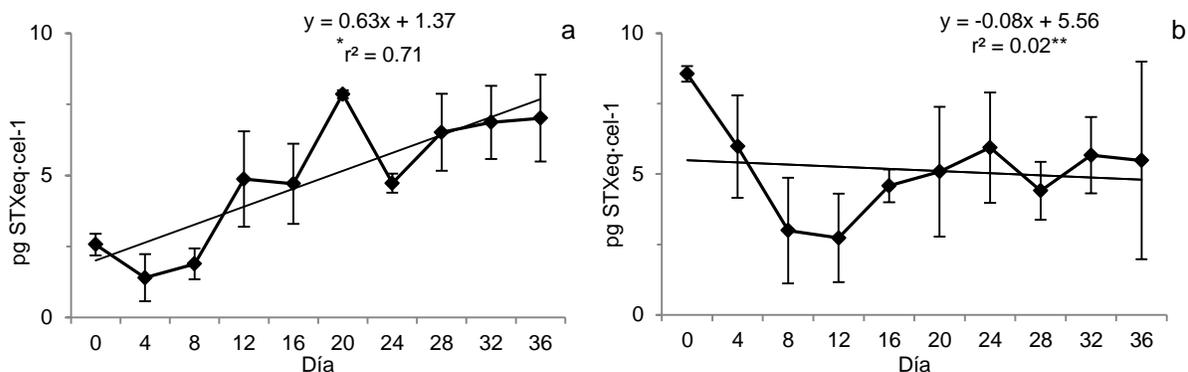


Fig. 36. Variación de la toxicidad (pg STX eq⁻¹) durante el ciclo de cultivo en 62L. a) medio f/2. b) medio GSe. * Relación no significativa; ** relación significativa.

6.3 Identificación de toxinas tipo benzoil por ¹H-RMN y UV

Se identificó la existencia de un anillo bencénico en extractos de *G. catenatum* (aislado G7) por el método de ¹H-RMN.

El espectro de ¹H-RMN de la fracción 2 (10% MeOH) exhibió una señal simple en 8.5 ppm, que corresponde a los protones de los grupos iminos de la STX. Las dos señales dobles centradas en 7.91 y 7.53 ppm corresponden al sistema AA'BB', característico de un anillo bencénico *para*-sustituido. Estas señales se atribuyeron al grupo *para*-hidroxibenzoil en la posición 6 del esqueleto base de la STX. Se observaron dos señales en 5.16 y 4.67 ppm, parcialmente enmascaradas por la señal intensa del agua intercambiada del disolvente, de acuerdo a las atribuciones reportadas por Negri y colaboradores (2003) (Fig. 37). La primera señal corresponde al protón H-5 del heterociclo base de STX acoplado al H6 y al NH vecinal; la segunda señal es atribuida al protón H11 (R2, R3 = H), acoplado al metileno H10.

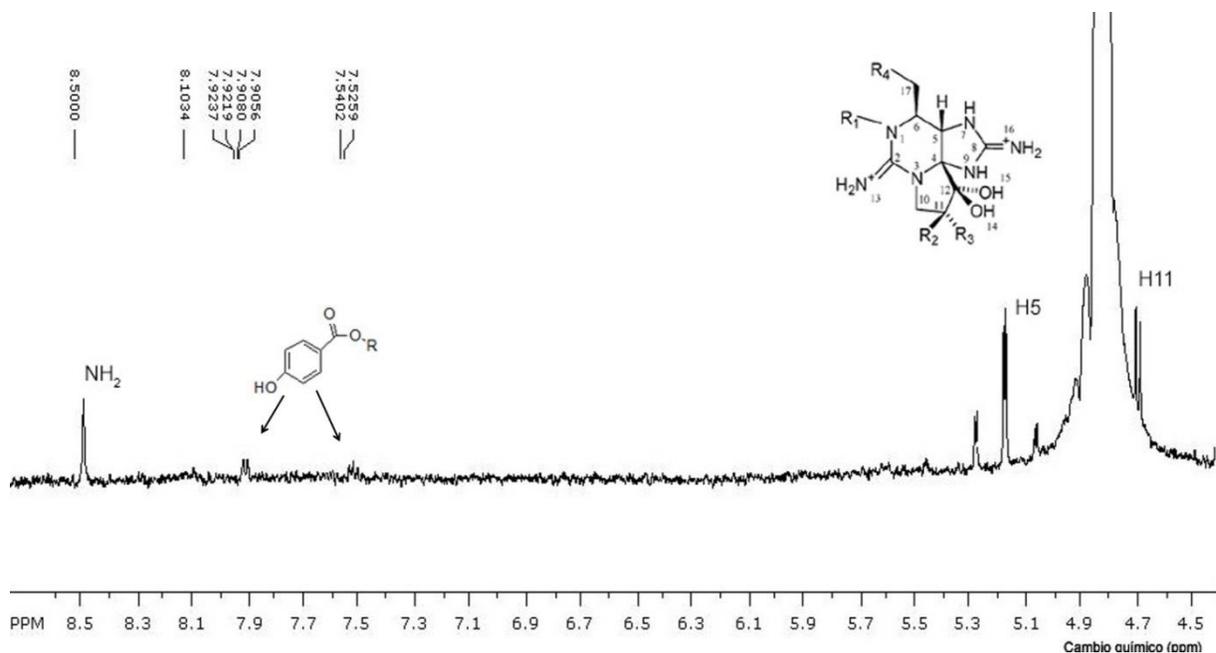


Fig. 37. ¹H-RMN de la fracción 2 de *Gymnodinium catenatum* (aislado G7), obtenida con 10% MeOH. Las dos señales dobles centradas en 7.91 y 7.53 ppm (sistema AA'BB') confirmaron la presencia de un anillo bencénico *para* sustituido, atribuido al *p*-hidroxibenzoil en posición 6 del esqueleto base.

Los espectros de ultravioleta de esta fracción mostraron absorciones en 254.32 y 318.94 nm, característicos de grupos bencénicos di-sustituidos en la posición *para*. No se observaron absorciones de UV en el resto de las fracciones (Fig. 38).

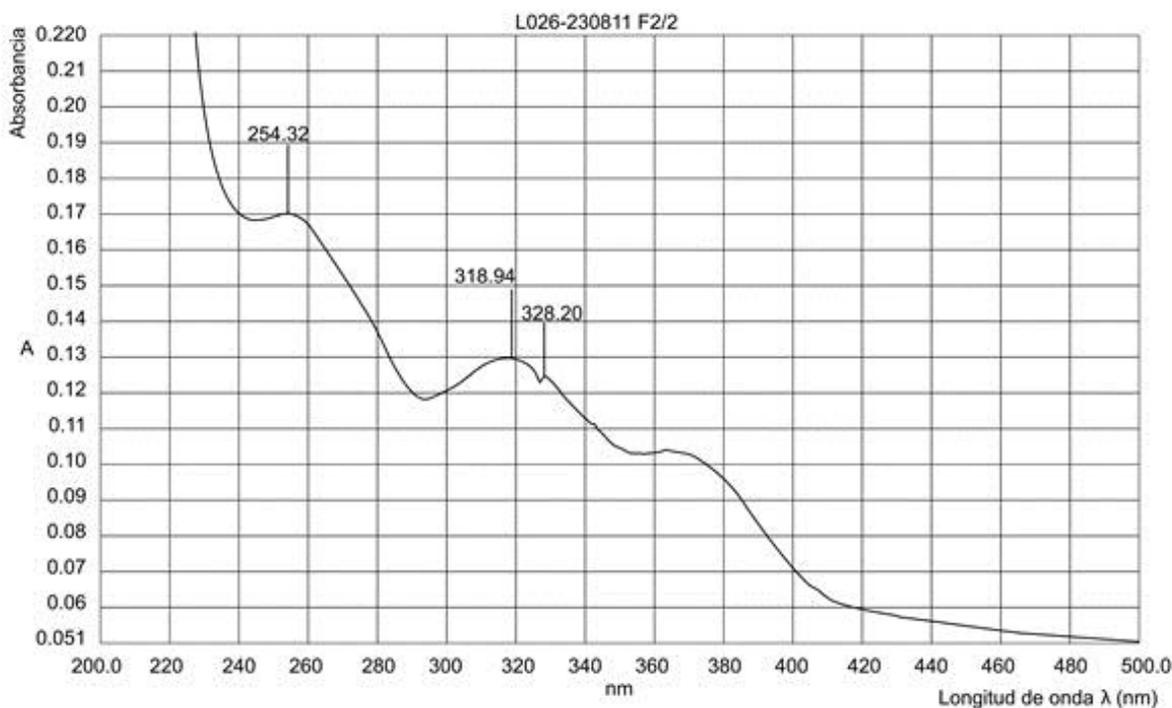


Fig. 38. UV-VIS de la fracción 2 de *G. catenatum* (aislado G7), obtenida con 10% MeOH.

Los desplazamientos químicos observados en el análisis por $^1\text{H-RMN}$, así como el análisis ultravioleta de la fracción 2 confirmaron la presencia del heterociclo base de STX, así como la presencia de grupos *p*-hidroxibenzoil.

6.4 Análisis y variación de toxinas tipo benzoil por cromatografía de líquidos

Por HPLC-FLD se identificaron cinco toxinas tipo benzoil de manera tentativa: GC1b, GC2b, GC1/2 (reportadas en conjunto, como un solo pico en el cromatograma) y GC3.

Debido a que no se cuenta con estándares de estas toxinas (GC1-6, GC1a - 6a, GC1b-6b, ver Fig. 2), no es posible su cuantificación, sin embargo se puede comparar su variación y es posible establecer diferencias entre días, entre aislados y entre medios, pero no entre las toxinas, ya que no se conoce el factor de respuesta de cada una de ellas. Por este motivo no es posible afirmar que cuando el área del pico de una toxina es mayor que la de otra, signifique que su cantidad sea mayor.

Los resultados muestran que se producen las cinco toxinas durante todo el ciclo en todos los aislados, con excepción de GC1b, la cual no fue posible detectar en el aislado GCCV7 en medio f/2. Se observó que BAPAZ5 y BAPAZ7 poseen mayores cantidades de estas toxinas, en comparación con GCCV7 y 62L, en ambos medios. En general, se encontró una mayor cantidad de toxinas GC en medio GSe, sólo con tres excepciones, en el aislado BAPAZ7.

Es importante mencionar que las cantidades de las toxinas son la sumatoria de las áreas durante todo el ciclo de cultivo, y el aislado con mayor cantidad, BAPAZ5, tuvo también el ciclo de cultivo más corto (20 días de análisis de toxinas GC), en comparación con los que presentaron cantidades de toxinas mucho menores (36 días de análisis de toxinas GC).

6.4.1 *Toxina GC1b*

La sumatoria de las áreas de la toxina GC1b durante todo el cultivo muestra que la mayor cantidad fue producida por el aislado BAPAZ5, tanto en medio f/2 como en medio GSe, siendo superior en éste último (0.78 ± 0.28 y 0.97 ± 0.24 unidades de $\text{área} \cdot \text{cel}^{-1}$, respectivamente). El aislado BAPAZ7 fue el segundo lugar, produciendo la misma cantidad de toxina en ambos medios (0.67 ± 0.15 y 0.67 ± 0.13 unidades de $\text{área} \cdot \text{cel}^{-1}$, respectivamente). El aislado 62L produjo cantidades mucho menores comparativamente (0.07 ± 0.02 y 0.14 ± 0.03 unidades de $\text{área} \cdot \text{cel}^{-1}$ en medio f/2 y GSe, respectivamente, es decir, 11 y 7 veces menor que en BAPAZ5). En el aislado GCCV7 no se detectó esta toxina en medio f/2 y en GSe se detectó en la menor cantidad en comparación con el resto de los aislados (0.05 ± 0.01 unidades de $\text{área} \cdot \text{cel}^{-1}$) (Fig. 39).

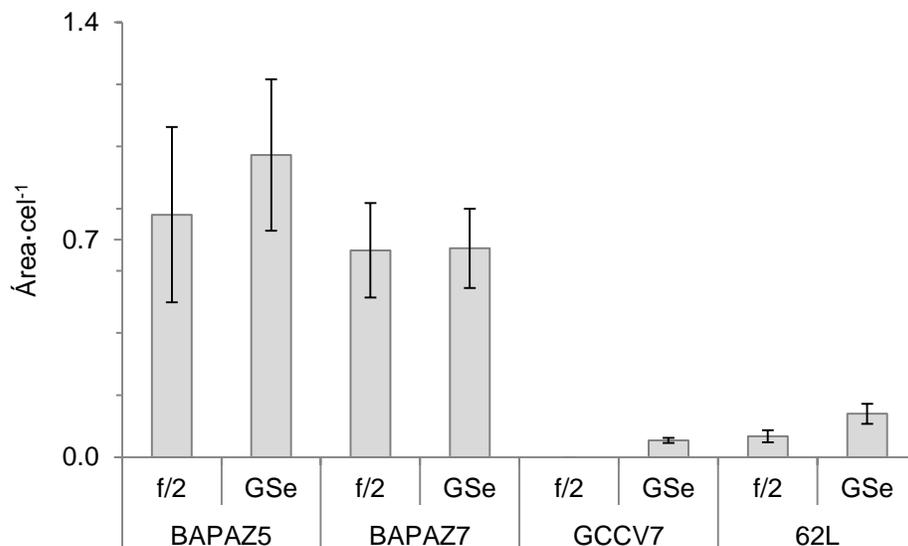


Fig. 39. Toxina GC1b en los cuatro aislados de *Gymnodinium catenatum* en el medio GSe y f/2.

6.4.2 Toxina GC2b

La sumatoria de las áreas de la toxina GC2b durante todo el cultivo muestra que la mayor cantidad fue producida por el aislado BAPAZ7, en medio f/2, seguida de BAPAZ5 en medio GSe (1.22 ± 0.27 y 1.02 ± 0.25 unidades de área·cel⁻¹, respectivamente). Nuevamente, los aislados GCCV7 y 62L presentaron la menor cantidad de toxina en comparación con BAPAZ5 y BAPAZ7, siendo GCCV7 en medio f/2 la menor de todas (0.19 ± 0.07 unidades de área·cel⁻¹) (Fig. 40).

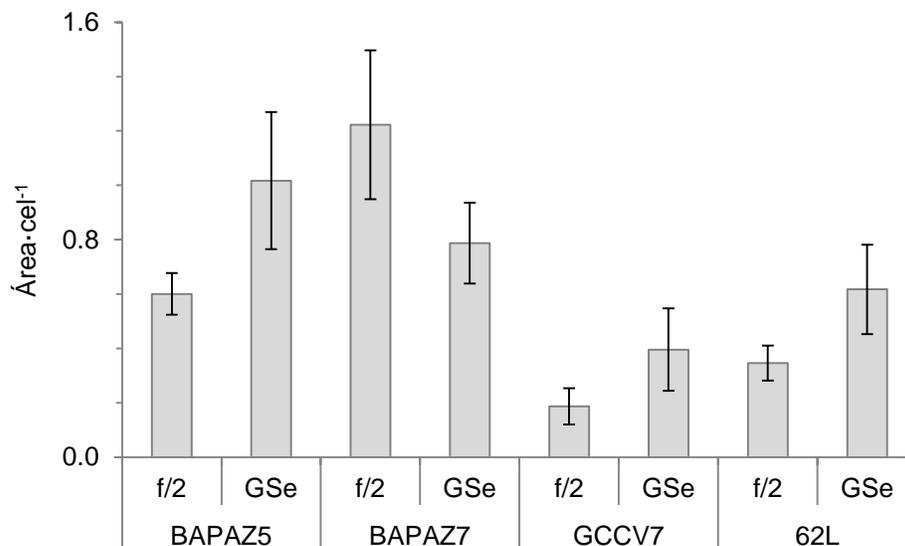


Fig. 40. Toxina GC2b en los cuatro aislados de *Gyrodinium catenatum* en el medio GSe y f/2.

6.4.3 Toxinas GC1/2

La sumatoria de las áreas de las toxinas GC1/2 durante todo el cultivo muestra que la mayor cantidad fue producida por el aislado BAPAZ5 en ambos medios (7.7 ± 1.9 y 13.5 ± 3.8 unidades de área·cel⁻¹, en medio f/2 y GSe, respectivamente). En segundo lugar se encuentra el aislado BAPAZ7 (7.4 ± 2.0 y 9.3 ± 1.6 unidades de área·cel⁻¹, en medio f/2 y GSe, respectivamente). Los aislados GCCV7 y 62L presentaron la menor cantidad de toxina en comparación con BAPAZ5 y BAPAZ7, siendo 62L en medio f/2 la menor de todas (1.1 ± 0.1 unidades de área·cel⁻¹). En todos los casos, la mayor cantidad de toxina se observó en medio GSe en comparación con f/2 (Fig. 41).

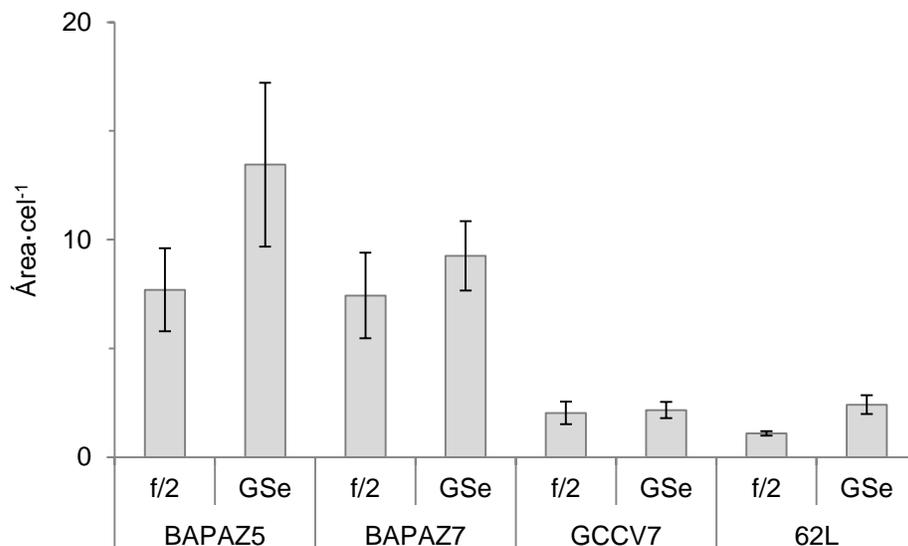


Fig. 41. Toxinas GC1/2 en los cuatro aislados de *Gymnodinium catenatum* en el medio GSe y f/2.

6.4.4 Toxina GC3

La sumatoria de las áreas de la toxina GC3 durante todo el cultivo muestra que la mayor cantidad fue producida por el aislado BAPAZ5 en medio GSe (26.1 ± 4.2 unidades de $\text{área} \cdot \text{cel}^{-1}$), seguida de BAPAZ7 en medio f/2 (23.6 ± 5.2 unidades de $\text{área} \cdot \text{cel}^{-1}$). En esta toxina, BAPAZ5 en medio f/2 presentó niveles inusualmente bajos en comparación con el comportamiento observado en el resto de las toxinas GC; niveles casi tan bajos como el observado en 62L en medio f/2, que fue el menor de todos (8.1 ± 0.7 unidades de $\text{área} \cdot \text{cel}^{-1}$) (Fig. 42).

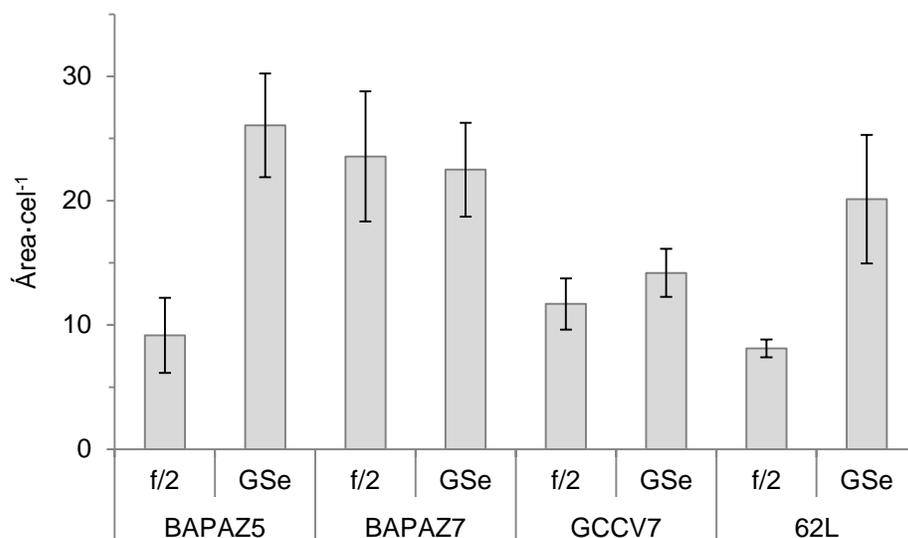


Fig. 42. Toxina GC3 en los cuatro aislados de *Gymnodinium catenatum* en el medio GSe y f/2.

6.4.5 Análisis de las toxinas tipo benzoil por HILIC-MS/MS

El análisis de las toxinas tipo benzoil por HILIC-MS/MS se realizó a partir de la fracción con 20% metanol, únicamente del aislado 62L para fines comparativos. Debido a la aparente baja sensibilidad de la técnica, pero principalmente debido a la baja concentración de las muestras, sólo fue posible detectar tres toxinas en estas muestras: GC1, GC1a y GC4. Ya que no se cuenta con estándares, los datos se reportan en área · célula⁻¹.

Los resultados muestran que en ambos medios de cultivo, estas tres toxinas tienen una tendencia similar: una concentración ligeramente alta durante la fase inicial del cultivo, una disminución durante la fase final de crecimiento exponencial y un máximo al final de la curva de crecimiento, durante la fase de decaimiento, con la excepción de GC4 en el medio f/2, en el que la concentración inicial fue la mayor y se observó una disminución al final de la fase exponencial. En todos los casos, la concentración de toxinas fue mayor en el medio GSe (Figs. 43 y 44).

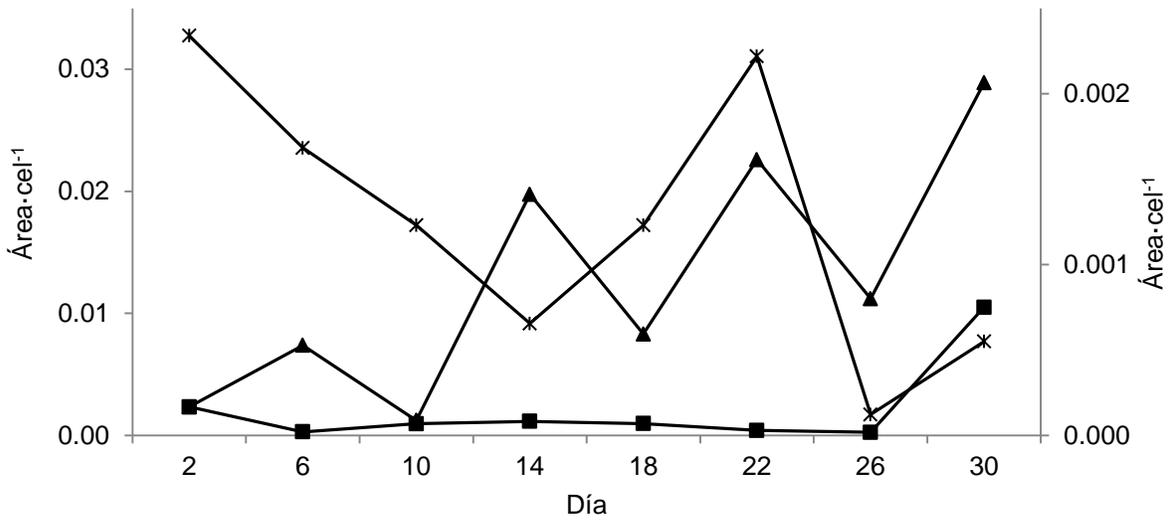


Fig. 43. Toxinas tipo benzoil en el aislado 62L en medio f/2, identificadas por HILIC-MS/MS. Cuadros: GC1; triángulos: GC1a; estrellas: GC4. Debido a la menor concentración de GC4, esta toxina corresponde al eje vertical de la derecha.

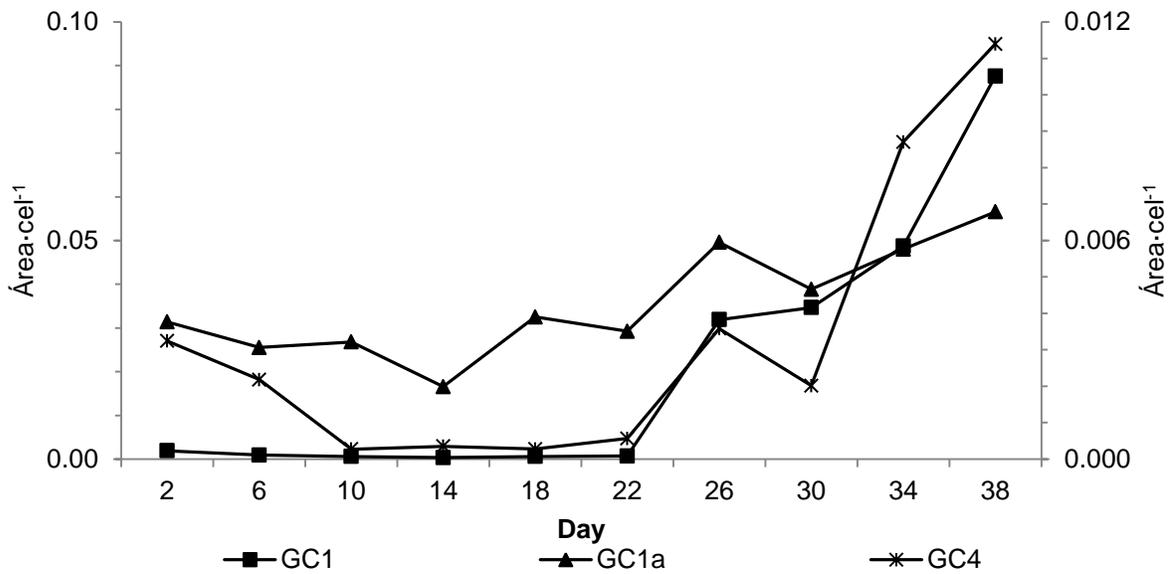


Fig. 44. Toxinas tipo benzoil en el aislado 62L en medio GSe, identificadas por HILIC-MS/MS. Cuadros: GC1; triángulos: GC1a; estrellas: GC4. Debido a la menor concentración de GC4, esta toxina corresponde al eje vertical de la derecha.

6.4.6 Variación de las toxinas tipo benzoil de los cuatro aislados

El análisis de la variación de las toxinas tipo benzoil se realizó a partir de los datos obtenidos por HPLC-FLD. Al igual que las toxinas hidrofílicas, las toxinas tipo benzoil mostraron variaciones durante el cultivo, aunque no se observaron tendencias de manera clara o directa. En las Figuras 45 – 48 se muestran las variaciones por toxina en cada medio de cultivo en los cuatro aislados de *G. catenatum*.

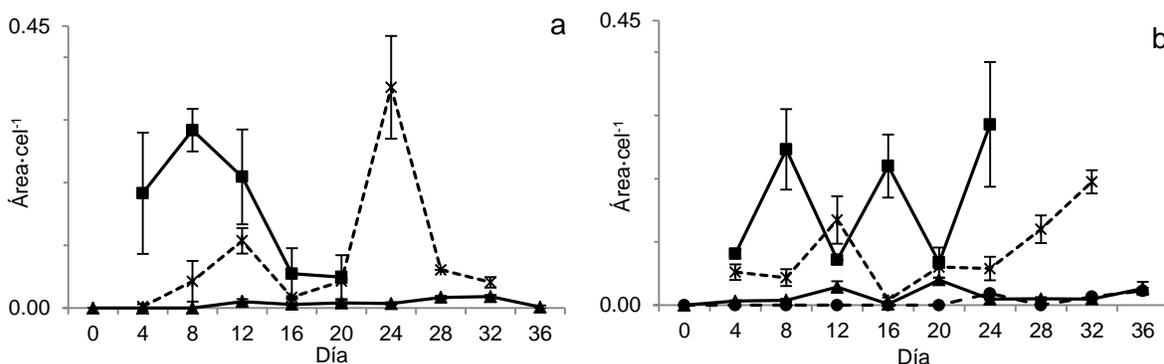


Fig. 45. Variaciones de la toxina GC1b en los cuatro aislados.
a) medio f/2. b) medio GSe. Cuadros: BAPAZ5; estrellas: BAPAZ7; círculos GCCV7; triángulos 62L.

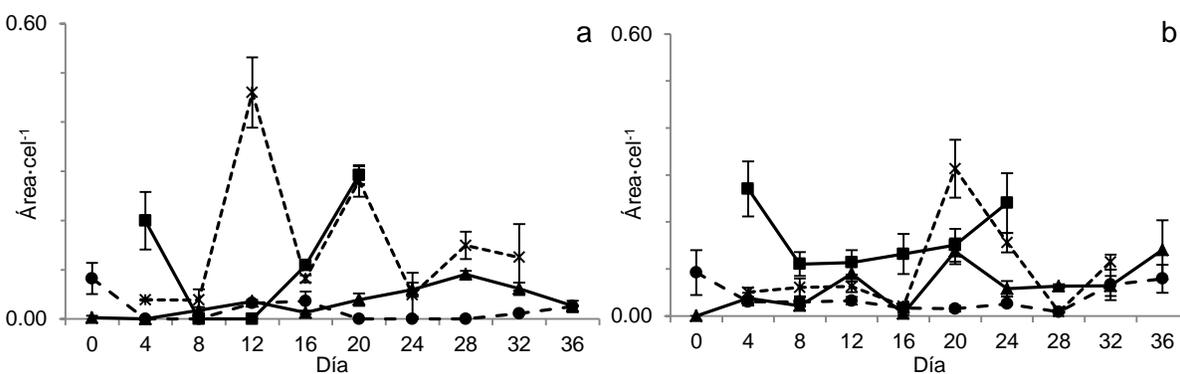


Fig. 46. Variaciones de la toxina GC2b en los cuatro aislados.
a) medio f/2. b) medio GSe. Cuadros: BAPAZ5; estrellas: BAPAZ7; círculos GCCV7; triángulos 62L.

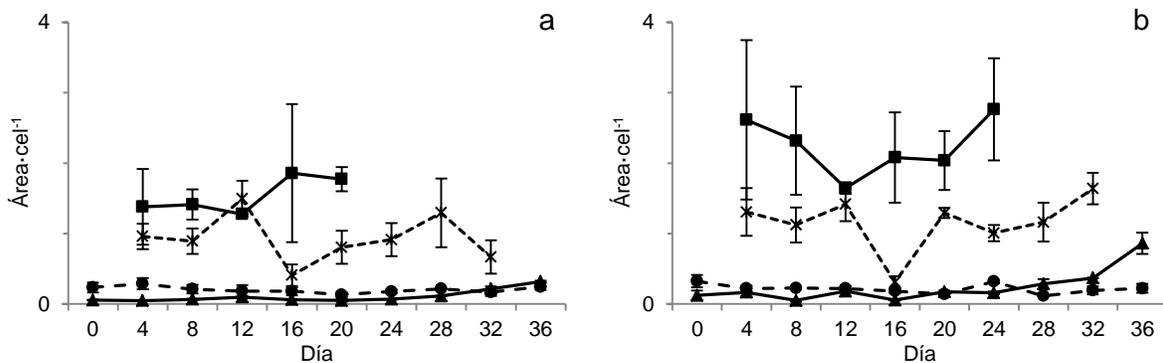


Fig. 47. Variaciones de las toxinas GC1/2 en los cuatro aislados.
a) medio f/2. b) medio GSe. Cuadros: BAPAZ5; estrellas: BAPAZ7; círculos GCCV7; triángulos 62L.

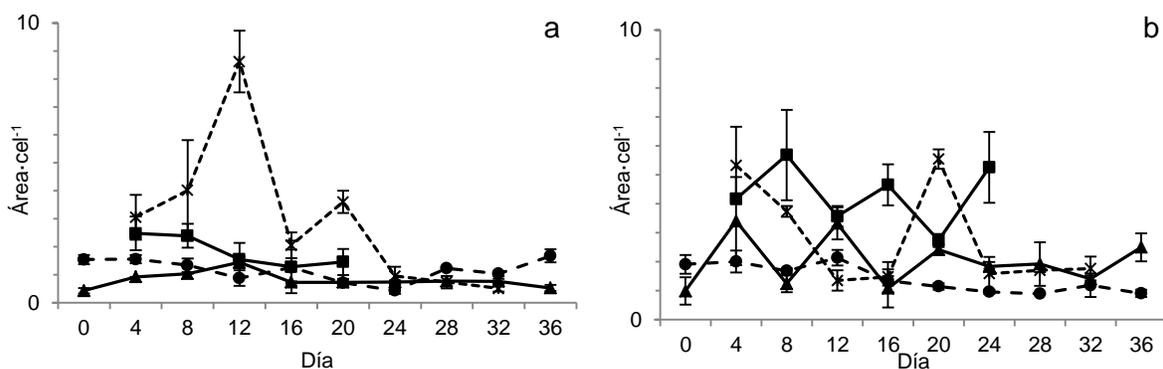


Fig. 48. Variaciones de la toxina GC3 en los cuatro aislados.
a) medio f/2. b) medio GSe. Cuadros: BAPAZ5; estrellas: BAPAZ7; círculos: GCCV7; triángulos: 62L.

6.4.7 Relaciones entre las toxinas tipo benzoil

Se encontraron relaciones entre algunas toxinas tipo benzoil en todos los aislados y medios, con la única excepción del aislado GCCV7 en medio f/2, sin embargo, no fueron constantes en todos los aislados y medios.

Las relaciones encontradas se dividieron en relaciones directas y relaciones indirectas. Se consideró que la relación es directa cuando las unidades de área·cel⁻¹ de las toxinas aumentan y disminuyen de manera similar, aunque suceda en una escala distinta. Se consideró que la relación es inversa cuando estas cantidades aumentan y disminuyen inversamente.

Una relación directa podría indicar que las toxinas son producidas al mismo tiempo y responden a las condiciones de la misma manera. Una relación inversa podría indicar que las toxinas que disminuyen en cantidad son las precursoras de las que aumentan.

Se encontraron 19 relaciones directas y sólo en BAPAZ5 se encontraron relaciones inversas, sin embargo no se encontró una relación en todos los aislados o medios.

Relaciones directas

Se encontró un total de 19 relaciones directas entre toxinas tipo benzoil. El aislado GCCV7 en medio f/2 fue el único que no presentó este tipo de relación.

Los aislados cultivados en medio GSe fueron los que mayor cantidad de relaciones directas mostraron, y la relación entre las toxinas GC2b y GC1/2 fue la que se encontró con mayor frecuencia (Tabla 13, Figs. 49 - 55).

Tabla 13. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil en los cuatro aislados, en los dos medios de cultivo.

Aislado / medio	GC1b – GC1/2	GC1b – GC2b	GC1b – GC3	GC2b – GC1/2	GC2b – GC3	GC1/2 – GC3	Total por aislado
BAPAZ5 f/2			X				1
BAPAZ5 GSe	X		X			X	3
BAPAZ7 f/2				X	X	X	3
BAPAZ7 GSe	X			X	X		3
GCCV7 f/2							0
GCCV7 GSe	X	X		X			3
62L f/2		X					1
62L GSe		X	X	X	X	X	5
Total por relación	3	3	3	4	3	3	19

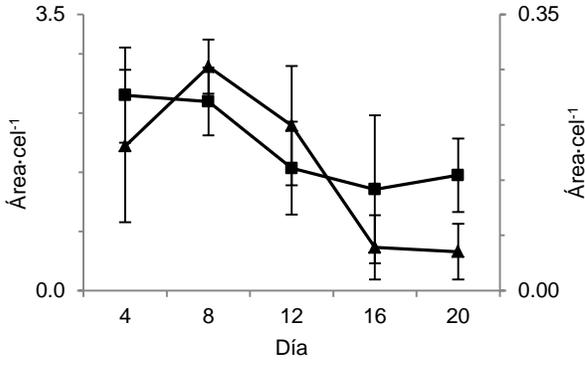


Fig. 49. Relación directa entre toxinas tipo benzoil en BAPAZ5 en medio f/2. Cuadros: GC3; triángulos: GC1b

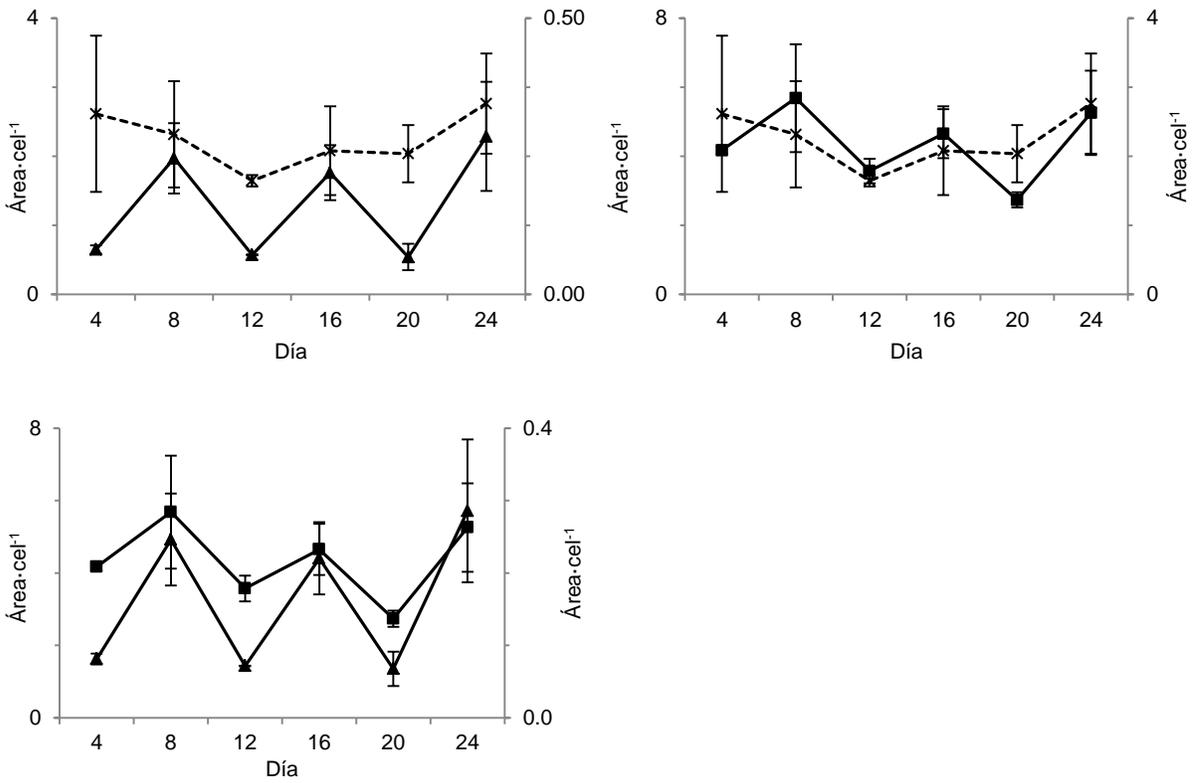


Fig. 50. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil en BAPAZ5 en medio GSe. Estrellas: GC1/2; triángulos: GC1b; cuadros: GC3.

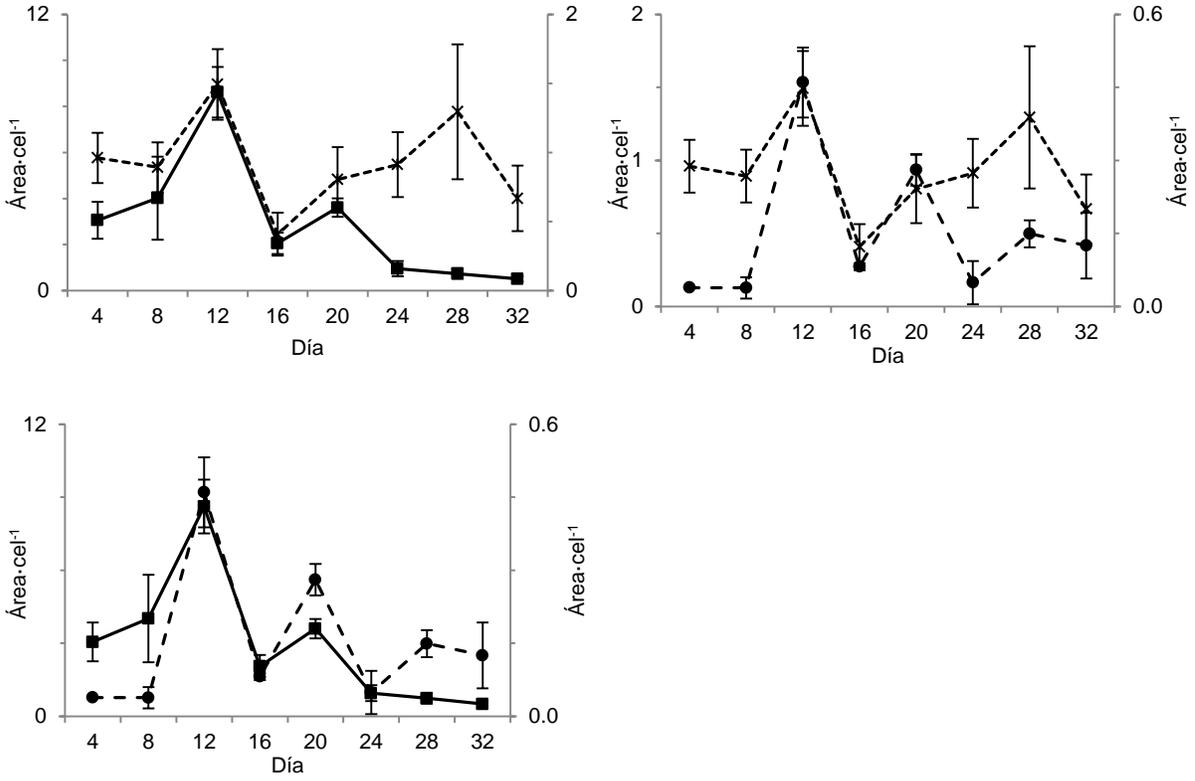
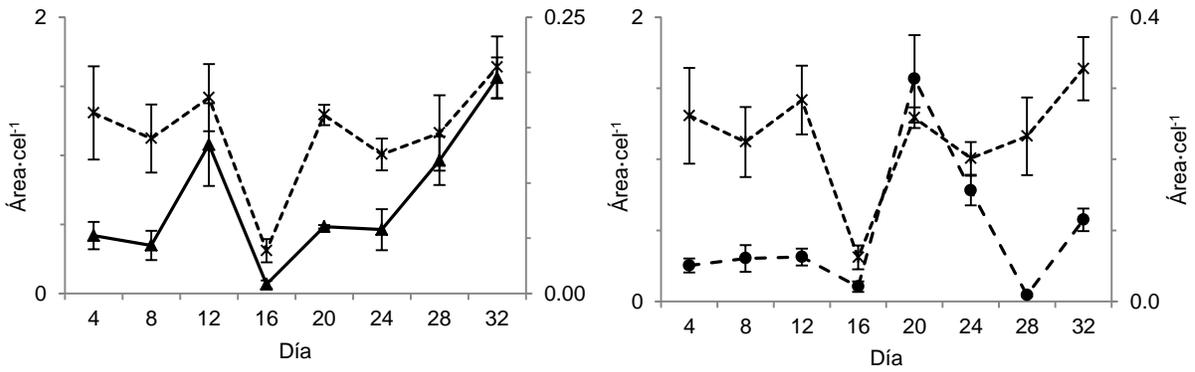


Fig. 51. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil en BAPAZ7 en medio f/2. Estrellas: GC1/2; cuadros: GC3; círculos GC2b.



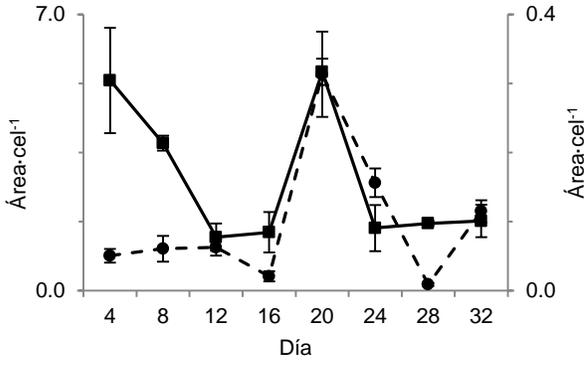


Fig. 52. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoin en BAPAZ7 en medio GSe. Estrellas: GC1/2; triángulos: GC1b; cuadros: GC3; círculos GC2b.

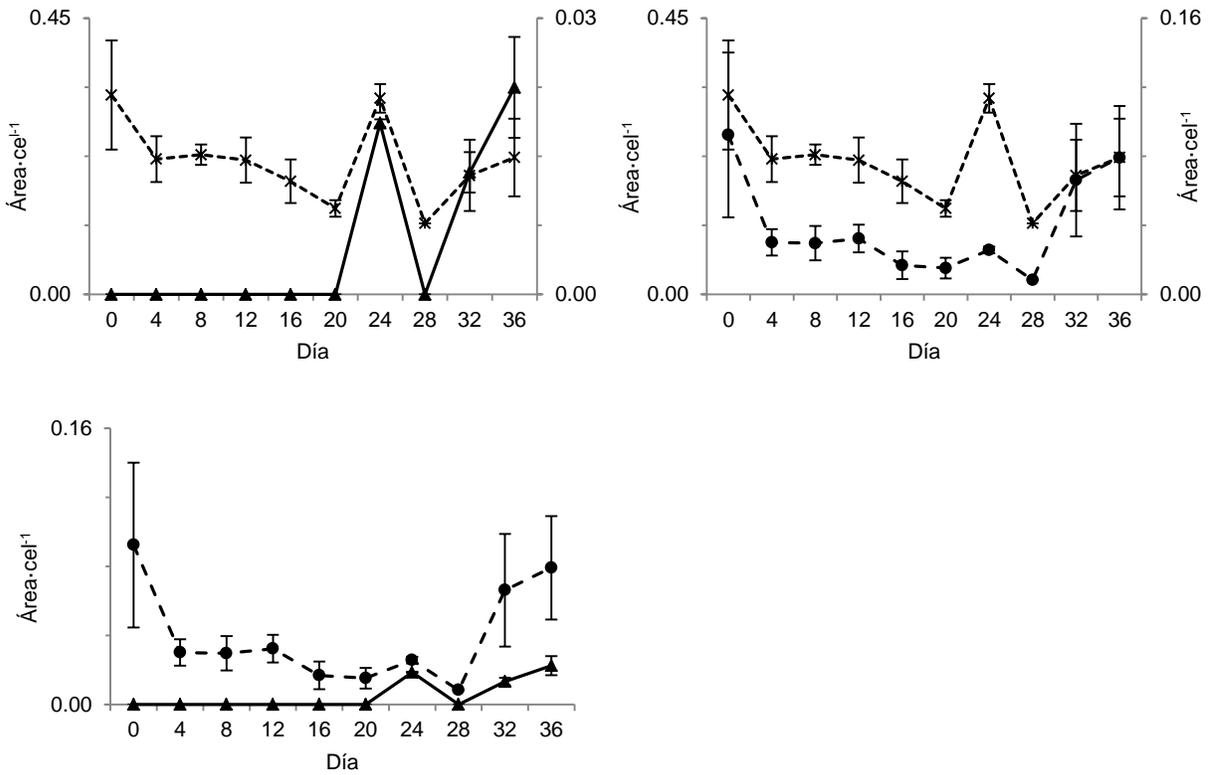


Fig. 53. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoin en GCCV7 en medio GSe. Estrellas: GC1/2; triángulos: GC1b; círculos GC2b.

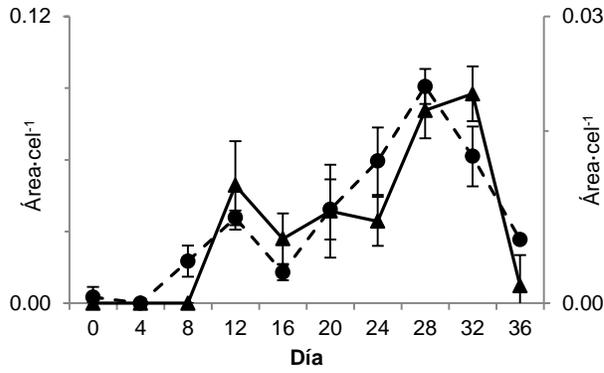
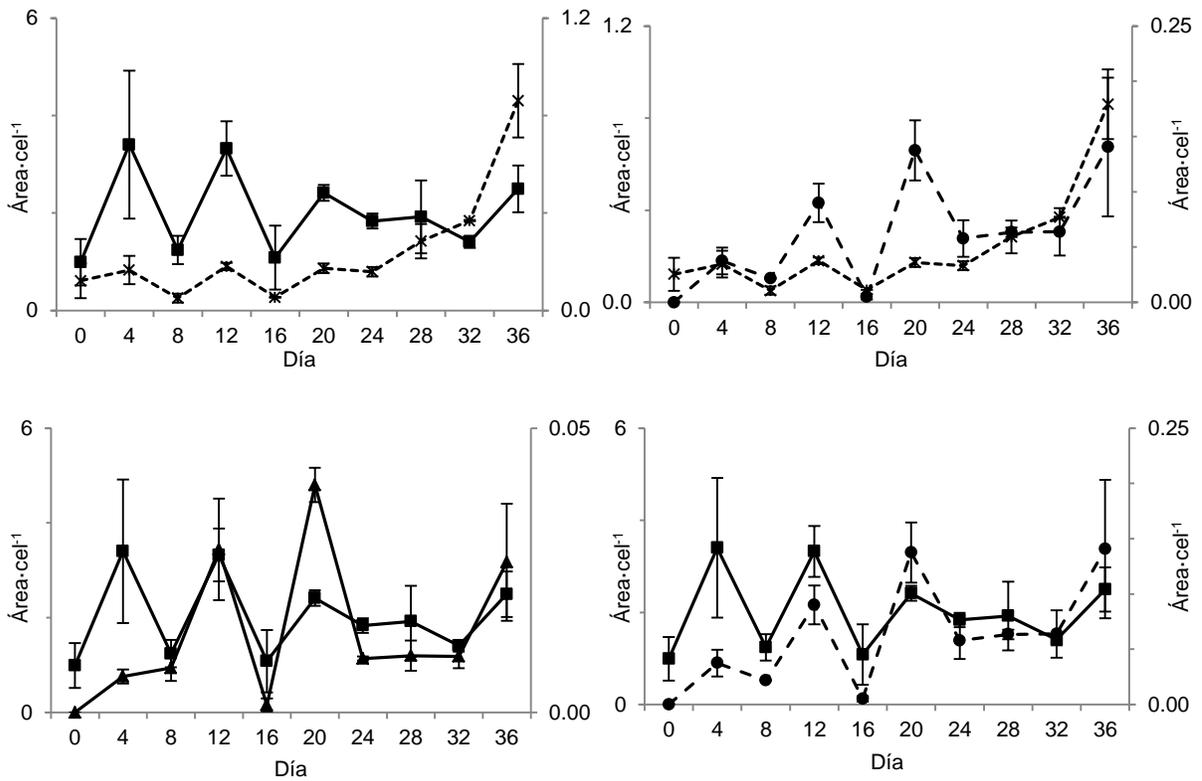


Fig. 54. Relación directa entre toxinas tipo benzoin en 62L en medio f/2. Triángulos: GC1b; círculos GC2b.



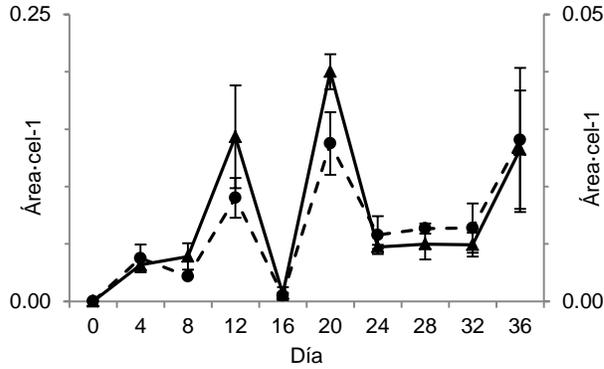


Fig. 55. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil en 62L en medio GSe. Cuadros: GC3; estrellas: GC1/2; círculos GC2b triángulos: GC1b.

Relaciones inversas

Únicamente se encontraron tres relaciones inversas y fue en el aislado BAPAZ5 en medio f/2, entre las toxinas GC1b - GC1/2, GC1b - GC2b y GC1/2 - GC3 (Fig. 56).

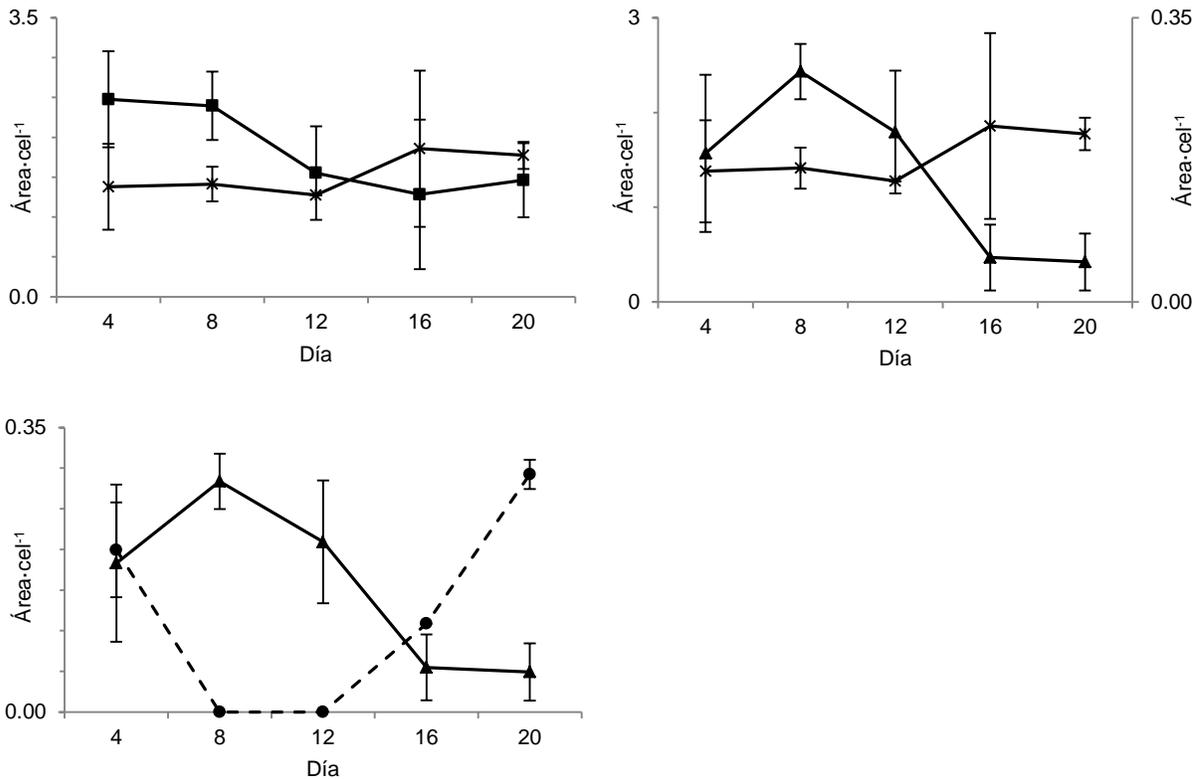


Fig. 56. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil en BAPAZ5 en medio f/2. Cuadros: GC3; estrellas: GC1/2; círculos GC2b triángulos: GC1b.

6.5 Relación de las toxinas decarbamoil y las toxinas tipo benzoil

Debido a que *G. catenatum* es la única especie conocida hasta ahora en producir toxinas tipo benzoil y también toxinas decarbamoil, se analizaron las relaciones que estos dos tipos de toxinas pudieran presentar, ya que de haberlas podría significar que son producidas al mismo tiempo o que unas son precursoras de otros análogos.

En efecto, se encontraron algunas relaciones entre toxinas tipo benzoil y toxinas decarbamoil, sin embargo, no fue en todos los aislados y medios, y no fueron constantes. Se dividieron en relaciones directas e inversas, bajo los mismos parámetros que las relaciones entre toxinas tipo benzoil.

Se realizó el análisis de 16 tipos de relaciones en los 3 aislados y los dos medios de cultivo (192 relaciones: 92 directas y 92 inversas), encontrándose 13 variaciones directas y 21 inversas (Tabla 14).

Tabla 14. Relaciones analizadas y encontradas entre toxinas tipo benzoil y toxinas decarbamoil.

Toxina tipo benzoil	Toxina decarbamoil	Directas	Inversas
GC1b	dcSTX	1	2
	dcNEO	1	1
	dcGTX2	1	0
	dcGTX3	0	1
GC2b	dcSTX	1	1
	dcNEO	1	2
	dcGTX2	0	0
	dcGTX3	0	2
GC1/2	dcSTX	0	0
	dcNEO	2	1
	dcGTX2	2	2
	dcGTX3	1	1
GC3	dcSTX	0	2
	dcNEO	2	3
	dcGTX2	0	2
	dcGTX3	1	1
Total		13	21

Relaciones directas

Se encontraron 13 relaciones directas entre toxinas tipo benzoil y toxinas decarbamoil. Los aislados BAPAZ7 en medio f/2 y 62L en medio GSe no presentaron relaciones directas (Tabla 15, Figs. 57 - 59).

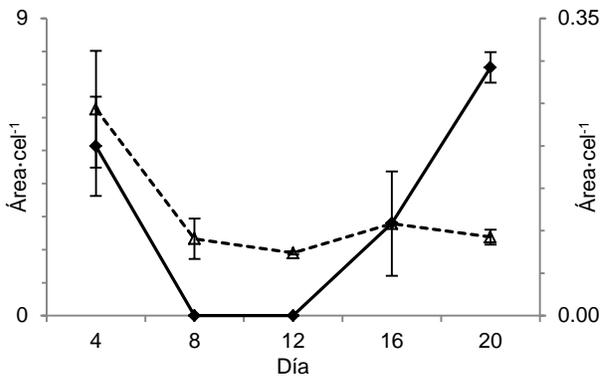
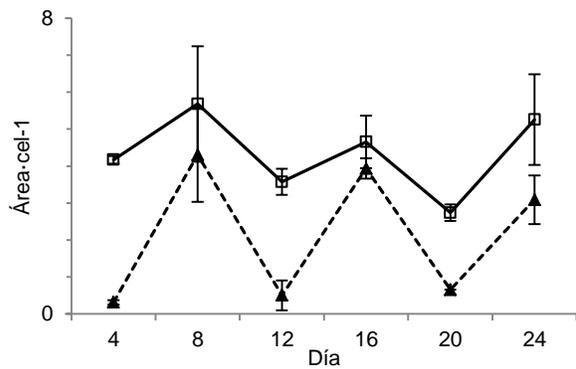
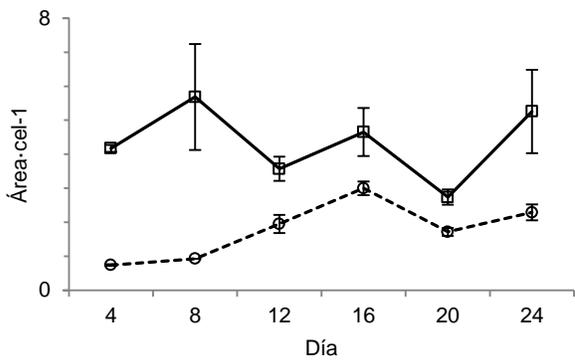
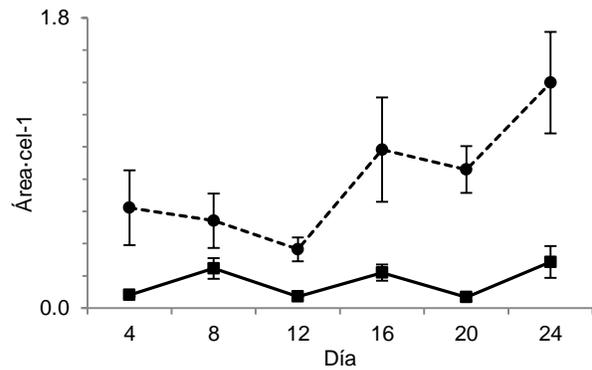
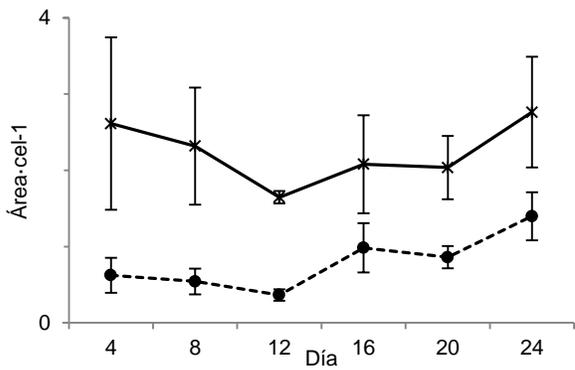


Fig. 57. Relación directa entre toxinas tipo benzoiil y decarbamoil en BAPAZ5 en medio f/2. Triángulos sin relleno: dcSTX; rombos negros: GC2b.



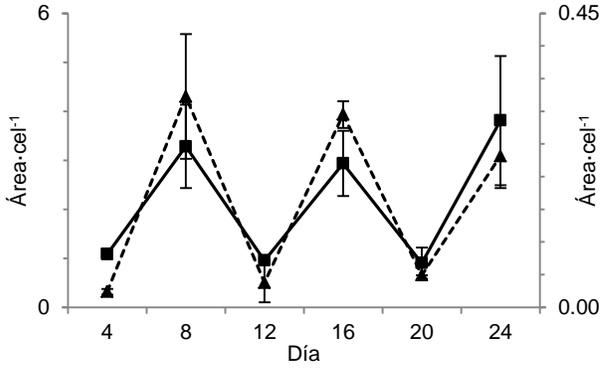


Fig. 58. Relaciones directa entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en BAPAZ5 en medio GSe. Estrellas: GC1-2; círculos negros: dcGTX2; cuadros negros: GC1b, cuadros sin relleno: GC3; círculos sin relleno: dcGTX3, triángulos negros: dcNEO.

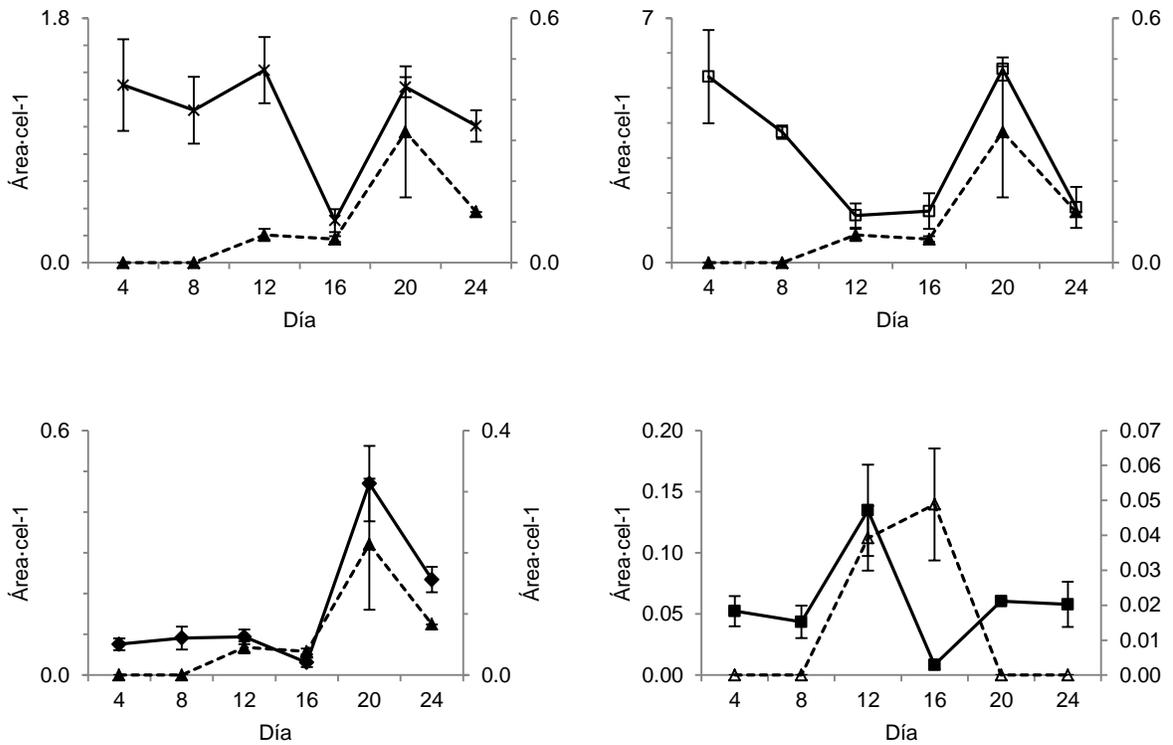


Fig. 59. Relaciones directa entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en BAPAZ7 en medio GSe. Estrellas: GC1-2; círculos negros: dcGTX2; cuadros negros: GC1b, cuadros sin relleno: GC3; círculos sin relleno: dcGTX3, triángulos negros: dcNEO, rombos negros: GC2b; triángulos sin relleno: dcSTX.

Relaciones inversas

Se encontraron un total de 21 relaciones inversas en todos los aislados y medios, con excepción de BAPAZ5 en medio GSe, que no presentó ninguna relación de este tipo (Tabla 16, Figs. 60 – 64).

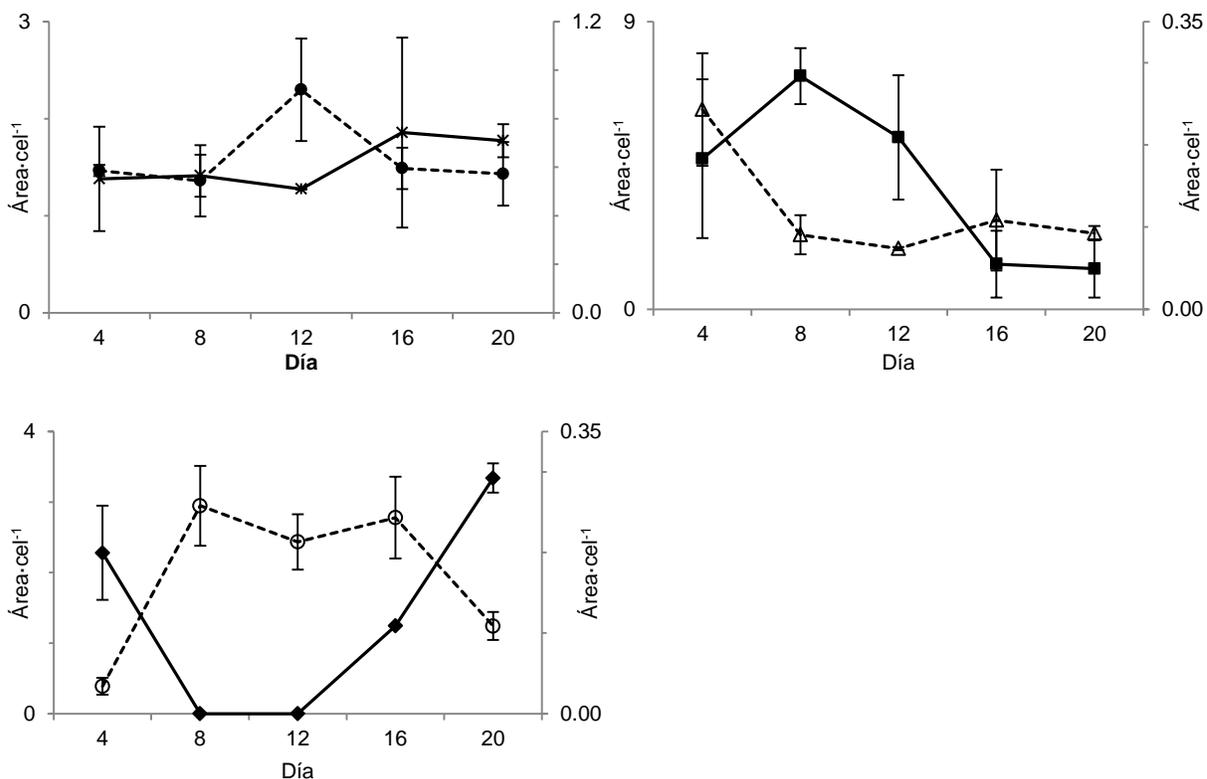


Fig. 60. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en BAPAZ5 en medio f/2. Estrellas: GC1-2; círculos negros: dcGTx2; cuadros negros: GC1b, círculos sin relleno: dcGTx3, rombos negros: GC2b; triángulos sin relleno: dcSTX.

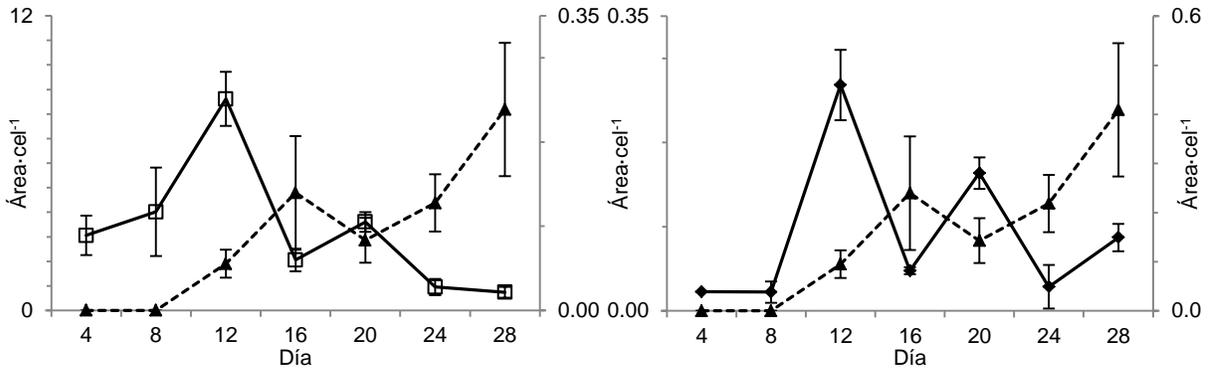


Fig. 61. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en BAPAZ7 en medio f/2. Cuadros sin relleno: GC3; triángulos negros: dcNEO; rombos negros: GC2b.

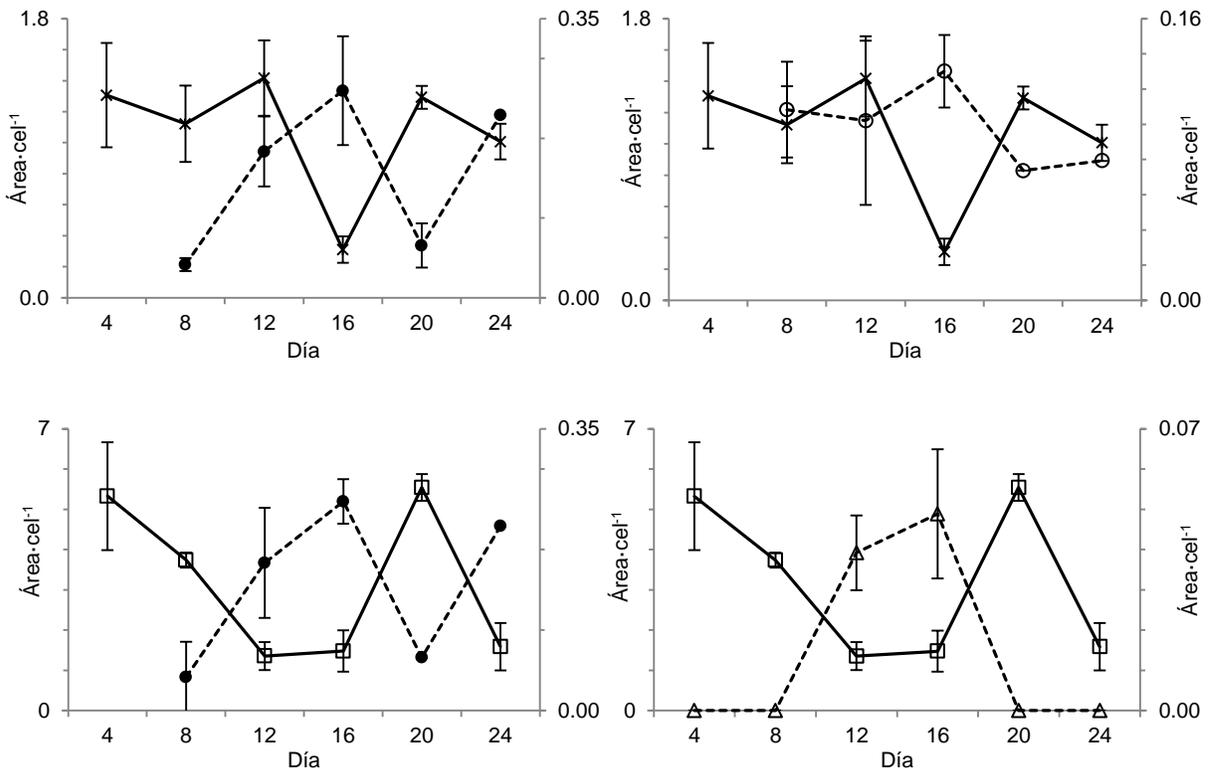


Fig. 62. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en BAPAZ7 en medio GSe. Estrellas: GC1/2; círculos negros: dcGTX2; círculos sin relleno: dcGTX3; cuadros sin relleno: GC3; triángulos sin relleno: dcSTX.

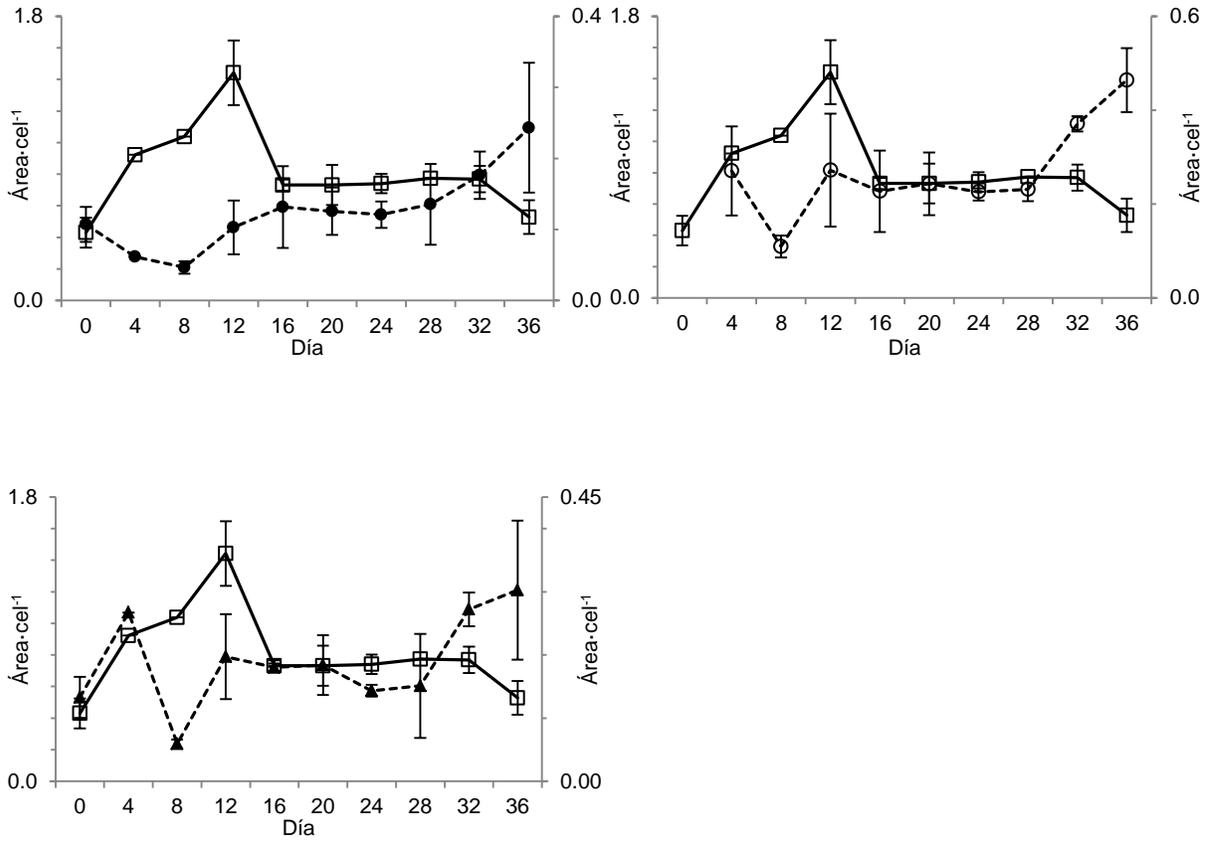
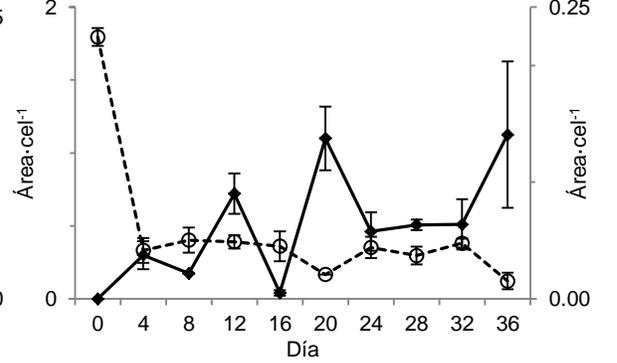
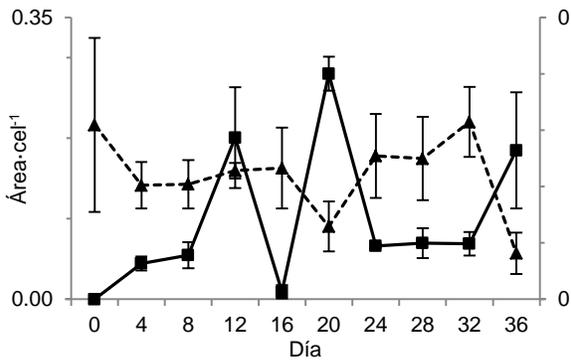
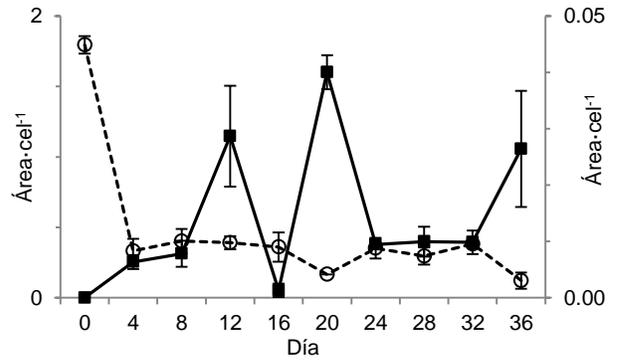
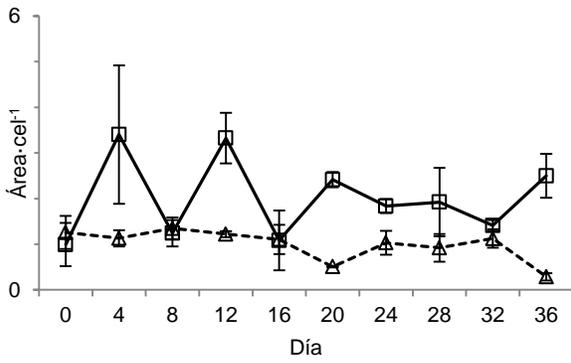
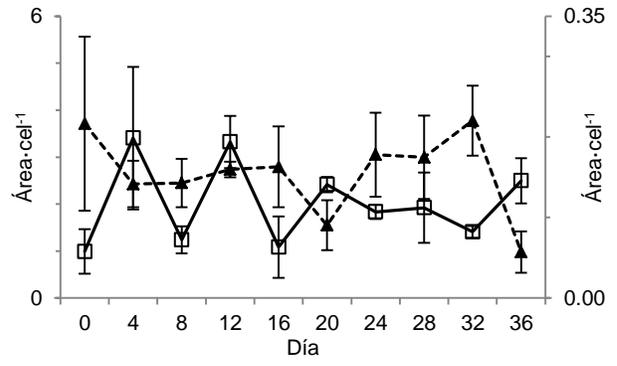
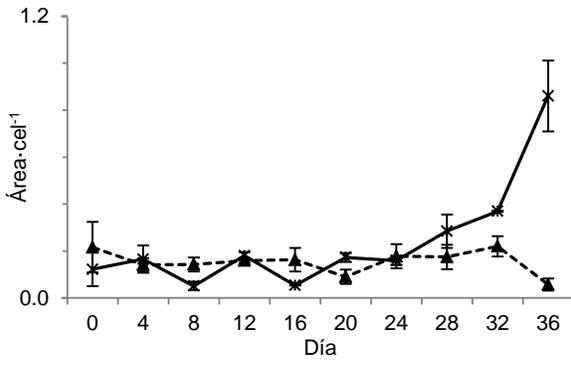


Fig. 63. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en 62L en medio f/2. Círculos negros: dcGTx2; círculos sin relleno: dcGTx3; cuadros sin relleno: GC3; triángulos negros: dcNEO.



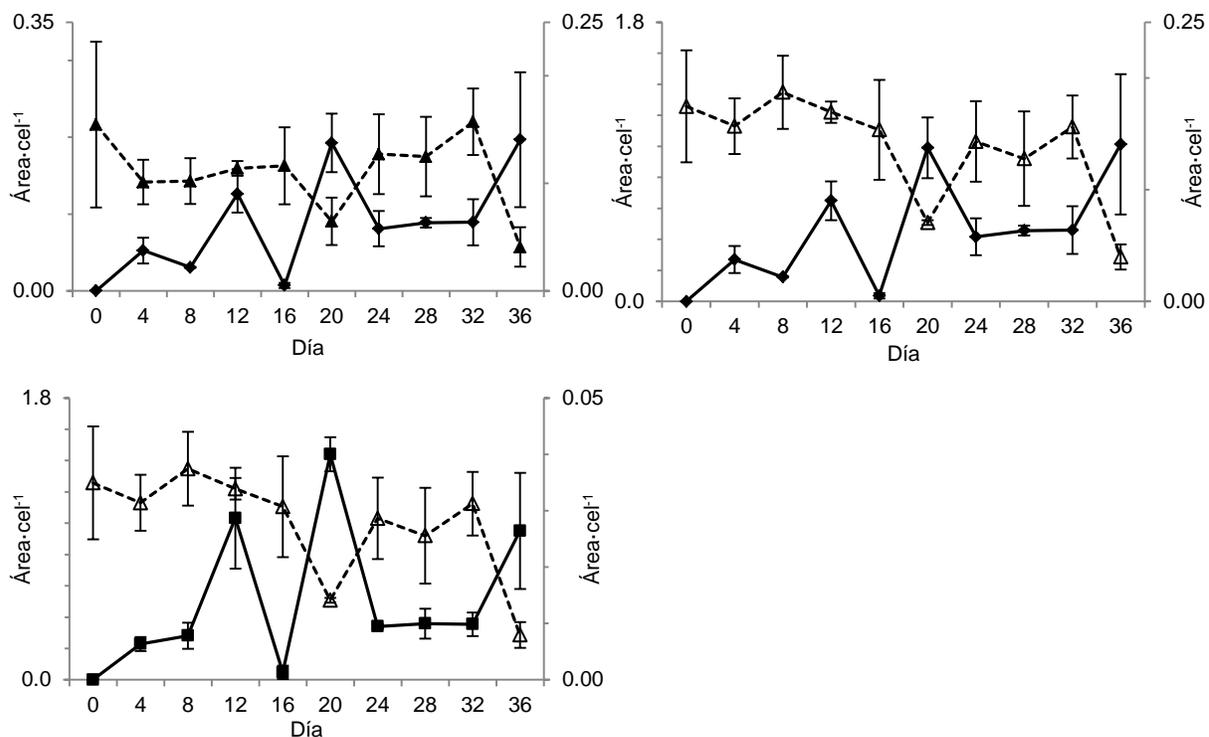


Fig. 64. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y decarbamoil en 62L en medio GSe.
 Triángulos negros: dcNEO; estrellas: GC1/2; cuadros sin relleno: GC3; triángulos negros: dcNEO;
 triángulos sin relleno: dcSTX; círculos sin relleno: dcGTX3; cuadros negros: GC1b; rombos negros:
 GC2b.

Tabla 15. Relaciones directas entre toxinas tipo benzoil y toxinas decarbamoil.

Aislado / medio	GC1b - dcSTX	GC1b - dcNEO	GC1b - dcGTX2	GC2b - dcSTX	GC2b - dcNEO	GC1/2 - dcNEO	GC1/2 - dcGTX2	GC1/2 - dcGTX3	GC3 - dcNEO	GC3 - dcGTX3	Total por aislado
BAPAZ5 f/2				X							1
BAPAZ5 GSe		X	X				X		X	X	5
BAPAZ7 f/2											0
BAPAZ7 GSe	X				X	X			X		4
62L f/2						X	X	X			3
62L GSe											0
Total por relación	1	1	1	1	1	2	2	1	2	1	13

Tabla 16. Relaciones inversas entre toxinas tipo benzoil y toxinas decarbamoil.

Aislado / medio	GC1b - dcSTX	GC1b - dcNEO	GC1b - dcGTX 3	GC2b - dcSTX	GC2b - dcNEO	GC2b - dcGTX 3	GC1/2 - dcNEO	GC1/2 - dcGTX 2	GC1/2 - dcGTX 3	GC3 - dcSTX	GC3 - dcNEO	GC3 - dcGTX 2	GC3 - dcGTX 3	Total por aislado
BAPAZ5 f/2	X					X		X						3
BAPAZ5 GSe														0
BAPAZ7 f/2					X						X			2
BAPAZ7 GSe							X	X	X	X		X		4
62L f/2											X	X	X	3
62L GSe	X	X	X	X	X	X	X			X	X			9
Total por relación	2	1	1	1	2	2	1	2	1	2	3	2	1	21

6.6 Aislamiento de las toxinas tipo benzoil

6.6.1 Pre-purificación en columna y rendimientos obtenidos

La biomasa obtenida de los cultivos a mayor escala fue de 29.01 g (peso húmedo), lo que representa un rendimiento de 9.67% con respecto a los 300 L de cultivo.

Se obtuvieron 2.23 g de extracto crudo (rendimiento: 7.7% con respecto a la biomasa). El peso y rendimiento de las fracciones obtenidas se detallan en la Tabla 17.

Tabla 17. Pesos y rendimientos (con respecto al extracto crudo) de las fracciones obtenidas para el aislamiento de toxinas GC.

Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)
F1 (H ₂ O)	1.185	53.2
F2 (20% MeOH)	0.088	4.0
F3 (100% MeOH)	0.0174	0.8
Rendimiento total	1.29	57.9
Peso de las fracciones		

Como se observa en la Tabla 17, el rendimiento total del fraccionamiento fue de 57.9%, lo que significa que 42.1% del extracto crudo no fue recuperado de la columna.

6.6.2 Análisis de las fracciones por HILIC-MS/MS

Con el análisis por HILIC-MS/MS se encontraron 15 toxinas tipo benzoil; 12 en la fracción F2 (20% metanol) y 3 en la fracción F3 (100% metanol).

En F2 se identificaron las toxinas GC1/2 (masa 473), GC4/5, GC1a/2a (masa 489), GC4a/5a (masa 505), GC1b/2b (masa 553), GC4b/5b (masa 569) (Tabla 18, Fig. 65).

Tabla 18. Toxinas GC encontradas en la fracción F2 (20% MeOH) por HILIC-MS/MS.

Toxina GC	Masa (Da)	TR (min)
GC1	473	7.05
GC2		10.63
GC4	489	5.96
GC5		8.82
GC1a		10.50
GC2a		14.04
GC4a		6.40
GC5a	505	8.28
GC1b	553	7.02
GC2b		10.13
GC4b	569	8.85
GC5b		13.96

En la fracción F3 se identificaron las toxinas GC3 (masa 377), GC6 y/o GC3a (masa 393) (Tabla 19, Fig. 66).

Tabla 19. Toxinas GC identificadas en la fracción F3 (100% MeOH) por HILIC-MS/MS.

Toxina GC	Masa (Da)	TR (min)
GC3	377	2.30
GC6	393	2.40
GC3a		2.40

Algunas toxinas tienen la misma masa (p. ej. GC4, GC5, GC1a, GC2a, todas tienen una masa de 489) y no es posible determinar con precisión qué análogos se encuentran en la muestra. Se consideró como un supuesto que los análogos con el grupo sulfato en posición α eluyen primero que los que lo tienen en posición β , y es de esta manera como se han reportado en las tablas.

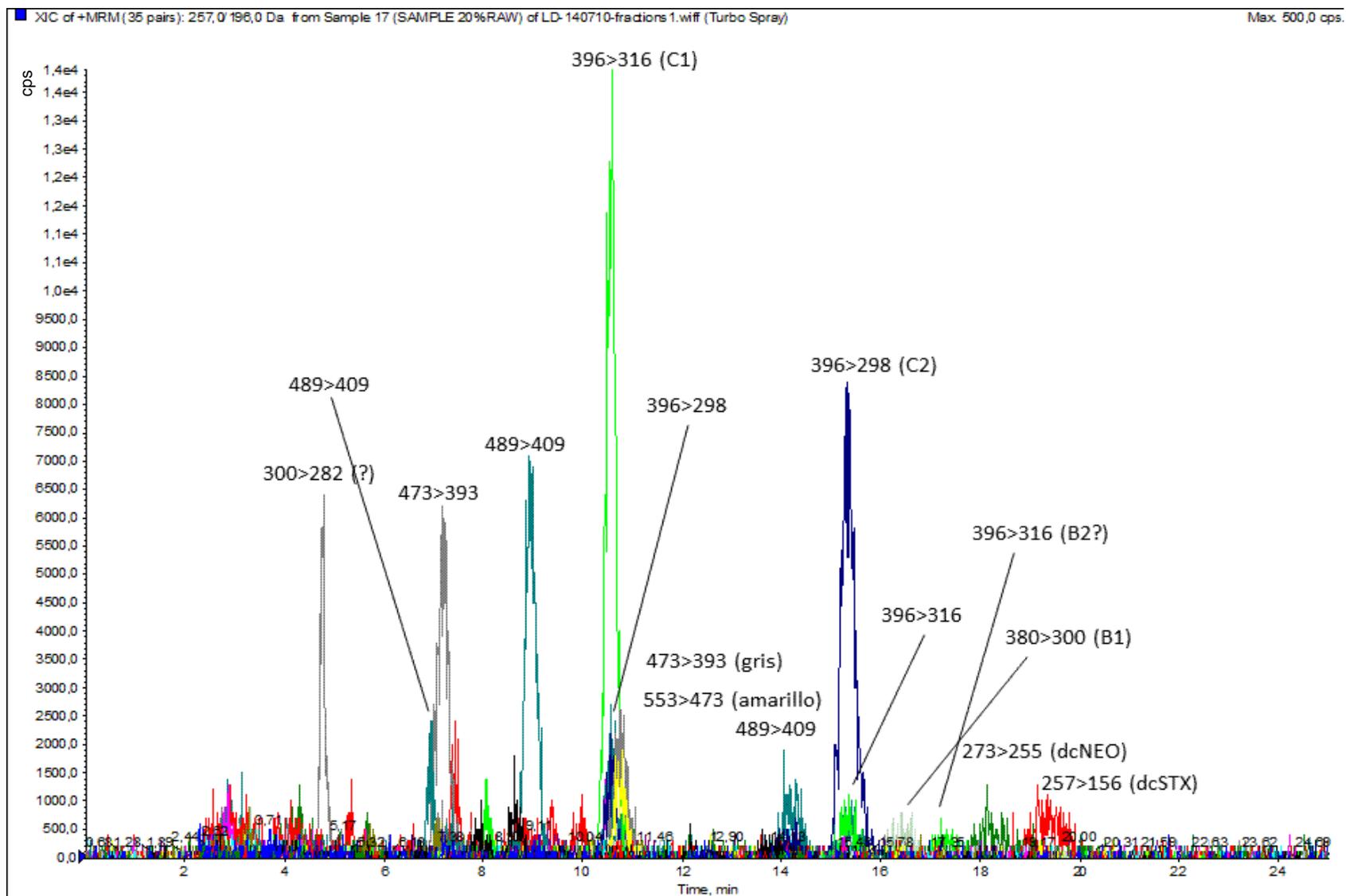


Fig. 65. Cromatograma de la fracción F2 (20% MeOH) por HILIC-MS/MS de monitoreo de reacción seleccionada (SRM) en modo de ion positivo.

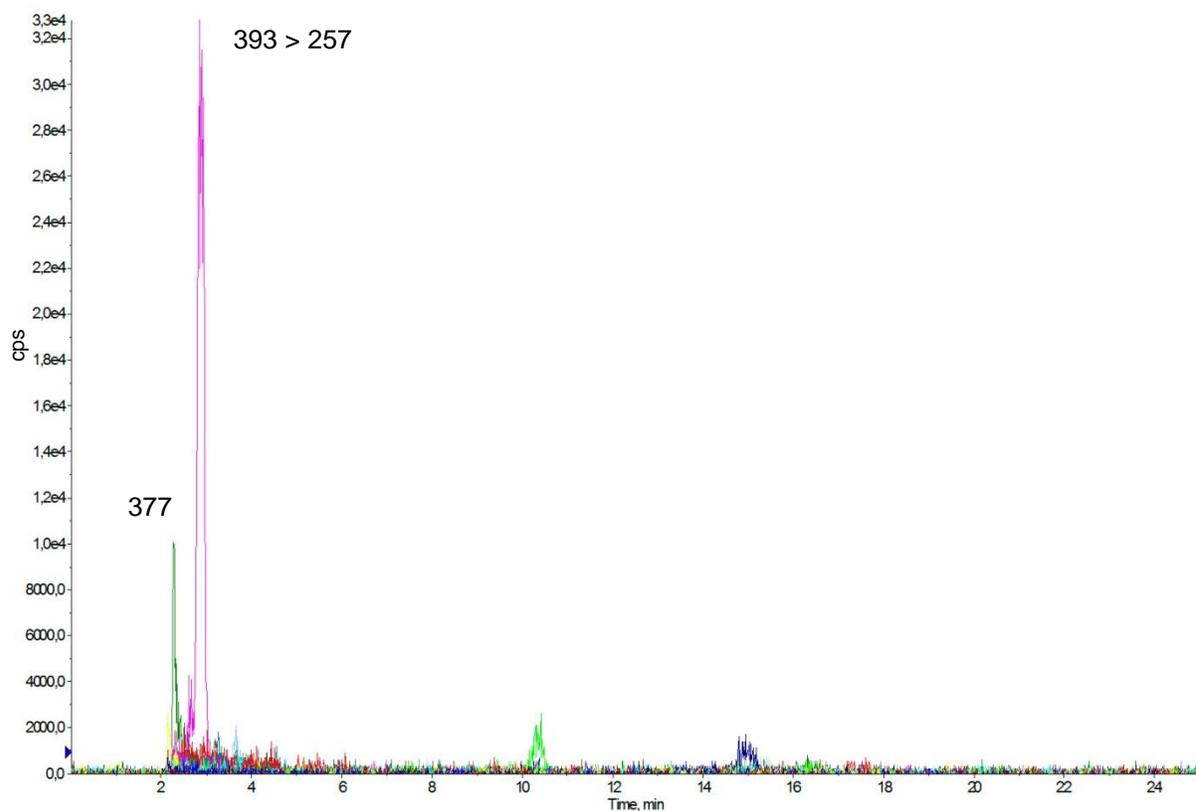


Fig. 66. Cromatograma de la fracción F3 (100% MeOH) por HILIC-MS/MS de monitoreo de reacción seleccionada (SRM) en modo de ion positivo.

6.6.3 Fraccionamiento por HILIC preparativa guiado por HILIC-MS/MS

Se sometieron a fraccionamiento por HILIC semi-preparativo las fracciones F2 (20% MeOH) y F3 (100% MeOH) por separado.

Se continuó con el fraccionamiento guiado por los resultados obtenidos en cada paso por HILIC-MS/MS. Las fracciones que contenían mayoritaria o únicamente toxinas C fueron desechadas, al igual que las fracciones en que no se observaron las masas correspondientes a las toxinas GC (Fig. 67a-c).

Fracción 2 (F2, 20% MeOH): Tomando como base los resultados obtenidos del análisis HILIC-MS/MS de la fracción semi-purificada (Fig. 65), se decidió separar en 12 fracciones en el primer paso. De éstas, únicamente la fracción F2(F2) mostró una pureza relativa de compuestos con una masa de 393, correspondiente con la masa

de la toxina GC3a. Para una mayor purificación, se sometió al proceso de separación nuevamente, sin embargo no fue posible realizar espectrometría de masas a las dos fracciones obtenidas por falta de tiempo. Estas fracciones fueron enviadas al Dr. Paulo Vale (IPMAR) en donde serán analizadas por HPLC-FLD para fines de comparación.

En las fracciones F5(F2) a F8(F2) se observaron compuestos con masas de 473 (GC1/2 y/o GC6b) y 489 (GC4/5 y/o GC1a/2a), por lo que se decidió unir estas fracciones y proceder nuevamente a su separación tomando como base un nuevo cromatograma.

En la F9(F2) se observó un compuesto con masa 489 (GC4/5 y GC1a/2a) como fracción mayoritaria, mezclada con masas correspondientes a las toxinas C1/2 (476); un segundo fraccionamiento mostró únicamente la masa de las toxinas C1/2.

En las F10(F2), F11(F2) y el enjuague (F2) únicamente se observaron las masas de las toxinas C1/2.

La mezcla de las fracciones F5(F2) a F8(F2) se denominó F5+6+7+8(F2). La separación de esta fracción mostró la coelución de toxinas C1/2 con los compuestos de masa 473, 489 y 553. Esta última masa no había sido detectada en las fracciones anteriores, probablemente debido a su baja concentración. No fue posible obtener fracciones puras, sin embargo, en la F3(F5+6+7+8(F2)) y F4(F5+6+7+8(F2)) se observaron sustancias de masa 473 y 489, respectivamente, con mayor concentración. Por este motivo, estas dos muestras se sometieron posteriormente a ¹H-RMN, con el fin de obtener más información sobre la estructura de los compuestos.

Fracción 3 (F3, 100% MeOH): Se obtuvieron 4 fracciones en el primer paso, y se identificó la toxina GC3 (masa 377) en la tercera fracción, F3(F3). El análisis por HPLC-FLD mostró compuestos desconocidos, por lo que se re-fraccionó para obtener esta toxina con mayor pureza (Figs. 67a, c).

La fracción obtenida (F2(F3(F3))) mostró una sola absorción, correspondiente a la masa 377, de la toxina GC3. Esta muestra no se sometió a análisis posteriores por

^1H RMN debido a que su estructura ya ha sido reportada por esta técnica con anterioridad.

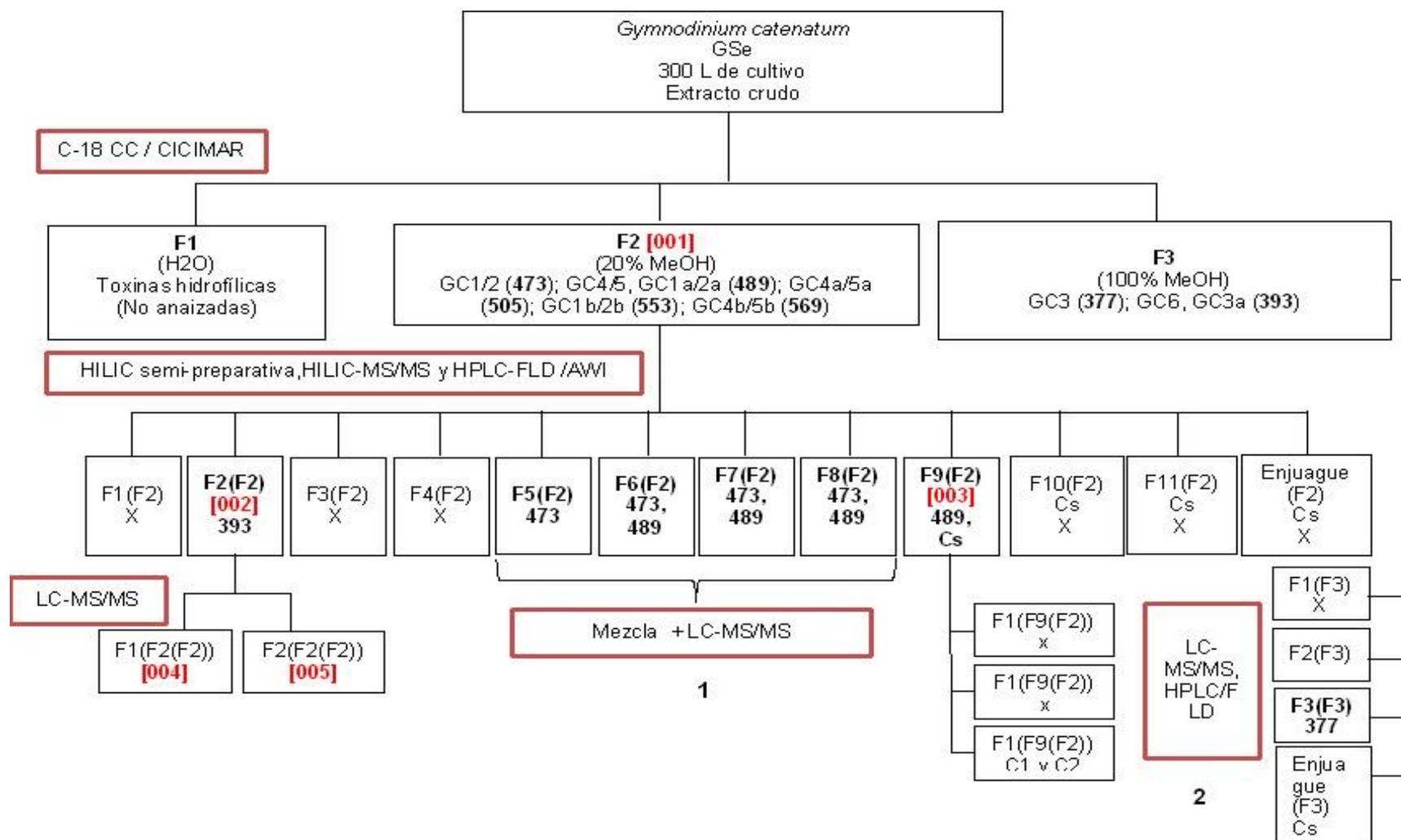


Fig. 67a. Fraccionamiento de F2 y F3 por cromatografía preparativa. Las fracciones marcadas con una x fueron desecadas. En negritas, masa encontrada en cada fracción y fracciones re-fraccionadas. Cs = toxinas C1/2. Rojo entre corchetes, muestras que se enviarán al Dr. Paulo Vale en IPMAR para un análisis por HPLC-FLD.

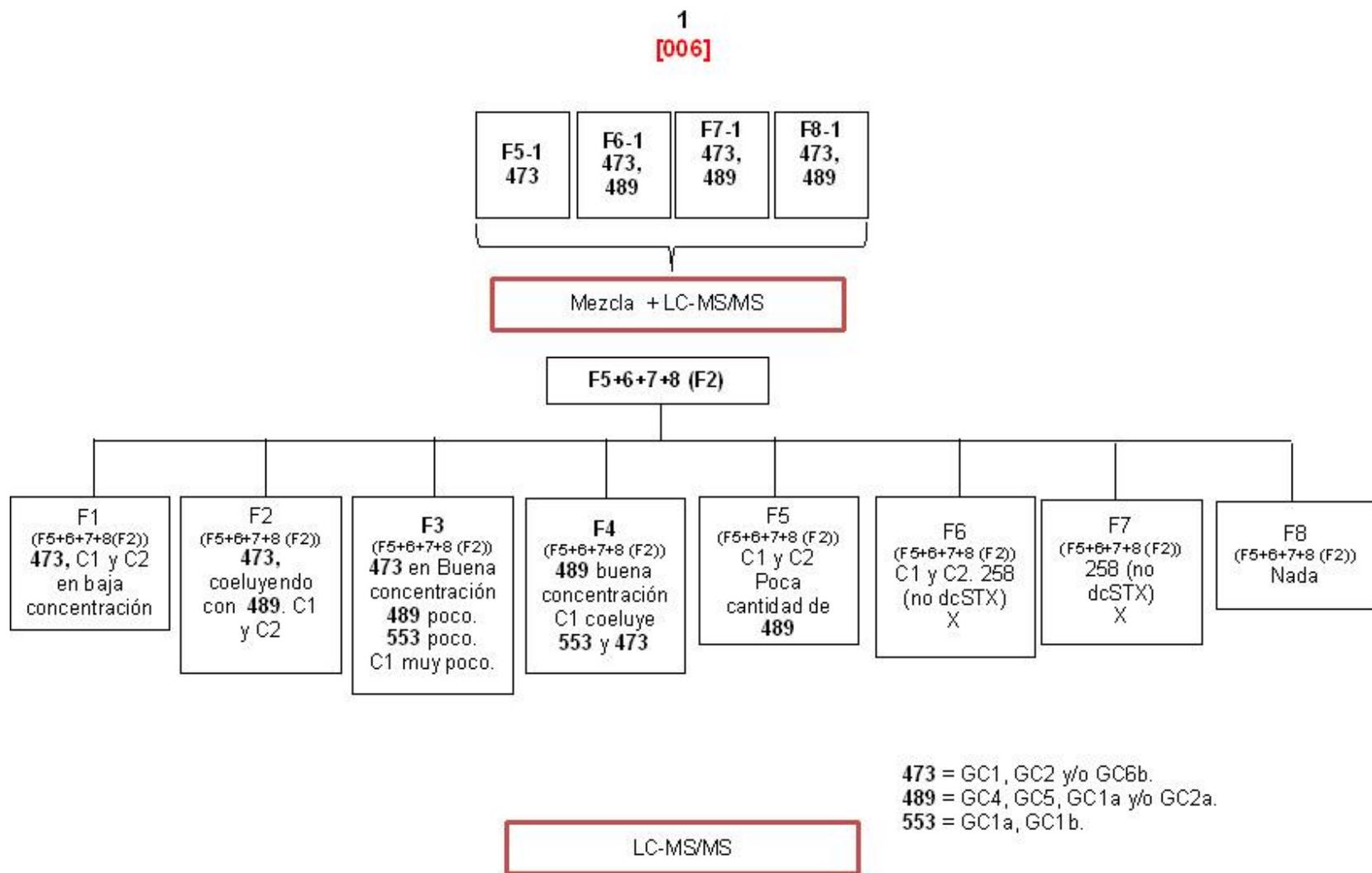


Fig. 67b. Continuación...

2

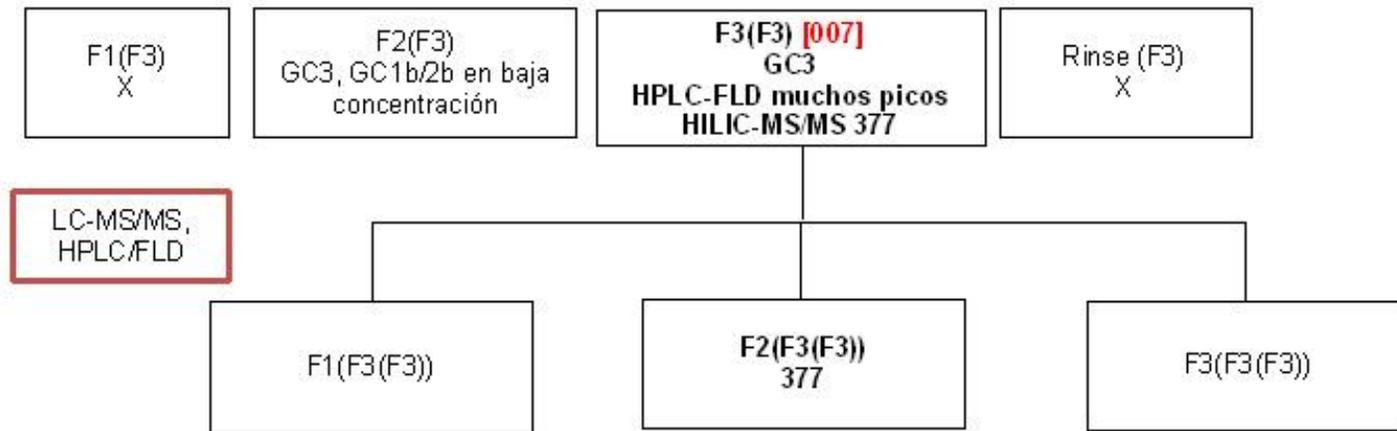


Fig. 67c. Continuación...

6.6.4 Espectroscopía por resonancia magnética nuclear de protón de las fracciones

Aunque las fracciones no se obtuvieron con la pureza necesaria para realizar la elucidación estructural inequívoca con esta técnica, fue posible observar ciertas características que nos proporcionaron información sobre los análogos presentes en las dos fracciones analizadas: F3(F5+6+7+8(F2)) y F4(F5+6+7+8(F2)).

Los resultados de ^1H -RMN de la fracción F3(F5+6+7+8(F2)) mostraron el patrón típico AA'BB' en 8.5-7.5 ppm, correspondiente a un anillo benzoil *para*-sustituido. Este patrón sólo puede corresponder a las toxinas GC1/2 (masa 473), GC4/5 (masa 489) y GC1b/2b (masa 553) (Fig. 68). A través de este análisis pudimos comprobar que en esta fracción no se encontraban presentes las toxinas di-hidroxibenzoil (GC1a/2a), las cuales tienen una masa de 489, al igual que las toxinas GC4/5.

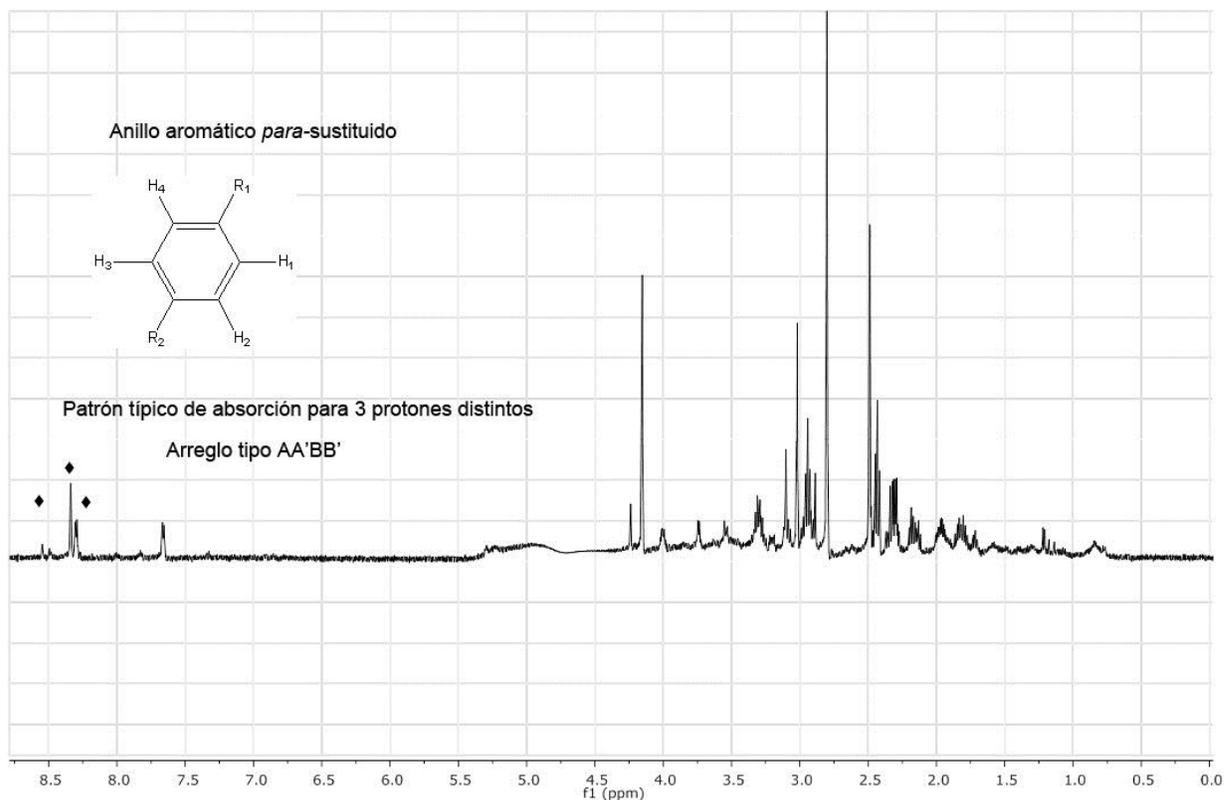


Fig. 68. Espectro de ^1H -RMN de F3(F5+6+7+8(F2)) con presaturación.

La zona aromática se localiza entre 8.6 y 7.5 ppm. Se indican los picos del anillo aromático *para*-sustituido.

En el espectro de ^1H RMN de la fracción F4(F5+6+7+8(F2)) se pudo observar el patrón típico de protones en arreglos de benzoiles tri-sustituídos (absorciones localizadas en 7.5 y 8.5 ppm), lo que significa que esta fracción contiene los anillos di-hidroxibenzoil de las toxinas GC1a/2a (masa 489). También se observó que contiene las toxinas con anillo benzoil *para*-sustituído GC1/2 (masa 473) y GC1b/2b (masa 553) (Fig. 69).

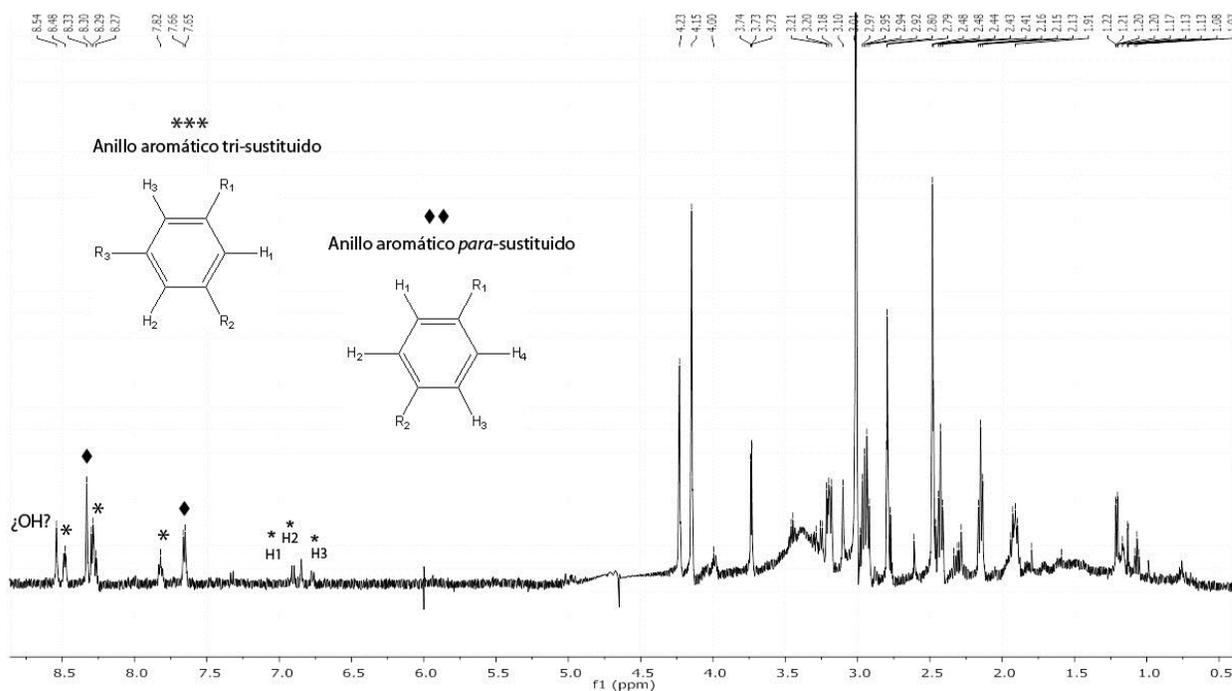


Fig. 69. Espectro de ^1H -RMN de F4(F5+6+7+8(F2)) con presaturación. La zona aromática se localiza entre 8.6 y 6.6 ppm. Se indican los picos de los anillos aromáticos tri y *para*-sustituídos.

6.7 Modo teórico de unión de los análogos de STX en el en canal de sodio regulado por voltaje $\text{Na}_v 1.4$

Como resultado de las simulaciones se determinó que las toxinas interactúan con 25 residuos del canal. Los residuos que mostraron interacción con más del 80% de las toxinas fueron D400, K1237, E403, E755 y E758 (Fig. 70). De estos residuos, D400, E755, K1237 y A1529 pertenecen al anillo de selectividad DEKA, aunque E1529 mostró mucho menos interacciones. E403 y E758 son parte del anillo externo con

carga negativa. La mayoría de los residuos involucrados en la unión con las toxinas pertenecen a los P-loops I y II (8 y 7 residuos, respectivamente), y estos residuos interactuaron con más toxinas que los de los P-loops III y IV. La excepción fue el residuo K1237, del P-loop III, el cual interactuó con 92.4% de las toxinas en las simulaciones (Fig. 71).

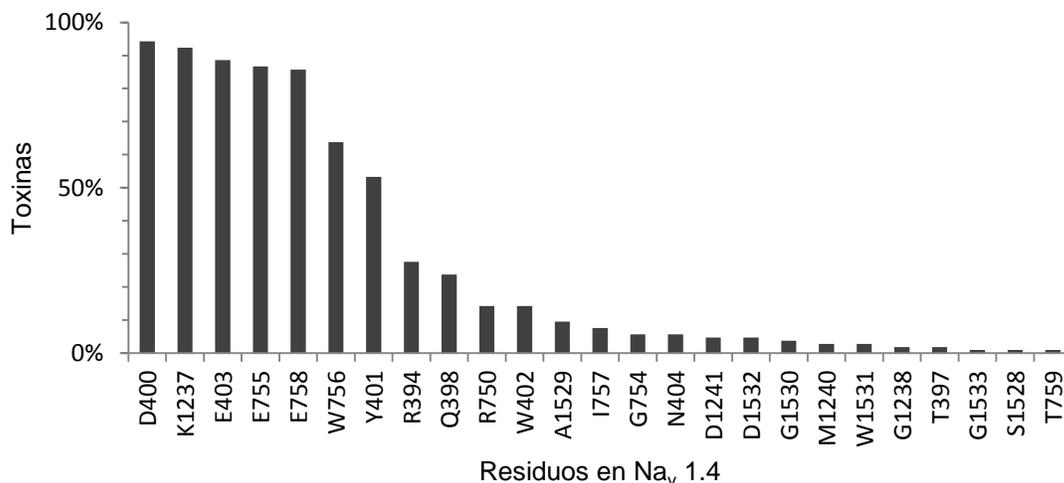


Fig. 70. Residuos involucrados en las interacciones con la STX y sus análogos. Se presenta el promedio de las tres simulaciones.

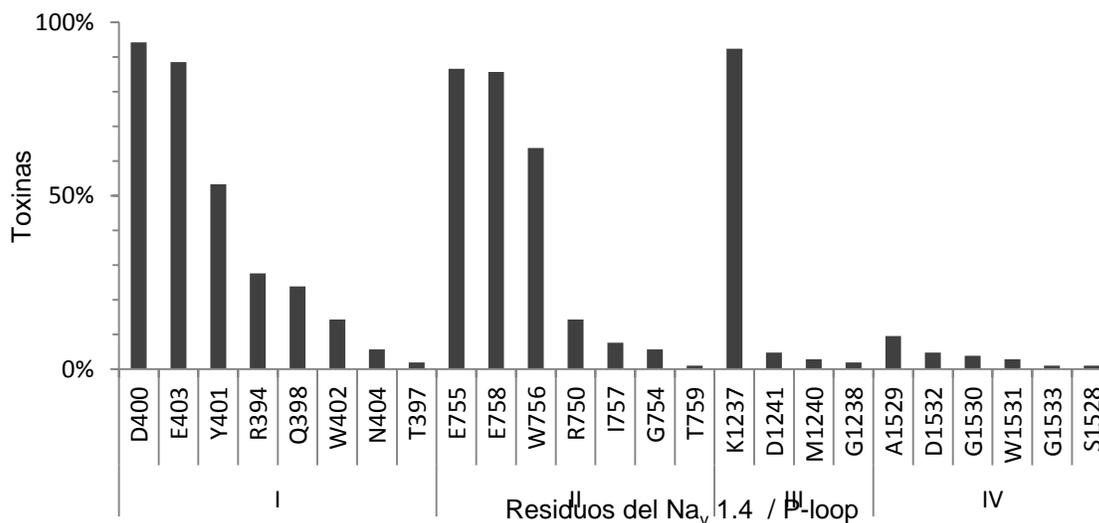
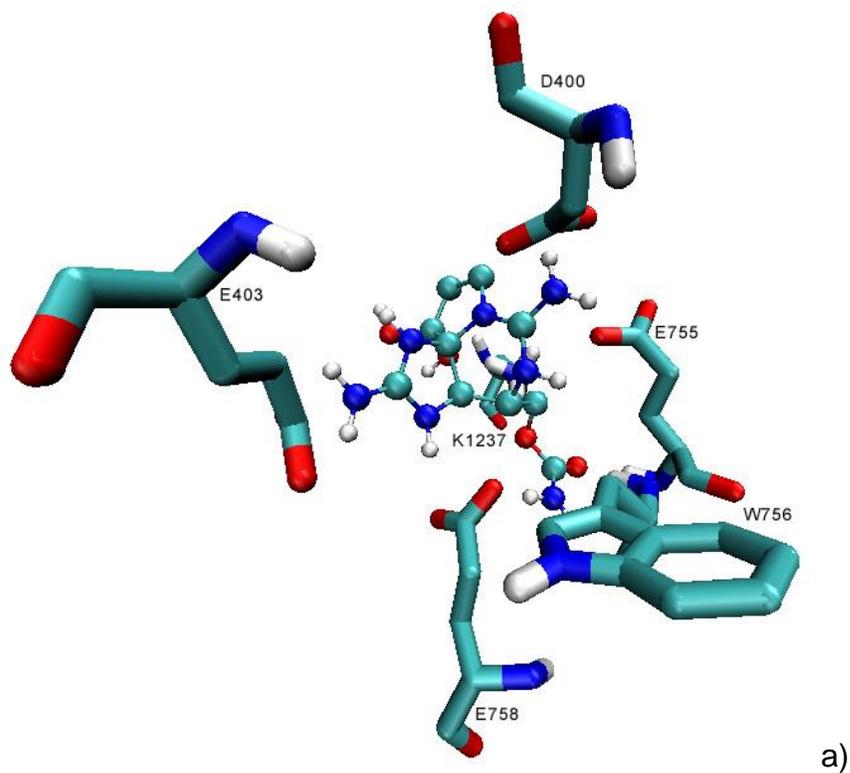
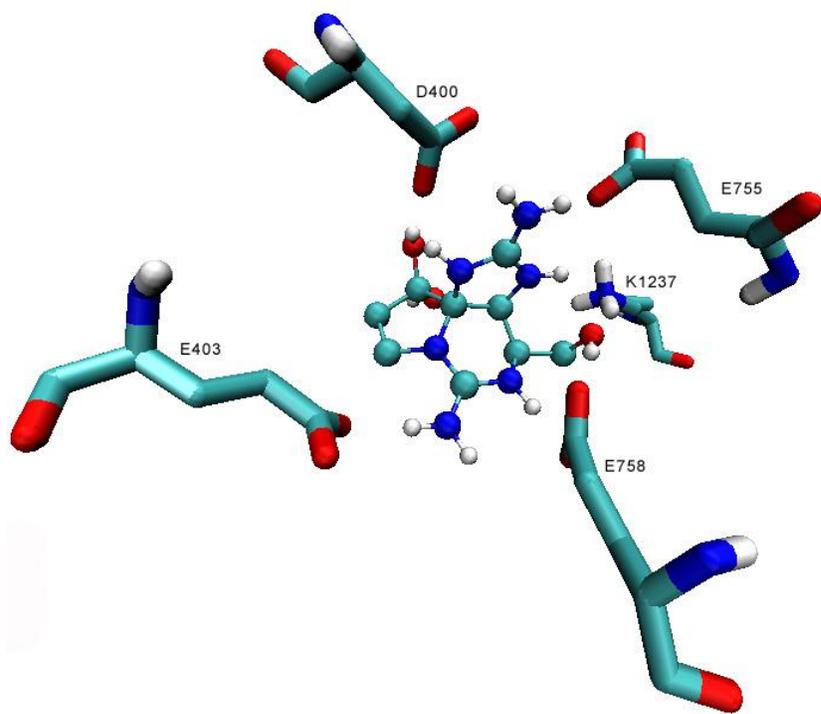


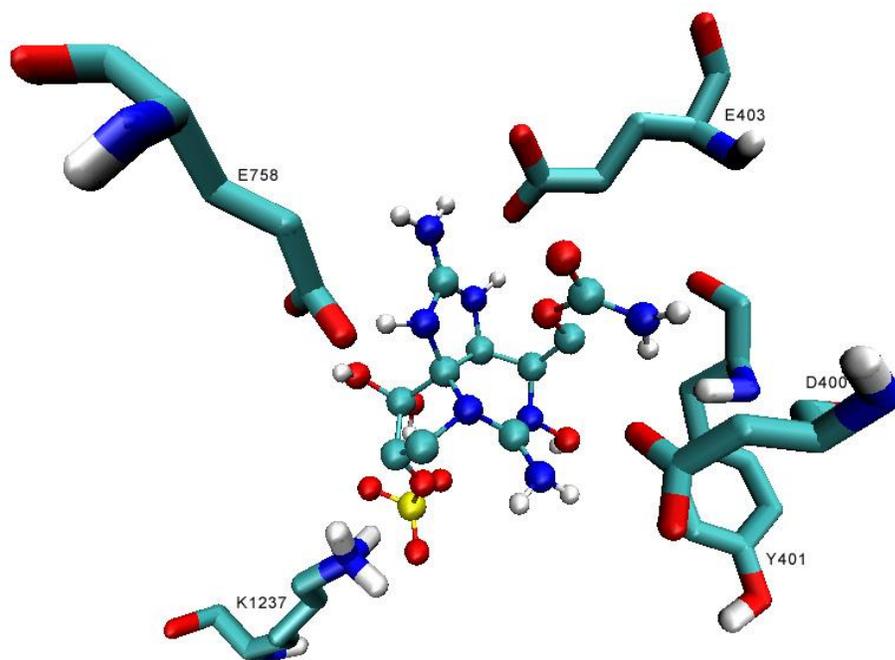
Fig. 71. Residuos y P-loops involucrados en las interacciones con la STX y sus análogos. Se presenta el promedio de las tres simulaciones.

La Figura 72 muestra que la STX y varios de sus análogos alcanzaron la cadena lateral a través del grupo guanidino de varios de los residuos mencionados (E403, D400, E755) a través de interacciones electrostáticas, mientras que existen puentes de hidrógeno con ambos grupos hidroxilo localizados en el C12.

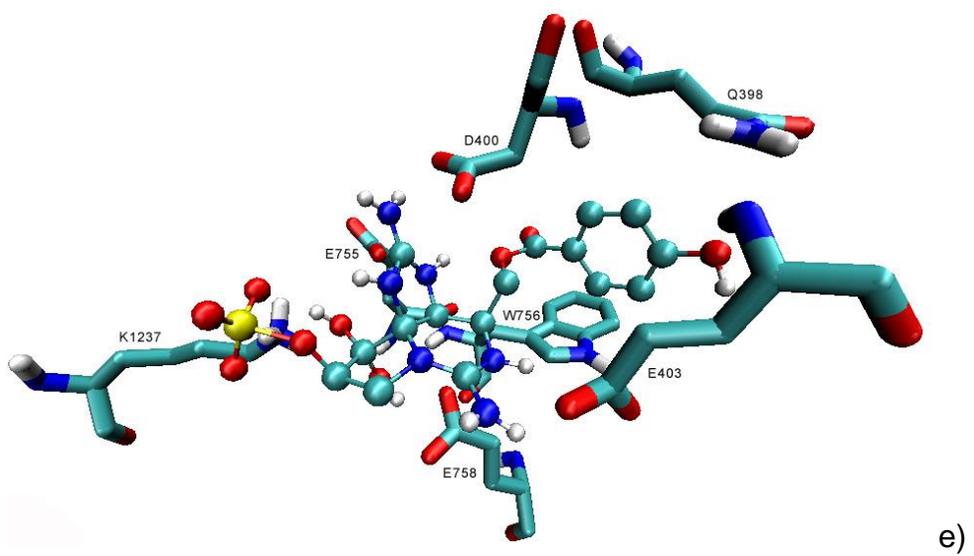
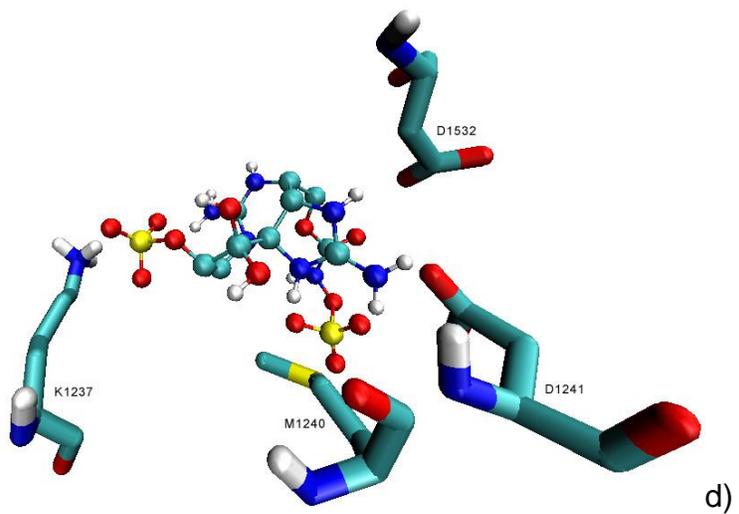




b)



c)



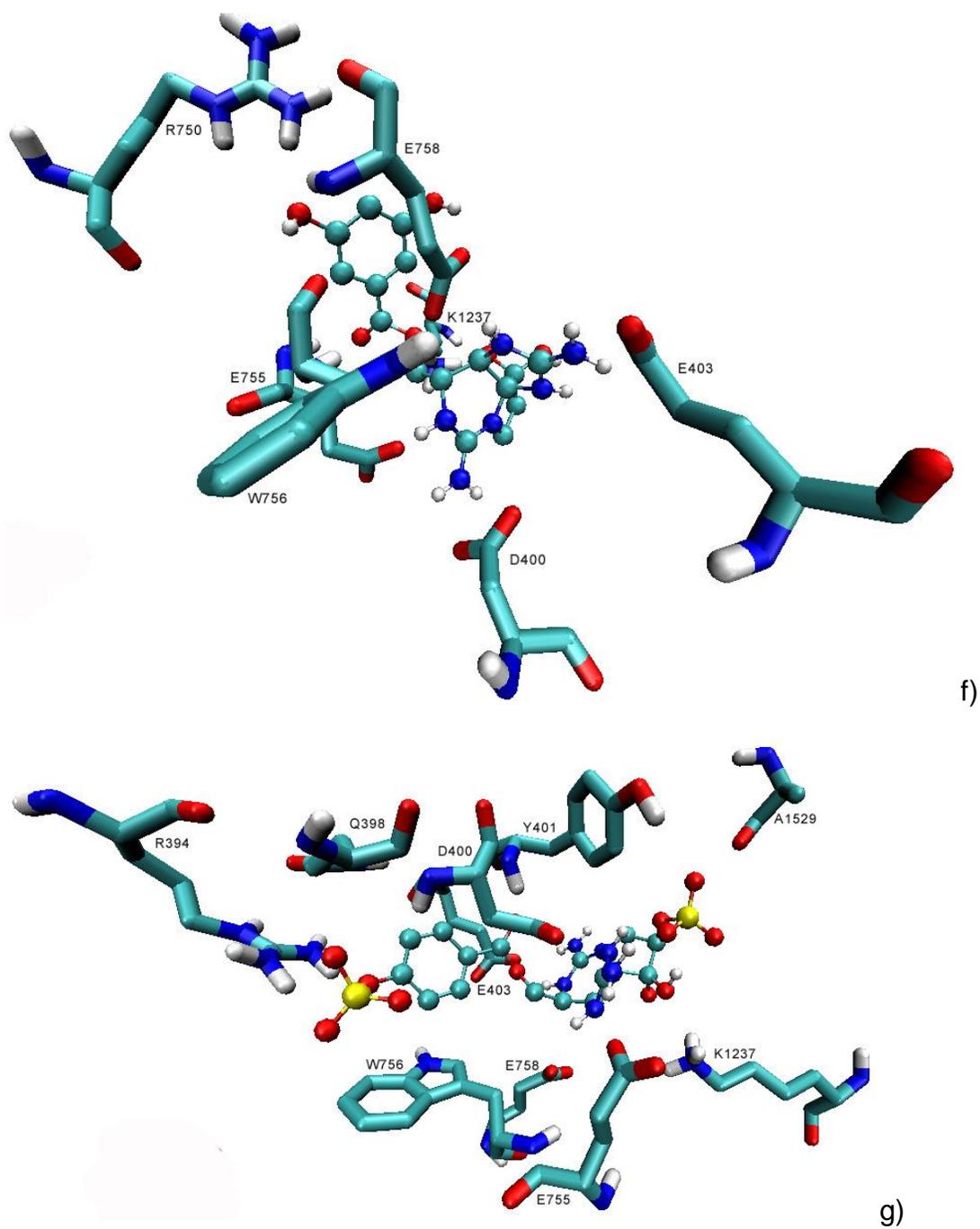


Fig. 72. Unión de la STX y algunos de sus análogos con los residuos del Na_v 1.4. de acuerdo a nuestras simulaciones.
 Estructura de esferas = toxinas. Palos = residuos. a) STX, b) dcSTX, c) GTX4, d) C2, e) GC1, f) GC3a, g) GC1b. Estas toxinas representan aquellas que mostraron los valores de ΔG menores en cada grupo.

6.7.1 Energía libre de unión

En estas simulaciones se obtuvieron valores bajos de energía libre de unión, ΔG (alta afinidad) para la STX y varios de sus análogos, como GC3b y GC1b ($-16.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Las toxinas más potentes, STX, NEO y dcSTX, que tienen una toxicidad relativa ~ 1 (Vale et al., 2008), en estas simulaciones mostraron valores promedio de ΔG entre -12.1 y $-12.7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Fig. 73).

En cuanto a los valores de ΔG por familia (en función de la cadena lateral), los ligandos que mostraron menor energía libre de unión fueron GTX4, C2, dcSTX, GC1, GC3a y GC1b. Cuatro de estos seis ligandos contienen al grupo sulfato en R2 o R3, lo que significa que el ambiente negativo aumenta la afinidad con K1237 por interacciones electrostáticas. Este residuo fue el segundo con mayor número de interacciones (92.4% de las toxinas interactuaron con este residuo), sólo después de D400 (94.3% de las toxinas interactuaron con este residuo) (Fig. 70).

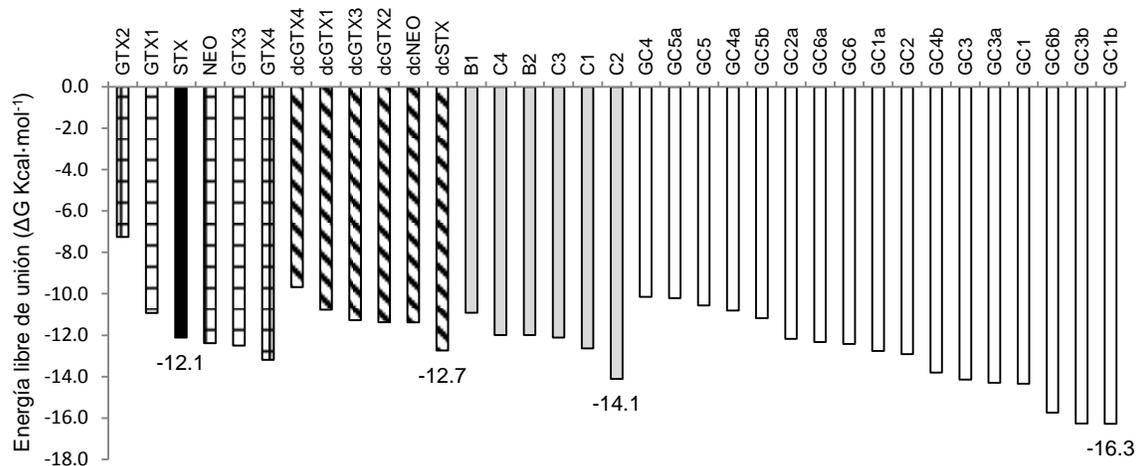


Fig. 73. Energía libre de unión (ΔG , $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) de las toxinas sometidas a las simulaciones. Las toxinas se muestran en grupos en función de su cadena lateral: cuadrícula, toxinas carbamoil; líneas diagonales, toxinas decarbamoil; gris, toxinas N-sulfocarbamoil; blanco, toxinas benzoil. La barra negra muestra a la STX, la TP más potente. Los números indican el valor de ΔG más bajo de cada grupo.

7. Discusión

7.1 *Curvas, tasas de crecimiento y formación de cadenas*

Todos los aislados en los dos medios de cultivo presentaron diferencias en las tasas de crecimiento, tiempo de división, biomasa máxima y formación de cadenas. A pesar de que tienen tiempos diferentes de haber sido aislados (GCCV7, 14 años; 62L, 9 años; BAPAZ5 y BAPAZ7, 7 años [detalles en anexo]), estos tiempos de permanencia en cultivos en el laboratorio no ofrecen una explicación sobre las diferencias encontradas, por lo que se concluye que los tiempos de aislamiento no son un factor determinante en los parámetros analizados. Se ha señalado que para realizar experimentos fisiológicos es deseable realizar los aislamientos lo más cercano posible en el tiempo para controlar, en medida de lo posible, los efectos evolutivos los cultivos (Lakeman et al., 2009). En este trabajo, los aislados tienen una diferencia importante en cuanto al tiempo en cultivos en el laboratorio, por lo que se realizaron periodos de aclimatación en condiciones consistentes de cultivo, cuyo propósito, como señala Lakeman et al. (2009) es remover o minimizar en la medida de lo posible el efecto de las condiciones de cultivo anteriores, de manera que sean comparables y cualquier diferencia después de este período será considerada como inherente (es decir, genéticamente programada) como respuesta a las condiciones experimentales en lugar de ser respuestas fisiológicas plásticas a las historias anteriores de cultivo.

El inicio de la fase exponencial de crecimiento en todos los aislados fue al segundo día de cultivo, con excepción de BAPAZ7 en medio f/2. Previo a los experimentos, todos los cultivos fueron aclimatados en sus respectivos medios por al menos tres resiembras, por lo que el que este aislado haya tardado más tiempo en iniciar la fase exponencial no fue debido a un periodo de aclimatación al medio de cultivo. De manera general, la duración de la fase de crecimiento exponencial fue mayor en el medio GSe, extendiéndose hasta el día 34.7 ± 2.3 en el aislado 62L, con excepción

del aislado BAPAZ7, que en este medio fue dos días menor que en medio f/2 (22.7 días en medio GSe y 24.7 días en medio f/2).

La tasa de crecimiento es un parámetro extremadamente importante en la dinámica de las poblaciones y en la ecología del fitoplancton, ya que integra numerosos procesos bioquímicos que dan un único resultado, generalmente definido en términos de cambios en el número celular o la biomasa. Idealmente, al determinar la variabilidad intraespecífica o intra-poblacional en el crecimiento, las células de cada linaje clonal deben ser aclimatadas bajo condiciones idénticas en un ambiente constante y las tasas de crecimiento deben ser determinadas después de este período de aclimatación (Tillman et al., 2009). Este estudio, como se ha mencionado, se realizó después de una aclimatación en condiciones idénticas.

En todos los aislados se observó una tasa de crecimiento de entre 0.07 y 0.09 div · día⁻¹, con excepción de BAPAZ7 en medio GSe, que fue el único que superó las 0.1 div · día⁻¹ (0.13 ± 0.03 div · día⁻¹) y presentó menor tiempo de división que el resto de los aislados en ambos medios (5.5 ± 1.4 días). Para esta especie se ha reportado una tasa de crecimiento de entre 0.19 - 0.34 div·día⁻¹ (Hallegraeff et al., 2012), con los valores más bajos en una cepa mexicana, de 0.14 div·día⁻¹ cultivada en medio f/2, 15-29°C, salinidad 30, 230 μmol m⁻²s⁻¹ (Band-Schmidt et al., 2004). Los valores obtenidos en estos experimentos muestran tasas aún más bajas, e incluso la tasa de crecimiento más alta (0.13·día⁻¹ en BAPAZ7, en medio GSe) se encuentra por debajo de lo reportado en la literatura. Band-Schmidt y colaboradores, en un trabajo con aislados de Bahía Concepción no encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de crecimiento con relación a los medios de cultivo, f/2 con selenio y GSe (Band-Schmidt et al., 2004), lo que concuerda con nuestro estudio, con excepción del aislado BAPAZ7 en medio GSe, que fue el único que mostró una diferencia significativa con el resto en cuanto a la tasa de crecimiento. Por otro lado, las tasas de crecimiento pueden ser características de los aislados, como lo menciona Oh et al. (2010) en un trabajo comparativo realizado con 83 aislados de *G. catenatum* de dos florecimientos en la Bahía de Inokushi, Japón, en el que, incluso

aislados obtenidos el mismo día en las mismas condiciones muestran diferencias contrastantes ($\mu < 0.1 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$ en algunos aislados y $\mu > 0.4 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$ en otros).

En *Alexandrium tamarense* se ha detectado variación genotípica y fenotípica entre clones o aislados separados, sea geográficamente (Maranda et al., 1985) o temporalmente (Shankle et al., 2004), entre clones de una misma población geográfica o incluso en clones de un mismo florecimiento (Oh et al., 2010). Las características que varían entre estos clones incluyen la tasa de crecimiento, requerimiento de nutrientes y vitaminas, iluminación y toxicidad (Wood y Leatham, 1992), por lo que los resultados obtenidos en este estudio son una muestra de la variación intraespecífica incluso en aislados geográficamente similares, al ser ésta una característica común en dinoflagelados (Tillman et al., 2009).

El crecimiento óptimo en *G. catenatum* se ha establecido en una división cada 3 a 4 días (Blackburn et al., 1989), sin embargo en este estudio se encontró que el tiempo menor fue de 5.5 ± 1.4 días en BAPAZ7 en medio GSe, y el mayor de 9.9 ± 1.0 en BAPAZ5 en medio f/2, por lo que se considera que los aislados no mostraron un crecimiento óptimo. Esto probablemente se debió a que algunos parámetros no considerados en nuestro estudio (pH, comunidad bacteriana) fueron diferentes a los utilizados en otros trabajos. Se ha reportado un amplio rango de temperatura para los aislados mexicanos de entre $11.5 - 30^\circ\text{C}$, con crecimientos máximos entre $21 - 29^\circ\text{C}$, y un rango de salinidad de entre 28 y 38 (Band-Schmidt et al., 2004); en este estudio se utilizó una temperatura de 24°C y una salinidad de 34, los cuales se encuentran dentro del rango óptimo de crecimiento para los aislados mexicanos, sin embargo no se realizaron mediciones de pH, ni de comunidad bacteriana, los cuales podrían influenciar el crecimiento. Por otro lado, las densidades celulares se encontraron dentro del rango reportado para aislados de la localidad (2000 – 4000 $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, Band-Schmidt et al., 2004; Hernández-Sandoval, 2010) e incluso mayores, y los cultivos se observaron en buenas condiciones (células activas, bien formadas, poca materia orgánica) durante todo el ciclo, con excepción de la fase de decaimiento, lo que podría indicar que aunque su tasa de crecimiento no fue óptima,

las condiciones de cultivo sí lo fueron y los cultivos se encontraron sanos. Las diferencias con las tasas de crecimiento reportadas para esta especie y aislados de la localidad podrían deberse a un retardo en llegar a la biomasa máxima debido a una baja densidad inicial del cultivo ($500 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) y a que los matraces utilizados eran de un volumen mayor (2000 mL) a los reportados en otros estudios. Aunque podría parecer que el tamaño del recipiente carece de importancia, Blackburn et al. (1989) reportan que sólo obtienen altas densidades celulares y cadenas muy largas (hasta de 64 células) en recipientes muy poco profundos. El trabajo reportado por Band-Schmidt et al. (2004) fue realizado en recipientes de 25 mL, y el de Hernández-Sandoval (2010) en 200 mL.

En cuanto a la biomasa máxima obtenida, el aislado GCCV7 tuvo un comportamiento particular, ya que fue el único que presenta grandes diferencias entre los dos medios de cultivo, obteniendo una biomasa máxima inferior a la mitad en medio f/2 en comparación con la obtenida en medio GSe (diferencia de $4812 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$). De manera general, en medio GSe se obtuvieron biomazas máximas superiores en comparación con f/2, con la excepción del aislado BAPAZ7, lo que ha sido reportado anteriormente, y se ha considerado que se debe a los nutrientes aportados por la fracción húmica del extracto de suelo (Prakash et al., 1973; Granéli et al., 1989).

Se ha reportado, para BAPAZ7 una densidad celular máxima de $4000 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ en medio f/2 (Hernández-Sandoval, 2010); un aislado de Bahía Concepción presentó una biomasa máxima de $3393 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ en medio GSe (Band-Schmidt et al., 2006), y en medio f/2 con una proporción N:P de 23:5. Un aislado de Bahía Concepción presentó una máxima biomasa de $5852 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Bustillos-Guzmán et al., 2012). En el presente trabajo se obtuvo una densidad superior a las $8000 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el aislado GCCV7 en medio GSe, la cual no ha sido reportada anteriormente. Esta situación es interesante debido a que, a pesar de que se obtuvieron densidades celulares superiores, la tasa de crecimiento no fue siquiera similar a la mínima reportada para los aislados mexicanos, de $0.15 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$, siendo, para este aislado, de $0.09 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$ en medio GSe. En el cálculo de la tasa de crecimiento se considera la cantidad de

días necesarios para obtener la densidad máxima (fin de la etapa de crecimiento exponencial), y aunque la densidad máxima fue muy alta, el tiempo necesario para llegar a ella fue de 32 días, cuando generalmente este tiempo es menor a 25 días, lo que indica que es una especie de lento crecimiento o crecimiento moderado.

En cuanto a la formación de cadenas de células, cada aislado en cada medio de cultivo mostró un comportamiento distinto, aunque en general se observó una tendencia a un comportamiento más constante en medio f/2 que en GSe. BAPAZ5, BAPAZ7 y GCCV7 en medio f/2 mantuvieron relativamente constante la proporción de células individuales durante el ciclo, con variaciones mínimas, visibles al final de la etapa de crecimiento exponencial y durante el decaimiento del cultivo. En medio GSe se observaron las mayores variaciones, observándose una disminución de células individuales durante la fase de crecimiento exponencial al tiempo que se formaban cadenas de células más largas. De manera general, en el medio f/2 se observó una mayor proporción de células individuales y en medio GSe de cadenas de 2 hasta 8 células, lo que concuerda con estudios anteriores realizados en ambos medios de cultivo (Band-Schmidt et al., 2006). Fraga et al. (1989) y Smayda (2010) mencionan que la formación de cadenas es un comportamiento adaptativo para el crecimiento de los dinoflagelados en sistemas de surgencias, ya que la mayor movilidad de las cadenas les facilita el desplazamiento durante la turbulencia y aumenta la resistencia a la mezcla vertical, evitando la dispersión potencialmente perjudicial para el comportamiento celular o poblacional. En estos experimentos, las células no se encontraron en sistemas de surgencias o en condiciones de turbulencia, ya que eran cultivos estáticos, y probablemente por este motivo no se formaron cadenas de mayor longitud. De acuerdo con Band-Schmidt (com. pers.), la capacidad de formar cadenas largas puede ser una característica específica de cada aislado, sin embargo, Blackburn et al. (1989) señalan que una mayor longitud de cadenas en el cultivo es indicador de que están en mejores condiciones fisiológicas.

En el estudio realizado por Blackburn et al. (1989) se observó que en la fase de crecimiento exponencial, la mayoría de las células formaron cadenas de 4-16 células,

mientras que en la fase estacionaria se rompen principalmente en células individuales, y bajo condiciones que limitan crecimiento y supervivencia predominan las células individuales. Estas observaciones coinciden en parte con nuestros resultados, ya que el aislado que presentó la menor densidad celular y menor tasa de crecimiento fue también la que presentó una mayor proporción de células individuales a lo largo de todo el cultivo (BAPAZ5 en medio f/2: 43.4% de células individuales; T.C. $0.07 \pm 0.01 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$), mientras que el aislado con la mayor tasa de crecimiento presentó también la mayor proporción de cadenas de 2-4 células (BAPAZ7 en medio GSe: 76.9% de cadenas de 2-4 células; T.C. $0.13 \pm 0.03 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$). Lo anterior no se aplica, sin embargo, al aislado 62L en medio GSe, que presentó una proporción de cadenas de 2-4 células similar a BAPAZ7 en medio GSe y la mayor proporción de cadenas de 8 células y mayores, sin embargo su tasa de crecimiento fue apenas superior a la de BAPAZ5 en medio f/2 (73.3% cadenas de 2-4 células; 9.6% cadenas de 8 células y mayores; T.C. $0.08 \pm 0.01 \text{ div}\cdot\text{día}^{-1}$).

La cantidad de cadenas observadas de 5 a 7 células no superó el 1.6% en ningún caso, y en la mayoría de los aislados y medios no se observaron, debido a que las células se dividen de manera semisincrónica, por lo cual es común observar únicamente cadenas de 2, 4, 8, 16, 32 o 64 células (Blackburn et al., 1989).

El largo de las cadenas es influenciado por las condiciones de cultivo (Blackburn et al., 1989). En su estudio, las cadenas largas, de hasta 64 células sólo se formaron en recipientes muy poco profundos. En el estudio de Bravo (1986) con aislados de España se encontraron cadenas más cortas (máximo 4 células) en medio f/2 que en medio Erd-Schreiber, que contiene extracto de suelo (máximo 8 células); en este estudio, las cadenas de células más largas se encontraron en el medio GSe.

Son muchas las diferencias que existen en la composición de los medios GSe y f/2 (ver anexo), y una de ellas es la adición de extracto de suelo. Blackburn et al. (1989) observaron que este extracto promueve un mejor crecimiento que el medio inorgánico f/2. Estudios previos han mostrado que el extracto de suelo estimula el

crecimiento de diatomeas y dinoflagelados (Prakash et al., 1973; Granéli et al., 1989). El mecanismo no ha sido esclarecido con detalle; se ha reportado que las sustancias húmicas (sustancias orgánicas de alto peso molecular que se encuentran en todos los ambientes acuáticos y terrestres) pueden actuar como quelantes, aumentando la disponibilidad de algunos metales traza esenciales y/o reaccionando e inactivando algunos metales traza tóxicos (Toledo et al., 1980). La cantidad de micronutrientes añadidos de esta manera es desconocida y depende del tipo de suelo que se utilice. En este caso, en que se utilizó tierra de composta con cultivo de lombrices, es probable que, además de los nutrientes añadidos por el suelo, los productos del metabolismo de las lombrices hayan intervenido en las diferencias observadas. Band-Schmidt et al (2004) también encontraron diferencias entre los dos medios, aún sin utilizar composta con cultivo de lombrices (utilizó tierra de suelo de mezquite) principalmente en densidad celular y en la formación de cadenas, que se discutirá posteriormente.

7.2 Perfil de toxinas

Negri y colaboradores (2007) reportaron la producción de al menos 21 análogos de STX en *G. catenatum*, sin embargo en este estudio se encontraron 25 de ellos en los aislados analizados: 10 hidrofílicos (toxinas carbamoil: GTX2/3; decarbamoil: dcSTX, dcNEO y dcGTX2/3 y N-sulfocarbamoil: C1/2, B1/2) y 15 tipo benzoil (GC1-6, GC1a-5a, y GC1b, 2b, 4b y 5b). De los 36 análogos reportados en la Fig. 2, únicamente no fueron detectados once en este trabajo (STX, NEO, GTX1/4, dcGTX1/4, C3/4, GC6a, GC3b y GC6b).

Es importante considerar que el método de HPLC-FLD para la detección y análisis de las toxinas hidrofílicas tiene algunos inconvenientes que pueden llevar a identificaciones erróneas en ciertas toxinas (Luckas, 1990, Krock et al., 2007). En el método utilizado, los análogos NEO y dcNEO muestran el mismo tiempo de retención, por lo que no es posible identificarlos de manera inequívoca. Al analizar la composición de aislados de *G. catenatum* de las costas mexicanas por HPLC-FLD y

LC-MS/MS, Bustillos-Guzmán et al. (2012), encontraron que la fracción que ha sido constantemente reportada como NEO corresponde a dcNEO, y de acuerdo a sus resultados, en este trabajo se reporta dcNEO y no NEO. Por otro lado, la existencia de otras moléculas que no son toxinas, pero que fluorescen bajo las condiciones del análisis (falsos positivos) han llevado a errores frecuentes. Tal es el caso de la STX, la cual, al ser analizada en nuestras muestras por HILIC-MS/MS mostró ser un falso positivo (Bustillos-Guzmán et al., 2012), por lo cual no se reporta su detección.

La presencia o ausencia y proporción de los análogos varía entre aislados y poblaciones, y aunque las especies productoras de toxinas típicamente sintetizan más de un solo análogo, no se conoce un aislado o cepa que sintetice todos ellos (Cembella, 1998). Por otro lado, se han reportado variaciones dentro de las mismas poblaciones y regiones (Camino-Ordás et al., 2004; Band-Schmidt et al., 2004, Oh et al., 2010) y diferencias en las proporciones de las toxinas en función de factores relacionados con el cultivo, como temperatura, proporción N:P, medio de cultivo y largo de cadenas de células (Band-Schmidt et al., 2006; Bustillos-Guzmán et al., 2012).

En este estudio se encontraron constantemente las 10 toxinas hidrofílicas, con pocas excepciones durante algunos días de cultivo. No se encontraron diferencias en el número de análogos entre medios, ni entre aislados, como reporta Band-Schmidt et al. (2006), quienes encontraron mayor número de análogos en aislados de Bahía Concepción en medio GSe en comparación con f/2, pero sí se observaron variaciones en las proporciones de cada toxina, relacionadas con la edad del cultivo.

En todos los casos, las toxinas C1/2 mostraron abundancias relativas constantemente superiores a 60% ($\text{pg}\cdot\text{cel}^{-1}$), llegando a representar hasta el 93.1% en BAPAZ7 en medio GSe. La alta proporción de toxinas C se considera una característica de *G. catenatum*, con pocas excepciones (Mohammad-Noor, 2010), lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio. La única excepción fue el aislado BAPAZ5 en medio GSe, el cual, durante los primeros días de la fase exponencial, mostró una mayor proporción de toxinas B1/2 (día 4, 60%). Una mayor

proporción de estas toxinas con respecto a las C1/2 sólo ha sido reportada para aislados del norte de España (Camino-Ordás et al., 2004), sin embargo es importante señalar que, de manera general, los estudios de toxinas se realizan durante los días finales de la fase de crecimiento exponencial y no al inicio de ésta.

Las segundas en abundancia fueron las toxinas B1/2 en BAPAZ7 y 62L, pero en BAPAZ5, la segunda en abundancia fue dcNEO. Sólo en BAPAZ5 en medio GSe, las toxinas B1/2 iniciaron con una proporción inusualmente alta (>60%) que fue disminuyendo conforme la edad del cultivo avanzaba, mientras que en BAPAZ7 en ambos medios, el comportamiento fue contrario, encontrándose una mayor proporción de B1/2 al final del ciclo. En 62L en ambos medios y BAPAZ5 en f/2, la proporción de estas toxinas fue relativamente constante a lo largo del cultivo.

La tercera en abundancia, con excepción de BAPAZ5, fue dcNEO. En BAPAZ7 y 62L, la abundancia relativa de esta toxina no superó el 7% en ningún día del cultivo, sin embargo en BAPAZ5 se encontraron niveles superiores al 10% durante todos los días analizados, con una sola excepción (d 20, 6.2%). La proporción de esta toxina explicaría también la mayor toxicidad de este aislado, ya que su factor de toxicidad relativa (0.4) es superior al de las toxinas C1/2 (0.01 y 0.1, respectivamente) y B1/2 (0.06 y 0.0, respectivamente). Estos resultados concuerdan con los de Gárate-Lizárraga et al. (2005) y Band-Schmidt et al. (2006), quienes encontraron una mayor proporción de dcNEO (reportada como NEO) en aislados de la Bahía de La Paz (BAPAZ), aunque la baja proporción encontrada en BAPAZ7 no coincide con estos resultados.

Se ha sugerido que la proporción de dcNEO está directamente relacionada con el largo de las cadenas celulares (Band-Schmidt et al., 2006), sin embargo en este estudio, el aislado BAPAZ5 en medio f/2 fue el que presentó mayor proporción de esta toxina y menor proporción de cadenas celulares en comparación con el resto de los aislados y medios de cultivo.

El resto de las toxinas detectadas (GTX2/3, dcSTX, dcGTX2/3) se encontraron constantemente en muy bajas proporciones, no superando el 7% del total (suma de los cinco análogos), lo cual se considera una característica de la especie (Hallegraeff et al., 2012).

A lo largo del cultivo los perfiles de toxinas permanecieron relativamente constantes en todos los aislados y medios, con excepción de BAPAZ5 en medio GSe. Algunas diferencias en el perfil de toxinas entre medios de cultivo en el mismo aislado fueron evidentes, específicamente en BAPAZ5 y BAPAZ7. Es conocido que el medio de cultivo puede afectar el perfil de toxinas, y en algunos casos, no sólo en la proporción, sino en el tipo de toxinas detectadas (Band-Schmidt et al., 2006). Por otro lado, las diferencias de los perfiles entre aislados también se deben la variación natural dentro de las mismas poblaciones (Park et al., 2004; Camino-Ordás et al., 2004; Band-Schmidt et al., 2006; Oh et al., 2010).

7.3 Toxicidad

Los resultados en este trabajo muestran variaciones ($\text{pg STXeq}\cdot\text{cel}^{-1}$) entre todos los aislados y medios de cultivo.

El aislado BAPAZ5 fue el más tóxico y BAPAZ7 el de menor toxicidad; estos resultados son interesantes ya que ambos fueron obtenidos de la misma zona geográfica (Bahía de La Paz, B.C.S., México) y durante el mismo evento, además de que fueron cultivados en las mismas condiciones, por lo que se podría considerar que pertenecen a una misma población y por lo tanto se esperaría una toxicidad similar. La contribución de la toxina dcNEO a la toxicidad es fundamental en estos resultados, ya que fue BAPAZ5 el más tóxico y a la vez en el que se encontró una mayor proporción de esta toxina.

Anderson et al. (1989) calcularon una toxicidad promedio en aislados de *G. catenatum* de Ría de Vigo, España, en $7.1 - 7.8 \text{ pg STX eq}\cdot\text{cel}^{-1}$; Bustillos-Guzmán et al. (2012) reportaron valores de entre 21.75 ± 2.93 y $10 \text{ pg STX eq}\cdot\text{cel}^{-1}$ en aislados

de Bahía Concepción, B.C.S., México. En este estudio, se encontraron valores máximos de 28.0 ± 5.1 y mínimos de 1.2 ± 0.3 pg STX eq·cel⁻¹, siendo el máximo superior y el mínimo inferior a lo reportado por estos autores. Considerando que históricamente, en los estudios de aislados mexicanos se ha reportado la presencia de STX y NEO, y que, posteriormente, de acuerdo con Bustillos-Guzmán et al. (sometido) se ha comprobado que el compuesto reportado como STX corresponde a un compuesto “fantasma” (es decir, que no es una toxina), y el reportado como NEO corresponde a dcNEO, la cual tiene un factor de toxicidad de 0.40, en comparación con el de NEO, de 0.92, es factible considerar que la toxicidad total en estos aislados está sobreestimada en los trabajos anteriores.

A lo largo del ciclo de cultivo se presentaron variaciones en la toxicidad, sin embargo únicamente se observó cierta tendencia en dos aislados en medio f/2, éstas fueron a incrementar la toxicidad conforme aumenta la edad de los cultivos. Bustillos-Guzmán et al. (2012) encontraron una tendencia ligera de disminución de la toxicidad desde el inicio del cultivo hasta los días 10 y 14, de casi la mitad del valor inicial. Sin embargo, al final del experimento, observaron un incremento en la toxicidad total. De acuerdo con Anderson et al. (1990), el contenido de toxina es un reflejo de la cantidad inicial de toxina en una célula y el equilibrio entre la síntesis y la pérdida de la misma (sea por liberación al medio, catabolismo o división celular).

Con excepción del aislado BAPAZ5, en el resto de los aislados en efecto se detectó un ligero aumento de la toxicidad al final del experimento, es decir, al final de la fase estacionaria. El incremento en la toxicidad en la fase estacionaria observado en este estudio puede ser el reflejo de una tasa neta de producción de toxinas que es constante y bastante independiente de la tasa de crecimiento, como lo reporta Lartigue et al. (2009).

Algunos autores han sugerido que la variación en la toxicidad y en el perfil de toxinas obedece a cambios fisiológicos de las células durante las diferentes fases de crecimiento (Anderson et al. 1990, Band-Schmidt et al. 2006), y que la mayor producción de toxinas por célula se da durante la fase exponencial de crecimiento en

varias especies productoras de diferentes toxinas (Ivanova et al., 2006), lo cual coincide con lo observado en los experimentos realizados, con excepción del aislado BAPAZ5 en ambos medios de cultivo.

Se asume frecuentemente que la producción de toxinas es un proceso biológico intrínseco en algunos dinoflagelados toxigénicos y que su base genética está codificada en el genoma algal (Ishida et al., 1993). Sin embargo en muchas especies formadoras de FAN se ha encontrado una enorme variabilidad intraespecífica en la toxicidad (Tillman et al., 2009). Esta variabilidad en niveles y composición de toxinas entre diferentes aislados, en el caso de *A. tamarense* es bien conocida (Alam et al., 1979) y ha sido documentada en muchos casos. En aislados del Pacífico occidental, Ogata et al. (1987) reportaron una variación de más de 100 veces en la toxicidad total entre clones de una misma área e incluso diferencias de 20 veces entre subclones originados de un mismo cultivo clonal, lo que los llevó a sugerir que los aspectos cuantitativos de la producción de toxinas pueden no ser una característica hereditaria sino ser el resultado de variación fortuita y factores epigenéticos.

7.4 Toxinas tipo benzoil identificadas por resonancia magnética nuclear de protón y espectroscopía ultravioleta

Uno de los aspectos más interesantes en la investigación de las toxinas paralizantes ha sido el descubrimiento de nuevos análogos (Vale, 2010). En *G. catenatum* únicamente se habían reportado análogos hidrofílicos, hasta que Negri et al. (2003) identificaron los análogos tipo benzoil (toxinas GC), los cuales pueden ser una fracción importante de las toxinas; se han observado, en base molar, desde 1-2% en un aislado proveniente de Japón, hasta el 100% en una cepa australiana (Negri et al., 2007).

A partir del aislamiento y la identificación precisa de estas toxinas por medio de técnicas cromatográficas y espectroscópicas [cromatografía de líquidos en columna (LCC), cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a detector de fluorescencia (HPLC-FLD), cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)

preparativa, espectrometría de masas (EM), resonancia magnética nuclear (RMN) y HPLC-FLD acoplado a EM], por el grupo de trabajo de Negri, ha sido posible la identificación de los análogos tipo benzoil GC1, GC2 y GC3 en HPLC-FLD por comparación de los tiempos de retención, máxima de emisión de fluorescencia y desaparición de los picos al eliminar la oxidación post-columna, técnica utilizada posteriormente por Negri *et al.* (2007), Vale (2008a) y Bustillos-Guzmán *et al.* (2011). Vale (2008b) utilizó HPLC-FLD y HPLC-EM para reportar la existencia de otros posibles análogos como los di-hidroxi-benzoil (GC4 - GC6), benzoil N1 hidroxilados (GC1a - GC6a) y sulfato-benzoil (GC1b - GC6b).

La presencia de toxinas hidrofílicas, tanto en aislados mexicanos como en aislados de otros países, ha sido un tema ampliamente discutido e investigado. En el caso de las investigaciones mexicanas, Band-Schmidt *et al.* (2010) hicieron una revisión y concluyen que de manera característica, *G. catenatum* produce los análogos STX, neoSTX, GTX2-3, dcGTX2-3, B1, C1 y C2. Las toxinas decarbamoil (dcGTX2-3) y *N*-sulfocarbamoil (C1 y C2) son generalmente los análogos con mayor contribución molar, sin embargo, no se consideraron los análogos tipo benzoil por falta de estudios. Para el caso de la presencia de las toxinas benzoil, Bustillos-Guzmán *et al.* (2011) analizaron un aislado de Bahía Concepción por HPLC-FLD, después de hacer una oxidación con periodato y extracción en fase sólida en cartuchos C18. Los autores reportan la presencia de varios análogos de toxinas tipo benzoil, aunque en sentido estricto no hubo confirmación de ello, debido a que no utilizaron estándares por la falta de disponibilidad y, por lo tanto, los resultados no fueron contundentes, como al utilizar técnicas espectroscópicas o espectrometría de masas. En este análisis se llevó a cabo un fraccionamiento como el reportado por Vale (2008b), para separar los análogos tipo benzoil, y por espectroscopía se demostró la ocurrencia del grupo bencénico en una de las fracciones. Este grupo se encuentra en el carbono 17, tomando el lugar del grupo carbamoil de las toxinas carbamatadas (STX, neoSTX y GTX1 a GTX4), y su presencia caracteriza a las toxinas tipo benzoil. En conclusión,

el análisis confirmó la existencia de este grupo de toxinas en otro aislado de costas mexicanas y corrobora los resultados de Bustillos-Guzmán et al. (2011).

La existencia de análogos tipo benzoil en aislados mexicanos de *G. catenatum* es importante por diversos motivos. Uno de ellos es el peligro potencial para la salud pública, ya que, aunque aún se desconoce su toxicidad en mamíferos (*in vivo*), Llewellyn et al. (2004) demostraron en un estudio realizado con sinaptosomas de cerebro de rata, que estas toxinas tienen una fuerte afinidad por los canales de sodio, menor que la saxitoxina, pero similar a la de las GTX y las toxinas sulfocarbamoil. La información obtenida en el estudio arriba mencionado resalta la importancia de analizar la toxicidad de los análogos tipo benzoil *in vivo* en mamíferos, ya que la toxicidad en los organismos es el resultado de la capacidad de una toxina de ser absorbida y distribuida al sitio de acción y no sólo de provocar un efecto en un blanco farmacológico. La presencia de un grupo que disminuye su polaridad, el grupo benzoil, genera la posibilidad de que este grupo de toxinas pueda tener una mayor capacidad que la saxitoxina y otros análogos para cruzar los epitelios, y por lo tanto podrían ser absorbidos con mayor facilidad a través del tracto intestinal de los mamíferos y del epitelio vascular, lo que significa un riesgo para la salud pública (Llewellyn et al., 2004). Además, esta menor polaridad podría reducir su tasa de eliminación por lo que las toxinas podrían ser retenidas por mayor tiempo en los tejidos grasos, como se ha demostrado con las brevetoxinas en estudios realizados en ratas (Llewellyn et al., 2004; Poli et al., 1990). Es importante mencionar que estas toxinas no son detectadas con el método de monitoreo y detección por HPLC (Negri et al., 2003), y debido a que existe una tendencia creciente a abandonar los bioensayos en animales para pruebas de biotoxinas marinas, reemplazándolos por análisis químicos (Vale, 2011), aumenta el riesgo de no detectarlas. Por otro lado, Vale (2008a) demostró que en algunos bivalvos las toxinas tipo benzoil sufren, en mayor o menor proporción, una biotransformación al perder la cadena lateral que contiene al grupo benzoil por la acción de la enzima

carbamoilasa, produciendo los análogos decarbamoil, probablemente de mayor toxicidad.

Otro factor de importancia en el estudio de estos nuevos análogos, es su potencial farmacológico. La STX, por su alta toxicidad, ha mostrado tener poco potencial como anestésico local en pruebas realizadas en conejo y ratón, pero gran potencial para la investigación celular, específicamente en los canales de sodio regulados por voltaje (Fusetani y Kem, 2009). Algunos derivados de menor toxicidad, las gonyautoxinas (GTX) se han utilizado con éxito en el tratamiento de fisuras anales crónicas en humanos (Garrido et al., 2007). El hecho de confirmar los análogos tipo benzoil en aislados de costas mexicanas genera la oportunidad de continuar con su investigación en nuestro país, tanto para determinar la toxicidad en mamíferos, como para, posteriormente, conocer su potencial farmacológico.

7.5 Variaciones y relaciones de las toxinas tipo benzoil

Este es el primer trabajo que reporta la producción de toxinas tipo benzoil a lo largo de todo el cultivo de *G. catenatum* y las variaciones durante el mismo.

En todos los aislados y medios se encontraron variaciones durante el cultivo, lo cual coincide con lo hallado en las toxinas hidrofílicas. En las toxinas tipo benzoil, sin embargo, no fue posible encontrar una tendencia clara en ningún aislado ni medio de cultivo. Esto ha sido reportado anteriormente en las toxinas hidrofílicas, en donde, aunque se encuentran variaciones con el tiempo de cultivo, no se encuentra una tendencia clara (Bustillos-Guzmán et al., 2012).

No es posible asegurar cuál de los análogos se encontraba en mayor proporción, debido a que se desconoce el factor de respuesta de la toxina en el detector de fluorescencia, sin embargo, de acuerdo a los resultados, se observó que todas las toxinas tipo benzoil se encontraban prácticamente de manera constante en todos los aislados. Por otro lado, sí es posible comparar el mismo análogo entre aislados, y en este caso resulta interesante que los aislados mexicanos y portugueses analizados

anteriormente con el mismo método, las toxinas GC1-2 fueron casi tan abundantes como la GC3 y la presencia de GC1b-2b fue claramente visible en los cromatogramas en muestras tomadas durante la fase exponencial (Vale, 2008b; Bustillos-Guzmán et al., 2011; Gu et al., 2013). En este trabajo se observaron variaciones en el mismo aislado durante el tiempo del cultivo y también diferencias entre aislados, debidas a las diferencias intraespecíficas comentadas anteriormente. La presencia simultánea de GC1-2 y GC3 fue observada por Negri et al. (2007) en todos los aislados analizados de distintas zonas geográficas, con la excepción de un aislado de Corea en el que no se encontró ninguno de ellos. Gu et al. (2013), en aislados de China, encontraron también los tres análogos, pero con diferencias importantes en las proporciones, particularmente en uno de los aislados, en el que las proporciones fueron mucho menores. Aunque el estudio de Negri et al. (2007) no incluye todas las posibles variantes de las toxinas tipo benzoil, no se reportó una dominancia de las toxinas GC1-2 sobre la GC3. En el presente estudio, la dominancia de GC3 fue evidente; las áreas obtenidas para GC3 fueron en prácticamente todos los casos, muy superiores al resto, y ésta podría ser una característica distintiva de los aislados analizados.

En los análisis realizados por HILIC-MS/MS se encontraron únicamente los análogos α , mientras que por HPLC-FLD se detectaron los análogos β . Estas diferencias pudieron deberse a las diferencias en las técnicas y las sensibilidades de las mismas, pero también a una epimerización debido al manejo y envío de las muestras. Se recomendaría realizar nuevamente los análisis utilizando las dos técnicas y con el menor manejo posible, evitando que las muestras pasen un tiempo prolongado a temperaturas altas, y procurando hacer los envíos durante los meses fríos.

En cuanto a las relaciones directas (variaciones similares) entre las toxinas tipo benzoil, no hubo una sola que se encontrara en todos los aislados y medios. Si una relación directa se encuentra de manera constante en todos los medios y tratamientos, se podría considerar que las toxinas están siendo producidas de

manera coordinada y probablemente intervengan los mismos factores, como la cantidad y tipo de nutrientes en el medio. Por ejemplo, este tipo de relación se encontró entre las toxinas GC1b y GC1/2 únicamente en medio GSe en tres de los cuatro aislados, lo que podría indicar que en este medio, la producción de estas toxinas está relacionada.

El máximo número de relaciones directas se encontró entre las toxinas GC2b y GC1/2 (en los aislados BAPAZ5 GSe, BAPAZ7 f/2, GCCV7 GSe y 62L GSe), sin embargo, al no encontrarse en todos los aislados y medios, no es posible afirmar que esta relación sea constante o significativa, sin embargo es interesante señalar que se encontraron relaciones directas entre todas las toxinas, aunque éstas no fueran constantes en los aislados y medios, lo cual constituye un tema de estudio a futuro porque pueden ser un indicador de la relación en la producción de estas toxinas a nivel celular.

En cuanto a las relaciones inversas (variaciones opuestas), éstas sólo fueron encontradas en BAPAZ5 en medio f/2. Al no ser encontradas entre más toxinas y en el resto de los aislados y medios, no es posible establecer la hipótesis de que unas toxinas son precursoras de otras, al menos con la información disponible hasta este momento.

7.6 Relación de las toxinas decarbamoil y las toxinas tipo benzoil

Se analizaron las posibles relaciones entre las toxinas decarbamoil y las toxinas tipo benzoil debido a que *G. catenatum* es la única especie que produce ambas, por lo cual se partió de la hipótesis de que unas podrían ser precursoras de las otras, ya sea por pérdida de la cadena lateral, en cuyo caso las toxinas tipo benzoil serían precursoras de la decarbamoil, o por la ganancia del grupo benzoil, que mostraría que las decarbamoil son las precursoras de las benzoil.

Se encontró una menor cantidad de relaciones directas (13) que de relaciones inversas (21), sin embargo, ninguna de estas relaciones fue encontrada en todos los

aislados y medios de cultivo, por lo cual no es posible afirmar con certeza que haya una relación constante entre la producción de estas toxinas. Las variaciones directas encontradas en algunos aislados sugerirían que se producen ambas toxinas al mismo tiempo, sin embargo, en algunas ocasiones se encontraron relaciones directas e inversas entre las mismas toxinas en diferentes aislados y medios de cultivo.

De acuerdo a la hipótesis planteada, las relaciones que se esperaba encontrar eran inversas, sin embargo con los datos obtenidos en este trabajo no es posible afirmar que las toxinas decarbamoil sean precursoras de las benzoil ni viceversa, debido al bajo número de relaciones inversas encontradas: de un número esperado de 128 relaciones inversas (en el caso en que todos los aislados y medios hubieran presentado este tipo de relaciones), se encontraron tan sólo 21, es decir, 16% de lo esperado.

Cabe señalar que este trabajo es el primero que analiza las relaciones entre la producción de toxinas en la búsqueda de un parámetro que nos permita esclarecer la relación en la producción de las toxinas a nivel celular, por lo cual no se cuenta con literatura de apoyo que provea de datos comparativos, sin embargo nuestros resultados constituyen una aproximación hacia un mayor conocimiento sobre las toxinas tipo benzoil y las posibles relaciones con las toxinas decarbamoil.

En un principio se estableció la hipótesis de la existencia de una relación entre las toxinas decarbamoil (dc) y las toxinas benzoil, debido a que estas dos son producidas únicamente por *G. catenatum*, y porque las toxinas dc, al carecer por completo de la cadena lateral, podrían ser fácilmente precursoras de cualquier otra toxina. En un futuro se analizarán las relaciones de las toxinas tipo benzoil con el resto de las toxinas hidrofílicas.

7.7 Aislamiento de las toxinas tipo benzoil

El análisis por HILIC-MS/MS mostró la presencia de 15 de las 18 toxinas benzoil reportadas por Vale (2008b). Por HPLC-FLD sólo se detectaron grupos de toxinas tipo benzoil, debido principalmente a la falta de estándares para comparar, a las condiciones de oxidación con peróxido de hidrógeno, que impiden la detección de análogos N1-OH, y a la baja concentración de las muestras, ya que aquellas se obtuvieron por filtración de 20 – 50 mL de cultivo, mientras que para el aislamiento se utilizó el extracto obtenido de 300 L de cultivo (29.01 g de biomasa en peso húmedo). Incluso con el análisis por HILIC-MS/MS en las muestras de filtros con baja concentración (aislado 62L), sólo fue posible detectar 3 toxinas benzoil (datos discutidos anteriormente).

Los cultivos de biomasa fueron realizados con tres aislados (BAPAZ5, GCCV7 y 62L) durante dos años, iniciando al comienzo de los experimentos de crecimiento y análisis de toxinas. Los aislados fueron seleccionados en función de la densidad observada a simple vista en los cultivos en mayor volumen y no en función de la cantidad de toxinas tipo benzoil que producen porque para ese momento no se contaba con la información. Con el fin de obtener la mayor cantidad de toxinas, se mezclaron los extractos de la biomasa obtenida de los tres aislados, por lo que no es posible determinar si las toxinas detectadas se encontraban en todos o sólo en alguno(s) de ellos.

El término *cromatografía preparativa* generalmente se asocia con grandes columnas y altos flujos. Sin embargo, no es el tamaño del equipo o la cantidad de fase móvil bombeada en el sistema lo que determina el tipo de cromatografía, sino el objetivo de la separación. El objetivo de la cromatografía analítica es la determinación cualitativa y cuantitativa de los compuestos. El de la cromatografía preparativa es el aislamiento y purificación de un compuesto de interés (Huber y Majors, 2007). En condiciones ideales, sin embargo, esta técnica se lleva a cabo con una columna específicamente designada para ello, la cual tiene mayores dimensiones que las columnas analíticas y por lo tanto, una mayor capacidad de carga. En este trabajo, la purificación de las

fracciones se realizó con una columna analítica (SeQuant ZIC-HILIC de 150 x 4.6 mm) en inyecciones sucesivas de 50 µL cada una (hasta 60 inyecciones para separar 3 mL de muestra en corridas de 45 min, es decir, procesos de duración de hasta 45 horas [1.9 días]). El fraccionamiento se guio por el análisis por HILIC-MS/MS de cada una de las fracciones obtenidas.

Una de las dificultades para determinar con precisión la naturaleza de los análogos GC por el método LC-MS/MS es que varios de ellos poseen la misma masa, por ejemplo, GC4/5 y GC1a/2a, con masa de 489; GC6 y GC3a, con masa de 393 y GC1/2 y GC6b, con masa de 473 (Tabla 8). Esta característica se debe a que en la molécula presentan los mismos grupos sustituyentes (grupo hidroxilo y grupo sulfato), pero en diferentes sitios de la molécula (grupo hidroxilo en N1 o en el anillo benzoil; grupos sulfato en C11 o en el anillo benzoil), por lo que para su identificación se analizaron los fragmentos moleculares obtenidos durante la espectroscopía de masas en tándem tomando como base los experimentos realizados por Vale (2008b).

En la fracción obtenida en el primer fraccionamiento por CC con 20% MeOH (Fracción 2 = F2) se identificaron 12 toxinas tipo benzoil, que incluyeron las toxinas N1-OH GC4/5, GC4a/5a y GC4b/5b. Estas no fueron detectadas por el método de fluorescencia por las razones comentadas anteriormente. También se detectó un número mayor de toxinas di-hidroxiladas (análogos GCa) que las detectadas en el análisis de los filtros por HILIC-MS/MS.

En la fracción obtenida con 100% MeOH (Fracción 3 = F3) se detectaron 3 toxinas tipo benzoil que no se encontraron en la F2, lo que indica que probablemente, al realizar el fraccionamiento (*clean up*) para el análisis de estos análogos en los filtros obtenidos durante las curvas de crecimiento, esta fracción, que no fue recuperada, pudo contener más análogos tipo benzoil. Aunque la toxina GC3 sí fue detectada en las muestras obtenidas con 20% MeOH de los filtros, probablemente una mayor cantidad de esta toxina se perdió en la fracción no recuperada. Estos datos indican también que el fraccionamiento (*clean up*) llevado a cabo con los cartuchos de 2 g de sílica C-18 no fue tan específico como el realizado en la columna cromatográfica con

100 g de sílica C-18, debido a que la proporción de sílica:muestra fue mucho mayor en la columna (cartucho de 2 g de sílica para 1 mL de muestra (baja concentración de toxinas) [2:1]; columna de 100 g de sílica para 13 mL de muestra (alta concentración de toxinas) [10:1.3]).

Aunque el cromatograma obtenido por HILIC-MS/MS de esta fracción mostró dos masas de toxinas: 377, correspondiente a GC3 y 393, correspondiente a GC6 y/o GC3a, después del primer fraccionamiento no se volvió a observar la masa 393. Los fraccionamientos posteriores permitieron obtener la toxina GC3 con mayor pureza, sin embargo no se realizaron análisis por $^1\text{H-RMN}$ porque su estructura es conocida y su masa es inequívoca.

Para comprobar la pureza de los compuestos obtenidos, es necesario el uso de otras técnicas cromatográficas, como el HPLC-FLD, ya que la técnica de HILIC-MS/MS nos permite observar únicamente los compuestos esperados a partir de las masas programadas y no muestra compuestos con otras masas. Es importante señalar que cada proceso de fraccionamiento – secado – análisis por HILIC-MS/MS tomaba alrededor de 120 horas, por lo que no fue posible comprobar la pureza de cada una de las fracciones obtenidas.

Debido a que se utilizó una columna analítica, la separación de cada fracción se llevó a cabo en múltiples inyecciones de 50 μL cada una, y durante cada proceso, el equipo y la columna fueron sometidos a cambios de temperatura (cambios normales en la temperatura ambiente durante el día), por lo que es posible que los tiempos de retención de los compuestos hayan variado ligeramente después de un número de inyecciones, resultando en fracciones con mezclas de compuestos. El equipo utilizado sólo cuenta con detector de UV, pero no fue posible utilizar los espectros ultravioleta para la separación, ya que las absorciones fueron muy bajas y corresponden básicamente al grupo bencénico, el cual es característico de todos los análogos benzoil.

La imposibilidad de obtener extractos puros en cantidades suficientes para realizar pruebas *in vivo* (modelo ratón) indican que es necesario contar con una mayor cantidad de extracto para realizar las separaciones y los análisis requeridos, si se desea obtener toxinas con un grado de pureza aceptable para ser utilizadas en pruebas de toxicidad. También se sugiere el uso de una columna preparativa para evitar la mezcla de fracciones debido al desplazamiento de los tiempos de retención de los compuestos debido a cambios ambientales. Sin embargo, con este estudio fue posible comprobar que una gran variedad de toxinas tipo benzoil se encuentran en la mezcla de los aislados analizados, pero en algunas ocasiones en concentraciones tan bajas que no se pueden detectar a menos que se obtengan de biomásas mayores.

7.8 Modo teórico de unión de los análogos de STX en el en canal de sodio regulado por voltaje

A pesar del conocimiento actual de las estructuras químicas y el origen de los análogos tipo benzoil (Negri et al., 2003), existen pocos esfuerzos de investigación para determinar otras propiedades de estas toxinas, como toxicidad, afinidad con sus receptores y mecanismo de acción. Determinar estas características no ha sido posible principalmente por la falta de estándares analíticos, y esta carencia es el resultado de la dificultad de su aislamiento y purificación a partir de cultivos de *G. catenatum*. La estrategia alternativa para explorar estas propiedades es el uso de herramientas computacionales y análisis estructural para descifrar las propiedades de reconocimiento y unión (Brooijmans, 2009; Gordon et al., 2013).

Este trabajo de docking molecular ha probado ser exitoso en la exploración e interpretación de las propiedades de unión entre receptores y ligandos, tales como las características electrostáticas, los obstáculos físicos y otras propiedades de las formas moleculares de ambas estructuras, lo cual provee valores de energía libre y formas de unión (Brooijmans, 2009). La técnica de docking tiene el potencial de revelar, con gran detalle estructural, las interacciones moleculares, los mecanismos y

los contactos estructurales involucrados en el proceso de reconocimiento, lo cual no es fácil de deducir a partir de experimentos electrofisiológicos (Gordon et al., 2013).

Algunos estudios *in silico* sobre la afinidad de las toxinas que bloquean el poro del canal Na_v utilizan docking molecular sobre modelos homólogos. Se han propuesto algunos mecanismos y modos de unión de estas toxinas, sin embargo no se ha determinado el modo de unión preciso (Gordon et al., 2013).

Estudios anteriores han mostrado la importancia de los residuos ácidos, en los cuales las cadenas carboxílicas laterales se localizan en las mismas posiciones estructurales (hacia el canal) en los cuatro dominios en los que se une la STX (Terlau et al., 1991; Choudhary et al., 2002). En este estudio se observó una frecuencia de interacción >90% de la STX y sus análogos con la cadena lateral D400 y K1237. Con los residuos E403, E755 y E758, la frecuencia fue >80%. Con base en estos datos, se postuló que la STX y sus análogos acceden al canal Na_v 1.4 por interacciones electrostáticas, las cuales son las interacciones no covalentes entre ligandos y proteínas. Este tipo de interacciones pueden explicar la gran afinidad y toxicidad relativa de estas toxinas.

Ya que el ΔG del conjunto ligando-proteína es el máximo determinante de la afinidad de unión, la predicción de su valor es la meta más importante en los métodos teóricos y computacionales. En este estudio, el ΔG del análogo más potente, la STX, fue de $-12.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, un valor similar o incluso mayor que el de otros análogos, como la toxina C2, cuya toxicidad es de 1/10 en comparación con la de la STX, pero cuyo ΔG fue de $-14.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Esta aparente incongruencia en los valores de energía y en la potencia real de la toxina puede ser el resultado del mayor peso molecular de la toxina C2, en comparación con el de la STX, proporcionándole una mayor superficie de interacción con los residuos del canal. Su alto peso molecular también puede afectar su paso a través de las barreras lipídicas, y sus cargas eléctricas, las cuales no están compensadas en la STX y sí lo están en las toxinas sulfocarbamoil, que poseen dos grupos sulfato y por lo tanto son eléctricamente neutras, puede ser otro factor que disminuya su toxicidad *in vivo*.

Choudhary et al. (2002) reportaron que las GTX eran aproximadamente tres veces menos potentes que sus contrapartes sin grupos sulfato en el C-11, y que la presencia del N1-OH confiere una mejor unión si además la molécula contiene el sulfato en C-11, como en las toxinas GTX 1,4 o sin este grupo, como en NEO. Además, encontraron que el grupo sulfato en C-11 interactúa principalmente con el residuo E758 y D1241. En contraste, en este estudio se encontró una menor energía de unión en las toxinas no sulfatadas en C-11, con una diferencia de $-1.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. También se encontró un valor menor de energía en los análogos no N-1 hidroxilados en comparación con los hidroxilados, siendo esta diferencia de $-1.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. A partir de estos resultados se infiere que el efecto del tamaño de la molécula, que podría obstaculizar su unión, tiene un papel importante en el acceso hacia los residuos localizados en zonas más profundas de la cavidad del poro en esta conformación del canal. No se observó interacción de los grupos sulfatos del C-11 con el residuo E758, pero sí se observaron algunas interacciones con el residuo D1241 y D1532 (<5%, considerando que 66% de los análogos contenían grupo sulfato en el C-11). Se observó que el grupo sulfato crea interacciones electrostáticas con K1237. Estas diferencias estructurales se relacionan con la capacidad de estas pequeñas toxinas de unirse al canal con modos alternativos de unión y no de una sola manera, como se asume generalmente.

Es importante considerar las dimensiones moleculares en el contexto de la eficiencia en el bloqueo y afinidades de unión. Las dimensiones de la STX en su estructura cristalina son de $8.5 \times 4 \times 6.5 \text{ \AA}$, la cual se incrementa en casi 6 \AA a lo largo de su eje principal en los análogos benzoil. A pesar del mayor tamaño de estos análogos, son capaces de acomodarse en la cavidad central del poro, como ha sido observado en estudios *in vitro* (Llewellyn et al., 2004; Llewellyn, 2006). Por lo tanto, esta cavidad es suficientemente grande para albergar a estas toxinas.

Chen y Chung (2012) reportaron que la toxina peptídica μ -conotoxina PIIIA es capaz de bloquear el canal desde el vestíbulo externo en el canal de sodio regulado por voltaje Na_vAb con diversos modos de unión, a pesar de su gran tamaño molecular

(más de 20 aminoácidos, ~2,500 Da). Los mismos mecanismos son posibles para los análogos de STX, los cuales son moléculas de menores dimensiones (~300–569 Da) en comparación con las toxinas peptídicas, permitiendo así mayor movimiento en el canal Na_v . En este estudio se demostró que existen diferentes modos de unión con energías similares, y que los distintos modos de unión son igualmente probables.

Tubaro et al. (2012) mostraron que todos los análogos de STX se unen en el mismo sitio, aunque con diferentes afinidades, lo cual fue confirmado en este estudio. Sin embargo, no se encontró relación directa entre la afinidad de unión y potencia de la toxina, lo cual se puede deber a las propiedades biológicas que influyen los parámetros farmacocinéticos, incluyendo la cantidad de moléculas que llegan al canal después de atravesar las barreras biológicas, las cuales no son consideradas en los estudios de docking.

Llewellyn (2007) realizó un estudio sobre la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR, Quantitative Structure-Activity Relationship) para determinar descriptores moleculares que consigan describir la potencia de las toxinas y predecir con éstos las propiedades de toxicidad de los análogos de STX que no han sido analizadas. En su estudio él encontró una relación entre los descriptores químicos y las propiedades de toxicidad de las TP, sin embargo, estas relaciones no son lineales o directas, y difieren entre las isoformas de los canales de sodio. Esta variación ocurre debido a que cada isoforma tiene diferentes residuos que conforman el poro, lo que afecta el reconocimiento de la toxina. Este estudio no consideró las propiedades de unión, las cuales pueden resultar en valores diferenciales de afinidad, relacionados con la potencia del bloqueo y, consecuentemente, con los efectos tóxicos.

Este estudio provee información crítica para aclarar el mecanismo de unión de la STX y sus análogos en el $\text{Na}_v 1.4$, sin pruebas experimentales. En él se encontró una toxicidad teórica superior para los análogos hidroxibenzoil sulfatados que para los análogos sin grupo sulfato, lo que contrasta con el estudio de Llewellyn et al. (2004). En este estudio, el autor realizó pruebas con sinaptosomas de cerebro de rata, los análogos benzoil se unieron fuertemente a los canales, pero con menos potencia que

la STX. En las simulaciones realizadas en el presente estudio se encontró que 12 de los 17 análogos benzoil se unen fuertemente al canal Nav 1.4, con un ΔG menor que la STX (Fig. 73). La ausencia de una correlación directa entre el ΔG y la potencia de la toxina puede ser el resultado de no tomar en cuenta los parámetros biológicos externos que modifican el comportamiento del canal, como la cantidad de agua y los componentes lipídicos, factores que están asociados con el comportamiento farmacocinético y los procesos de reconocimiento de los ligandos (Correa-Basurto, com. pers.).

Es muy importante considerar que existe una gran diferencia entre la unión de las toxinas en el canal de sodio regulado por voltaje y la toxicidad en un organismo. Se sabe que existen muchos factores biológicos que no son tomados en cuenta en las simulaciones por docking (en donde se considera a la proteína como una estructura rígida y no flexible, y los comentados en el párrafo anterior), sin embargo este acercamiento describe de manera comparativa las propiedades de unión de las toxinas en el canal Na_v a nivel atómico con valores de energía. Estos datos pueden ser comparados con datos de toxicidad cuando se cuente con estándares de estos nuevos análogos.

En conclusión, incluso con la falta de datos experimentales de toxicidad para varios análogos de la STX, incluyendo los análogos benzoil, producidos por *G. catenatum*, las simulaciones del comportamiento de unión predicen que son tóxicos, lo que significa un riesgo sanitario durante los florecimientos de esta especie, particularmente en zonas donde se cultivan o se colectan moluscos, ya que estos análogos no se encuentran en la lista de las toxinas analizadas de manera rutinaria, y los riesgos cuantitativos de toxicidad aún son desconocidos. Aunque el estudio *in silico* aquí presentado no muestra una relación lineal entre la toxicidad teórica y los datos experimentales existentes, representa el primer modelo de acción de los análogos benzoil, lo cual contribuye a un mejor entendimiento de los modos de acción de las TP, y sugiere que la unión con el canal de sodio es mediada principalmente por interacciones electrostáticas con las moléculas.

8. Conclusiones

Nuestros resultados muestran la presencia de toxinas benzoil en todos los aislados analizados en este trabajo, por lo tanto, es muy probable su producción sea una característica inherente de la especie, la cual se desconocía. Los métodos utilizados para el estudio de las toxinas PSP han fallado en detectarlas además de que históricamente su estudio se había enfocado a las toxinas hidrofílicas. La presencia de las toxinas benzoil en los aislados estudiados no sólo es importante desde el punto de vista científico, sino también desde la perspectiva de inocuidad alimentaria. Así por ejemplo, el hecho de que estén presentes en esta especie y cuando son ingeridas por organismos filtradores una fracción de ellas pueda biotransformarse a toxinas de mayor potencia (sin el grupo benzoil), les confiere el estatus de moléculas involucradas en la salud pública.

Se observó la presencia de toxinas tipo benzoil durante todas las etapas de crecimiento en todos los aislados y medios de cultivo, sin embargo, la variabilidad observada entre los diversos grupos de análogos no ha permitido probar las relaciones que esperábamos, aunque las observamos en algunos casos. Estos resultados indican que se debe continuar su estudio en más aislados para poder observar las tendencias de estas relaciones. La variabilidad intraespecífica queda clara en los resultados de este trabajo y afirma los conceptos de la variación epigenética, los efectos ambientales y del enorme potencial evolutivo en los procesos biológicos de esta especie así como se ha demostrado en otros organismos productores de toxinas (Smayda 1997; Lakeman et al., 2009; Tillman, 2009). *Gymnodinium catenatum* es un organismo que produce una diversidad de análogos con toxicidades distintas, y a pesar de que se han realizado una enorme cantidad de estudios sobre las TP, ha sido hasta hace poco más de diez años que se identificaron al menos 18 nuevos análogos: las toxinas tipo benzoil. Considerando que se conocen al menos 18 análogos más (denominados en este trabajo como “toxinas hidrofílicas”), se sabe ahora que este dinoflagelado produce al menos 36 toxinas, una cantidad de compuestos digna de atención desde el punto de vista

ecológico y químico, pero también desde el de la salud pública, ya que muchos de ellos no han sido suficientemente estudiados y su toxicidad permanece desconocida.

En este estudio se observó que el extracto de suelo favorece, en la mayoría de los casos, la densidad celular y la producción de toxinas, como ha sido observado anteriormente (Prakash et al., 1973; Granéli et al., 1989, Blackburn et al., 1989). Sin embargo aún no se ha establecido de manera específica la contribución de los extractos húmicos y diversos micronutrientes en el desarrollo de estas características, lo cual constituye un tema a investigar a mayor profundidad.

Para la detección de toxinas de manera inequívoca se recomienda el uso de métodos combinados (p. ej. HPLC-FLD + LC-MS/MS), ya que el uso de un solo método para la detección y cuantificación de toxinas presenta las desventajas discutidas anteriormente, que pueden llevar a errores de detección por la presencia de otros compuestos o se presta a la confusión entre toxinas que coeluyen, impidiendo la correcta determinación del perfil de toxinas y por lo tanto, la toxicidad de los aislados analizados.

Las técnicas bioinformáticas utilizadas en este trabajo señalan claramente que las toxinas tipo benzoil tienen una afinidad hacia el canal de sodio regulado por voltaje ($Na_v 1.4$), lo que demuestra de manera teórica que son potencialmente tóxicas. Aunque Llewellyn et al. (2004) han demostrado esta toxicidad en sinaptosomas de rata, este estudio nos ha permitido hacerlo para todos los análogos, incluyendo las toxinas tipo benzoil. La técnica de docking molecular ha demostrado ser una herramienta valiosa para la determinación de las interacciones de las toxinas a nivel atómico y molecular, y representa un avance en su estudio, sin embargo aún es necesario profundizar en su uso para generar modelos que proporcionen información sobre la toxicidad, especialmente para los análogos que no han sido probados por métodos biológicos por la dificultad de su aislamiento, como es el caso de las toxinas tipo benzoil. Aunque el docking molecular proporciona información que contribuye al conocimiento de los modos de unión de las toxinas en su proteína blanco, el canal de sodio regulado por voltaje, este método no considera diversos factores involucrados

en la farmacocinética, como los iones presentes, las moléculas de agua y de lípidos, además de que considera a la proteína como una estructura rígida, cuando su naturaleza es flexible. Se recomienda el uso de dinámica molecular en estudios posteriores para adquirir un mayor conocimiento sobre los modos de unión entre la proteína y la toxina, que eventualmente podría proporcionar información más precisa sobre su toxicidad en los sistemas biológicos.

Este trabajo contribuye al escaso conocimiento sobre los análogos tipo benzoil, sin embargo, es necesario profundizar en su estudio desde todas las perspectivas, incluyendo la química, la ecología química, la biología y la genética.

9. Perspectivas de estudio

Las necesidades de investigación sobre *Gymnodinium catenatum* y las toxinas que este organismo produce abarcan una gran cantidad de aspectos que requieren de un enfoque multidisciplinario.

Existe una preocupación global por el aumento observado en los fenómenos de FAN, y *G. catenatum* es una de las especies observada cada vez con mayor frecuencia y en más sitios geográficos (Hallegraeff, 1993); este aumento probablemente está relacionado al incremento en el interés sobre esta especie por ser productora de TP, las cuales representan un riesgo para la salud humana, el ambiente y la economía, pero también se ha comprobado la introducción de esta especie en ecosistemas en donde antes no se encontraba, por medio de agua de lastre de los barcos, contaminación y sobre enriquecimiento de zonas costeras (Hallegraef y Gollasch, 2006; Bolch y Salas, 2007). El estudio de las poblaciones, la introducción de estos organismos en otros ecosistemas, los parámetros ambientales que desencadenan los FAN y las consecuencias de éstos sobre el ambiente a mediano y largo plazo, son temas de importancia en investigaciones futuras.

La investigación sobre la ecología química de los microorganismos marinos es una contribución para nuestro entendimiento sobre su importancia en la dinámica poblacional de los organismos productores de toxinas y sus efectos en las cadenas tróficas marinas. Existen aún temas sin esclarecer, como el rol de estos compuestos en los organismos productores y las ventajas que les confieren.

En las últimas décadas, el número de publicaciones sobre los metabolitos de microalgas marinas ha mostrado un extraordinario incremento, y como resultado ha surgido una nueva aproximación para su estudio desde el punto de vista de la ecología química. La importancia de explorar la función y la coevolución de los metabolitos secundarios es cada vez más evidente para los químicos, ecólogos y biólogos (Cembella, 2003). Existen, no obstante, retos importantes para este estudio. Los metabolitos con actividad biológica se producen típicamente en cantidades

minúsculas por las microalgas marinas (Wright y Cembella, 1998) y los procesos de extracción, aislamiento y purificación de estas sustancias traza son complicados, además de que los métodos convencionales para su identificación presentan varias desventajas. Aunque la estructura de la STX se conoce desde hace varias décadas, el descubrimiento de nuevos análogos ha sido continuo. El uso de métodos de detección con mayor sensibilidad permitirá que en un futuro se identifiquen más compuestos relacionados y en una mayor cantidad de organismos (Wiese et al., 2010).

Las rutas de biosíntesis y funciones metabólicas y fisiológicas de estos compuestos son otro tema de estudio urgente. La caracterización de las rutas biosintéticas y los genes involucrados en dinoflagelados y cianobacterias también contribuirán al entendimiento sobre la historia evolutiva de estos genes, su origen y transferencia (Kellman y Neilan, 2007). Por otro lado, el conocimiento sobre las rutas de biotransformación puede proveer información para la remoción eficiente de estas toxinas del medio y su detoxificación (Smith et al., 2001).

Finalmente, un mayor entendimiento de las funciones intra y extracelulares de la STX y sus análogos podrán abrir nuevos campos de investigación, como su aplicación farmacéutica.

El campo de estudio de las ficotoxinas es amplio y aún quedan muchos aspectos que abordar que exigen la participación de investigadores de todas las disciplinas relacionadas con la biología, la ecología, la química, la medicina y la farmacología. Sin duda, el futuro de la investigación sobre *G. catenatum* y las TP ofrece oportunidades y retos que deben ser afrontados en un futuro muy próximo.

10. Literatura citada

- Alam, M.I., C.P. Hsu, Y. Shimizu, 1979. Comparison of toxins in three isolates of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 15: 106–110.
- Alonso-Rodríguez R., J.L. Ochoa, 2004. Hydrology of winter-spring “red tides” in Bahía de Mazatlán, Sinaloa, Mexico. *Harmful Algae*, 3: 163–171.
- Alonso-Rodríguez R., J.L. Ochoa, M. Uribe-Alcocer, 2005. Grazing of heterotrophic dinoflagellate *Noctiluca scintillans* (Mcartney) Kofoid on *Gymnodinium catenatum* Graham. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 47: 6–10.
- Alonso-Rodríguez R. and F. Páez-Osuna, 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: A review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture*. 219: 317–336.
- Anderson, D.M., D.M. Kulis, B.J. Brinder, 1984. Sexuality and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*: cyst yield in batch cultures. *J Phycol* 20: 418–425.
- Anderson D.M., J.J. Sullivan, B. Reguera, 1989. Paralytic shellfish poisoning in northwest Spain: the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon*, 27: 665–674.
- Anderson, D.M., D.M. Kulis, J.J. Sullivan, S. Hall, C. Lee, 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. *Mar. Biol.* 104: 511–524.
- Anderson D.M., A.W. White, 1992. Marine biotoxins at the top of the food chain. *Oceanus* 35(3): 55–61.
- AOAC, 2006. Official Method 2005.06 Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Shellfish. Prechromatographic Oxidation and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. First Action 2005. AOAC International.
- Baden D.G., Bourdelais A.J., Jacocks H., Michelliza S., J. Naar, 2005. Natural and derivative brevetoxins: historical background, multiplicity and effects. *Environ. Health Perspect.*, 113 : 621–625.
- Baker, T.R., G.J. Doucette, C.L. Powell, G.L. Boyer, F.G. Plumley, 2003. GTX4 imposters: characterization of fluorescent compounds synthesized by *Pseudomonas stutzeri* SF/PS and *Pseudomonas/Alteromonas* PTB-1 symbionts of saxitoxin-producing *Alexandrium* spp. *Toxicon* (41)3: 339–347.
- Balech E., 1964. El plancton de Mar del Plata durante el período 1961-1962. *Boletín del Instituto de Biología Marina, Universidad Nacional de Buenos Aires, Mar del Plata*. 4: 1-49.
- Band-Schmidt, C.J., L. Morquecho, C.H. Lechuga-Devéze, M. Anderson, 2004. Effects of growth medium, temperature, salinity and seawater source on the growth of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *J Plankton Res* 26 : 1459–1470.
- Band-Schmidt C.J., Bustillos-Guzmán J., Gárate-Lizárraga I., Lechuga-Devéze C.H., Reinhardt K. and B. Luckas, 2005. Paralytic shellfish toxin profile in strains of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* Graham and the scallop *Argopecten ventricosus* G.B. Sowerby from Bahía Concepción, Gulf of California, Mexico. *Harmful Algae*. 4: 21–31.
- Band-Schmidt, C.J., J.J. Bustillos-Guzmán, D.J. López-Cortés, I. Gárate-Lizárraga, E.J. Núñez-Vázquez, F.E. Hernández-Sandoval, 2010. Ecological and physiological studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: A review. *Mar. Drugs* 8: 78–87.

- Band-Schmidt, C.J., J.J. Bustillos-Guzmán, D.J. López-Cortés, E. Núñez-Vázquez, F.E. Hernández-Sandoval, 2011. El estado actual del estudio de florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiológica* 21: 381–413.
- Band-Schmidt, C., J. Bustillos-Guzmán, L. Morquecho, I. Gárate-Lizárraga, R. Alonso-Rodríguez, A. Reyes-Salinas, K. Erler, B. Luckas, 2006. Variations of PSP toxin profiles during different growth phases in *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains isolated from three locations in the Gulf of California, Mexico. *J Phycol* 42: 757–768.
- Band-Schmidt, C.J., J.J. Bustillos-Guzmán, F.E. Hernández-Sandoval, E.J. Núñez-Vázquez, D.J. López-Cortés, 2014. Effect of temperature on growth and paralytic toxin profiles in isolates of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) of the Pacific coast of Mexico. *Toxicon* 90:199–212.
- Blackburn, S.I., C.J. Bolch, K.A. Haskard, G.M. Hallegraeff, 2001. Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*. 40(1): 78–87.
- Blackburn, S.I., G.M. Hallegraeff, C.J. Bolch, 1989. Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from Tasmania. *Aust J Phycol* 25: 577–590.
- Bolch, C.J.S., M.F. de Salas, 2007. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium tamarensis* complex to Australasia. *Harmful Algae* 6: 465–485.
- Bordner, J., W.E. Thiessen, H.A. Bates, H. Rapoport, 1975. Structure of a crystalline derivative of saxitoxin. Structure of saxitoxin. *J Am Chem Soc* 97(21): 6008–6012.
- Bravo, I., 1986. Germinación de quistes, cultivo y enquistamiento de *Gymnodinium catenatum* Graham. *Invest Pesq.* 50(3): 313–321.
- Bravo, I., D.M. Anderson, 1994. The effects of temperature, growth medium and darkness on excystment and growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from northwest Spain. *J. Plank. Res.* 16: 513–525.
- Brooijmans, N., 2009. Docking methods, ligand design, and validating data sets in the structural genomics era. In: Gu, J., P.E. Bourne (Eds.), *Structural Bioinformatics*. Wiley-Blackwell, New Jersey, pp 633–661.
- Bustillos-Guzmán J.J., P. Vale, C.J. Band-Schmidt, 2011. Presence of benzoate type toxins in *Gymnodinium catenatum* Graham isolated from the Mexican Pacific. *Toxicon* 57: 922–926.
- Bustillos-Guzmán, J.J., C.J. Band-Schmidt, D.J. López-Cortés, I. Gárate-Lizárraga, E. Núñez-Vázquez, F.E. Hernández-Sandoval, 2012. Variations in growth and toxicity in *Gymnodinium catenatum* Graham from the Gulf of California under different ratios of nitrogen and phosphorous. *Ciencias Marinas* 38(1A): 101–117.
- Bustillos-Guzmán, J.J., C.J. Band-Schmidt, D.J. López-Cortés, F.E. Hernández-Sandoval, E. Núñez-Vázquez, I. Gárate-Lizárraga, 2013. Grazing of the dinoflagellate *Noctiluca scintillans* on the paralytic toxin-producing dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*: does grazing eliminate cells during a bloom? *Ciencias Marinas* 39(3): 291–302.
- Bustillos-Guzmán, J.J., C.J. Band-Schmidt, L.M. Durán-Riveroll, F.E. Hernández-Sandoval, D.J. López-Cortés, E.J. Núñez-Vázquez, A.D. Cembella, B. Krock. Paralytic toxin profile of the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Graham) from the Mexican Pacific as revealed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Sometido*.
- Caillaud, A., P. De la Iglesia, H.T. Darius, S. Pauillac, K. Aligizaki, S. Fraga, M. Chinain, J. Diogéne, 2010. Update on methodologies available for ciguatera determination: perspectives to confront the onset of ciguatera fish poisoning in Europe. *Mar Drugs* 8: 1838–1907.

- Camino-Ordás, M., S. Fraga, J.M. Franco, A. Ordás, A. Figueras, 2004. Toxin and molecular analysis of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) strains from Galicia (NW Spain) and Andalucía (S Spain). *J Plankton Res* (26)3: 341–349.
- Catterall, W.A., A.L. Goldin, S.G. Waxman, 2005. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57: 397–409.
- Catterall, W.A., S. Cestele, V. Yarov-Yarovoy, F.H. Yu, K. Konoki, T. Scheuer, 2007. Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*. 49: 124–141.
- Cembella, A.D., 1998. Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae. In: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 381–403.
- Cembella, A.D., 2003. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia* 42(4): 420–447.
- Chen, R., S.H. Chung, 2012. Binding modes of μ -Conotoxin to the bacterial sodium channel (Na_vAb). *Biophys. J.* 102: 483–488.
- Chinain, M., H.T. Darius, A. Ung, M.T. Fouc, T. Revel, P. Cruchet, S. Pauillac, D. Laurent, 2010. Ciguatera risk management in French Polynesia: the case study of Raivavae Island (Australes Archipelago). *Toxicon* 56: 674-690.
- Choudhary, G., M.P. Aliste, D.P. Tieleman, R. J. French, 2007. Docking of μ -conotoxin GIIIA in the Sodium Channel Outer Vestibule. *Channels*. 5: 344–352.
- Choudhary, G., L. Shang, X. Li, S.C. Dudley, 2002. Energetic localization of saxitoxin in its channel binding site. *Biophys. J.* 83: 912–919.
- Christian, B., B. Luckas, 2008. Determination of marine biotoxins relevant for regulations: from the mouse bioassay to coupled LC-MS methods. *Anal Bioanal Chem* 391: 117–134.
- Cortés-Altamirano, R., 1981. Redescrición y distribución de *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae), causante de "mareas rojas" tóxicas. VI Simposio sobre el medio ambiente del Golfo de California, del 8-12 abril 1981. Hermosillo, Son. México. (Inédito).
- Cortés-Altamirano R., R. Alonso-Rodríguez, 1997. Mareas rojas durante 1997 en la bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Cienc Mar* 15: 31–37.
- Cortés-Altamirano, R., J. L. Cifuentes, J. Gaxiola-López, 2002. Mareas rojas: biodiversidad de microbios que pintan el mar. *Atlas de biodiversidad de Sinaloa*. Colegio de Sinaloa. 29–41.
- Cortés-Altamirano, R., A. Núñez-Pasten, 1991. Registros de mareas rojas en la Bahía de Mazatlán, Sin., México (1985–1990). *Rev Invest Cient UABCS* 2: 44–55.
- Cortés-Altamirano, R., A. Sierra-Beltrán, R. Barraza-Guardado, 2006. Mortandad de peces debido a microalgas nocivas y tóxicas: Cinco casos de marea roja en la costa continental del Golfo de California (2003-2004). pp. 79-90. En: Salas, S., M.A. Cabrera, J. Ramos, D. Flores, J. Sánchez (Eds). *Memorias Primera Conferencia de Pesquerías Costeras en América Latina y el Caribe. Evaluando, Manejando y Balanceando Acciones*. Mérida, Yucatán, México. Octubre 4–8, 2004.
- Costa, P.R., M.J. Botelho, K.A. Lefebvre, 2010. Characterization of paralytic shellfish toxins in seawater and sardines (*Sardina pilchardus*) during blooms of *Gymnodinium catenatum*. *Hydrobiologia* 655: 89–97.
- CSIRO <http://www.marine.csiro.au/microalgae/methods/Media%20CMARC%20recipes.htm#GSe>. (Consultado el 2 de febrero de 2011).

- De la Garza-Aguilar, J., 1983. Intoxicación alimentaria por consumo de mariscos contaminados. *Salud Pública México* 25(2): 145–150.
- Dennington, R., T. Keith, J. Millam, 2009. GaussView, Version 5. Semichem, Shawnee Mission, KS.
- Dickey, R.W., 2008. Ciguatera toxins: chemistry, toxicology and detection. In: Botana, L.M. (Ed.) *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology, and detection*. 2a ed. CRC Press-Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA. Disponible en línea en: <http://es.scribd.com/doc/72138201/22/Ciguatera-Toxins-Chemistry-Toxicology-and-Detection> (Consultado el 7 de noviembre de 2012).
- Dickey, R.W., S.M. Plakas, 2010. Ciguatera: A public health perspective. *Toxicon* 56: 123–136.
- Diener, M., K. Erler, S. Hiller, B. Christian, B. Luckas, 2007. Application of a new zwitterionic hydrophilic interaction chromatography column for determination of paralytic shellfish poisoning toxins. *J Sep Sci* 30: 1821–1826.
- Duncan K.G., J.L. Duncan, D.M. Schwartz, 2001. An anesthetic of the deepithelized rabbit cornea. *Cornea* 20: 639–642.
- Durán-Riveroll, L.M., J. Peralta-Cruz, J.J. Bustillos-Guzmán, C.J. Band-Schmidt, 2013. Presencia de toxinas tipo benzoato en una cepa de *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) aislada de Manzanillo, Colima, México. *Hidrobiológica* 23 (2): 169–175.
- Durán-Riveroll, L.M., J. Correa-Basurto, C.J. Band-Schmidt, A.D. Cembella, J.J. Bustillos-Guzmán. Electrostatic interactions govern the recognition of saxitoxin benzoyl analogs in the voltage-gated sodium channel. *Sometido*.
- Dutz J., 1998. Repression of fecundity in neritic copepod *Acartia clausi* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium lusitanicum*: Relationship between feeding and egg production. *Mar Ecol Prog Ser* 175: 97–107.
- Escalera L., Y. Pazos, A. Moroño, B. Reguera, 2007. *Noctiluca scintillans* may act as a vector of toxicogenic microalgae. *Harmful Algae* 6: 317–32.
- Estrada, N.A., N. Lagos, C. García, A.N. Maeda-Martínez, F. Ascencio, 2007. Effects of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* on uptake and fate of paralytic shellfish poisons in the Pacific giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Mar Biol* 151: 1205–1214.
- Estrada, M., F.J. Sánchez, S. Fraga, 1984. *Gymnodinium catenatum* (Graham) en las rías gallegas (NO de Espana). *Invest Pesq* 48: 31–40.
- Etheridge, S.M., 2010. Paralytic shellfish poisoning Seafood safety and human health perspectives. *Toxicon* 56: 108–122.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2009. Marine biotoxins in shellfish – saxitoxin group. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA Journal* 1019: 1-76.
- Fraga, S., S.M. Gallagher, D.M. Anderson, 1989. Chain-forming dinoflagellates: an adaptation to red tides. In: Okaichi, T., D.M. Anderson, T. Nemoto (Eds.) *Red tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 281–284.
- Frisch, M.J., G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, T. Vreven, T., Kudin, K. N., Burant, J. C., Millam, J. M., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J. E., Hratchian, H. P., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Ayala, P. Y., Morokuma, K., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Zakrzewski, V. G., Dapprich, S., Daniels, A. D., Strain, M. C., Farkas,

- O., Malick, D. K., Rabuck, A. D., Raghavachari, K., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cui, Q., Baboul, A. G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B. B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R. L., Fox, D. J., Keith, T., Al-Laham, M. A., Peng, C. Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P. M. W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M. W., Gonzalez, C., Pople, J. A., 2004. Gaussian 03, Revision C.02. *Gaussian*, Wallingford, CT.
- Fusetani, N., W. Kem, 2009. Marine toxins as research tools. *Progress in Molecular and Subcellular Biology, Marine Molecular Biotechnology* 46. Springer – Verlag. Heidelberg. 259 p.
- Gallardo-Rodríguez, J., A. Sánchez-Mirón, F. García-Camacho, L. López-Rosales, Y. Chisti, E. Molina-Grima, 2012. Bioactives from microalgal dinoflagellates. *Biotechnol Adv* 30: 1673-1684.
- Gárate-Lizárraga, I., J.J. Bustillos-Guzmán, R. Alonso-Rodríguez, R. Hummert, C. Luckas, 2002. Comparación del perfil de toxinas de *Gymnodinium catenatum* y moluscos bivalvos en dos localidades del Golfo de California. *XII Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Planctología and V International Meeting of the Mexican Society of Planktology*. Mayo 6 – 9, Xalapa, Veracruz, México.
- Gárate-Lizárraga, I., J.J. Bustillos-Guzmán, L. Morquecho, C.J. Band-Schmidt, R. Alonso-Rodríguez, K. Erler, B. Luckas, A. Reyes-Salinas, D.T. Góngora-González, 2005. Comparative paralytic shellfish toxin profiles in the strains of *Gymnodinium catenatum* Graham from the Gulf of California, Mexico. *Mar Pollut Bull* 50: 208–236.
- Garrido, R., N. Lagos, M. Lagos, A.J. Rodríguez-Navarro, G. García, D. Truan and A. Enriquez, 2006. Treatment of chronic anal fissure by gonyautoxin. *The Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. Colorectal Disease*. 9: 612–624.
- Gordon, D., R. Chen, S. Chung, 2013. Computational methods of studying the binding of toxins from venomous animals to biological ion channels: theory and applications. *Physiol. Rev.* 93: 767–802.
- Graham, H.W., 1943. *Gymnodinium catenatum*, a new dinoflagellate from the Gulf of California. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 62: 259–261.
- Granéli, E., P. Carlsson, P. Olsson, B. Sundström, W. Granéli, O. Lindahl, 1989. From anoxia to fish poisoning: the last ten years of phytoplankton blooms in Swedish marine waters. In: *Novel phytoplankton blooms*, pp. 407–427. Springer, Berlin Heidelberg.
- Gu, H., T. Liu, P. Vale, Z. Luo, 2013. Morphology, phylogeny and toxin profiles of *Gymnodinium inusitatum* sp. nov., *Gymnodinium catenatum* and *Gymnodinium microreticulatum* (Dinophyceae) from the Yellow Sea, China. *Harmful Algae*, 28: 97–107.
- Guillard, R.L. and J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian J. Microbiology* 8: 229–239.
- Guillard, R.R.L., 1973. Division rates. En: Stein, J.R. (Ed.) *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, London. pp 289–311.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA. pp 26-60.
- Hada, Y., 1967. Protozoan plankton of the Inland Sea Setonaikai. I. The Mastigophora. *Bulletin of Suzugamine Women's College of Natural Science* 13:1–26.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32(2): 79–99.

- Hallegraeff, G.M., S.I. Blackburn, M.A. Doblin, C.J.S. Bolch, 2012. Global toxicology, ecophysiology and population relationships of the chainforming PST dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae* 14:130–143.
- Hallegraeff, G. M. and S. Fraga, 1998. Bloom Dynamics of the Toxic Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*, with Emphasis on Tasmanian and Spanish Coastal Waters. In: Anderson, D. M., A. D. Cembella, G. M. Hallegraeff, eds. *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer – Verlag. Heidelberg. pp 59–80.
- Hallegraeff, G. and S. Gollasch, 2006. Potential transport vectors for microalgae. In: Granéli, E., and T. Turner (Eds.). *Ecology of Harmful Algae*. Springer –Verlag, Berlín Heidelberg. pp 379–419.
- Hernández-Sandoval, F., 2010. Efecto de la proporción N:P en el crecimiento y toxicidad de *Gymnodinium catenatum* de la Bahía de La Paz y Bahía de Mazatlán. Tesis de doctorado. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas – Instituto Politécnico Nacional, La Paz, 112 p.
- Hille, B. 1975. The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin. A structural hypothesis. *Biophys Jour*, 15: 615–619.
- Huber, U. and R. E. Majors, 2007. *Principles in preparative HPLC*. Agilent Technologies, Inc. Germany. 77p.
- Hummert, C., M. Ritscher, K. Reinhardt, B. Luckas, 1997. Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of *Alexandrium* by HPLC based on ion-pair separation, post-column oxidation, and fluorescence detection. *Chromatographia* 45: 312–316.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD–Visual molecular dynamics. *J. Molec. Graphics*. 14:33–38.
- Ianora A, M. Boersma, R. Casotti, A. Fontana, J. Harder, F. Hoffmann, H. Pavia, P. Potin, S.A. Poulet, G. Toth, 2006. The H.T. Odum Synthesis Essay. *New trends in marine chemical ecology. Estuar. Coasts* 29: 531–551.
- Ishida, Y., K. Chang-Hoon, S. Yoshihiko, H. Nobuyasu, U. Aritsume, 1993. PSP toxin production is chromosome dependent in *Alexandrium* spp. In: Smayda, T.J., Y. Shimizu (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooming the Sea*. Elsevier Science Publisher, Amsterdam, pp. 881–887.
- Kao, C. and S.E. Walker, 1982. Active groups of saxitoxin and tetrodotoxin as deduced from actions of saxitoxin analogues on frog muscle and squid axon. *J. Physiol.* 323: 619–637.
- Kellmann, R., B.A. Neilan, 2007. Biochemical characterization of paralytic shellfish toxin biosynthesis *in vitro*. *J Phycol* 43: 497–508.
- Krock, B, C.G. Seguel, A.D. Cembella, 2007. Toxin profile of *Alexandrium catenella* from the Chilean coast as determined by liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Harmful Algae* 6: 734–744.
- Lakeman, M.B., P. von Dassow, R.A. Cattolico, 2009. The strain concept in phytoplankton ecology. *Harmful Algae* 8: 746–758.
- Landsberg, J.H. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science* (10)2: 113–390.
- Lartigue, J., E.L.E. Jester, R.W. Dickey, T.A. Villareal, 2009. Nitrogen source effects on the growth and toxicity of two strains of the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Harmful Algae*. 8: 781–791.
- Llewellyn, L., Negri, A., Quilliam, M., 2004. High affinity for the rat brain sodium channel of newly discovered hydroxybenzoyl saxitoxin analogues from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon*. 43: 101–104.

- Llewellyn, L.E., 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Product Reports*, 23: 200–222.
- Llewellyn, L.E., 2007. Predictive toxinology: an initial foray using calculated molecular descriptors to describe toxicity using saxitoxins as a model. *Toxicol.* 50: 901–913.
- Lipkind, G.M., H.A. Fozzard, 2000. KcsA crystal structure as framework for a molecular model of the Na⁺ channel pore. *Biochemistry*. 39: 8161–8170.
- Luckas, B., 1990. The occurrence of decarbamoyl saxitoxin in canned mussels. In: Bernoth, E.M. (Ed.), *Public health aspects of seafood-borne zoonotic diseases*. Vet. Med. Hefte, WHO, Geneva, pp. 89–97.
- Maranda, L., D.M. Anderson, Y. Shimizu, 1985. Comparison of toxicity between populations of *Gonyaulax tamarensis* of Eastern North American waters. *Estuarine, Coastal Shelf Science*, 24: 401–410.
- Martins CA, P. Alvito, M. Joao-Tavares, P. Pereira, G. Doucette, S. Franca, 2003. Reevaluation of production of paralytic shellfish toxin by bacteria associated with dinoflagellates of the Portuguese coast. *Appl Environ Microbiol.* 69: 5693–5698.
- Masó, M. and E. Garcés, 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Marine Pollution Bulletin* 53: 620- 630.
- Mee, L.D.; M.Espinosa, G. Díaz, 1986. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Mar. Environ. Res.* 19: 77–92.
- Mohammad-Noor, N., 2010. First record of toxic *Gymnodinium catenatum* off the west coast of Sabah, Malaysia. In: Ho, K.-C., Zhou, M.J., Qi, Y.Z. (Eds.), *Harmful Algae 2008*. International Society for the Study of Harmful Algae & Environmental Publication House, Hong Kong, China, pp. 25–29.
- Morey-Gaynes, G., 1982. *Gymnodinium catenatum* Graham (Dinophyceae): morphology and affinities with armoured forms. *Phycologia*. 21(2): 154–163.
- Morris, G.M., D.S. Goodsell, R.S. Halliday, R. Huey, E. Hart, R.K. Belew, A.J. Olson, 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19: 1639–1662.
- Naar, J., A. Bourdelais, C. Tomas, J. Kubanek, P.L. Whitney, L. Flewelling, K. Steidinger, J. Lancaster and D.G. Baden, 2002. A competitive ELISA to detect brevetoxins from *Karenia brevis* (formerly *Gymnodinium breve*) in seawater, shellfish and mammalian body fluid. *Environ Health Perspect* 110: 179–185
- Nadendla, R.R., 2004. Molecular modeling: a powerful tool for drug design and molecular docking. *Resonance* 9.5: 51–60.
- Negri, A. P., C.J.S. Bolch, S. Blackburn, M. Dickman, L.E. Llewellyn, S., Méndez, 2001. Paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum* strains from six countries. *9th International Conference-Harmful Algal Blooms 2000*. Vol. 10.
- Negri, A., D. Stirling, M. Quilliam, S. Blackburn, C. Bolch, I. Burton, G. Eaglesham, K. Thomas, J. Walter and R. Willis. 2003. Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chem. Res. Toxicol.* 16: 1029 – 1033.
- Negri, A.P., C.J.S. Bolch, S. Geier, D.H. Green, T.G. Park and S.I. Blackburn. 2007. Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae*, 6: 774–780.

- Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Diario Oficial de la Federación, 10 de febrero de 2011. 128 p.
- Núñez-Vázquez, E.J., I. Gárate-Lizárraga, C.J. Band-Schmidt, A. Cordero-Tapia, D.J. López-Cortés, F.E. Hernández-Sandoval, A. Heredia-Tapia, J.J. Bustillos-Guzmán, 2011. Impact of harmful algal blooms on wild and cultured animals in the Gulf of California. *J Environ Biol* 32: 413–423.
- Oh, S.J., Y. Matsuyama, Y.H. Yoon, K. Miyamura, C.G. Choi, H.S. Yang and I.J. Kan, 2010. Comparative analysis of paralytic shellfish toxin content and profile produced by dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* isolated from Inokushi Bay, Japan. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.* 55(1): 47–54.
- Ogata, T., M. Kodama, T. Ishimaru, 1987. Toxin production in the dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon* 25, 923–928.
- Osorio-Tafall, B.F. 1943. El Mar de Cortés y la productividad fitoplanctónica de sus aguas. *Anal. Esc. Nal. Cien. Biol. IPN, Mex.*, 3: 73–118.
- Palomares-García, J.P., J.J. Bustillos-Guzmán, C.J. Band-Schmidt, D. López-Cortés, B. Luckas, 2006. Efecto del dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum* sobre el consumo, la producción de huevos y la tasa de eclosión del copépodo *Acartia clausi*. *Ciencias Marinas* 32: 111–119.
- Park, T.G., C.H. Kim, y Y. Oshima, 2004. Paralytic shellfish toxin profiles of different geographic populations of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in Korean coastal waters. *Phycol. Res.* 52: 300–305.
- Pérez-Linares, J.P., J.L. Ochoa, A. Gago-Martínez, 2008. Effect of PSP toxins in white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *J F S* 73(4): 39–73.
- Poli, M.A., C.B. Templeton, W.L. Thompson, J.F. Hewetson. 1990. Distribution and elimination of brevetoxin Pb Tx-3 in rats. *Toxicon* 28: 903–910.
- Prakash, A., M.A. Rashid, A. Jensen, D.V. Subba Rao, 1973. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 18(4): 516–524.
- Quijano-Scheggia, S.A., J.J. Olivos-Ortiz, J.J. Bustillos-Guzmán, J.H. Gaviño-Rodríguez, M.A. Galicia-Pérez, M. Patiño-Barragán, C.J. Band-Schmidt, F.J. Hernández-Sandoval, D.J. López-Cortés, 2012. Bloom of *Gymnodinium catenatum* in Bahía Santiago and Bahía Manzanillo, Colima, México. *Rev. Biol. Trop.* 60: 173–186.
- Saldade-Castañeda, O., J.L. Vázquez-Castellanos, J. Galván, A. Sánchez-Anguiano, A., Nazar, 1991. Intoxicaciones por Toxina Paralizante de Molusco en Oaxaca. *Rev. Salud Pública de México*, 33: 240–247.
- Schantz, E.J., V.E. Ghazarossian, H.K. Schnoes, F.M. Strong, J.P. Springer, J. O. Pezzanite, J. Clardy. 1975. Structure of saxitoxin. *J. Am. Chem. Soc.*, 97 (5): 1238 – 1239.
- Schwartz D.M., H.L. Fields, K.G. Duncan, J.L. Duncan, M.R. Jones, 1998. Experimental study of tetradoxin, a long-acting topical anesthetic. *Am J Ophthalmol*, 125: 481–7.
- Shankle, A.M., X. Mayali, P.J.S. Franks, 2004. Temporal patterns in population genetic diversity of *Prorocentrum micans* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 40: 239–247.
- Shimizu, Y. 1982. Recent progress in marine toxin research. *Pure & Appl. Chem.* (54)10: 1973–1980.
- Sierra-Beltrán, A., Palafox-Urbe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A., Ochoa, J.L., 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas: evidence that domoic acid is spreading. *Toxicon* 35 447–454.

- Smayda, T.J., 1989. Primary production and the global epidemic of phytoplankton blooms in the sea: a linkage? p. 449-483. In: Cosper, E.M., V.M. Bricelj, E.J. Carpenter (Eds). Novel Phytoplankton Blooms. Springer, Berlin Heidelberg.
- Smayda, T.J. 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnology and Oceanography* 42(5): 1137–1153.
- Smayda, T.J., 2010. Adaptations and selection of harmful and other dinoflagellate species in upwelling systems. 2. Motility and migratory behavior. *Progress in Oceanography* 85: 71–91.
- Smith, E.A., F. Grant, C.M.J. Ferguson, S. Gallacher, 2001. Biotransformations of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from bivalve molluscs. *Appl Environ Microbiol* 67: 2345–2353.
- Sommer, H., 1981. The occurrence of the paralytic shellfish poison in the common sand crab. *Science* 76: 574–575.
- Sournia, A. 1995. Red-tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: An inquiry into biodiversity, p. 103-112. In: Harmful marine algal blooms. Proc. 6th Int. Conf. on Toxic Marine Phytoplankton. Lavoisier.
- Sullivan, J.J., M.M. Wekell, L.L. Kentala, 1985. Application of HPLC for the determination of PSP toxins in shellfish. *J. Food Sci.* 50:26–29.
- Terlau, H., Heinemann, S.H., Stuhmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K., Numa, S., 1991. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett.*, 293, 93–96.
- Thronsen, J., 1979. Special methods-micromanipulators. In: Stein, R.J., Ed. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge. London. 139–144 p.
- Tillman, U., T.L. Alpermann, R.C. da Purificação, B. Krock, A. Cembella, 2009. Intra-population clonal variability in allelochemical potency of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Harmful Algae* 8: 759–769.
- Toledo, A.P.P., J.G. Tundisi, V.A. D'Aquino. 1980. Humic acid influence on the growth and copper tolerance of *Chlorella* sp. *Hydrobiologia* 71: 261–263.
- Tubaro, A., Sosa, S., Hungerford, J., 2012. Toxicology and diversity of marine toxins. In: Gupta, R.C. (Ed), *Veterinary Toxicology*. pp. 896–934. Academic Press, London.
- Vale, P., 2008a. Fate of benzoate paralytic shellfish poisoning toxins from *Gymnodinium catenatum* in shellfish and fish detected by pre-column oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatography A*, 1190: 191–197.
- Vale, P., 2008b. Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poison compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *J. Chromatography A* 1195: 85–93.
- Vale, P., 2010. New saxitoxin analogues in the marine environment: developments in toxin chemistry, detection and biotransformation during the 2000s. *Phytochem. Rev.* 9: 525–535.
- Vale, P., 2011. Hydrolysis of hydrobenzoate saxitoxin analogues originating from *Gymnodinium catenatum*. *Food Chem.* 125: 1160–1165.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ. Health Perspect.*, 108: 133–141.
- Venegas, M., 1757. Noticia de la California y de su conquista temporal y espiritual hasta el tiempo presente sacada de la historia manuscrita formada en Mexico año de 1739. Por el padre Miguel Venegas... añadida de algunos mapas particulares... dedicada al rey Ntro. Señor por la

- Provincia de Nueva-España SJ. Vol. 2. En la imprenta de la viuda de Manuel Fernandez, 263 p.
- Wang, D., 2008. Neurotoxins from Marine Dinoflagellates: A Brief Review. *Marine Drugs* 6: 349–371.
- Watkins, S.M., A. Reich, L.E. Fleming y R. Hammond, 2008. Neurotoxic Shellfish Poisoning. *Mar. Drugs* 6:431–455.
- Wiese, M., P.M. D'Agostino, T.K. Mihali, M.C.Moffitt and B.A. Neilan. 2010. Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Mar. Drugs*, 8: 2185–2211.
- Wood, A.M., T. Leatham, 1992. The species concept in phytoplankton ecology. *J. Phycol.* 28: 723–729.
- Wright, J.L., A.D. Cembella, 1998. Ecophysiology and biosynthesis of polyether marine biotoxins. *Nato ASI Series G Ecological Sciences* 41: 427–452.
- Yotsu-Yamashita, M.; Y.H. Kim, S.C. Dudley, G. Choudhary, A. Pfahnl, Y. Oshima, J.W. Daly, 2004. The structure of zetekitoxin AB, a saxitoxin analog from the Panamanian golden frog *Atelopus zeteki*: A potent sodium-channel blocker. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 4346–4351.
- Yu RC, C. Hummert, B. Luckas, P.Y. Qian, J. Li, M.J. M.J. Zhou, 1998. Modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. *Chromatographia.* 48: 671–676.

11. Anexos

I. Datos de los aislamientos de *Gymnodinium catenatum*

Tabla 20. Aislados de *Gymnodinium catenatum* en distintas locaciones en el Pacífico Mexicano. Código, fuente, fecha y nombre de la persona que lo realizó.

Aislado (código)	Lugar y año de aislamiento	Aislado por
GCCV-7	Bahía Concepción, B.C.S. 2000 (26° 40' LN and 111° 50' LW)	C. Band-Schmidt ¹
BAPAZ-5	Bahía de La Paz, B.C.S., 2007 (24° 27' LN and 110° 30' LW)	C. Band-Schmidt ¹
BAPAZ-7	Bahía de La Paz, B.C.S., 2007 (24° 27' LN and 110° 30' LW)	C. Band-Schmidt ¹
62L	Lázaro Cárdenas, Michoacán, 2005 (17° 58' LN and 102° 05' LW)	M. C. Rodríguez-Palacio ²
G7	Manzanillo, Colima, 2010 (19° 06' LN and 104° 22' LW)	S. Quijano-Scheggia ³

Instituciones: 1. Centro interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. 2. Universidad Autónoma Metropolitana. 3. Universidad de Colima.

II. Medio de cultivo GSe (Blackburn et al., 2001)

Tabla 21. Medio de cultivo GSe.

Preparación de stocks	Por litro de agua destilada (dH ₂ O)	
1. KNO ₃	100.0 g	
2. K ₂ HPO ₄	34.8 g	
3. Vitaminas	a 100 mL de dH ₂ O, añadir:	
<u>Solución stock de trabajo</u>		
Biotina	2.0 mL stock primario	
Vitamina B ₁₂	1.0 mL stock primario	
Tiamina HCL	100.0 mg (solución fresca cada 3 meses)	
<u>Stocks primarios</u>		
Vitamina B ₁₂	10.0 mg /100 mL dH ₂ O	
Biotina	10.0 mg / 100 mL dH ₂ O	
4. PII Metal Mix	g / L	Añadir el Na ₂ EDTA a ~750 mL de dH ₂ O en un matraz volumétrico y mezclar con calor hasta disolver. Añadir cada uno de los demás ingredientes de manera separada en ~200 mL of dH ₂ O y disolver completamente entre adiciones. Posteriormente añadir esta solución al Na ₂ EDTA y aforar a 1L.
Na ₂ EDTA	6.0 g	
FeCl ₃ .6H ₂ O	0.29 g	
H ₃ BO ₃	6.85 g	
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.86 g	
ZnCl ₂	0.06 g	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.026 g	
	(ajustar pH a 7.8 - 8.0 con NaOH)	
5. Extracto de suelo	Ver protocolo de extracto de suelo	
6. Selenio (selenita) H ₂ SeO ₃	1.29 mg	

Conservar en refrigeración.

Solución de concentrado GSe (sin extracto de suelo)

Añadir:

Solución stock	Cantidad
Nitrato	20 mL
Fosfato	10 mL
Vitaminas	10 mL
PII metal mix	50 mL
Selenio	10 mL

Aforar a 200 mL con dH₂O. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Medio GSe para uso en cultivos

Añadir asépticamente 20 mL de la solución de concentrado GSe y 0.5 mL de extracto de suelo¹ por cada litro de medio.

III. Extracto de suelo

Se utiliza suelo de un ambiente natural, sin fungicidas, insecticidas o fertilizantes de ningún tipo. En este trabajo se utilizó tierra de composta con cultivo de lombrices.

Preparación:

Se suspenden 50 g de suelo (previamente tamizado) en 500 mL de dH₂O. Se coloca en la autoclave por 15 minutos a 121°C. Una vez frío, se filtra con filtros de papel y finalmente con filtros de fibra de vidrio de 0.47 µ. Se esteriliza en autoclave nuevamente, por 15 minutos a 121°C.

¹ La cantidad de 0.5 mL de extracto de suelo por cada litro de cultivo fue determinada en el laboratorio durante este trabajo, y no es parte de la referencia de CSIRO.

IV. Medio de cultivo f/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975)

Este medio es usado ampliamente. Ha sido diseñado para cultivar microalgas marinas costeras, especialmente diatomeas, sin embargo si es utilizada para otro grupo que no requiere sílice, no se añade este compuesto. La concentración de la fórmula original, llamada “medio F” (Guillard y Ryther, 1962) aquí es reducida a la mitad.

En nuestro laboratorio se utilizó esta fórmula con la modificación propuesta por Anderson et al. (1984), con $\frac{1}{4}$ de la cantidad de CuSO_4 y se añade selenio (selenita) en una concentración de 10^{-8} M (preparación como en el medio GSe, reportado anteriormente).

Soluciones stock:

Solución de metales traza

En 950 mL de dH_2O añadir los componentes y aforar a 1 L con dH_2O . Esterilizar en autoclave.

Componente	Stock primario	Cantidad
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	3.15 g
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	4.36 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$2.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$	1 mL
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$6.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$	1 mL
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$22.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$	1 mL
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$	1 mL
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$180.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$	1 mL

Solución de vitaminas

Preparar las soluciones stock. Para preparar la solución stock final de vitaminas, iniciar con 950 mL de dH_2O , disolver la tiamina, añadir 1 mL de los stocks primarios y aforar a 1 L con dH_2O . Esterilizar por filtración. Almacenar en refrigeración o congelación.

Componente	Stock primario	Cantidad
Tiamina HCL	-	200 mg
Biotina	$1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$	1 mL
Vitamina B_{12}	$1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$	1 mL

Medio f/2 para uso en cultivos (no se incluyen silicatos y se agrega selenio preparado de la misma manera en que se reporta para el medio GSe)

Para su preparación, iniciar con 950 mL de agua marina estéril y añadir los siguientes componentes. Aforar a 1 L con agua de mar estéril, de manera aséptica.

Componente	Stock primario	Cantidad
NaNO ₃	75 g·L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5 g·L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL
Solución de metales traza	(ver preparación arriba)	1 mL
Solución de vitaminas	(ver preparación arriba)	0.5 mL
Selenio	(preparación como en medio GSe)	1 mL

V. Diferencias en la composición de los medios f/2 y GSe

Tabla 22. Diferencias (en concentración μM) entre los medios f/2 y GSe

Compuesto	f/2	GSe
Macronutrientes		
Nitrato - NaNO_3	882.41	
Nitrato - KNO_3		1978.24
Fosfato - K_2HPO_4		199.79
Fosfato - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36.215	
Quelantes / buffers		
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		5.36
Na_2EDTA	40.295	80.59
Citrato férrico	13.43	
Ácido cítrico	23.385	
Elementos traza		
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.045	0.55
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.04	
H_2SeO_3	0.01	0.01
H_3BO_3		553.94
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.91	21.73
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	
ZnCl_2		0.44
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.075	
Vitaminas		
Tiamina	0.2965	2.96
Biotina	0.002045	0.008
B_{12}	0.00037	0.0008
Extracto de suelo	No	Sí

VI. Método de oxidación de muestras con peróxido de hidrógeno para análisis por HPLC-FLD (AOAC, 2006)

Soluciones:

- H₂O₂ al 10% (preparar justo antes de utilizar)
- NaOH 1M
- Ácido acético concentrado

Procedimiento:

A 25 µL de solución de H₂O₂, añadir 250 µL de solución de NaOH 1M. Mezclar.

Añadir 100 µL de muestra o estándar. Mezclar. Dejar reaccionar por dos minutos.

Añadir 20 µl de ácido acético concentrado. Mezclar.

Inyectar 25 - 50 µL en LC (Inyectar más causará ensanchamiento de picos).

VII. Hidrólisis de toxinas paralizantes

Soluciones:

- HCl 1 M
- Acetato de sodio 1M

Procedimiento:

A 150 μ L del extracto a analizar, añadir 37 μ L de HCl 1 M. Mezclar 30 segundos. Incubar por 15 min a 90°C, y dejar enfriar a temperatura ambiente. Mezclar 30 segundos y añadir 75 μ L de solución de acetato de sodio 1 M. Mezclar 30 segundos.

VIII. *Peso molecular y factor de toxicidad de las toxinas hidrofílicas*

En la Tabla 23 se reportan los pesos moleculares y factores de toxicidad relativa utilizados para los cálculos realizados en este trabajo.

Tabla 23. Pesos moleculares y factores de toxicidad relativa.

Toxina	PM	Factor de toxicidad
STX	301.31	1.00
NEO	317.31	0.92
GTX1	412.36	0.99
GTX2	396.36	0.36
GTX3	396.36	0.64
GTX4	412.36	0.73
dcSTX	258.28	0.51
dcGTX2	353.34	0.65
dcGTX3	353.34	0.75
dcGTX1*	369.34	0.5
dcGTX4*	369.34	0.5
dcNEO	274.28	0.40
B1	380.36	0.06
B2	396.36	0.00
C1	476.42	0.01
C2	476.42	0.1
C3	492.41	0.01
C4	492.41	0.06

EFSA, 2009.

**Sullivan et al., 1985.

12. Publicaciones

En este apartado se incluyen tres documentos, el primero de ellos, publicado (2013) y el segundo y tercero, sometidos para publicación:

Durán-Riveroll, L.M., J. Peralta-Cruz, J.J. Bustillos-Guzmán, C.J. Band-Schmidt, 2013. Presencia de toxinas tipo benzoato en una cepa de *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) aislada de Manzanillo, Colima, México. *Hidrobiológica* 23 (2): 169–175.

Durán-Riveroll, L.M., J. Correa-Basurto, C.J. Band-Schmidt, A.D. Cembella, J.J. Bustillos-Guzmán. **Sometido**. Electrostatic interactions govern the recognition of saxitoxin benzoyl analogs in the voltage-gated sodium channel. *Toxicon*.

Bustillos-Guzmán, J.J., C.J. Band-Schmidt, **L.M. Durán-Riveroll**, F.E. Hernández-Sandoval, D.J. López-Cortés, E.J. Núñez-Vázquez, A.D. Cembella, B. Krock. **Sometido**. Paralytic toxin profile of the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Graham) from the Mexican Pacific as revealed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Additives Contaminants: Part A*.

En el segundo y tercer caso, no se incluye la bibliografía por encontrarse ésta en la literatura citada del presente trabajo.

Presencia de toxinas tipo benzoato en una cepa de *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae)
aislada de Manzanillo, Colima, México

Presence of benzoate type toxins in a strain of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae)
isolated from Manzanillo, Colima, Mexico

Lorena M. Durán-Riveroll,¹ Javier Peralta-Cruz,² José J. Bustillos-Guzmán³ y Christine J. Band-Schmidt¹

¹Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas - Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Plancton y Ecología Marina. Av. Instituto Politécnico Nacional s/n Col. Playa Palo de Santa Rita. La Paz, 23096. B.C.S., México

²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas - Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Química Orgánica. Unidad Profesional Lázaro Cárdenas, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Santo Tomás. Delegación Miguel Hidalgo, México, D.F. 11340. México

³Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Santa Rita. A.P. 128. La Paz, 23090. B.C.S., México
e-mail: cbands@ipn.mx

Durán-Riveroll, L. M., J. Peralta-Cruz, J. J. Bustillos-Guzmán, C. J. Band-Schmidt. 2013. Presencia de toxinas tipo benzoato en una cepa de *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) aislada de Manzanillo, Colima, México. *Hidrobiológica* 23 (2): 169-175.

RESUMEN

Se analizó, por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN), el extracto de una cepa de *Gymnodinium catenatum* Graham, aislada de las costas de Manzanillo, Colima, para determinar la existencia de toxinas tipo benzoato. El extracto fue fraccionado con un gradiente ascendente de metanol de 0 a 100% (v/v) por extracción en fase sólida con cartuchos LC-18 en pasos de 10%. La fracción 2 (10% metanol) exhibió dos señales dobles centradas en 7.91 y 7.53 ppm, correspondientes a un sistema AA'BB', que confirmó la presencia de un anillo bencénico *para* sustituido, atribuido al *p*-hidroxibenzoato en el carbono 17 del esqueleto base de la toxina. Con ello se confirmó la presencia de análogos tipo benzoato en la cepa de *Gymnodinium catenatum* proveniente de esta zona del Pacífico Mexicano, los cuales han sido poco estudiados, y el hecho de detectarlos en cepas de México es importante por el peligro potencial que representan para la salud pública. Asimismo, se generó la oportunidad de continuar estudiando estos compuestos, tanto para determinar su toxicidad en mamíferos como para, eventualmente, conocer su potencial farmacológico.

Palabras clave: *Gymnodinium catenatum*, toxinas paralizantes (TP), toxinas tipo benzoato, ¹H-RMN.

ABSTRACT

The extract of a *Gymnodinium catenatum* strain, isolated from Manzanillo, Colima, in the Mexican Pacific coast, was analyzed by nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) to determine the presence of benzoate-type analogs. The extract was fractionated using solid-phase extraction (SPE) partitioning on a C-18 cartridge, using a stepwise gradient from 0 to 100% (v/v). Fraction 2 (10% methanol) showed two aromatic doublet signals at 7.91 and 7.53 ppm, consistent with an AA'BB' system, corresponding to a *para* substituted benzenic ring, attributed to the hydroxybenzoate moiety on C-17 of the toxin basic structure. These findings indicate the presence of benzoate type analogs in this Mexican strain. These analogs have been poorly studied, and the report on their existence in our country is of great importance because they could represent a public health risk, but in the other hand, their existence generates the opportunity to continue the research to determine their toxicity in mammals and, eventually, their pharmacological potential.

Key words: Benzoate type toxins, *Gymnodinium catenatum*, paralytic shellfish toxins (PST), ¹H-NMR.

INTRODUCCIÓN

Las toxinas paralizantes (TP) son un grupo de alcaloides neurotóxicos. La saxitoxina (STX) es la TP más investigada hasta ahora, y, desde su descubrimiento, en 1957, se han identificado 57 análogos de ocurrencia natural en varios organismos taxonómicamente distantes, como dinoflagelados, cianobacterias, el cangrejo *Atergatis floridus* Linnaeus, el pez globo *Tetraodon cutcutia* Hamilton, y la rana dorada de Panamá *Atelopus zeteki* Dunn (Yotsu-Yamashita *et al.*, 2004; Wiese *et al.*, 2010), lo cual es interesante desde el punto de vista de la divergencia taxonómica (Llewellyn, 2006). En el ambiente marino, las TP son producidas por dinoflagelados; 11 especies del género *Alexandrium*, *Gymnodinium catenatum* Graham y *Pyrodinium bahamense* Plate (Landsberg, 2002). Las toxinas son transferidas en la cadena alimenticia por vectores tradicionales como bivalvos filtradores, o no tradicionales como crustáceos, gasterópodos y peces planctívoros. Estos organismos acumulan las toxinas al alimentarse de los dinoflagelados, en muchas ocasiones sin daño aparente (Wiese *et al.*, 2010), aunque la susceptibilidad hacia las toxinas varía en función del historial de exposición; poblaciones con historial de exposición crónica parecen tener menor sensibilidad que los organismos de poblaciones que no han sido expuestas (Landsberg, 2002).

La intoxicación con TP puede resultar en un padecimiento severo y ocasionalmente fatal, conocido como envenenamiento por toxinas paralizantes (PSP, por sus siglas en inglés paralytic shellfish poisoning) (Wiese *et al.*, 2010). El modo de acción de estas toxinas se da por el bloqueo total o parcial (en función del análogo) de los canales de sodio regulados por voltaje, los cuales han sido detectados en la membrana celular de los vertebrados y

en la mayoría de los invertebrados, incluyendo moluscos, medusas y gusanos planos (Llewellyn, 2006). Estos canales son unos de los principales canales iónicos responsables de la excitabilidad neuronal, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Krafte & Bannon, 2008), al generar el potencial de acción en las membranas (Caterall, 2000). La inhibición es mediada por la interacción entre los grupos guanidino cargados positivamente de la STX, con los grupos carboxilo con carga negativa en el sitio

1 del canal, bloqueando el poro (Wiese *et al.*, 2010).

La mayoría de los canales de sodio en mamíferos son sensibles a la STX y por lo tanto las células neuronales en humanos y otros tejidos, son susceptibles a su acción. Actualmente se sabe que también bloquean canales de calcio y potasio, los cuales se encuentran, de igual manera, en células excitables (Llewellyn, 2006).

La STX es una molécula pequeña, con un peso molecular de 299. Presenta un sistema tricíclico que contiene dos grupos guanidino, los cuales le confieren una gran polaridad, por lo que es extremadamente estable en soluciones biológicas y fisiológicas. La STX muestra una alta solubilidad en agua, menor en alcohol y es insoluble en disolventes orgánicos (Wiese *et al.*, 2010). Esta toxina exhibe un número sorprendente de análogos naturales, en los cuales hay variaciones en la cadena lateral carbamoil, en el nitrógeno 1 (N1) y en el carbono 11 (C11). En los análogos hidrofílicos de *G. catenatum*, las variaciones en la cadena lateral pueden ser, desde carecer de ella hasta presentar un grupo sulfato o benzoato. El N1 puede ser hidroxilado y el C11 puede albergar grupos sulfato (Llewellyn, 2006). Entre estos análogos se encuentran la STX, NeoSTX, gonyautoxina (GTX), B1, B2, C1, C2, C3, C4, decarbamoil (dc) STX, dcNeoSTX, dcGTX, entre otras

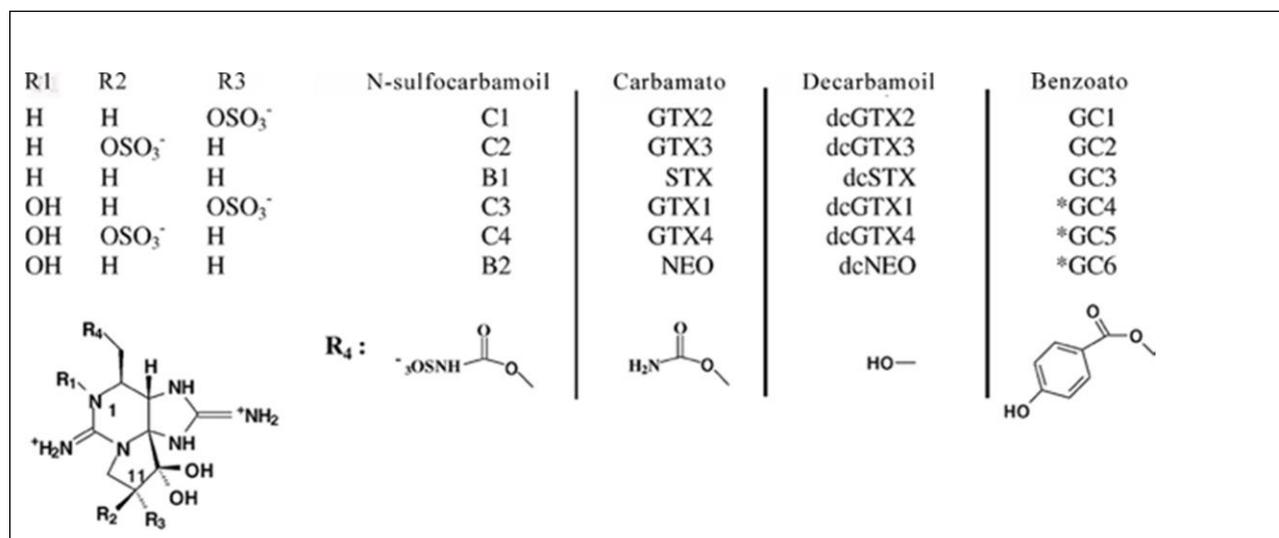


Figura 1. Estructura de las principales toxinas de dinoflagelados asociadas al síndrome de envenenamiento por toxinas paralizantes. La estructura de las toxinas marcadas con un asterisco (*) no ha sido caracterizada (Modificada de Vale, 2008b).

(Vale, 2008b) (Fig. 1). De éstos, la STX es el análogo más potente y las de menor potencia son las toxinas B y C (Fusetani & Kem, 2009).

Tradicionalmente los análogos de STX estudiados han sido únicamente compuestos hidrofílicos. En el 2003, tres nuevos análogos “hidrofóbicos”, los análogos tipo benzoato, fueron aislados de cepas australianas de *G. catenatum* como una fracción importante de las toxinas (hasta 100% en porcentaje molar en una cepa australiana), y han sido nombradas toxinas GC1, GC2 y GC3 (Negri *et al.*, 2003). Más tarde se sospechó la existencia de un mayor número de análogos: los N1-hidroxil de GC1 a GC3 (GC4 a GC6), los di-hidroxibenzoato (de GC1a a GC6a) y los sulfato-benzoato (de GC1b a GC6b) (Vale, 2008b) (Fig. 2). Es importante considerar el efecto de las toxinas tipo benzoato en la salud pública, ya que el método de monitoreo y detección de toxinas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) obvia su presencia debido a que, por su ligera hidrofobicidad, son retenidos en la resina de los cartuchos utilizados para eliminar los compuestos que causan interferencia en el análisis (Negri *et al.*, 2003). Estos análogos han sido poco estudiados debido a su reciente descubrimiento y a la falta de estándares (Vale, 2011).

Las toxinas tipo benzoato han sido reportadas en cepas de Australia, China, Japón, Portugal, España y Uruguay (Negri *et al.*, 2007) y recientemente en una cepa de Bahía Concepción, del Golfo de California, México (Bustillos-Guzmán *et al.*, 2011). En este trabajo se analizó una cepa de *Gymnodinium catenatum*, aislada de las costas del Pacífico mexicano (Manzanillo, Colima, México), en la que se detectó la presencia de estas toxinas al identificar su anillo benzénico por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron cultivos de una cepa de *G. catenatum* aislada de Manzanillo, Colima, México (cepa G7), inoculando una densidad inicial de 500 cél mL^{-1} en un volumen de 1000 mL de medio GSe (Blackburn *et al.*, 2001), en matraces Erlenmeyer de 2 L, por triplicado. La temperatura del cultivo se mantuvo en $24 \pm 1^\circ\text{C}$ en un régimen luz-oscuridad de 12:12, a una intensidad de $150 \mu\text{molEm}^{-2}\text{s}^{-1}$. El medio de cultivo se preparó con agua de mar esterilizada por filtración, a una salinidad de 34 ups. Las vitaminas se esterilizaron por filtración y el resto de los nutrientes por calor húmedo (121°C , 15 libras de presión durante 15 min).

Se cosecharon 50 mL de cultivo durante la etapa exponencial tardía, utilizando filtros de fibra de vidrio de $0.47 \mu\text{m}$ de tamaño de poro (Whatman GFF 24 mm). Las muestras se conservaron a -20°C en ácido acético al 1% (v/v) hasta el momento de la extracción de las toxinas.

Extracción de toxinas. La extracción de toxinas se realizó aplicando dos ciclos de congelado-descongelado y sonicación (Vale, 2008a). El sobrenadante se filtró con acrodiscos de fibra de vidrio (Whatman 3.0 mm GD/X). El extracto se conservó a -20°C hasta su fraccionamiento y posteriores análisis.

Fraccionamiento de toxinas. Se utilizaron cartuchos SPE LC18 (Honeywell Burdick & Jackson C-18) de 2.0 g, acondicionados con 6.0 mL de metanol y 6.0 mL de agua destilada y desionizada. Se agregó 1.0 mL del extracto y se eluyó con un gradiente ascendente de metanol de 0 a 100% (v/v) en pasos de 10% (5.0 mL cada uno). Se obtuvieron 11 fracciones (F1 = 100% H_2O ; F2 = 90:10 $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$; F11 = 100% MeOH). Posterior a la fracción aislada con 100% metanol, se colectó una última fracción con 9:1 (v/v) meta-

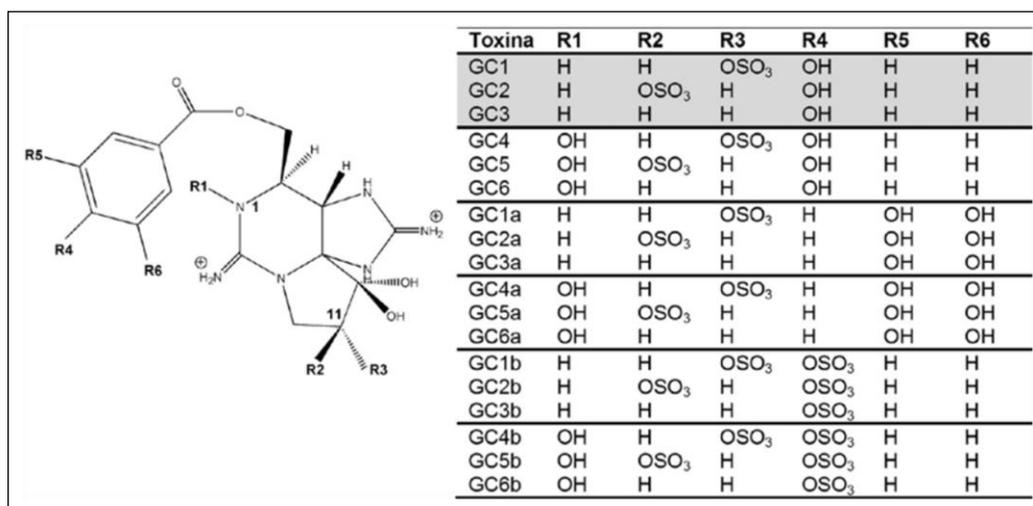


Figura 2. Análogos benzoato identificados en *G. catenatum* de acuerdo a Vale 2008b. Las estructuras resaltadas han sido determinadas por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Vale (2010) ha inferido la existencia del resto de las toxinas por los pesos moleculares obtenidos mediante espectrometría de masas.

nol: ácido acético 1M (Vale, 2008b). Las 12 fracciones se secaron por liofilización y se conservaron a -20°C .

Espectroscopía de las fracciones. El análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón ($^1\text{H-RMN}$), fue realizado en un espectrómetro Varian 500-MR, a 20°C . Se utilizó agua deuterada como disolvente. Los espectros de ultravioleta (UV) se obtuvieron con un espectrómetro Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS, en un intervalo de 200 a 500 nm.

RESULTADOS

El espectro de $^1\text{H-RMN}$ de la fracción 2 (10% MeOH) exhibió una señal simple en 8.5 ppm, que corresponde a los protones de los iminos de la saxitoxina. Las dos señales dobles centradas en 7.91 y 7.53 ppm corresponden al sistema AA'BB', característico de un anillo bencénico *para* sustituido; estas señales se atribuyeron al grupo *p*-hidroxibenzoato en posición 6 del esqueleto base de la saxitoxina. Se observaron dos señales: en 5.16 y 4.67 ppm, parcialmente enmascaradas por la señal intensa del agua intercambiada del disolvente, de acuerdo a las atribuciones reportadas por Negri *et al.* (2003) (Fig. 3). La primera señal corresponde al protón H-5 del heterociclo base de saxitoxina acoplado al H6 y al NH vecinal; la segunda señal es atribuida al protón H11 (R2, R3 = H), acoplado al metileno H10.

Los espectros de ultravioleta de esta fracción mostraron absorciones en 254.32 y 318.94 nm, característicos de bencenos disustituídos en la posición *para*. No se observaron absorciones de ultravioleta en el resto de las fracciones (Fig. 4).

Los desplazamientos químicos observados en RMN de protón ($^1\text{H-RMN}$), así como el análisis ultravioleta de la fracción 2, confirmaron la presencia del heterociclo base de saxitoxina, así como la presencia de grupos *p*-hidroxibenzoato.

DISCUSIÓN

Uno de los aspectos más interesantes en la investigación de las toxinas paralizantes, ha sido el rápido descubrimiento de nuevos análogos (Vale, 2010).

En *G. catenatum* únicamente se habían reportado análogos hidrofílicos, hasta que Negri *et al.* (2003) identificaron los análogos tipo benzoato (GC), los cuales pueden ser una fracción importante de las toxinas; se han observado, en base molar, desde

1-2% en una cepa proveniente de Japón, hasta el 100% en una cepa australiana (Negri *et al.*, 2007).

A partir del aislamiento y la identificación precisa de estas toxinas por medio de técnicas cromatográficas y espectroscópicas [cromatografía de líquidos en columna (LCC), cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a detector de fluorescencia (HPLC-FLD), cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) preparativa, espectrometría de masas (EM), resonancia magnética nuclear (RMN) y HPLC-FLD acoplado a EM], por el grupo de trabajo de Negri, ha sido posible la identificación de los análogos tipo benzoato GC1, GC2 y GC3 en HPLC-FLD por comparación de los tiempos de retención, máxima de emisión de fluorescencia y desaparición de los picos al eliminar la oxidación post-columna, técnica utilizada posteriormente por Negri *et al.* (2007), Vale (2008a) y Bustillos-Guzmán *et al.* (2011). Vale (2008b) utilizó HPLC-FLD y HPLC-EM para reportar la existencia de otros posibles análogos como los di-hidroxi-benzoato (GC4 - GC6), benzoato N1 hidroxilados (GC1a - GC6a) y sulfato-benzoato (GC1b - GC6b) (Fig. 2).

La presencia de toxinas hidrofílicas, tanto en cepas mexicanas como en cepas de otros países, ha sido un tema ampliamente discutido e investigado. En el caso de las cepas mexicanas, Band-Schmidt *et al.* (2010) hicieron una revisión y concluyen que de manera característica, *G. catenatum* produce los análogos STX, neoSTX, GTX2-3, dcGTX2-3, B1, C1 y C2. Las toxinas decarbamoil (dcGTX2-3) y *N*-sulfocarbamoil (C1 y C2), son generalmente los análogos con mayor contribución molar, sin embargo, no se consideraron los análogos tipo benzoato en los estudios reportados en dicha revisión. Para el caso de la presencia de las toxinas benzoato, Bustillos-Guzmán *et al.* (2011), analizaron una cepa de Bahía Concepción por HPLC-FLD, después de hacer una oxidación con periodato y extracción en fase sólida en cartuchos C18. Los autores reportan la presencia de varios análogos de toxinas tipo benzoato, aunque en sentido estricto no hubo confirmación de ello, debido a que no utilizaron estándares por la falta de disponibilidad y, por lo tanto, los resultados no fueron contundentes, como al utilizar técnicas espectroscópicas o espectrometría de masas. En este análisis se llevó a cabo un fraccionamiento como el reportado por Vale (2008b), para separar los análogos tipo benzoato, y por espectroscopía se demostró la ocurrencia del grupo bencénico en una de las fracciones. Este grupo se encuentra en el carbono 17, tomando

el lugar del grupo carbamoil de las toxinas carbamatadas (STX, neoSTX y GTX1 a GTX4), y su presencia caracteriza a las toxinas tipo benzoato. En conclusión, el análisis confirmó la existencia de este grupo de toxinas en otra cepa aislada de costas mexicanas y corrobora los resultados de Bustillos-Guzmán *et al.* (2011).

La existencia de análogos tipo benzoato en cepas mexicanas de *G. catenatum* es importante por diversos motivos. Uno de ellos es el peligro potencial para la salud pública, ya que, aunque aún se desconoce su toxicidad en mamíferos (*in vivo*), Llewellyn *et al.* (2004) demostraron, en un estudio realizado con sinaptosomas de cerebro de rata, que estas toxinas tienen una fuerte afinidad por los canales de sodio, menor que la saxitoxina pero similar a la de las GTX y las toxinas sulfocarbamoil. La información obtenida en el estudio arriba mencionado resalta la importancia de analizar la toxicidad de los análogos tipo benzoato *in vivo* en mamíferos, ya

que la toxicidad en los organismos es el resultado de la capacidad de una toxina de ser absorbida y distribuida al sitio de acción y no sólo de provocar un efecto en un blanco farmacológico. La posesión de un grupo que disminuye su polaridad, el grupo benzoato, genera la posibilidad de que este grupo de toxinas pueda tener una mayor capacidad que la saxitoxina y otros análogos para cruzar los epitelios, y por lo tanto podrían ser absorbidos con mayor facilidad a través del tracto intestinal de los mamíferos y del epitelio vascular, lo que significa un riesgo para la salud pública (Llewellyn *et al.*, 2004). Además, esta menor polaridad podría reducir su tasa de eliminación por lo que las toxinas podrían ser retenidas por mayor tiempo en los tejidos grasos, como se ha demostrado con las brevetoxinas en estudios realizados en ratas (Llewellyn *et al.*, 2004; Poli *et al.*, 1990). Es importante mencionar que estas toxinas no son detectadas con el método de monitoreo y detección por HPLC (Negri *et al.*, 2003), y debido a que existe una tendencia creciente a abandonar los bioensayos en animales para pruebas de biotoxinas marinas, reemplazándolos por análisis químicos (Vale, 2011), aumenta el riesgo de no detectarlas. Por otro lado, Vale (2008a) demostró que en algunos bivalvos las toxinas tipo benzoato sufren, en mayor o menor proporción, una biotransformación al perder la cadena lateral que contiene al grupo benzoato por la acción de la enzima carbamoilasa, produciendo los análogos decarbamoil, probablemente de mayor toxicidad.

Otro factor de importancia en el estudio de estos nuevos análogos, es su potencial farmacológico. La STX, por su alta toxicidad, ha mostrado tener poco potencial como anestésico local en pruebas realizadas en conejo y ratón, pero gran potencial para la investigación celular, específicamente en los canales de sodio regulados por voltaje (Fusetani & Kem, 2009). Algunos derivados de menor toxicidad, las gonyautoxinas (GTX) se han utilizado con éxito en el tratamiento de fisuras anales crónicas en humanos (Garrido *et al.*, 2007). El hecho de confirmar los análogos tipo benzoato en las cepas mexicanas

genera la oportunidad de continuar con su investigación en nuestro país, tanto para determinar la toxicidad en mamíferos (modelo ratón), como para, posteriormente, conocer su potencial farmacológico. 171

Nuestro equipo de trabajo se encuentra realizando la identificación por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS), sin embargo, la técnica de resonancia magnética nuclear ha sido eficiente para la confirmación de la existencia de un grupo bencénico para sustituido en nuestras muestras. Con este estudio confirmamos la existencia del grupo benzoato, aunque para identificar plenamente los análogos existentes en nuestros extractos se deberán realizar pruebas con HPLC-FLD-MS, pruebas que nos darán información acerca del peso molecular de cada toxina aislada en un determinado tiempo de retención, contribuyendo de esta manera a la identificación de cada pico en el cromatograma con su correspondiente toxina, facilitando los análisis de las toxinas por HPLC-FLD.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por los proyectos institucionales SIP 2012-1152, SIP 2012-1448, SIP 2013-0942 (CICIMAR-IPN) y PC0.11 y 0.12 (CIBNOR) y el proyecto CONACyT 178227. Se agradece el apoyo de la Dra. Sonia Quijano Scheggia, por la facilitación de la cepa. Al Dr. Francisco Hernández por su asesoría técnica en la extracción y análisis de toxinas paralizantes, al Dr. Paulo Vale por su asesoría en la detección de toxinas tipo benzoato y a los revisores que ayudaron a mejorar el manuscrito. Christine J. Band-Schmidt y Javier Peralta-Cruz son becarios de la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas y de Estímulos al Desempeño de los Investigadores del Instituto Politécnico Nacional. Lorena M. Durán-Riveroll es becaria PIFI y CONACyT, número de beca 65354.

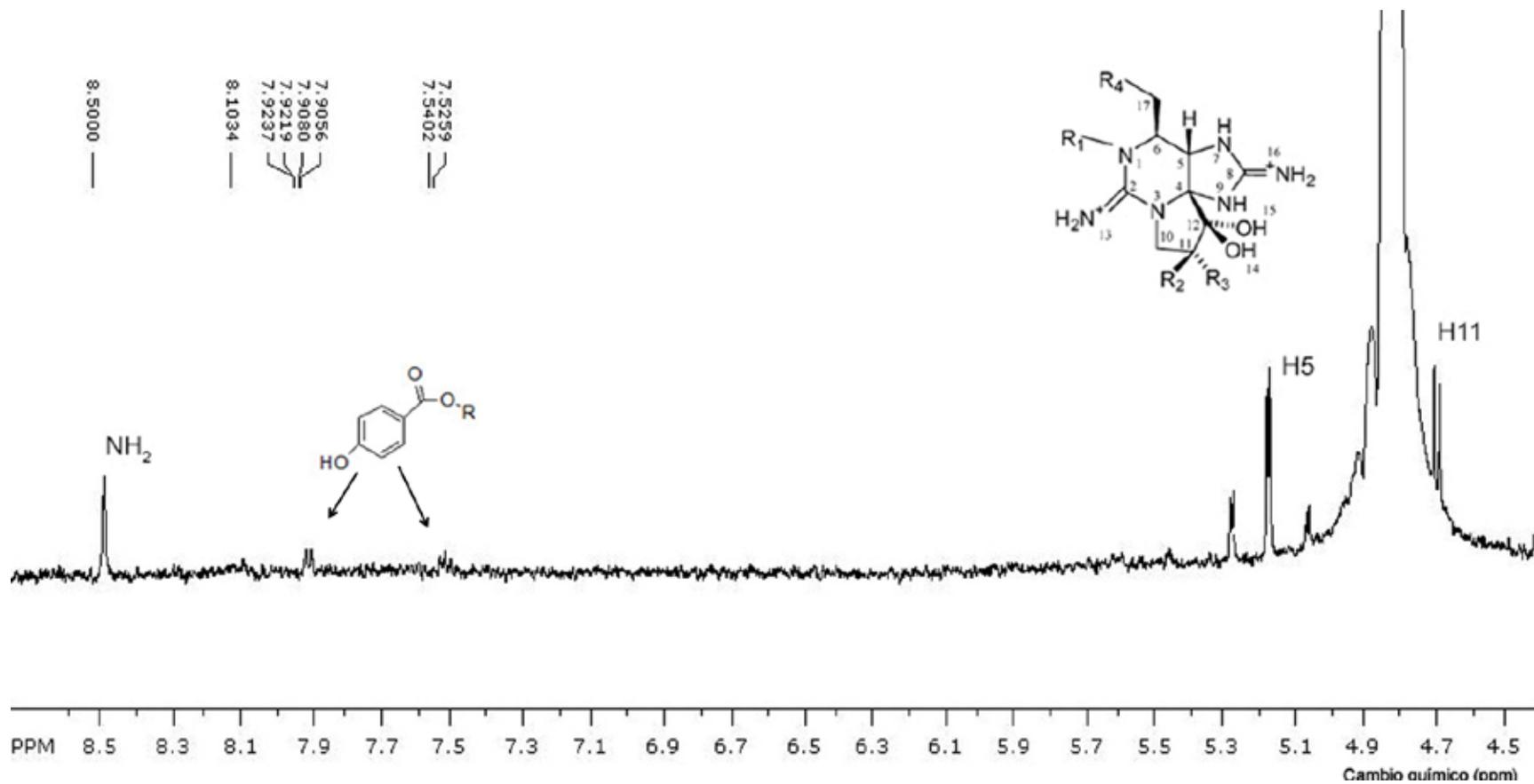


Figura 3. ¹H-RMN de toxinas de *Gymnodinium catenatum*, cepa G7, fracción 2 obtenida con 10% MeOH. Las dos señales dobles centradas en 7.91 y 7.53 ppm (sistema AA'BB'), confirmaron la presencia de un anillo bencénico *para* sustituido, atribuido al *p*-hidroxibenzoato en posición 6 del esqueleto base.

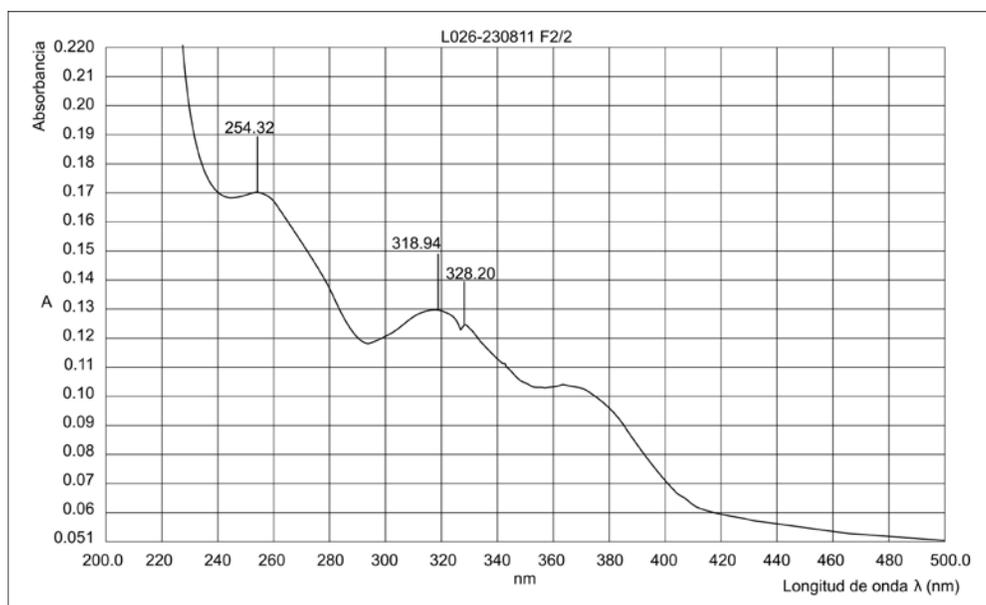


Figura 4. UV-VIS de toxinas de *Gymnodinium catenatum*, cepa G7, fracción 2 obtenida con 10% MeOH.

REFERENCIAS

- Band-Schmidt, c. J., J. J. BuStilloS-Guzmán, d. J. Iópez-CortÉS, i. Gárate IizárraGa, e. J. núñez-Vázquez & F. e. hernández-SandoVal. 2010. Ecological and Physiological Studies of *Gymnodinium catenatum* in the Mexican Pacific: A Review. *Marine Drugs* 8: 1935-1961.
- BlackBurn, S. i., c. J. Bolch, k. a. haSkard & G. m. halteGraeff. 2001. Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia* 40 (1): 78-87.
- BuStilloS-Guzmán, J. J., p. Vale & c. J. Band-Schmidt. 2011. Presence of benzoate type toxins in *Gymnodinium catenatum* Graham isolated from the Mexican Pacific. *Toxicon* 57: 922-926.
- Caterall, W. a. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26: 13-25.
- FuSetani, n. & W. kem. 2009. Marine toxins as research tools. *Progress in Molecular and Subcellular Biology, Marine Molecular Biotechnology* 46. Springer-Verlag, Heidelberg. 259 p.
- Garrido, r., n. IaGoS, m. IaGoS, a. J. rodríguez-naVarro, G. García, d. truan & a. henriquez. 2007. Treatment of chronic anal fissure by gonyautoxin. *The Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. Colorectal Disease* 9: 612-624.
- KraFte, d. S. & a. W. Bannon. 2008. Sodium channels and nociception: recent concepts and therapeutic opportunities. *Current Opinion in Pharmacology* 8: 50-56.
- landSBerG, J. h. 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science* 10: 113-390.
- IleWellyn, I. e. 2006. Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. *Natural Product Reports* 23: 200-222.
- IleWellyn, I., a. neGri & m. quilliam. 2004. High affinity for the rat brain sodium channel of newly discovered hydroxybenzoate saxitoxin analogues from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon* 43: 101-104.
- neGri, a., d. Stirling, m. quilliam, S. BlackBurn, c. Bolch, i. Burton, G. eaGleSham, k. thomaS, J. Walter & r. Willis. 2003. Three novel Hydroxybenzoate Saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chemical Research in Toxicology* 16: 1029-1033.
- neGri, a. p., c. J. S. Bolch, S. Geier, d. h. Green, t. G. park & S. i. Black-Burn. 2007. Widespread presence of hydrophobic paralytic shellfish toxins in *Gymnodinium catenatum*. *Harmful Algae* 6: 774-780.
- poli, m. a., c. B. templeton, W. I. thompSon, J. F. heWetSon. 1990. Distribution and elimination of Brevetoxin Pb Tx-3 in rats. *Toxicon* 28: 903-910.
- Vale, p. 2008a. Fate of Benzoate paralytic shellfish poisoning toxins from *Gymnodinium catenatum* in shellfish and fish detected by pre-column oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1190: 191-197.
- Vale, p. 2008b. Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poison

compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1195: 85-93.

Vale, p. 2010. New Saxitoxin analogues in the marine environment: Developments in toxin chemistry, detection and biotransformation during the 2000s. *Phytochemistry Reviews* 9: 525-535.

Vale, p. 2011. Hydrolysis of Hydroxybenzoate Saxitoxin analogues originating from *Gymnodinium catenatum*. *Food Chemistry* 125: 1160-1165.

Wiese, m., p. m. d'agostino, t. k. mihali, m. c. moFFitt & B. a. neilan. 2010. Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs. *Marine Drugs* 8: 2185-2211.

Yotsu-Yamashita, m. y. h. kim, S. c. dudley, G. choudhary, a. pfahnl, y. oshima & J. W. daly. 2004. The structure of Zetekitoxin AB, a Saxitoxin analog from the panamanian golden frog *Atelopus zeteki*: A potent sodium-channel blocker. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 4346-4351.

Recibido: 20 de agosto de 2012.

Aceptado: 05 de enero de 2013.

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicon

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Electrostatic interactions govern the recognition of saxitoxin benzoyl analogs in the voltage gated sodium channel

Article Type: Research Paper

Keywords: Voltage-gated sodium channel; benzoyl saxitoxin analogs; molecular docking; free binding energy.

Corresponding Author: Dr. LORENA MARIA DURAN-RIVEROLL.

Corresponding Author's Institution: CICIMAR-IPM

First Author: LORENA MARIA DURAN-RIVEROLL.

Order of Authors: LORENA MARIA DURAN-RIVEROLL, Ph.D.; José Correa-Basurto, Ph.D.; Christine J Band-Schmidt, Ph.D.; Allan D Cembella, Ph.D.; José J Bustillos-Guzmán, Ph.D.

Abstract: Saxitoxin (STX) and its analogs are potent paralytic alkaloid neurotoxins that block the voltage-gated sodium channel pore (Nav), impeding passage of Na⁺ ions into the intracellular space and thereby preventing the action potential in the peripheral nervous system and skeletal muscle. The marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* produces an array of such toxins, including the recently discovered benzoyl analogs. In this theoretical study, we submitted STX and 34 analogs to a docking study on the tri-dimensional channel Nav 1.4. The benzoyl analogs showed unusual free-binding energy (ΔG) values and binding poses, based on their chemical substituents and characterized by their negative charges (SO₄⁻²) and aromatic moieties. The acidic components, D400, K237, E403, E758, and the basic K1237 were the Nav 1.4 residues most frequently accessed by STX and its analogs under electrostatic interactions with the guanidinium and sulfate groups. We demonstrate that these toxins exhibit different binding modes with similar free binding energies, that these alternative binding modes are equally probable. Our simulation constitutes the first in silico modeling study on benzoyltype paralytic toxins and provides an approach towards a better understanding of the mode of action of STX and its analogs. We propose that the principal binding that governs ligand recognition is mediated by electrostatic interactions.

Suggested Reviewers:

Lyndon P. Llewellyn Ph.D.

Research Program Leader, Data and Technology Innovation, Australian Institute of Marine Science
L.Llewellyn@aims.gov.au

David Lodwick Ph.D.

University of Leicester, Leicester, United Kingdom
lod@le.ac.uk

Paul Blount Ph.D.

Department of Physiology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA.
paul.blount@utsouthwestern.edu

Ekaterina V. Bartashevich Ph.D.

Department of Chemistry, South Ural State University (National Research University), 454080
Chelyabinsk, Russia
kbartash@yandex.ru

Jianmin Cui Ph.D.

Department of Biomedical Engineering, Center for the Investigation of Membrane Excitability
Disorders, Cardiac Bioelectricity and Arrhythmia Center, Washington University, St. Louis, Missouri
63130.

jcui@wustl.edu

Opposed Reviewers:

Electrostatic interactions govern the recognition of saxitoxin benzoyl analogs in the voltage-gated sodium channel

Lorena M. Durán-Riveroll^{a,*}, José Correa-Basurto^b, Christine J. Band-Schmidt^a, Allan D. Cembella^c, José J. Bustillos-Guzmán^d

^aDepartamento de Plancton y Ecología Marina, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas–Instituto Politécnico Nacional, La Paz, B. C. S. 23096, Mexico

^bLaboratorio de Modelado Molecular y Diseño de Fármacos, Escuela Superior de Medicina–Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

^cAlfred-Wegener-Institut, Helmholtz Zentrum für Polar-und Meeresforschung, 27570 Bremerhaven, Germany

^dCentro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, B.C.S. 23096, Mexico

*Corresponding author: Lorena María Durán Riveroll. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas–Instituto Politécnico Nacional, Avenida Instituto Politécnico Nacional s/n, La Paz, B.C.S. 23096, Mexico

Tel: 52 612 123-4658, Fax 52 612 122-5322. e-mail: lorena.duran@gmail.com

ABSTRACT

Saxitoxin (STX) and its analogs are potent paralytic alkaloid neurotoxins that block the voltage-gated sodium channel pore (Na_v), impeding passage of Na^+ ions into the intracellular space and thereby preventing the action potential in the peripheral nervous system and skeletal muscle. The marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* produces an array of such toxins, including the recently discovered benzoyl analogs. In this theoretical study, we submitted STX and 34 analogs to a docking study on the tri-dimensional channel $\text{Na}_v 1.4$. The benzoyl analogs showed unusual free-binding energy (ΔG) values and binding poses, based on their chemical substituents and characterized by their negative charges (SO_4^{-2}) and aromatic moieties. The acidic components, D400, K237, E403, E758, and the basic K1237 were the $\text{Na}_v 1.4$ residues most frequently accessed by STX and its analogs under electrostatic interactions with the guanidinium and sulfate groups. We demonstrate that these toxins exhibit different binding modes with similar free binding energies, that these alternative binding modes are equally probable. Our simulation constitutes the first *in silico* modeling study on benzoyl-type paralytic toxins and provides an approach towards a better understanding of the mode of action of STX and its analogs. We propose that the principal binding that governs ligand recognition is mediated by electrostatic interactions.

Keywords: Voltage-gated sodium channel; benzoyl saxitoxin analogs; molecular docking; free binding energy

Abbreviations

GC toxins (benzoyl toxins); voltage-gated sodium channel (Na_v); Paralytic shellfish poisoning (PSP); Paralytic shellfish toxins (PST); saxitoxin (STX);, free binding energy (ΔG)

1. Introduction

Saxitoxin (STX) and its numerous naturally occurring analogs are alkaloids with neurotoxic properties. These toxins are hetero-tricycles with two guanidinium groups that are positively charged at pH ~7. The guanidinium groups are responsible for toxin polarity and water solubility, and are essential for sodium channel binding properties. These toxins also have two hydroxyl groups at the C-12 position that are critical for binding to the sodium channel (Llewellyn, 2006).

Intoxication by these toxins can be severe and occasionally fatal for consumers of contaminated shellfish (Kao and Walker, 1982). Typically, the toxins affect humans after consuming bivalve shellfish that have ingested toxic dinoflagellates during a harmful algal bloom, but rare cases of poisoning can occur from eating contaminated fish or crustaceans.

In the marine environment, PST are produced by free-living dinoflagellates belonging to three genera (Cembella, 1998). These toxigenic dinoflagellates include about more than ten species of the gonyaulacoid genus *Alexandrium*, plus the heavily armored species *Pyrodinium bahamense* and the naked chain-forming *Gymnodinium catenatum*, the only PST-producing gymnodinoid dinoflagellate (Oshima et al., 1987).

At least 57 naturally occurring analogs have been identified in diverse aquatic and terrestrial organisms (Yotsu-Yamashita et al., 2004; Wiese et al., 2010). These analogs have been grouped as hydrophilic or hydrophobic, according to their relative solubility in water. Alternatively, they have also been subdivided according to their chemical substituent groups on the lateral chain, as carbamoyl, decarbamoyl, N-sulfocarbamoyl, and benzoyl (*p*-hydroxybenzoyl, di-hydroxybenzoyl, or sulfobenzoyl) derivatives. Variation in the substituent groups confers different toxicity levels, ranging in relative toxicity from the most potent, saxitoxin, to the least potent, N-sulfocarbamoyl derivatives, usually determined by intraperitoneal injection into laboratory mice (EFSA, 2009).

Benzoyl toxins (also called GC toxins) have been exclusively identified in strains of *G. catenatum* (Negri et al., 2003; 2007; Vale, 2008; Bustillos-Guzmán et al., 2011; Durán-Riveroll et al., 2013). Identification of these analogs has been limited, for lack of analytical standards (Vale, 2011). Currently, 15 putative structures have been proposed, based upon mass spectrometry (Vale, 2008; 2010), but their toxicity is unknown.

Given the lack of information on toxicity and mode of action of the GC analogs, theoretical studies are essential to decipher the recognition and binding patterns of these recently discovered analogs. Studies with some STX analogs show strong binding affinities to the Na_v channel (Llewellyn et al., 2004). Cloning of the family of mammalian Na⁺ channel genes has led to identification of four key residues in the selectivity region as an aspartate-glutamate-lysine-alanine (DEKA) motif. This motif consists of one amino acid from each of the four P-loop regions from domains I–IV, respectively, (Asp400 [D400], Glu755 [E755], Lys1237 [K1237], and Ala1529 [A1529]; Terlau et al., 1991). PSTs are selective blocking agents that reduce functional Na_v channels, while occupying a site near the channel opening with a 1:1 affinity in the binding site 1 (Noda et al., 1989; Terlau et al., 1991). STX and its analogs bind to the same site on Na_v because of their similar chemical structures, but with different affinities (Tubaro et al., 2012).

Previous computational studies have been able to reproduce many of the experimental observations, including the binding affinity and specificity of a given ligand, such as the toxin analog in several subfamilies of ionic channels (Gordon et al., 2013). From these studies, it is possible to obtain important information about the action mode, which helps explain the toxicity of diverse molecules, prior to *in vivo* or *in vitro* tests.

With the scarce information on the recognition of SXT and its analogs, we performed molecular docking studies to depict the kinds of interactions that govern their recognition on the Na_v 1.4 binding site. The guanidinium groups with positive charges and sulfate groups with negative charges could participate in integrated electrostatic interactions with basic or acidic residues located in the Na_v recognition site.

2. Materials and methods

2.1. Voltage-gated sodium channel model

We used the Na_v 1.4 outer vestibule model kindly provided by R.J. French, Department of Physiology & Pharmacology, University of Calgary, Canada. This model has been validated by exploring the recognition of tetrodotoxin (TTX), STX, and μ -conotoxins at binding site 1, which is located in the α subunit of the channel (Choudhary et al., 2007) (Table 1). This model was generated following the methods of Lipkind and Fozzard (2000) for building channels using the S5 and S6 backbone coordinates and the pore helices from the well-known KcsA bacterial potassium channel and supported with functional biophysical data (Choudhary et al., 2007).

2.2. Docking study

The structures of STX and 35 analogs identified in the strains of the dinoflagellate *G. catenatum* (Fig. 1) were drawn with the CHEMDRAW ULTRA 7.0.1 program. All molecules are represented according to the stereochemistry reported by Vale (2010).

The tridimensional structures of ligands were developed with GAUSSVIEW 5.0. software (GaussView, 2009). The conformation associated with the lowest energy and the highest stability was obtained by structural optimization at the AM1 semi-empirical level using GAUSSIAN 3.0 software (Frisch et al., 2004). Docking studies were performed with AUTODOCK 4.0.1. (Morris et al., 1998). In the docking studies, the protein was kept rigid and the docked ligands were considered flexible. The grid box was set at 60 \times 60 \times 60 Å and was centered on the channel orifice, considering the external vestibule of the Na_v1.4 α -subunit, where the binding site 1 is located (Catterall et al., 2007). The Lamarckian genetic search algorithm was chosen for the best ligand conformation, and a set of 100 best conformers was considered for each ligand. Dockings were performed three times, each time with a different computer, thereby obtaining 300 simulations for each ligand (10,500 simulations). We calculated an average of the lowest three ΔG values per ligand.

Molecular docking results were analyzed with AUTODOCK TOOLS 1.5.6. (Sanner, 1999) and figures were created with VMD 1.9.1 software (Humphrey et al., 1996).

3. Results

3.1. Interaction of STX and its analogs with Na_v1.4 amino acid residues

Based on the three docking simulations, we determined that PST interact with 25 residues of Na_v1.4. The residues that showed interactions with >80% of the toxins were D400, K1237, E403, E755, and E758 (Fig. 2). Of these residues, D400, E755, K1237 and A1529 correspond to the DEKA selectivity filter ring (although the latter showed much less interaction), whereas E403 and E758 are part of the outer ring containing a negative charge. Most of the residues involved in binding to the toxins belong to P-loops I and II (8 and 7 residues, respectively), and these residues interacted with more toxins than the residues from P-loops III and IV, except for K1237 in P-loop III, which interacted with 92.4% of the toxins in the docking simulations (Fig. 3). Figure 4 shows that STX and some of its analogs reach the

side-chain with their guanidinium group of some residues (E403, D400, E755) by electrostatic interactions, whereas there are hydrogen bonds with both hydroxyl groups located at C-12.

3.2. Free binding energy

Free binding energy (ΔG , kcal·mol⁻¹) values are a result of ligand-residue interactions, and thus serve as an intermolecular affinity indicator. ΔG is the sum of non-covalent interactions, as well as the plane and dihedral angles, which make the most energetically important contribution. The lowest ΔG values indicate the highest affinity between the ligand and the protein. These molecular docking simulations exhibit high affinity values for STX and some of its analogs, such as the sulfobenzoyl derivatives GC3b and GC1b (both showing $\Delta G = -16.3$ kcal·mol⁻¹). The most potent toxins, STX, NEO, and dcSTX, have relative toxicities of ~1 (Vale, et al., 2008) and showed similar average ΔG values between -12.1 and -12.7 kcal·mol⁻¹ (Fig. 5). Analyzing the ΔG for each structural family, the ligands that had the lowest ΔG s were GTX4, C2, GC1, GC1b, GC3a, and dcSTX. The first four ligands have the double-negatively charged sulfate moiety at R2 or R3 (Fig. 1), signifying that the negative charge increases the affinity by electrostatic interactions with K1237. Where the sulfate group is absent, this residue will form hydrogen bonds, mostly with oxygen. K1237 was the second most accessed residue. About 92.4% of all the analogs showed interactions, but only residue D400 had a higher percentage (94.3%) of interactions with the analogs (Fig. 2).

4. Discussion

Despite knowledge of the basic structures and origin of the benzoyl STX analogs for over two decades (Negri et al., 2003), there have been few targeted efforts to determine associated properties, including mammalian toxicity, receptor-binding affinities, and action mechanisms. These challenges remain unmet because of the lack of a comprehensive suite of analytical standards, which in turn is a function of the difficulty in their isolation and purification from *G. catenatum* cultures.

The alternative strategy to explore these properties was to use computational tools linked with structural analysis to decipher their binding recognition interactions. Our approach to molecular docking studies of PSTs has already proven successful for exploring and interpreting hindrance, electrostatic, and complementary shape properties between receptors and ligands, and which have also provided free energy values and binding poses (Brooijmans, 2009). The docking technique has the potential to reveal, in great structural detail, the molecular interactions, mechanisms, and structural contacts involved in the binding recognition process, which are not easily deduced from electrophysiological experiments (Gordon et al., 2013).

Some computational studies of Na_v channel-binding affinities of pore-blocking toxins have used homology models of the channel, as well as molecular docking. Models of the mechanism and binding modes of pore-blocking toxins have been proposed, but the exact binding modes between toxins and Na_v channels have not yet been elucidated (Gordon et al., 2013).

Previous studies showed the importance of the acidic residues, whereby carboxyl side chains are located in the same structural positions (toward the channel) in the four domains to which STX binds (Terlau et al., 1991; Choudhary et al., 2002). In our study, we observed the interaction of STX and its analogs with the side chain D400 and K1237 at >90%. With E403, E755, and E758, the frequency was >80%. Based on these binding pose data, we postulate that STX and its analogs access the Na_v1.4 by electrostatic interactions, which are the most

important non-covalent interactions between ligands and proteins. These kinds of interactions could also explain the high affinity and relative toxicities of these toxins.

Since the ΔG of the ligand–protein is the ultimate determinant of binding affinity, predicting this value is the most important goal of the theoretical and computational studies. In our study, the ΔG of the most potent analog, STX, was $-12.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, similar to or even greater than that of other STX analogs. For example, in comparing energy values of toxins with markedly different toxin potency, such as the N-sulfocarbamoyl C2, with $\Delta G -14.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, and carbamoyl toxins such as STX, its molar toxicity is about 1/10 of STX. This difference could be caused by the higher molecular weight of C2 compared with STX, and hence, a larger surface interaction on $\text{Na}_v1.4$. Its higher molecular weight could also affect its passage through lipid-protein barriers, thereby diminishing its toxic properties, or be caused by the positive uncompensated charges on STX, whereas N-sulfocarbamoyl toxins, carrying two sulfate groups, are electrochemically neutral.

Choudhary et al. (2002) found that the gonyautoxins (GTX), the C-11 sulfated STX analogs were approximately three-fold less potent than their non-sulfated counterparts, and that the presence of N-1-OH conferred better binding to the Na_v channel with a sulfate group at C-11, such as GTX1,4, than without a sulfate group at C-11, such as NEO. Furthermore, they found that a sulfate group at C-11 interacted mainly with E758 and D1241.

In contrast, in our study, we found a lower binding energy for non-sulfated C-11 toxins than for sulfated C-11 toxins, a difference of $-1.2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. We also found lower free-binding energy values for the non-N-1 hydroxylated analogs, compared with N-1 hydroxylated toxins, a difference of $-1.1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. From this, we infer hindrance effects play an important role in accessing residues located in deep pore cavities and that are not close to amino acid residues in this Na_v channel conformation. We did not observe interaction between the sulfate groups at C-11 with residue E758, but some interactions were observed with D1241 and D1532 (<5%, considering 66% of the analogs were C-11 sulfated). We did find that the sulfate group creates electrostatic interactions with K1237. These structural differences are related to the capacity of these small toxins to bind in the channel with alternative binding modes, not only a single mode, as is generally assumed.

It is important to consider the molecular dimensions of the in the context of blocking efficacy and binding affinities. The dimensions of the STX crystal structure are $8.5 \times 4 \times 6.5 \text{ \AA}$, which is increased by almost 6 \AA along the major axis in benzoyl analogs. In spite of the larger size of the analogs, they fit in the Na_v central cavity, as observed in *in vitro* studies (Llewellyn et al., 2004; Llewellyn, 2006). Hence, this cavity is large enough to host these toxins.

Chen and Chung (2012) found that the peptide μ -conotoxin PIIIA in the outer vestibule of the voltage-gated sodium channel Na_vAb is capable of blocking the channel by various binding modes, despite its large molecular size (over 20 amino acids, $\sim 2,500 \text{ Da}$). The same mechanisms are plausible for the STX analogs, which are smaller molecules ($\sim 300\text{--}569 \text{ Da}$) than the peptide toxins, thereby allowing more free movement in the Na_v channel. We were able to demonstrate different binding modes for toxins with similar free binding energies and that alternative binding modes are equally probable.

Tubaro et al. (2012) showed that all STX analogs bind to the same site, although with different affinities. These observations were confirmed in our study. However, we found no direct relationship between binding affinity and toxin potency, likely because biological properties that influence pharmacokinetic parameters, including the quantity of molecules

reaching the targets after crossing biological barriers, which were not considered in docking studies.

Llewellyn (2007) performed a study of quantitative structure-relationship activity (QSAR) to use molecular descriptors to describe the potency of natural toxins and predict the toxicity properties of untested natural STX analogs. He found a relationship between the chemical descriptors and toxicity properties of PST and evidence linking sodium channel affinity and toxicity, even though the relationship was not linear or direct and differed among the different sodium channel isoforms. This variation occurs because each sodium channel isoform has different residues that form the channel tunnel, thereby affecting toxin recognition. The Llewellyn (2007) study did not consider the binding properties, which could yield differential affinity values related to blocking potency and, consequently, toxicity effects.

Our study provides critical information in clarifying the binding mechanism of STX and its analogs on the Na_v1.4, without experimental assays. We found higher predicted toxicities for the sulfated hydroxybenzoyl STX analogs than for derivatives lacking sulfate, in contrast to sodium channels in rat brain studied by Llewellyn et al. (2004). In rat synaptosomes, benzoyl STX analogs strongly bind to the channels, with less potency than STX. In our docking simulations, we found that 12 of the 17 benzoyl analogs bound strongly to the Na_v 1.4 channel, and had a lower ΔG than STX (Fig. 5). Again, the absence of direct correlation between ΔG and toxin potency could result from not considering external biological parameters that modify channel behavior, such as water and lipid components. Such factors are associated with pharmacokinetic behavior and ligand recognition processes.

It is important to bear in mind that there is a huge difference between voltage-gated sodium channel binding and whole animal toxicity. We recognize that there are major biological factors that are not taken into account by docking simulations. However, this approach can describe comparative binding properties of toxins on the Na_v channel at the atomic level with approximate free energy values. These data can be compared with toxicity data as novel derivatives become available.

In conclusion, even with the lack of experimental data on toxicity for several novel and known STX analogs, including benzoyl variants produced by *G. catenatum*, our simulations of binding behavior predict that they would be toxic. This poses challenges for human health protection where blooms of *G. catenatum* occur in waters from which shellfish are harvested because these compounds are not subject to routine analysis and quantitative toxin risk remains unknown. Although our *in silico* study does not show a linear relationship between theoretical and experimental data related to toxin affinities to the Na_v channel and biological potencies, our simulation constitutes the first modeling of benzoyl-type paralytic toxins. This approach contributes to a better understanding of the action modes of STX and its analogs, suggesting that the principal binding that governs ligand recognition is mediated by electrostatic interactions.

Acknowledgments

We thank Robert French of the Department of Physiology & Pharmacology, University of Calgary for generous access to the Na_v 1.4 outer vestibule model. Ira Fogel of CIBNOR provided detailed technical and English editing services. This project was funded by Instituto Politécnico Nacional projects SIP20140252 and SIP 20141469, by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT–SEP 132353 and 178227), by CYTED grant 214RT0482, and CIBNOR grant PC0.10 and PC0.11. L.M.D.R. is a recipient of a doctoral fellowship

(CONACYT 65354; BEIFI-IPN). C.J.B.S. and J.C.B. are COFAA-IPN and EDI-IPN fellows. L.M.D.R. received additional funding by the Padrón Nacional de Posgrados de Calidad. The contribution of co-author A.D.C was supported by the PACES II Theme Coast within Workpackage 3: Evolution and Adaptation to Climate Change and Anthropogenic Stress in Coastal and Shelf Systems through the Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven, Germany.

Figure legends

Fig. 1. Chemical structure of STX and the analogs produced by *Gymnodinium catenatum*. Toxins marked with * have not been fully structurally characterized, but their putative structures have been inferred based upon mass spectrometry analysis (Vale, 2008). Saxitoxin = STX; neosaxitoxin = NEO; gonyautoxin 2 = GTX2; gonyautoxin 3 = GTX3; gonyautoxin 1 = GTX1; gonyautoxin 4 = GTX4; N-sulfocarbamoyl toxins C1, C2, C3, C4, B1, B2; decarbamoyl saxitoxin = dcSTX; decarbamoyl neosaxitoxin = dcNEO; decarbamoyl gonyautoxin 2 = dcGTX2; decarbamoyl gonyautoxin 3 = dcGTX3; decarbamoyl gonyautoxin 1 = dcGTX1; decarbamoyl gonyautoxin 4 = dcGTX4; benzoyl-type toxins GC1, GC2, GC3, GC4, GC5, GC6, GC1a, GC2a, GC3a, GC4a, GC5a, GC6a, GC1b, GC2b, GC3b, GC4b, GC5b, GC6b.

Fig. 2. Residues involved in binding interaction with STX and its analogs. Percentages represent the average number of residues in the three dockings studies.

Fig. 3. Residues and P-loops involved in binding interaction with STX and its analogs. Here we present the average percentage of the three docking studies.

Fig. 4. Binding of STX and some of its analogs with the residues from the voltage-gated sodium channel 1.4. (Na_v 1.4.). according to our modelling study. Spheres = toxins; sticks = Na_v residues. a) STX, b) dcSTX, c) GTX4, d) C2, e) GC1, f) GC3a, g) GC1b. These toxins represent those that have the lowest ΔG values per structural group.

Fig. 5. Free-binding energy (ΔG , kcal·mol⁻¹) of the docked toxins. Toxins are grouped according to their lateral chain: squares, carbamoyl toxins; diagonal lines, decarbamoyl toxins; gray, N-sulfo-carbamoyl toxins; empty bars, benzoyl toxins; black bar, saxitoxin (the most potent PST). Numbers indicate the lowest ΔG in each group.

Table 1. Amino acid sequences of the SCN4a P-loops included in the docking model. Sequence numbers are shown for the DEKA selectivity filter ring. The selectivity filter (numbered residues) and the outer ring of negative charge are indicated in bold (adapted from Choudhary et al., 2007).

Nav P-loops			400
P-loop I	385	TFSWAFLALFRLMTQDYWENLFQLT	409
P-loop II	740	DFFHSFLIVFRILCGEWIETMWDCMD	765
P-loop III	1222	NVGLGYLSLLQVATFKGWMDIMYAA	1246
P-loop IV	1514	TFGNSIICLFEITTSAGWDGLLN	1536

Fig. 1

Toxin	R1	R2	R3	R4
STX	H	H	H	
NEO	OH	H	H	
GTX1	OH	H	OSO ₂	carbamoyl
GTX2	H	H	OSO ₂	
GTX3	H	OSO ₂	H	
GTX4	OH	OSO ₂	H	
B1	H	H	H	
B2	OH	H	H	
C1	H	H	OSO ₂	
C2	H	OSO ₂	H	
C3	OH	H	OSO ₂	sulfocarbamoyl
C4	OH	OSO ₂	H	
dSTX	H	H	H	
dNEO	OH	H	H	
dGTX1	OH	H	OSO ₂	
dGTX2	H	H	OSO ₂	
dGTX3	H	OSO ₂	H	decarbamoyl
dGTX4	OH	OSO ₂	H	
GC1	H	H	OSO ₂	
GC2	H	OSO ₂	H	
GC3	H	H	H	
GC4*	OH	H	OSO ₂	hydroxybenzoyl
GC5*	OH	OSO ₂	H	
GC6*	OH	H	H	
GC1a*	H	H	OSO ₂	
GC2a*	H	OSO ₂	H	
GC3a*	H	H	H	
GC4a*	OH	H	OSO ₂	hydroxybenzoyl
GC5a*	OH	OSO ₂	H	
GC6a*	OH	H	H	hydroxybenzoyl
GC1b*	H	H	OSO ₂	
GC2b*	H	OSO ₂	H	
GC3b*	H	H	H	
GC4b*	OH	H	OSO ₂	hydroxybenzoyl
GC5b*	OH	OSO ₂	H	
GC6b*	OH	H	H	sulfobenzoyl

Fig. 2.

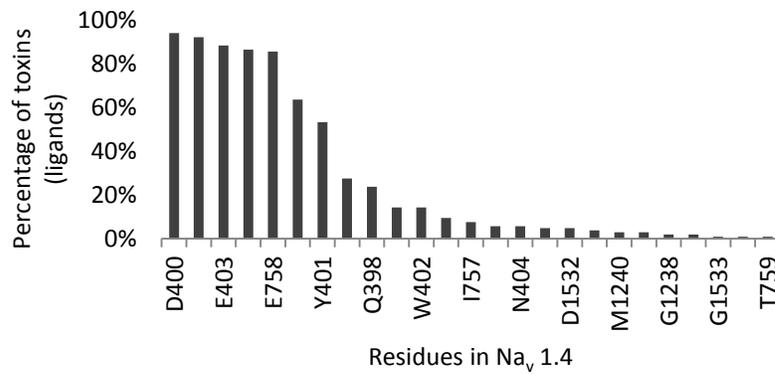


Fig. 3

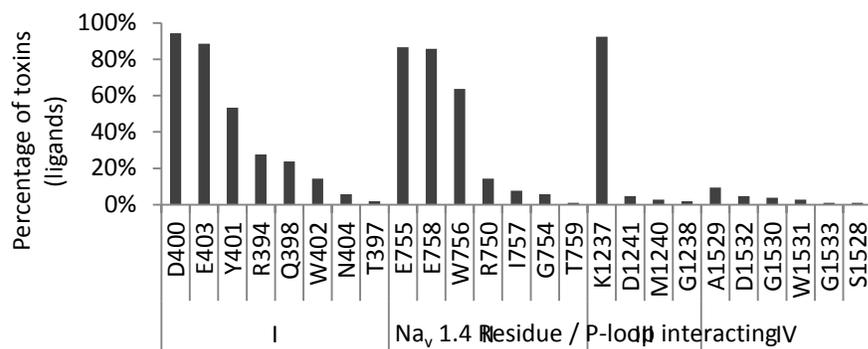


Fig. 4.

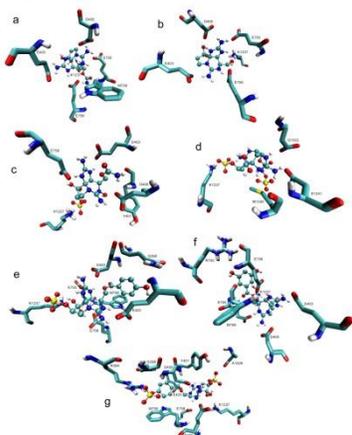
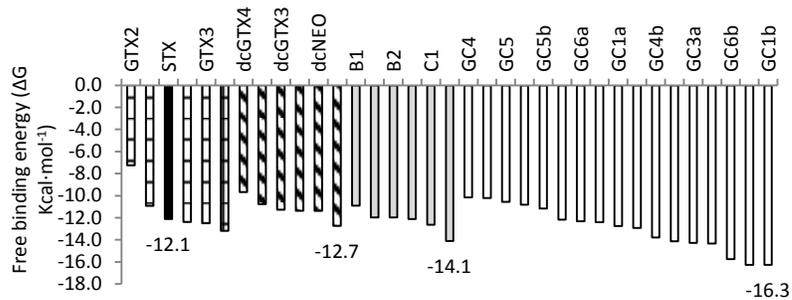


Fig. 5



Paralytic toxin profile of the marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Graham) from the Mexican Pacific as revealed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

José J. Bustillos-Guzmán^{a*}, Christina J. Band-Schmidt^b, Lorena M. Durán-Riveroll^b, Francisco E. Hernández-Sandoval^a, David J. López-Cortés^a, Erick J. Nuñez-Vazquez^a, Allan Cembella^c, Bernd Krock^c

^aCentro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), La Paz, B.C.S. 23096, Mexico

^bDepartamento de Plancton y Ecología Marina, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional, La Paz, B.C.S. 23096, Mexico

^cAlfred Wegener Institut-Helmholtz Zentrum für Polar- und Meeresforschung, 27570 Bremerhaven, Germany

*Corresponding author E-mail: jose04@cibnor.mx

ABSTRACT

The paralytic shellfish toxin (PST) profiles of *Gymnodinium catenatum* Graham have been reported for several isolates from the Pacific coast of Mexico cultured under different laboratory conditions, as well as from natural populations. Up to 15 saxitoxin analogues occurred and the quantity of each toxin depended on growth phase and culturing conditions. Previous analysis of toxin profiles of *G. catenatum* have often based upon liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FLD), a method prone to artifacts and non-specificity, leading to misinterpretation of toxin composition. We describe, for the first time, the complete toxin profile for several *G. catenatum* isolates from diverse locations of the Pacific coast of Mexico. Our new results confirm previous reports on the dominance of the less potent sulfocarbamoyl toxins (C1/2); significant differences, however, in the composition (e.g., absence of saxitoxin, gonyautoxin 2/3, and neosaxitoxin) were revealed in our confirmatory analysis. The LC-MS/MS analyses also revealed at least seven putative benzoyl toxins analogues and provided support for their existence. This new toxin profile shows high similarity (>80%) to the profiles reported from several regions around the world, suggesting low genetic variability among global populations.

Keywords: Toxin profile, tandem mass spectrometry, benzoyl analogues, paralytic shellfish toxins, *Gymnodinium catenatum*

Abbreviations

ACN, acetonitrile; B1/2, Sulfocarbamoyl toxins type B1 and B2; C1/2, Sulfocarbamoyl toxins type C1 and C2; C3/4, Sulfocarbamoyl toxins type C3 and C4; CID, Collision-Induced Dissociation; dcGTX1, Decarbamoyl Gonyautoxin 1; dcGTX2, Decarbamoyl Gonyautoxin 2; dcGTX3, Decarbamoyl Gonyautoxin 3; dcGTX4, Decarbamoyl Gonyautoxin 4; dcNEO, decarbamoyl neosaxitoxin; doSTX, deoxysaxitoxin; DNA, Deoxyribonucleic acid; GC1/2: hydroxy-benzoyl analogues 1 and 2; GC4/5: hydroxy-benzoyl analogues 4 and 5; GC1b/2b: sulfated benzoyl analogues 1b and 2b; GTX1, Gonyautoxin 1; HILIC, Hydrophilic interaction liquid ion chromatography; LC-FLD, Liquid chromatography with fluorescence detection; LC-MS/MS, Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; NEO, Neosaxitoxin, PST, Paralytic shellfish toxin; STX, Saxitoxin; SRM, Selected reaction monitoring; THF, tetrahydrofurane.

Introduction

The toxic marine dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* is a conspicuous inhabitant of warm-temperate, subtropical, and tropical waters, with a wide global distribution, including the Iberian Peninsula, Pacific coast of North America, Southeast Asia, and Tasmania (reviewed by Hallegraeff et al. 2012). This species is occasionally responsible for incidents of shellfish poisoning caused by the consumption by humans of shellfish contaminated with paralytic shellfish toxins (PSTs) produced by the dinoflagellate. Although *G. catenatum* was first described from material collected in the Gulf of California in 1939 (Graham 1943), it was not until the 1980s that it was associated with shellfish poisoning (Mee et al. 1986). Among the PSTs, up to 15 analogues of the neurotoxin saxitoxin have been reported for strains isolated from the coast of Mexico (Band-Schmidt et al. 2006, 2010; Gárate-Lizárraga et al. 2005; Bustillos-Guzmán et al. 2012). Recently, at least four benzoyl saxitoxin analogues have been tentatively identified from two Mexican isolates (Bustillos-Guzmán et al. 2011). Proton magnetic nuclear resonance ($^1\text{H-NMR}$) spectroscopy proved the presence of benzyl rings from *G. catenatum* toxin extracts (Durán- Riveroll et al. 2013).

The lack of certified analytical standards is one of the main critical limitations for qualitative and quantitative analyses of novel saxitoxin analogues, other than the common carbamoyl and N-sulfocarbamoyl derivatives found in dinoflagellates, certain cyanobacteria, and accumulated in shellfish (Vale 2011). This has imposed a particular constraint on the confirmatory structural analysis of recently discovered benzoyl analogues (Negri et al. 2007; Vale 2008b, 2010). In many previous studies, lack of toxin standards has compromised both quantification and confirmatory structural analysis, particularly if results are inferred from available toxin response factors of other analogues, such as saxitoxin. When PST analysis is conducted by liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FLD), misidentification may also occur if two or more toxins have the same retention time. Finally, when extraction and cleanup methods are not efficient, fluorescent matrix compounds can compromise toxin identification resulting from phantom peaks (Luckas 1990; Baker et al. 2003; Martins et al. 2003; Krock et al. 2007). Application of advanced analytical techniques based upon comparative ion masses for PSTs by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (e.g. Krock et al. 2007), and specific separation of toxin analytes by hydrophobic interaction liquid ion chromatography (HILIC) (Diener et al. 2007), has done

much to alleviate many of these analytical constraints on confirmatory structural analysis of PSTs.

In this work, we describe, for the first time, the complete PST profile for several *G. catenatum* isolates from several regions of the Pacific coast of Mexico, as revealed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). This new profile of hydrophilic toxins is compared to other profiles of *G. catenatum* from diverse locations in order to detect toxin patterns and possible relationships among worldwide populations.

Materials and methods

Isolates and culture conditions

Eight isolates of *G. catenatum* were brought into unialgal culture from six locations along the Pacific coast of Mexico: Bahía Concepción, Bahía de Topolobampo, Bahía de la Paz, Bahía de Mazatlán, Bahía de Manzanillo, and Lázaro Cárdenas. Details of isolates are provided in Table 1.

Isolates were cultivated in GSe medium (Blackburn et al. 2001) with earthworm soil extract, and also in modified f/2 medium (Guillard 1975), modified by adding 10^{-8} M selenium (H_2SeO_3) and lowering the copper (CuSO_4) concentration (10^{-8} M), with seawater obtained from the Ensenada de La Paz (salinity 34). Culture in two media allowed us to compare changes in the toxin profile of *G. catenatum* when grown under different nutrient conditions. The cultures were maintained at $24\text{--}26 \pm 1$ °C under $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ illumination from cool white fluorescent lights on a 12:12 light:dark cycle in a controlled environment chamber. Both seawater and nutrient stock solutions for growth media were sterilized by high filtration ($0.22 \mu\text{m}$). Cultures were maintained in 50 mL and 1400 mL Erlenmeyer flasks for 9–18 days (until late exponential growth phase) after which cells were harvested by filtration (GF/F, Whatman International, Maidstone, UK) and immediately frozen (-20 °C).

Only one strain of *G. catenatum* (BAPAZ5) was additionally cultivated in a 19 L glass flask with 10 L culture media to have sufficient biomass to set up the LC-MS/MS method and corroborate the production of the less abundant toxins. Seawater was sterilized by adding 0.017 g L^{-1} 90% calcium hypochlorite ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$); after 24 h, 0.119 g L^{-1} sodium thiosulfate was added to neutralize the chlorine. Cells were inoculated into the culture flask after 24 h, adding 1.5 L of actively growing culture. Cultures were maintained without supplementary aeration under the same conditions mentioned above. Cells were collected upon a $20 \mu\text{m}$ mesh sieve after 15 days of culturing and then gently centrifuged to eliminate excess of water.

Extraction and analyses of paralytic shellfish toxins

Filters were lyophilized, and extracted in 500 μL of 0.05 M acetic acid and disrupted with a Microson XL ultrasonic cell disruptor (Misonix, Farmingdale, NY USA) for 60 s. All extracts were centrifuged at $5,000 \times g$ for 10 min and filtered with 13 mm diameter syringe filters ($0.22 \mu\text{m}$ pore-size PVDF Millex membrane, EMD Millipore, Billerica, MA, Sao Paulo, Brazil) prior to liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FLD) and LC-MS/MS analysis.

Hydrophilic toxins were detected and quantified by liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FLD) and post-column **derivatization** according to Diener et al. (2006) with slight modifications. LC-FLD was performed on an Agilent LC1100 liquid chromatograph connected to a post-column derivatization system (Pinnacle PCX2500, Pickering Laboratories). Eluant A consisted of 6 mM octanesulphonic acid, 6 mM heptanesulfonic acid, 40 mM ammonium phosphate, adjusted to pH 7 with diluted H₃PO₄ and 0.75% THF and eluant B consisted of 13 mM octanesulphonic acid, 50 nM phosphoric acid (adjusted to pH 6.9 with ammonia), 15% ACN, and 1.5% THF. Gradient (1 mL·min⁻¹ flow) of both solutions was as follow: from minute 0 to 15, 100% eluant A, from minute 16 to 35, 100% eluant B, and from minute 36 to 45, 100% eluant A. Sample volumes were 20 µL and separation was performed on a Phenomenex Luna C-18, 250 x 4.6 mm, 5µm column with a Phenomenex SecuriGuard precolumn. The post-column oxidation was performed with 10 mM periodic acid and 550 mM ammonia and subsequent cyclization with 0.75 N nitric acid. Fluorescence measurement was performed at 333 nm excitation wave length and 395 nm emission wave length.

Reagents were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The certified standard calibration solutions of PSTs were purchased from the Institute of Marine Biosciences, Certified Reference Materials Program, National Research Council of Canada, Halifax, NS, Canada. Enantiomeric pairs (such as C1 and C2) were expressed as sums because they easily epimerize under extraction and analytical conditions. Even though they can be determined individually, their measured ratios do not necessarily reflect the original composition in plankton. PSTs were quantified by external calibration with toxin standards. Toxin B2 was expressed as B1 equivalents, C3 and dcGTX1 were expressed as GTX1.

Mass spectral experiments to confirm the identity of the PSP toxin components were performed on a triple quadrupole mass spectrometer (API 4000 QTrap, AB Sciex, Darmstadt, Germany) equipped with a Turbo Ion Spray interface, coupled to a liquid chromatograph (model 1100, Agilent, Waldbronn, Germany). The liquid chromatograph includes a solvent reservoir, in-line degasser (G1379A), binary pump (G1311A), refrigerated autosampler (G1329A/G1330B), and temperature-controlled column oven (G1316A). Mass spectrometric analyses for PSTs were performed according to the hydrophilic interaction liquid ion chromatography (HILIC) method described by Diener et al. (2007) with slight modifications. The analytical column (150 × 4.6 mm) was packed with 5 µm ZIC-HILIC stationary phase (Merck, Darmstadt, Germany) and maintained at 35 °C. The flow rate was 0.7 mL min⁻¹ and gradient elution performed with eluent A (2 mM formic acid and 5 mM ammonium formate in acetonitrile in water (80:20 v/v)) and eluent B (10 mM formic acid and 10 mM ammonium formate in water). The gradient process involved: 20 min column equilibration using 80% eluent A solution, linear gradient for 5 min reaching 65% eluent A, 10 min for a 60% eluent A concentration, 20 min using 55% eluent A, subsequent isocratic elution with 55% eluent A for 24 min, and finally returning to an initial 80% concentration of eluent A for 25 min (total run time: 45 min).

Selected reaction monitoring (SRM) experiments were performed in the positive ion mode. The transitions are listed in Table 2. Dwell times of 100–200 ms were used for each transition. For these studies, the source parameters were: curtain gas (30 psi), temperature (650 °C), ion spray voltage (5000 V), gas 1 and 2 (70 psi), interface heater (on), collision gas

(high), declustering potential (66 V), entrance potential (10 V), collision energy (30 V), and collision cell exit potential (12 V).

Comparison of hydrophilic toxin profiles

The relative composition of PSTs of the isolates that were examined, expressed as molar percentages (% mol), was converted to a matrix of relative abundance, with pooled epimeric pairs and based upon the scoring criteria of Negri et al. (2001). The arbitrarily defined categories were: not detected (0), <5% (1), 5%–40% (2), and >40% (3). Toxin profiles of isolates from the Pacific coast of Mexico were compared with those of strains from other regions by accessing published data sets (Oshima et al. 1993; Méndez et al. 2001; Negri et al. 2001; Holmes et al. 2002; Camino-Ordás et al. 2004; Park et al. 2004; Montoya et al. 2006; Mohammad-Noor 2010; Oh et al. 2010; Costa et al. 2012). All toxins (in % mol) were also converted to their relative abundance as in Negri et al. (2001) (see annex). The matrix was compared by a Bray–Curtis single-link cluster analysis with the BioDiversity Professional Beta, 2.0 software (McAleece, 1997). The toxin analogues doSTX, C5/C6 (GC1/2 as described by Negri et al. 2003), and other benzoyl variants were not included in the cluster analysis because they were not analyzed or reported in the cited papers. In few cases where the complete array of toxins (including doSTX, C5/C6, and benzoyl toxins) was considered in the calculation of individual contributions (% mol basis), we recalculated the data by assuming no contribution of doSTX, C5/C6, and benzoyl toxins to the toxin profile.

Results

Toxin profiles

A typical chromatogram of cell extracts mainly showed decarbamoyl family toxins: decarbamoyl neosaxitoxin (dcNEO), decarbamoyl gonyautoxin 1/4 (dcGTX1/4), and the less potent sulfocarbamoyl toxins B1, B2, C1/2, and C3/4 (Fig. 1). The N-sulfocarbamoyl component C1/2 was the most abundant, with an average content >85% on a molar basis (Table 3). Decarbamoyl toxins generally represented a mean average content <5%. No clear differences in molar toxin composition for the isolates were evident from comparison of growth on different media.

Benzoyl profile

The LC-MS/MS analysis revealed five hydroxy-benzoyl analogues (GC1/2, GC3, and GC4/5) and two sulfated benzoyl analogues (GC1b/2b) (Table 4). Major ions recorded (data not shown) are those reported by Vale (2008b). We thereby confirm the presence of hydroxy-benzoyl toxins in the two *G. catenatum* strains we analyzed previously (Bustillos-Guzmán et al. 2011; Durán-Riveroll et al. 2013). As with hydrophilic STX analogues, there was no clear evidence of an effect of the growth medium on the relative contribution of the benzoyl group toxins to the total toxin composition (data not shown).

The lack of benzoyl toxin standards did not allowed determination of the appropriate response factor for quantification. In terms of relative abundance, (area cell⁻¹) peaks were compared (Table 4). There was a trend of increasing cell quotas of all benzoyl toxins from north to south. An opposite gradient is also evident when comparing toxin ratios in the same strains (Table 5), most evident among toxins GC4-5/1-2 and GC4-5/3, which vary from 3.4 to 16 and 3 to 13.1, respectively.

Cluster analysis

Cluster analysis grouped all *G. catenatum* strains from Mexico at 88.8% similarity, with the exception of one isolate from Colima (Fig. 2). This isolate contained only N-sulfocarbamoyl toxins C1/2, and is thus more similar (87%) to a strain from Galicia, Spain (Camino-Ordás et al. 2004) than to others from Mexico. A toxin profile consisting of 97% C1/2 is characteristic of the Galician isolate.

Discussion

Analytical determination of toxin profiles

We could confirm the presence of only 10 saxitoxin analogues among the isolates analyzed by LC-MS/MS. This is surprising because at least 15 PST have been recorded from among diverse strains in Mexico (Band-Schmidt et al. 2005, 2006; Gárate-Lizárraga et al. 2005). In contrast to previous studies, we could not confirm the presence of dcGTX2/3, STX, GTX2/3, or NEO. The absence of NEO merits particular mention because strains in Mexican coastal waters were considered to be the unique in producing this analogue in significant quantities (reviewed in Band-Schmidt et al. 2010; Hallegraeff et al. 2011).

In general, the LC-MS/MS method in all configuration has a rather low sensitivity for non-N1-hydroxylated PSTs, such as dcGTX2 (limit of quantitation: 77 pg) particularly in comparison to LC-FLD approaches. These toxins could therefore have been simply undetected in low biomass samples because they remained below the detection limit. Nevertheless, this is less likely because LC-MS/MS method also failed to detect dcGTX2/3 in the BAPAZ 5 sample from the mass culture that contained a much higher cell equivalent concentration (Table 3). It is more plausible that dcGTX2/3 are absent or only present in low quantities in Mexican *G. catenatum* isolates. In any case, STX and NEO have been recurrently reported in strains from Mexico (Band-Schmidt et al. 2005; Gárate-Lizárraga et al. 2005) based upon LC-FC analysis. In previous studies, however, the concentrations of these two analogues was shown to vary, dependant on the composition of the growth medium. Nevertheless, the specific reasons for this discrepancy remain unresolved from the growth-rate dependant shifts in toxin composition. Indeed the apparent absence of toxin profile stability within an isolate of *G. catenatum* is highly unusual among dinoflagellates (see review by Cembella, 1998). In most cases, a major shift in toxin composition (usually to fewer STX analogs and less complex derivatives) only occurs in response to extreme growth conditions, such as in advanced senescence or high nitrogen starvation. As cited in the review by Band-Schmidt et al. (2010), STX was usually absent from strains when cultivated in f/2 medium, but at maximum

concentrations (0.8% mol) when cultivated in GSe medium. Concentration of NEO also varied considerably (from 0.0 to 46.3% mol), depending on the strain and the growth medium (see review Band-Schmidt et al. 2010). Whereas wide variation in toxin composition between strains is not unexpected, the lack of stability within an isolate is remarkable if it is a function of biological factors.

This brings the question regarding the reliability of LC-FLD as analytical approach to qualitative and quantitative analysis of PST profiles in dinoflagellates. Although both pre- and post-column oxidation LC-FLD methods have been subjected to rigorous inter-laboratory comparison (deGrasse et al. 2012) and are widely used in analysis of known PST analogs in routine toxin control in shellfish monitoring programs, the methods are subject to several and serious drawbacks when used to resolve complex toxin profiles. This is especially true where novel and structurally undefined analogs may be present, and for which reference standards are lacking. These issues are related to the failure of liquid chromatography to resolve all PST analogues and the lack of confirmation of peak identifications via fluorescence detection (Luckas 1990). For example, with the post-column oxidation method (Yu et al. 1998), we followed in the previous PST analyses of *G. catenatum* isolates from Mexico (Band-Schmidt et al. 2010 and references therein), dcNEO and NEO would not have been resolved because they have the same retention time. The recurrent finding of NEO, may actually correspond to dcNEO, as suggested by our results. Furthermore, the B2 toxin in these isolates also contribute to the "NEO peak" because the Yu et al. (1998) method requires an additional analysis after oxidation to transform B2 to NEO for its indirect detection and quantification. Misidentification of peaks of fluorescent molecules, other than toxins (false positives), - either as pre- or post-column oxidation products has also undoubtedly led to frequent misinterpretations of PST analysis with fluorescence-based detection methods (Baker et al. 2003; Biré et al. 2003; Krock et al. 2007; Soto-Liebe et al. 2010). A case of inconsistencies involving PST analogues produced by the toxigenic cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3 is described by Soto-Liebe et al. (2010). All published PST profiles, based solely on LC-FLD, including our own previous analyses of *G. catenatum* strains, are subject to misinterpretation and must be taken with caution. A second independent detection method, such as mass spectrometry, must therefore be included to confirm the identity of the chromatographic peaks for critical analysis.

Benzoyl toxins

The precautionary approach to the interpretation of toxin profiles also applies to the benzoyl toxins reported from several strains of *G. catenatum* (Negri et al. 2007; Vale 2008 a, b; 2010), including isolates from the coast of Mexico (Bustillos-Guzmán et al. 2011). These studies used different analytical approaches. For example, Bustillos-Guzmán et al. (2010) detected benzoyl toxins by comparing LC-FLD chromatogram peaks with similar retention times to those from a *G. catenatum* strain from Portugal. Further separation by net charge in a carboxylic acid resin cartridge and analysis by automated pre-column periodate oxidation revealed the sulfated and sulfonated STX analogues (C1/2 and C3/4) in the first fraction (Charge: 0), the benzoylated GTXs were observed in the second fraction (charge: +1), and the non-sulfonated analogues eluted in the last fraction (charge: +2). The presence of benzoyl toxins in a *G. catenatum* isolate collected at Manzanillo, Colima, Mexico was subsequently analyzed by NMR detection of aromatic protons (Durán-Riveroll et al. 2013). Significantly,

the sulfated benzoyl analogues GC1b/GC2b were recorded only in isolates collected in Bahía de La Paz (BAPAZ 5 and 7) and Bahía de Manzanillo (G7). These sulfated benzoyl analogues had previously been recorded only in a strain from Portugal (Vale 2008b). Presence of benzoyl toxins as well as its gradient variation, should be considered with caution because we only have data of four strains. Also if these gradients are related to the geographical origin of strains, this would have to be confirmed by further research with more strains collected in each area. More detailed studies on the physiology of the production of benzoyl analogues in a larger number of strains are now underway in our laboratory.

These benzoyl saxitoxin analogues merit special attention because they have been detected in many *G. catenatum* strains, representing an important fraction, up to 42% of the toxin composition (Negri et al. 2007). Yet the significance of these compounds regarding to their toxicity, structural diversity, biosynthesis and biogeographical distribution in dinoflagellates and marine food webs remains largely unresolved. For example, Negri et al. (2003, 2007) considered only the contribution of GC1-3 to the toxin composition of *G. catenatum*. The search for benzoyl toxin accumulation in bivalves shellfish, crabs, and sardines during blooms of *G. catenatum* revealed that these analogues were either absent or represented a minor component of the N1-H-containing toxins (Vale 2008a). A non-specific carbamoylase activity converts benzoyl toxins into the decarbamoyl analogues, as was confirmed when digestive glands of some bivalves were incubated with semi-purified GC toxins. The risk to human health of metabolic biotransformation of GC toxins in shellfish must be carefully considered, especially in areas where *G. catenatum* blooms are common. For example, Mexican food safety regulations for PSP require the mouse bioassay for seafood security analysis. Since benzoyl toxins can be converted by bivalves, the mouse bioassay should assure detection of their net toxicity contribution. Nevertheless, from the perspective of toxin research, analysis of benzoate toxins is essential to clarify the sources as well as the food vectors to humans. In this context, it is important to point out that most LC methods miss the presence of the benzoyl fraction because of its hydrophobic side and longer retention time than common hydrophilic analogues (Vale 2008a).

As mentioned earlier, the medium influences the hydrophilic (Band-Schmidt et al. 2010) and benzoyl toxin profile (Vale 2008a). However, in our study, no clear differences were noted in strains cultured in GSe or f/2 media.

Comparison of toxin profiles

Cluster analysis grouped all *G. catenatum* isolates from Mexican coastal waters with 88.8% similarity, with the exception of one isolate from Colima (Fig. 2). This isolate contained only N-sulfocarbamoyl toxins C1/2 and thus is more similar (87%) to a strain from Galicia, Spain (Camino-Ordás et al. 2004) than to other strains from Mexico. A toxin profile consisting of 97% C1/2 is characteristic of this Galician isolate. Both the Colima and Galician strains have 79.91% similarity to the toxin profiles of other Mexican and Korean strains. Less similar profiles are those of Australian isolates derived from cysts, and considered by Hallegraef et al. (-2012) as aberrant profiles. Malaysian strains are also less similar to those from Mexico because the former isolates contain a higher molar % of GTX 1-4 toxins (Mahammad-Noor 2010). In any case, most of the published *G. catenatum* toxin profiles

demonstrate a high degree of toxin relatedness, with similarity >80%, indicating a relatively low phenotypic diversity in toxin composition.

This high similarity of toxin profiles agrees with studies of alloenzyme variations and analysis of small and large subunit ribosomal DNA that both show very little genetic variation in *G. catenatum* over its global range (Bolch et al. 1999, Holmes et al. 2002). Nevertheless, *G. catenatum* strains from the Pacific coast of Mexico can still be clearly distinguished from isolates from other geographic regions on the base of the presence dcGTX1/4 and the high relative contribution of the N-sulfocarbamoyl toxins C1/C2 (on average 85% of total composition). In any case, all toxin profiles of *G. catenatum* strains must be corroborated by complementary techniques, such as mass spectrometry, to confirm these results.

In conclusion, we confirmed the presence of benzoyl and hydrophilic saxitoxin analogues, based on specific CID mass transitions, in diverse strains isolated from the coast of Mexico. The biogeographic distribution of toxin profiles of *G. catenatum* extend over an important geographical zone of the Mexican Pacific coast, more than 1300 km long, from the middle of the Gulf of California to Lázaro Cárdenas, Michoacán. The toxin profiles were rather unexpectedly complex in that at least seven benzoyl analogues were detected, together with 10 hydrophilic STX analogues. Among the hydrophilic analogues, the absence of the carbamoyl group was the most significant finding. Although benzoyl toxins have been previously detected in two Mexican isolates of *G. catenatum*, the present study confirms for the first time the presence of these toxins by LC-MS/MS. Our work also reports benzoyl toxins in other isolates from diverse geographical zones of the Mexican Pacific. In addition, in three of these strains, we found unreported benzoyl toxins namely: GC1a/b and GC5. Further analysis of the benzoyl group is clearly needed to establish possible relationships among diverse strains of *G. catenatum* from widespread geographical regions. In some cases, this will require reanalysis of toxin profiles with advanced confirmatory methods. Finally, the implications of the accumulation and biotransformation of the benzoyl analogs on the toxic effect in diverse trophic interactions should be reconsidered in the context of risk assessment of seafood consumption.

Acknowledgments

We thank Ira Fogel of CIBNOR for editorial services and suggestions. S. Quijano-Scheggia, M.C. Rodriguez Palacio and CODIMAR kindly provided *Gymnodinium catenatum* isolates for this study. Authors thank anonymous reviewers for the suggestions done during the edition of this manuscript. This project was funded by institution projects (PC 0.11 and 0.12 of CIBNOR, SIP 2014-1469 of CICIMAR-IPN), and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT 178227). C.J.B.S. is an EDI-IPN and COFFA-IPN fellow. L.M.D.R. is recipient of a BEIFI and CONACYT 65354 fellowship. Additional funding was provided by the HGF (Helmholtz Association of German Research Centres) through the research programme PACES II.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts in interest concerning this investigation.

Figure Legends

Figure 1: Bray-Curtis single link cluster analyses of similarity (%) of PST profiles from globally diverse isolates. See annex for data and strain codes. Country groups are given in the right side of the figure.

Figure 2: LC-MS/MS SRM chromatogram of strain BAPAZ5 (Q1 mass>Q3 mass). Each ion trace is normalized to 100% base peak, i.e. peak sizes of different ion traces do not reflect relative toxin abundances. The identities of B1, C1, C2, dcNEO and dcSTX have been confirmed by comparison of CID spectra and retention times with analytical standards. All other compounds are inferred from literature data and molecular masses.

Table Legends

Table 1. *Gymnodinium catenatum* strains isolated from different locations in the Mexican Pacific. Strain code, source, date, and isolator

Table 2.- Mass transitions m/z (Q1>Q3 mass) and their respective paralytic shellfish toxin.

Table 3.- Relative abundances (%) of PSTs on a molar basis. dcSTX: decarbamoyl saxitoxin; dcNEO: decarbamoyl neosaxitoxin; dcGTX1/4: decarbamoyl gonyautoxin 1/4; B1: N-sulfocarbamoyl toxin B1; B2: N-sulfocarbamoyl toxin B2; C1/2: N-sulfocarbamoyl toxin C1/2; C3/4: N-sulfocarbamoyl toxin C3/4. In parenthesis the growth medium is shown.

Table 4.- Semiquantitative benzoyl toxin profiles (chromatographic peak area cell⁻¹) for some strains of *G. catenatum* isolated from diverse sites in Mexico. BACO, Bahía Concepción; BAPAZ, Bahía de La Paz; BAMAN, Bahía de Manzanillo. All strains were cultivated in Gse medium.

Table 5.- Relative toxin/ chromatographic peak area ratios for benzoyl toxins of *G. catenatum* isolated from diverse sites in Mexico. BACO, Bahía Concepción; BAPAZ, Bahía de La Paz; BAMAN, Bahía de Manzanillo; LC, Lázaro Cárdenas. In parenthesis culture medium.

TABLE 1.

Strain (code)	Place and year of isolation	Isolated by
GCCV-6	Bahía Concepción, B.C.S., 2000 (26° 40' LN and 111° 50' LW)	C. Band-Schmidt ¹
GCCV-7	Bahía Concepción, B.C.S., 2000 (26° 40' LN and 111° 50' LW)	C. Band-Schmidt ¹
BAPAZ-5	Bahía de La Paz, B.C.S., 2007 (24° 27' LN and 110° 30' LW)	C. Band-Schmidt ¹
BAPAZ-7	Bahía de La Paz, B.C.S., 2007 (24° 27' LN and 110° 30' LW)	C. Band-Schmidt ¹
TOPO-8	Bahía de Topolobampo, 2007 (25° 33' LN and 109° 05' LW)	C. Band-Schmidt ¹
GCMV-7	Bahía de Mazatlán, 2006 (23° 13' LN and 106° 26' LW),	C. Band-Schmidt ¹
62L	Lázaro Cárdenas, Michoacán, 2005 (17° 58' LN and 102° 05' LW)	M. C. Rodríguez-Palacio ²
G7	Manzanillo, Colima, 2010 (19° 06' LN and 104° 22' LW)	S. Quijano-Scheggia ³

Institution affiliation 1. Centro interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN. 2. Universidad Autónoma Metropolitana. 3. Universidad de Colima.

TABLE 2.

Mass transition	Toxin	Collision energy (CE) [V]
257>156	dcSTX	30
257>196	dcSTX	30
273>255	dcNEO	30
300>204	STX	30
300>282	STX	30
316>196	NEO	30
316>298	NEO	30
353>273	dcGTX2/3	30
369>289	dcGTX1/4	30
377>257	GC3	30
380>282	B1	30
380>300	B1	30
393>273	GC6	30
396>298	B2, C1/2, GTX2/3	30
396>316	B2, C1/2, GTX2/3	30
412>314	C3/4, GTX1/4	30
412>332	C3/4, GTX1/4	30
457>377	GC3b	30
473>393	GC1/2, GC6b	30
489>409	GC1a/2a, GC4/5	30
553>473	GC1b/2b,	30
569>489	GC4b/5b	30

TABLE 3.

Strain	Source (medium)	dcSTX	dcNEO	dcGTX1/4	B1	B2	C1/2	C3/4
GCCV-6	BACO (f/2)	0.74	1.15	1.60	0.86	0.89	94.80	0.00
GCCV-6	BACO (GSe)	1.86	1.38	1.77	0.57	0.58	94.02	0.00
GCCV-6	BACO (GSe)	1.88	1.10	0.00	1.16	0.00	96.02	0.00
BAPAZ-7	BAPAZ (f/2)	3.00	2.66	0.00	1.11	0.00	83.89	9.44
BAPAZ-5	BAPAZ (GSe)	3.60	2.36	3.59	1.45	0.30	80.63	8.12
BAPAZ-5	BAPAZ (GSe)	2.58	2.04	4.07	1.12	0.31	81.59	8.42
BAPAZ-5	BAPAZ (GSe) [#]	3.93	3.41	2.62	2.83	3.02	75.99	8.22
BAPAZ-7	BAPAZ (GSe)	2.60	2.30	4.53	1.68	0.48	74.75	13.75
G7	BAMAN (f/2)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00
G7	BAMAN (GSe)	0.61	4.58	7.59	0.00	0.00	75.68	11.55
G7	BAMAN (GSe)	0.25	4.10	5.24	0.22	0.00	76.50	13.78
G7	BAMAN (f/2)	1.07	1.35	0.72	1.22	0.00	95.79	0.00
62-L	LC (f/2)	0.55	2.61	1.73	1.46	0.00	81.90	12.01
	Average	1.74	2.23	2.57	1.05	0.43	85.50	6.56
	Std dev*	1.31	1.28	2.33	0.77	0.83	9.24	5.70

* Standard deviation; # Massive culture

TABLE 4.

Strain	Source	Toxin (area cell ⁻¹)			
		GC1/2	GC4/5	GC3	GC1b/2b
GCCV-6	BACO	0.25	4.39	1.24	0.00
GCCV-6	BACO	0.16	5.38	1.54	0.00
BAPAZ-5	BAPAZ	2.47	5.47	2.35	0.22
BAPAZ-5	BAPAZ	1.75	6.41	3.20	0.11
BAPAZ-7	BAPAZ	4.19	20.95	3.31	0.40
G7	BAMAN	8.39	24.60	7.96	1.88
G7	BAMAN	11.00	32.86	11.85	4.27
	Average	4.03	14.29	4.49	0.98
	Std dev*	4.17	11.64	3.94	1.59

* Standard deviation

TABLE 5.

Strain	Source (medium)	Ratio		
		GC4-5/GC1-2	GC4-5/GC3	GC1-2/GC3
GCCV-6	BACO (f/2)	13.14	15.95	1.21
GCCV-6	BACO (GSe)	20.41	12.93	0.63
GCCV-6	BACO (GSe)	14.91	10.76	0.72
BAPAZ-7	BAPAZ (f/2)	10.01	28.77	2.87
BAPAZ-5	BAPAZ (GSe)	3.85	7.43	1.93
BAPAZ-5	BAPAZ (GSe)	6.72	6.44	0.96
BAPAZ-5	BAPAZ (GSe) [#]	4.00	32.84	8.20
BAPAZ-7	BAPAZ (GSe)	6.84	18.31	2.68
G7	BAMAN (f/2)	3.89	13.93	3.58
G7	BAMAN (GSe)	3.61	5.66	1.57
G7	BAMAN (GSe)	3.48	3.97	1.14
G7	BAMAN (f/2)	17.91	6.39	0.36
62-L	LC (f/2)	3.41	3.00	0.88
	Average	8.63	12.80	2.06
	Std dev*	6.05	9.30	2.09

* Standard deviation; [#] Mass culture

Fig. 1.

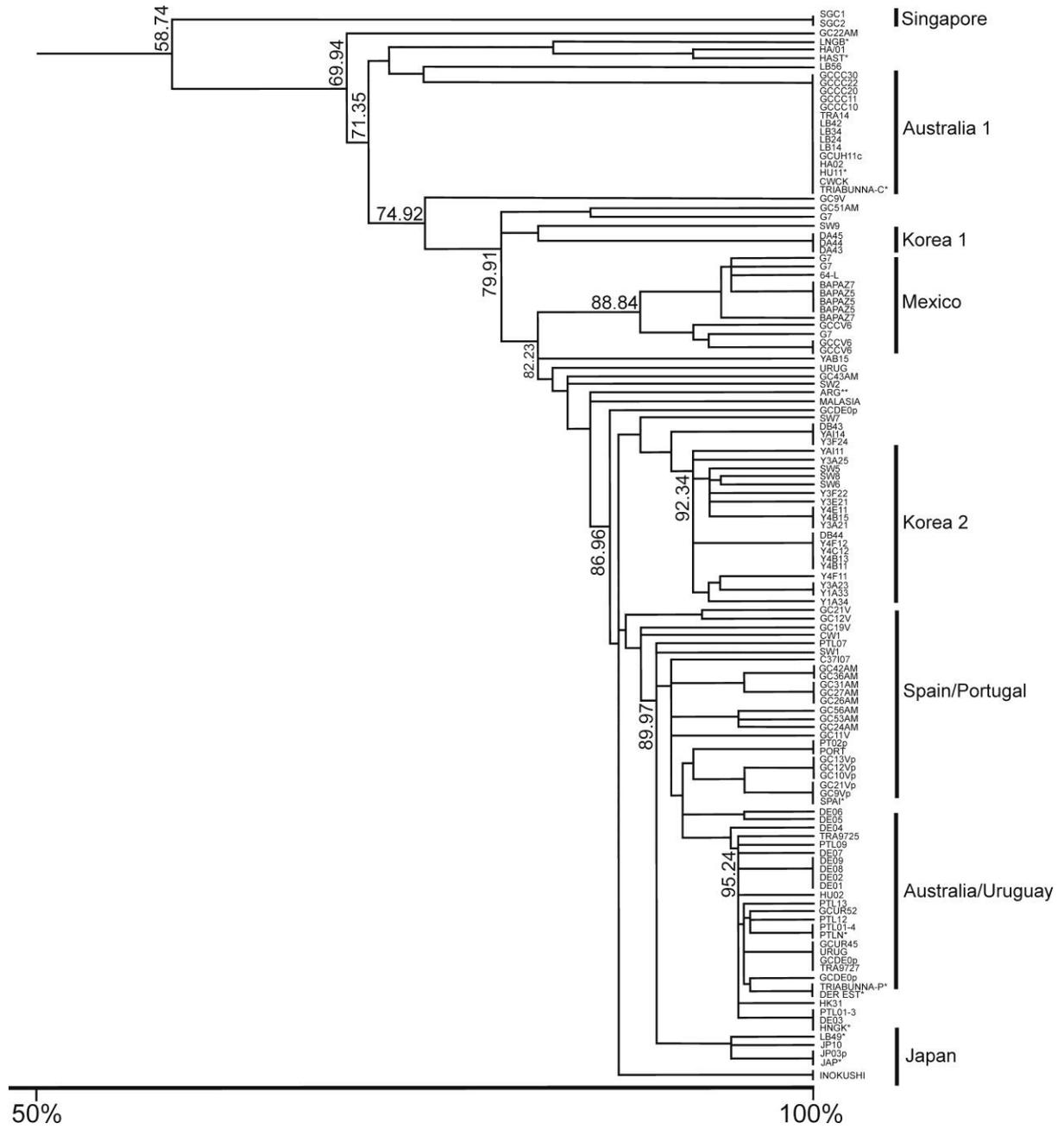


Fig. 2.

