



**Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.**

**Posgrado en Ciencias del Agua**

**Diversidad y toxicidad del género *Ostreopsis* Schmidt,  
1902 (Dinophyceae) en la zona norte del Caribe Mexicano**

**Tesis que presenta:**

Jennifer Méndez Torres

**En opción al título:**

Maestría en Ciencias del Agua

Director: Dr. Antonio Almazán Becerril

Cancún, Quintana Roo. Méxio, julio de 2019.

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

Cancun, Quintana Roo a 3 de julio de 2019

Jennifer Méndez Torres.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS DEL AGUA



#### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Jennifer Méndez Torres** titulado "Diversidad y toxicidad del género *Ostreopsis* Schmidt, 1902 (Dinophyceae) en la zona norte del Caribe Mexicano" fue realizado en la Unidad de Ciencias del Agua, en la línea de Ecología y dinámica de ecosistemas acuáticos, en el Laboratorio de Ecología Costera, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio Almazán Becerril, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias del Agua de este Centro.

Atentamente.

Dra. Clelia De la Peña Seaman

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 10 de junio de 2019

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado la beca con número 619268 para continuar con mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C (CICY) en la Unidad de Ciencias del Agua y del Laboratorio de Ecología Costera por brindarme la oportunidad de estudiar el posgrado y poder trabajar en sus instalaciones.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), a la división de Oceanología y la división de Biología experimental y aplicada en los laboratorios de biología algal y metagenómica por el apoyo técnico y la experiencia adquirida durante mi estancia.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) en el Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos por la estancia académica y el apoyo para la realización de los ensayos toxicológicos.

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, Baja California Sur (CICIMAR-IPN) en el departamento de plancton y ecología marina por las facilidades para realizar una estancia académica, así como los conocimientos adquiridos.

A la Red de Florecimientos Algales Nocivos por el apoyo económico para realizar una estancia académica como desarrollo complementario para la investigación de este trabajo.

Al proyecto Presencia de ciguatoxinas en la especie invasora pez león (*Pterois volitans*) y en otros peces arrecifales en dos áreas naturales protegidas de Quintana Roo: Arrecife de Puerto Morelos e Isla Contoy (MQ001) de la CONABIO por el financiamiento para la elaboración de esta tesis.

Investigación para la Conservación y el Desarrollo (INCODE A. C.) por el apoyo en el uso de equipo, así como el hospedaje en sus instalaciones durante la estancia en La Paz

Al Dr. Antonio Almazán Becerril por confiar en mí al aceptar dirigir este trabajo, por el tiempo, la paciencia y el compartir sus conocimientos. Sobre todo, por su amistad y palabras de motivación en el ámbito académico y personal ha sido muy gratificante laborar con usted.

Al Dr. Ernesto García Mendoza por las facilidades en la estancia académica y el apoyo para trabajar en su laboratorio, así como el tiempo y comentarios en cada uno de los tutoriales para mejorar esta tesis. Le agradezco los consejos académicos y personales.

Le agradezco al B. M. Erick J. Núñez Vásquez por su paciencia y disponibilidad para compartir sus conocimientos, por todas las facilidades en su laboratorio para que mi estancia fuera productiva. Gracias por los comentarios, consejos y apoyo para mejorar este trabajo.

A la Dra. Christine J. Band Schmidt por el aprendizaje y las experiencias. Muchas gracias por la confianza y comentarios que me han ayudado a la ejecución de este trabajo.

A la Dra. Asunción Lago Lestón por brindarme las facilidades en su laboratorio que me llevaron a enriquecer este trabajo.

A los integrantes de mi comité tutorial el Dr. José Adán Caballero Vázquez y el Dr. Jesús Alvarado Flores por los comentarios y tiempo que dedicaron para revisar esta tesis.

Al M.C. Benjamín Delgado Pech, gracias por apoyarme en mis salidas de campo y en el laboratorio, por compartir estos años tus experiencias y conocimientos.

A la M.B. Yamne Ortega Saad por la paciencia, tiempo y apoyo en el laboratorio. Gracias por tu compañerismo y tus palabras de aliento.

Al M.C. Rigel Castañeda Quezada, gracias por toda la ayuda y orientación en diferentes aspectos de este trabajo, pero más importante, gracias por la amistad que me brindaste y esas largas horas de pláticas y convivencias que hicieron de mi estancia una experiencia invaluable.

Al M.C. Pablo Monsalvo Spencer por proporcionarme las artemias en cultivo para los ensayos toxicológicos y a los Biol. Gabriel Gómez y José Luis por el cultivo de microalgas como alimento.

Al Dr. Amauri Cordero y al Tec. Guadalupe Sánchez responsables del biotero, quienes me facilitaron el manejo de los organismos para realizar los ensayos en ratón.

A las B.M Sheila Solís Arreola y Daniela Grajales García por estar siempre apoyándome y alentándome, ustedes son parte importante de este logro, gracias a ustedes pude concluir esta etapa, pero sobre todo me siento infinitamente agradecida por su amistad.

A las B.M Arizbeth Ramos Sánchez y Frida Alfonso Calles, por ser mis amigas y a pesar de la distancia hemos podido conversar, ver y compartir.

A mis compañeras y amigas de laboratorio la Biol. Lucía Medrano, la M.C. Gabriela Reséndiz, la M.C. Damaris Irola y la M.C. Azucena Uitzil por su apoyo, sus consejos y las "horas de café" que compartimos, por la diversión y su valiosa amistad.

A la casi M.C. Stephany Moscoso Alejo, por ser mi amiga y compartir conmigo el aprendizaje, las charlas y desesperación en esta etapa; así como los momentos divertidos.

A los que integran los chidos del CICY cada uno hizo que este proceso fuera más ameno; gracias por su compañía, la buena comida y todos los momentos de diversión.

## *Dedicatoria*

*A mis padres, por su apoyo en cada una de mis desiciones, por sus consejos y alentarme para no darme por vencida.*

*A mi hermano por escucharme, por siempre alentarme en los momentos más difíciles.*

*A mis abuelos por todas las muestras de cariño y apoyo.*

## ÍNDICE

GLOSARIO.....	1
RESUMEN .....	3
ABSTRACT .....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1 Morfología del género <i>Ostreopsis</i> .....	8
2.2 Distribución global del género <i>Ostreopsis</i> .....	11
2.3 Estructura, propiedades físico-químicas de la Palytoxina y análogos .....	15
2.4 Toxicidad y perfil tóxico de especies de <i>Ostreopsis</i> .....	17
2.5 Casos de intoxicación en humanos por palytoxinas.....	19
2.6 Mecanismos de acción de la palytoxina .....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	25
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	26
5. HIPÓTESIS.....	26
6. OBJETIVO GENERAL.....	26
5.1 Objetivos particulares.....	26
7. ÁREA DE ESTUDIO .....	27
7.1 Sitios de muestreo.....	27
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
8.1 Trabajo de Campo.....	29
8.2 Cuantificación de la abundancia de <i>Ostreopsis</i> .....	30
8.3 Análisis morfológico de las especies del género <i>Ostreopsis</i> .....	30
8.4 Análisis filogenético de las especies de <i>Ostreopsis</i> .....	34
8.4.1 Extracción de ADN .....	34
8.4.2 Amplificación de Reacción en Cadena de Polimerasa .....	35
8.4.3 Análisis de las secuencias y reconstrucción fitogenética.....	36
8.5 Análisis de toxicidad.....	36
8.5.1 Obtención de extractos .....	36
8.5.2 Preparación de la muestra para bioensayos .....	37
8.5.3 Toxicidad evaluada mediante el ensayo agudo en modelo en ratón ( <i>Mus musculus</i> ) .....	37

8.5.4	Ensayo toxicológico en modelo de <i>Artemia salina</i> (ARTOX) .....	39
9.	RESULTADOS .....	40
9.1	Abundancias de <i>Ostreopsis</i> spp. sobre <i>Dictyota</i> .....	40
9.2	Análisis morfológico y morfométrico.....	42
9.3	Análisis filogenético de las especies de <i>Ostreopsis</i> .....	53
9.4	Toxicidad en modelo en ratón ( <i>Mus musculus</i> ).....	57
9.5	Toxicidad en modelo en <i>Artemia</i> ( <i>A. salina</i> ).....	60
9.5.1	Cambios morfológicos en <i>A. salina</i> expuestos a extractos de <i>Ostreopsis</i> spp.     61	
10.	DISCUSIÓN.....	62
10.1	Abundancias de <i>Ostreopsis</i> spp. sobre <i>Dictyota</i> .....	62
10.2	Análisis morfológico y morfométrico.....	64
10.3	Análisis de la region ITS.....	72
10.4	Toxicidad en modelo en ratón .....	73
10.5	Toxicidad en modelo de <i>Artemia salina</i> .....	76
12.	BIBLIOGRAFIA.....	80



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquemas de la interpretación de la tabulación de <i>Ostreopsis</i> según diferentes autores: Fukuyo (1981) epiteca (a), hipoteca (b); Besada (1982); epiteca (c), hipoteca (d); Faust (1995) epiteca (e), hipoteca (f). .....	10
Figura 2. Ocurrencia global de las especies del género <i>Ostreopsis</i> 1902-2018. Mapa construido con base a reportes publicados en revistas científicas. ....	12
Figura 3. Estructura química de la palytoxina.....	17
Figura 4. Altas coberturas de macroalgas en el arrecife de Ixlaché en la zona de Isla Contoy sobre las cuales se han reportado elevadas abundancias de <i>Ostreopsis</i> . 27	
Figura 5. Coberturas de macroalgas en La Bonanza en el Sistema Arrecifal de Puerto Morelos. ....	28
Figura 6. Ubicación de los sitios de muestreo en la zona de Puerto Morelos e Isla Contoy en el estado de Quintana Roo. ....	29
Figura 7. Patrón tabular de las tecas del género <i>Ostreopsis</i> . (Tomado de Fukuyo, 1981). ....	33
Figura 8. Interpretación de las placas del sulcus del género <i>Ostreopsis</i> . (Tomado de Accoroni <i>et al.</i> , 2016). ....	33
Figura 9. Variaciones en las abundancias del género <i>Ostreopsis</i> en la macroalga <i>Dictyota</i> sp. en dos sitios del Caribe Mexicano. ....	41
Figura 10. Imágenes en microscopía de epifluorecencia de <i>O. heptagona</i> .....	44
Figura 11. Imágenes de microscopía de luz de <i>O. heptagona</i> . ....	44
Figura 12. Imágenes en microscopía de epifluorescencia de <i>O. lenticularis</i> . ....	46
Figura 13. Imágenes de microscopía de luz de <i>O. lenticularis</i> .....	47

Figura 14. Imágenes en microscopía de epifluorescencia y microscopía de luz de <i>O. cf siamensis</i> .....	48
Figura 15. Esquemas en donde se representan las variables morfométricas de la epiteca (a) y de la hipoteca (b) para la identificación de las especies.....	49
Figura 16. Relación entre la longitud dorsoventral ( $\mu\text{m}$ ) y el transdiámetro ( $\mu\text{m}$ ) de las tres especies de <i>Ostreopsis</i> : <i>O. lenticularis</i> , <i>O. heptagona</i> y <i>O. cf. siamensis</i> reportadas en el norte del Caribe mexicano.....	50
Figura 17. Relación de cada una de las variables morfométricas de <i>Ostreopsis</i> : <i>O. lenticularis</i> , <i>O. heptagona</i> y <i>O. cf. siamensis</i> .....	51
Figura 18. Árbol de máxima verosimilitud (ML) inferido a partir de secuencias del ITS del rDNA..	55
Figura 19. Signos clínicos observados durante el análisis toxicológico en modelo en ratón expuesto a extractos de <i>Ostreopsis</i> aislados de la zona norte del Caribe Mexicano.....	58
Figura 20. Mortalidad de <i>A. salina</i> (adultos) expuestos durante 24(h) a extractos de <i>Ostreopsis</i> spp. aislados en la zona norte del Caribe Mexicano. ....	61
Figura 21. Imágenes de <i>Artemia salina</i> expuestos a extractos de <i>Ostreopsis</i> spp de la zona del norte del Caribe Mexicano. ....	62
Figura 22. Imágenes de especies morfológicamente similares a <i>Ostreopsis lenticularis</i> . ....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución y abundancia del género <i>Ostreopsis</i> en el mundo.....	13
Tabla 2. Propiedades químicas y biológicas de la palytoxina y análogos .....	16
Tabla 3. Casos de intoxicación en humanos por palytoxina.....	21
Tabla 4. Abundancias (cel g <sup>-1</sup> PHM) del género <i>Ostreopsis</i> en el alga <i>Dictyota</i> sp. en la zona norte del Caribe Mexicano. ....	41
Tabla 5. Tamaño de tres especies del género <i>Ostreopsis</i> de la zona norte del Caribe mexicano. ....	50
Tabla 6. Valores del coeficiente de determinación entre las variables morfométricas de <i>O. lenticularis</i> .....	52
Tabla 7. Valores del coeficiente de determinación entre las variables morfométricas de <i>O. heptagona</i> .....	53
Tabla 8. Valores del coeficiente de determinación entre las variables morfométricas de <i>Ostreopsis</i> cf. <i>siamensis</i> .....	53
Tabla 9. Secuencias de especies de <i>Ostreopsis</i> utilizados en el árbol filogenético: aislamiento, ubicación, número de acceso en GenBank y referencia. ....	56
Tabla 10. Concentración celular de cada uno de los extractos utilizados en este estudio.....	57
Tabla 11. Evaluación de la toxicidad de extractos de <i>Ostreopsis</i> de la zona Norte del Caribe Mexicano en modelo en ratón.....	59
Tabla 12. Toxicidad aguda de <i>Artemia salina</i> de extractos de <i>Ostreopsis</i> spp de la zona norte del Caribe Mexicano. ....	60

Tabla 13. Descripción de *Ostreopsis lenticularis* y taxa relacionados de acuerdo a diferentes autores..... 69

Tabla 14. Descripción de *Ostreopsis siamensis* y taxa relacionados de acuerdo a diferentes autores..... 70

Tabla 15. Descripción de *Ostreopsis heptagona* y taxa relacionados de acuerdo a diferentes autores..... 71

## GLOSARIO

**Ataxia:** Desorden, irregularidad, perturbación de las funciones del sistema nervioso.

**Artralgia:** Dolor de las articulaciones.

**Bradycardia:** Ritmo cardíaco más lento que el normal.

**Cianosis:** Coloración azul y alguna vez negruzca o lívida de la piel, debida, a trastornos circulatorios.

**Concentración letal:** Animales cuyos signos clínicos fueron marcados por la intoxicación en los que el paro respiratorio y la muerte sobreviven en pocos minutos o en horas, con esto se puede determinar la toxicidad de la muestra.

**Concentración subletal:** Muestras en la que los ratones presentaban conductas anormales, pero sin causar la muerte de los animales. Los animales vuelven a recuperar su estado normal después de las 24 horas.

**Concentración inocua:** Muestras en animales en cuyo comportamiento fue normal o con signos leves, por lo que se recuperan totalmente al poco tiempo después de la inyección.

**Conjuntivitis:** Inflamación en la conjuntiva que cubre la parte blanca del globo ocular.

**Dermatitis:** Inflamación en la piel.

**Disgeusia:** Es un síntoma semiológico que denota alguna alteración en la percepción relacionada con el sentido del gusto.

**Disnea:** Dificultad para respirar

**Higroscópico:** Término químico en donde los compuestos atraen las moléculas de agua del ambiente en cuanto pueden.

**Hipercalcemia:** Nivel de calcio en la sangre superior a lo normal.

**Mialgia:** Dolor de los músculos.

**Mioglobinuria:** Excreción de la mioglobina en la orina a causa a causa de una mioglobinemia presente de la destrucción de la musculatura estriada.

**Parestesia:** Sensación o conjunto de sensaciones anormales y especialmente hormigueo, adormecimiento o ardor que experimentan en la piel ciertos enfermos de la piel o circulatorio.

**Rinorrea:** Salida de fluidos por las fosas nasales, provocada por el incremento de la secreción de moco.

**Taquicardia:** Frecuencia excesiva del ritmo de las contracciones cardíacas.

## RESUMEN

Los dinoflagelados del género *Ostreopsis* presentan hábitos epifito-bentónicos, asociados a diferentes sustratos. Algunas especies de este género producen análogos de palytoxina (PLTX), considerada una de las toxinas más potentes que puede provocar problemas en la salud humana y en el ecosistema. En el Caribe Mexicano se tienen registros de cuatro de las once especies de *Ostreopsis* reportadas a nivel internacional. En este estudio se determinó la abundancia y taxonomía de las especies de *Ostreopsis* mediante pruebas morfológicas, morfométricas y filogenéticas. Además, se evaluó su actividad toxicológica en dos ensayos agudos (ratón y artemia). Las muestras fueron obtenidas de la macroalga *Dyctiota* en dos sitios arrecifales localizados en la porción Norte del Caribe Mexicano, (Isla Contoy y Puerto Morelos) durante el periodo de noviembre de 2017 a junio de 2018. En Isla Contoy las máximas abundancias registradas fueron de 34,907 cel g<sup>-1</sup> en el mes de noviembre y en Puerto Morelos se observaron 45,842 cel g<sup>-1</sup> en mayo. Se identificaron tres especies: *O. lenticularis*, *O. heptagona* y *O. cf. siamensis*. Las relaciones isométricas fueron mayores entre el diámetro dorsoventral y el transdiámetro de la epiteca en *O. lenticularis* y *O. heptagona*; en *O. cf. siamensis* fue entre el diámetro dorsoventral de la hipoteca y el largo de la segunda antapical. Se amplificó un segmento de la región de los espaciadores internos (ITS) que fue reportada como *O. lenticularis*. Esta secuencia se integró a un clado monofilético junto con muestras de la Reunión Francesa, Galápagos y Hawái. En ambos sitios se reportaron concentraciones subletales en bioensayo en ratón al presentar signos clínicos característicos de intoxicación (arqueamiento corporal, pérdida de locomoción de los cuartos traseros, espasmos, así como en el bioensayo de *A. salina* al mostrar cambios en su comportamiento, como nado errático y en una de las muestras de este ensayo agudo provocó la mortalidad en un 90% de los ejemplares. Algunos individuos de *A. salina* fueron observados y se detectaron cambios morfológicos severos tales como necrosis en el tejido. Los resultados de esta investigación demuestran la dominancia y producción de toxinas del género *Ostreopsis* en las comunidades epibentónicas de dinoflagelados de los

sistemas arrecifales del Norte del Caribe Mexicano, lo cual aporta conocimiento para comprender su papel en estos ecosistemas y su posible impacto en la salud pública.



## ABSTRACT

The dinoflagellates of the genus *Ostreopsis* present epiphytonic habits, associated with different substrates. Some species of this genus produce palytoxin (PLTX) analogs that are considered between the most potent toxins that can cause problems in human health and in the ecosystem. In the Mexican Caribbean there are records of four of the eleven *Ostreopsis* species reported internationally. In this study the abundance and taxonomy of the *Ostreopsis* species were determined by morphological, morphometric and phylogenetic analysis. In addition, their toxicological activity was evaluated in two acute trials (mouse and artemia). Samples were obtained from the macroalga *Dictyota* in two coral reefs sites located at of the northern portion of the Mexican Caribbean (Isla Contoy and Puerto Morelos) during November, 2017 to June, 2018. Maximum abundances registered were 34,907 cel g<sup>-1</sup> in Isla Contoy during November, and 45,842 cel g<sup>-1</sup> in Puerto Morelos on May. Three species were identified: *O. lenticularis*, *O. heptagona* and *O. cf. siamensis*. The isometric relationships were greater between the dorsoventral diameter and the transdiameter of the epitheca in *O. lenticularis* and *O. heptagona*, whereas in *O. cf. siamensis* it was between the dorsoventral diameter and the length of the second antapical. A segment of the region of the internal spacers (ITS), which was reported as *O. lenticularis*, was amplified. This sequence was associated to a monophyletic clade along with samples from the French Reunion Island, Galápagos and Hawaii. In both sites sublethal concentrations were reported in the mouse bioassay presenting characteristic clinical signs of intoxication (body bowing, loss of locomotion of the hindquarters, spasms. In the case of the *A. salina* bioassays the individuals showed changes in their behavior and erratic swimming. One of the samples caused 90% mortality of *A. salina* specimens associated to severe morphological changes such as tissue necrosis. Results of this research demonstrate the dominance and toxin-producing of this dinoflagellate genus in the epibenthic community of the coral reef sites of the Mexican Caribbean, an important issue to understand its role in these ecosystems and as well as its possible impact in the pulic health.

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Ostreopsis* agrupa a varias especies de dinoflagelados principalmente epifito-bentónicos, pero que también pueden estar presentes en la columna de agua (Ciminiello *et al.*, 2006; Okolodkov *et al.*, 2007; Mangialajo *et al.*, 2008; Totti *et al.*, 2010; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2018).

La investigación sobre este género se centra en la capacidad que tienen algunas especies de producir toxinas. Las toxinas que produce este género son análogos de la palytoxina (PLTX C<sub>129</sub>H<sub>223</sub>N<sub>3</sub>O<sub>54</sub>) (Usami, 1995), un compuesto polihidroxiado soluble en agua considerada como una de las toxinas marinas más potentes y complejas debido a la mezcla de compuestos u homólogos estrechamente relacionados. Esta toxina se identificó originalmente en el coral blando *Palythoa toxica* (Onuma *et al.*, 1999; Durando *et al.*, 2007; Tichadou *et al.*, 2010). La PLTX tiene un grupo de compuestos análogos producidos por algunas especies de *Palythoa*, *Zoanthus*, cianobacterias del género *Trichodesmium* y dinoflagelados del género *Ostreopsis* (mascarenotoxinas, homopalytoxinas, bishomopalytoxinas, neopalytoxina, deoxypalytoxina, 42-hydroxypalytoxina, ostreocina-A, -B, -D, -E1, ovotoxinas a-l y palytoxina isobárica) (Moore y Scheuer, 1971; Usami *et al.*, 1995; Lenoir *et al.*, 2004; Ciminiello *et al.*, 2006, 2008; Pelin *et al.*, 2015; Tartaglione *et al.*, 2016; Terajima *et al.*, 2018).

La intoxicación vía oral por PLTX se produce por el consumo de peces y cangrejos y se caracteriza por la presencia de síntomas neurológicos y gastrointestinales que incluyen náuseas, sabor metálico, hiperventilación, calambres, diarrea severa, parestesia de las extremidades y dificultades respiratorias, entre otros (Onuma *et al.*, 1999).

Se han descrito once especies del género *Ostreopsis* de las cuales se ha descrito la producción de estas toxinas en: *O. siamensis*, *O. ovata*, *O. mascarensis*, *O. fattorussoi*, *O. heptagona*, *O. lenticularis* y *O. rhodesae* (Norris *et al.*, 1985; Usami *et al.*, 1995; Ukena *et al.*, 2001; Lenoir *et al.*, 2004; Ciminiello *et al.*, 2006; Accoroni *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2016). Sin embargo, en otras especies (*O. belizeanus*, *O. caribbeanus*, *O. labens* y *O. marina*) su toxicidad aún no ha sido demostrada.

La distribución geográfica de *Ostreopsis* abarca principalmente regiones tropicales y subtropicales, pero se ha observado que su ámbito de distribución se ha extendido hacia latitudes templadas (Rhodes, 2011).

La identificación taxonómica tradicional de las especies de este género se basa principalmente en caracteres morfológicos tales como la forma y tamaño de la célula, así como la forma y disposición de las placas de la teca. Sin embargo, las especies de *Ostreopsis* son morfológicamente plásticas, lo que complica discriminarlas completamente solamente mediante su forma y tamaño ya que estos caracteres no son robustos (Penna *et al.*, 2014). Para superar este inconveniente, en los últimos años se han implementado análisis filogenéticos para identificar a las especies utilizando secuencias de ADN, principalmente de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS<sub>1</sub> e ITS<sub>2</sub>) y el gen 5.8 ARNr (Penna *et al.*, 2005, 2010; Guerrini *et al.*, 2010; Tawong *et al.*, 2014).

Para el estudio e identificación de las toxinas producidas por estas especies se utilizan bioensayos y determinaciones analíticas. El bioensayo más común es el ensayo en modelo en ratón que permite identificar los signos de intoxicación producidos por las toxinas presentes en los extractos evaluados, así como su toxicidad total, expresada en unidades ratón (UR), nanogramos (ng) o microgramos (µg) de PLTX equivalente, con base en el tiempo de muerte de los ratones, generalmente administrada por vía intraperitoneal en ensayos agudos (Riobó *et al.*, 2008). Por otro lado, las técnicas analíticas como la cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección con ultravioleta (HPL-UV) o fluorescencia (HPLC-FLD), y recientemente a la espectrometría de masas (LC-MS/MS), entre otras, permiten identificar y cuantificar la composición química de un perfil de toxinas presentes en los extractos crudos incluso en bajas concentraciones (Ciminiello *et al.*, 2011; Riobó *et al.*, 2011).

Actualmente, en la zona del Caribe Mexicano hay reportes de la ocurrencia de cuatro especies de *Ostreopsis*: *O. heptagona*, *O. siamensis*, *O. cf. marina*, y *O. belizeana* (Almazán-Becerril *et al.*, 2015, 2016; Irola-Sansores *et al.*, 2018). Estas investigaciones mencionan la predominancia en abundancia del género *Ostreopsis* sobre los demás géneros de dinoflagelados bentónicos (*Gambierdiscus*, *Fukuyoa*,

*Coolia*, *Prorocentrum*). Irola-Sansores *et al.* (2018) mencionan que *O. cf. marina* y *O. heptagona* son abundantes en determinadas épocas del año y que incluso *O. cf. marina* puede presentar proliferaciones de hasta 19,672 cel g<sup>-1</sup> de macroalga. De las especies reportadas en esta región y con la evidencia de que *O. siamensis* y *O. heptagona* pueden producir PLTX y análogos (Norris *et al.*, 1985, Ukena *et al.*, 2001), es necesario no sólo determinar la identidad de las especies de *Ostreopsis* presentes en el Caribe Mexicano, sino elucidar su potencial tóxico para determinar el posible riesgo ante eventos de proliferaciones en la zona.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es identificar las especies presentes en el norte del Caribe Mexicano del género *Ostreopsis* con base a sus caracteres morfológicos y técnicas moleculares, así como determinar la posible producción de toxinas, lo cual permitirá evaluar el riesgo para el ecosistema, la salud humana y las actividades económicas, recreativas y turísticas del lugar.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Morfología del género *Ostreopsis*

La primera especie descrita de este género fue *Ostreopsis siamensis* Schmidt registrada en el Golfo de Siam (Tailandia) en 1902. Se observó que era una especie predominantemente de hábitos bentónicos. La descripción original mencionaba un cuerpo aplanado en forma de ostra, ápice excéntrico marcado por un área estrecha en forma de hendidura. El *cingulum* es longitudinal y estrecho que solo puede ser observado en vista hipotecal. Presenta tres placas apicales (una reducida), y una placa antapical. Las placas son porosas. Posteriormente, Fukuyo (1981) erigió dos nuevas especies de muestras colectadas en la Polinesia Francesa, Nueva Caledonia y Japón: *O. lenticularis*, caracterizada por presentar dos tipos de poros de diferente tamaño, y *O. ovata*, de forma más ovalada y esbelta que la anterior. Ambas especies las agrupó en la Familia Ostreopsidaceae dentro del Orden Peridineales.

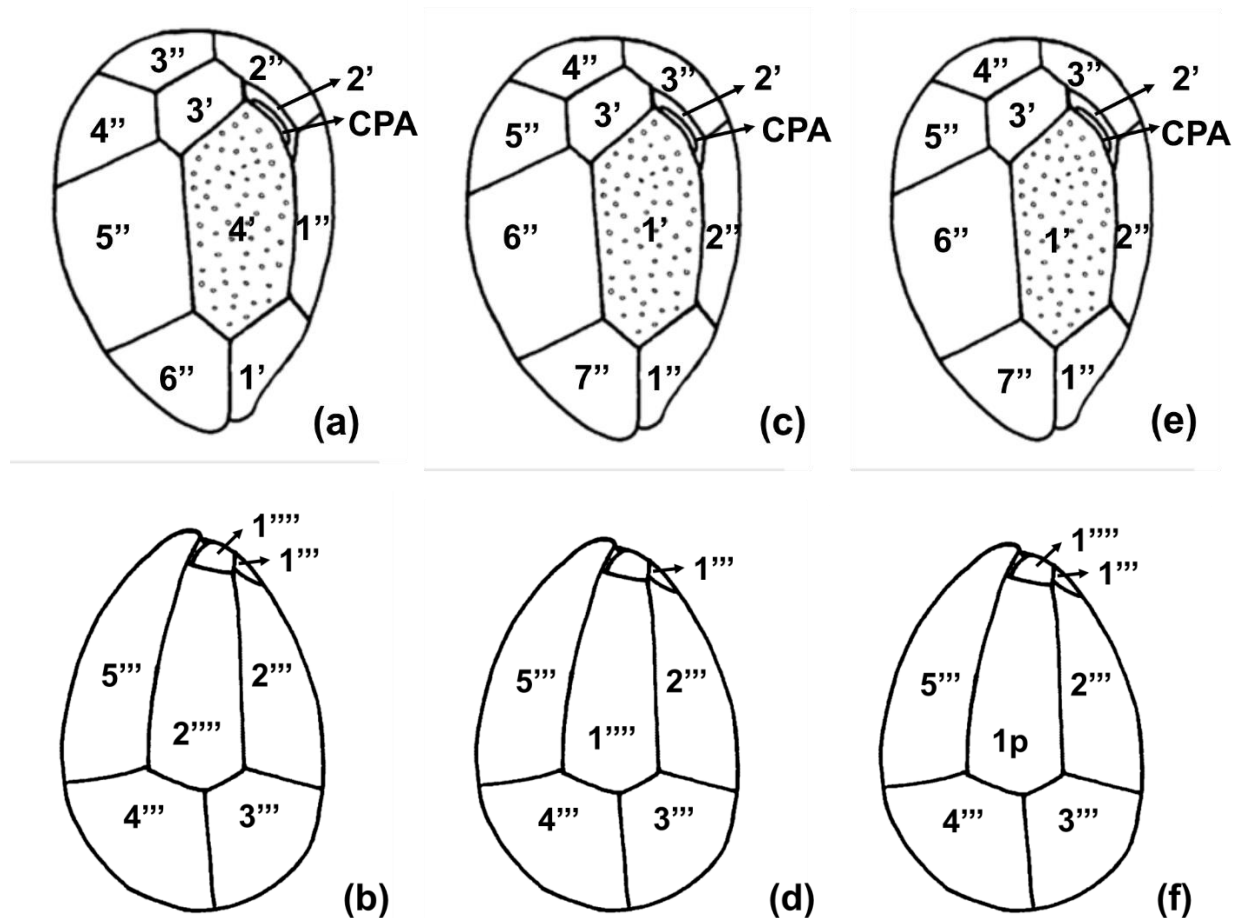
Posteriormente, Besada *et al.* (1982) colocaron al género en el Orden Gonyaulacales con base en la tabulación de Kofoid (1909) enfatizando la asimetría de las placas apicales.

La interpretación de Besada *et al.* (1982) consistió en considerar cuatro placas apicales en lugar de tres como mencionan los autores Schmidt (1902) y Fukuyo (1981); así, la primera placa apical (1') en la interpretación de Besada *et al.* (1982) estaría desplazada y adyacente al sulcus. Debido a su posición, la interpretación más sencilla sería considerarla como la primera placa precingular (1''). Sin embargo, la interpretación de Besada *et al.* (1982) dota a la interpretación tabular de afinidad por los Gonyaulacales, Orden en el que deben estar presentes cuatro placas apicales y no tres; interpretación con la que posteriormente coinciden varios autores (Gómez *et al.*, 2011; Adl *et al.*, 2012; Hoppenrath, 2016).

En este contexto, Fensome *et al.* (1993) y Taylor (1999) mencionan que en los géneros Gonyaulacales donde el primer homólogo apical (1') no tiene contacto con el complejo del poro apical (CPA), pues este se encuentra a una gran distancia, se denomina patrón tipo excerto, lo cual aplicaría para el género *Ostreopsis*.

Todas las especies de *Ostreopsis* presentan la misma fórmula para la identificación de las placas, pero las variaciones en forma y tamaño constituyen las diferencias entre especie. En la literatura especializada no existe una homogenización en la descripción de las especies de este género ya que algunos autores como Accaroni *et al.* (2016) y Verma *et al.* (2016) siguen la descripción de la epiteca de acuerdo al trabajo de Fukuyo (1981), aunque la descripción de la hipoteca concuerde con la interpretación de Besada *et al.* (1982). Otros más (Pin *et al.*, 2001; Lenoir, 2004; Penna, 2005; Aligizaki *et al.*, 2006; Monti *et al.*, 2007; Riobó, 2008; Ismael y Halim, 2012; David *et al.*, 2013; Almazán-Becerril *et al.*, 2015) siguen la tabulación de Faust y Morton (1995), mientras que otros (Bravo *et al.*, 2012; Escalera *et al.*, 2014; Almazán-Becerril *et al.*, 2016) solo utilizan la tabulación de Besada *et al.* (1982). La figura 1 muestra las diferentes interpretaciones de la teca de *Ostreopsis* según Fukuyo (1981), Besada *et al.* (1982) y Faust y Morton (1995). De acuerdo a lo mencionado resulta evidente la falta de consistencia en la literatura científica sobre la interpretación de las tecas en este género de dinoflagelado.

Actualmente hay once especies de *Ostreopsis*: *O. siamensis* Schmidt (1902), *O. lenticularis* (Fukuyo, 1981), *O. ovata* (Fukuyo, 1981), *O. heptagona* Norris, Bomber y Balech (Norris *et al.*, 1985), *O. mascarensis* Quod (Quod, 1994) *O. labens* Faust y Morton (Faust y Morton, 1995), *O. marina* Faust, *O. belizeana* Faust, *O. caribbeana* Faust (Faust, 1999), *O. rhodesae* Verma, Hoppenrath y Murray (Verma *et al.*, 2016) y *O. fattorussoi* Accoroni, Romagnoli y Totti (Accoroni *et al.*, 2016).

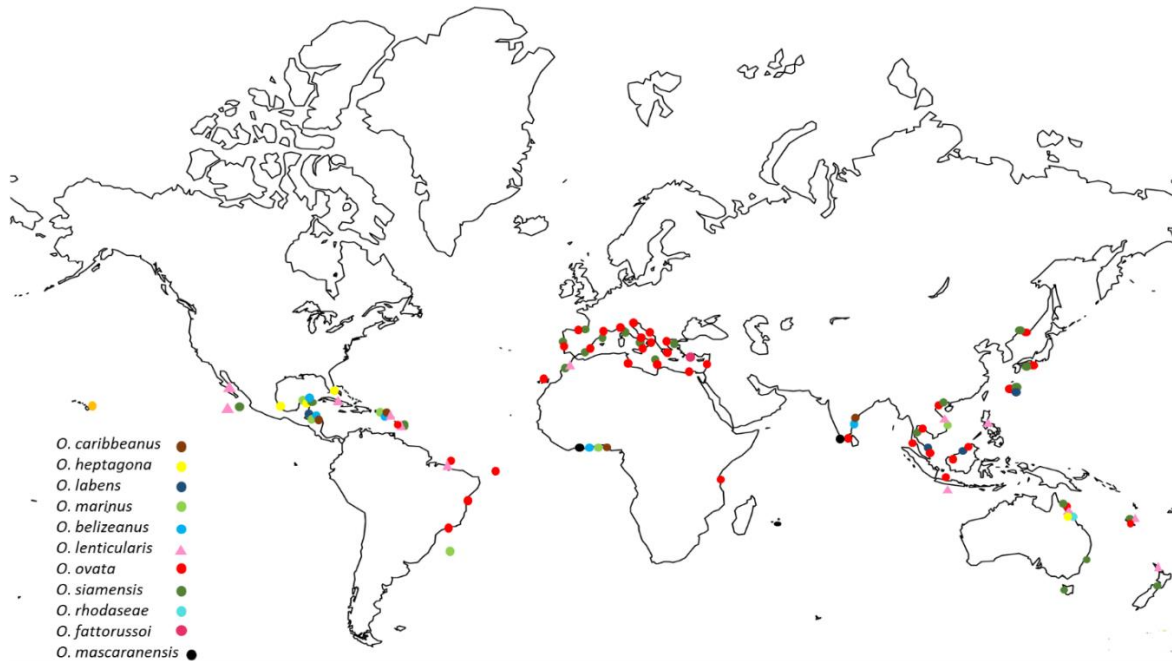


**Figura 1.** Esquemas de la interpretación de la tabulación de *Ostreopsis* según diferentes autores: Fukuyo (1981) epitaca (a), hipoteca (b); Besada (1982); epitaca (c), hipoteca (d); Faust (1995) epitaca (e), hipoteca (f). (Imagen tomada de Fukuyo, 1981).

## 2.2 Distribución global del género *Ostreopsis*

El género *Ostreopsis* fue descrito hace más de 100 años por Schmidt, sin embargo, el impacto que tiene este dinoflagelado en la biodiversidad acuática y los problemas en la salud humana han intensificado las investigaciones sobre este género (Shears y Ross, 2009), además de que su distribución se considera que crece notablemente (Rhodes, 2011).

Con base a los registros internacionales, actualmente las dos especies que abarcan mayor extensión geográfica son *O. ovata* y *O. siamensis* y son también las que han presentado un aumento de florecimientos en sitios como el Mar Mediterráneo (Ciminiello *et al.*, 2012) y Nueva Zelanda (Verma *et al.*, 2016) entre otros. Sin embargo, registros recientes indican que *O. lenticularis* también tiene una amplia distribución, encontrándose en el Caribe, Pacífico Tropical Oriental, Mar de China y la Polinesia Francesa (Ballantine *et al.*, 1988; Moreira *et al.*, 2012; Gárate-Lizárraga *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Chomérat *et al.*, 2019). En la figura 2 se observa la distribución mundial de las especies del género *Ostreopsis*, así mismo, en la tabla 1 se describen las abundancias y ocurrencias de cada una de las especies según la literatura especializada.



**Figura 2 .** Ocurrencia global de las especies del género *Ostreopsis* 1902-2018. Mapa construido con base a reportes publicados en revistas científicas.

### Distribución en México

En el Golfo de California se ha descrito la presencia de *O. ovata* en la Isla El Pardito (Sierra *et al.*, 2000; Nuñez-Vázquez, 2005) y *O. siamensis* en Cabo Pulmo (Nuñez-Vázquez *et al.*, 2013, 2018). En el norte del Pacífico mexicano, Cortés *et al.* (2005) identificaron a *O. siamensis* en la Isla volcánica Isabel en muestras de red, o sea, provenientes de la columna de agua. Recientemente, en la Isla Gaviota localizada en la Bahía de La Paz, Baja California Sur, Sepúlveda-Villarraga (2017) identificó mediante cultivos y análisis filogenético a la especie tóxica *O. cf. lenticularis*. Posteriormente, Gárate-Lizárraga *et al.* (2018) reportaron la presencia de esta misma especie en el Archipiélago de Revillagigedo, con base en las características morfológicas de los ejemplares colectados.

En el Golfo de México, específicamente en el Sistema Arrecifal Veracruzano, Okolodkov *et al.* (2007) identificaron la presencia de *O. heptagona* con una abundancia máxima de 400 cel. g<sup>-1</sup> aproximadamente.



Ghinaglia *et al.* (2004) reportaron la presencia de *O. ovata* en las costas de Campeche mientras que, en las costas de Yucatán, Okolodkov *et al.* (2014) observaron bajas abundancias de *O. heptagona* durante el periodo 2008-2009. En el Caribe Mexicano (Almazán-Becerril *et al.*, 2015, 2016) reportaron la existencia de *O. siamensis*, *O. belizeanus*, *O. heptagona* y *O. cf. marina*, siendo las dos últimas las más abundantes en algas pardas del género *Dictyota* (Irola-Sansores *et al.*, 2018).

**Tabla 1.** Distribución y abundancia del género *Ostreopsis* en el mundo.

Sitio	Especie	Abundancia	Macroalga	Referencia
Golfo de Siam, Tailandia	<i>O. siamensis</i>	-		Schmidt, 1902
Nueva Caledonia, Polinesia Francesa (Francia)	<i>O. lenticularis</i> <i>O. ovata</i> <i>O. siamensis</i>	-	<i>Turbinaria ornata</i> , <i>Jania</i> y <i>Amphiroa</i>	Fukuyo 1981
Islas Port de Gustavia, St. Barthelemy y Leeward (Mar Caribe)	<i>O. ovata</i>	-		Besada <i>et al.</i> , 1982
Cayos de Florida, Estados Unidos	<i>O. heptagona</i>			Norris <i>et al.</i> , 1985
Puerto Rico	<i>O. lenticularis</i>	15,000 cel g <sup>-1</sup>	<i>Dictyota</i> spp.	Ballantine <i>et al.</i> , 1988
Isla Reunión, Francia	<i>O. mascaranensis</i>	-		Quod, 1994
Islas de Oshigaki e Iriomote, Japón	<i>O. labens</i>	-	<i>Sargassum</i> sp., <i>Galaxaura</i> sp., <i>Padina</i> sp. y <i>Turbinaria</i> sp.	Faust 1995
Belice	<i>O. labens</i>	-		Faust, 1995
Okinawa, Japón	<i>O. siamensis</i>	-		Usami <i>et al.</i> , 1995
Belice	<i>O. heptagona</i> <i>O. lenticularis</i>	-	<i>Acantophora</i> sp., <i>Dictyota</i> sp. y <i>Halimeda</i> sp.	Morton <i>et al.</i> , 1997
Puerto Rico, Belice	<i>O. caribbeanus</i>	-	<i>Dictyota</i> sp.	Faust, 1999
Belice	<i>O. marinus</i> , <i>O. belizeanus</i>	-	<i>Dictyota</i> sp.	Faust, 1999
El Archipiélago de Mascareignes Francia y Mauricio	<i>O. belizeanus</i> , <i>O. marinus</i> <i>O. caribbeanus</i>	-	<i>Dictyota</i> sp.	Faust, 1999
Parengarenga Harbour, Rangiputa, Whatawhiwhi, Nueva Zelanda	<i>O. siamensis</i>	-	<i>Lessonia</i> sp. y <i>Sargassum sinclarii</i>	Rhodes <i>et al.</i> , 2000
Extremo norte de Nueva Zelanda	<i>O. siamensis</i> <i>O. lenticularis</i> <i>O. ovata</i>	-		Chang <i>et al.</i> , 2000

Port Dickson, Pulau Redang, y Kota Kinabalu, Malasia	<i>O. ovata</i> <i>O. lenticularis</i>	-	<i>Padina</i> sp., <i>Sargassum</i> sp., <i>Turbinaria</i> sp. y <i>Dictyota</i> sp.	Pin <i>et al.</i> , 2001
Toscana, Italia.	<i>O. ovata</i>	50,000 cel/L		Sansoni <i>et al.</i> , 2003
Isla de Madagascar, Madagascar	<i>O. mascaranensis</i>	-	<i>Turbinaria</i> , <i>Dictyota</i> e <i>Hypnea</i>	Lenoir <i>et al.</i> , 2004
Jaimanitas, noroeste de la Habana Cuba	<i>O. lenticularis</i>	1,000 cel g <sup>-1</sup>		Delgado <i>et al.</i> , 2006
Costas del Mar Egéo, Grecia	<i>O. ovata</i> <i>O. siamensis</i>	40,500 cel g <sup>-1</sup>	<i>Padina</i> sp.	Aligizaki <i>et al.</i> , 2006
Génova, Italia	<i>O. ovata</i>	1,800,000 cel/L		Ciminiello <i>et al.</i> 2006
Golfo de Trieste (Italia), Rovinj (Croacia), Mar Adriático	<i>O. cf. ovata</i>	-	<i>Padina pavonica</i> , <i>Laurencia obtusa</i> y <i>Amphiroa rubra</i>	Monti <i>et al.</i> , 2007
Hawái	<i>Ostreopsis</i> sp. <i>O. ovata</i>	4,322 cel g <sup>-1</sup> 1,057 cel g <sup>-1</sup>	<i>Pterocliadiella capillacea</i>	Parsons y Preskitt, 2007
Génova, Italia	<i>O. ovata</i>	2,541,000 cel g <sup>-1</sup>	<i>Padina</i> , <i>Dictyota</i> spp. y <i>Jania</i> spp.	Mangialajo <i>et al.</i> , 2008
Isla Magnetica, Australia	<i>O. siamensis</i> <i>O. lenticularis</i> <i>O. ovata</i> <i>O. heptagona</i>	12,408 cel g <sup>-1</sup>	<i>Turbinaria</i> y <i>Sargassum</i>	Heimann <i>et al.</i> , 2009
Reserva de Cape Rodney-Okakari Point, Nueva Zelanda	<i>O. siamensis</i>	140,600 cel g <sup>-1</sup>	<i>Carpophyllum plumosum</i>	Shears y Ross, 2009
Costas del Mediterráneo, Francia	<i>Ostreopsis</i> sp.	30,000 cel/L		Tichadou <i>et al.</i> , 2010
Costas de Ancona, norte del mar Adriático	<i>O. ovata</i>	1,700,000 cel g <sup>-1</sup>	<i>Hypnea muciformis</i>	Totti <i>et al.</i> , 2010
Bahía de Great, Japón	<i>O. siamensis</i> <i>O. ovata</i>	-		Selina y Levchenko, 2011
Bahía Cienfuegos, costa centro-sur Cuba y el mar Caribe	<i>Ostreopsis</i> sp.	79,000 <sup>4</sup> cel g <sup>-1</sup>	<i>Dictyota</i> sp.	Moreira <i>et al.</i> , 2012
Río de Janeiro, Brasil	<i>O. cf. ovata</i>	-	<i>Sargassum</i> sp.	Nascimento <i>et al.</i> , 2012
Costas de Alexandria, Egipto	<i>Ostreopsis</i> sp.	9,053 cel g <sup>-1</sup>	<i>Padina pavonica</i>	Ismael <i>et al.</i> , 2012
Bahía de Great, Japón	<i>O. siamensis</i> <i>O. ovata</i>	330,000 cel g <sup>-1</sup>	<i>Bryopsis</i> sp.	Selina <i>et al.</i> , 2014
Mar Mediterraneo	<i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i>	633,000 cel g <sup>-1</sup>		Casablanca <i>et al.</i> , 2014

Golfo de Tailandia	<i>O. cf. ovata</i>	-	<i>Padina</i> spp. y <i>Sargassum</i> spp.	Tawong <i>et al.</i> , 2014
Costas del Mediterráneo, Francia	<i>Ostreopsis</i> spp.	207,000 cel g <sup>-1</sup>	<i>Jania rubens</i>	Blanfuné <i>et al.</i> , 2015
Cyprus y Lebanon, Mar Mediterráneo	<i>O. fattorussoi</i>	-	<i>Halopteris scoparia</i> y <i>Corallina elongata</i>	Accoroni <i>et al.</i> , 2016
Sur de la Gran Barrera, Australia	<i>O. rhodasae</i>	-	<i>Padina</i> sp. y <i>Sargassum</i> sp.	Verma <i>et al.</i> , 2016
Lago Merimbula, Australia	<i>O. cf. siamensis</i>	-	<i>Padina</i> sp. y <i>Sargassum</i> sp.	Verma <i>et al.</i> , 2016
Mediterraneo	<i>O. ovata</i>	359,900 cel g <sup>-1</sup>	<i>Halopteris</i> sp.	Mangialajo <i>et al.</i> , 2017
Gosier, Rivière Sens, Mar Caribe	<i>Ostreopsis</i> spp.	2,079 cel g <sup>-1</sup>	<i>Halophila spiculacea</i>	Boisnoir <i>et al.</i> , 2018
Norte del Caribe Mexicano	<i>O. heptagona</i> <i>O. marina</i>	53, 231 cel g <sup>-1</sup> 46,462 cel g <sup>-1</sup>	<i>Dictyota</i> sp.	Irola-Sansores <i>et al.</i> , 2018
Reserva Marina de los Galápagos	<i>O. cf. lenticularis</i> <i>O. cf. ovata</i>	-		Carnicer <i>et al.</i> , 2019

**Nota:** Las abundancias están tomadas por gramo de macroalga. Debido a que las especies de macroalgas son diferentes, las abundancias no son comparables.

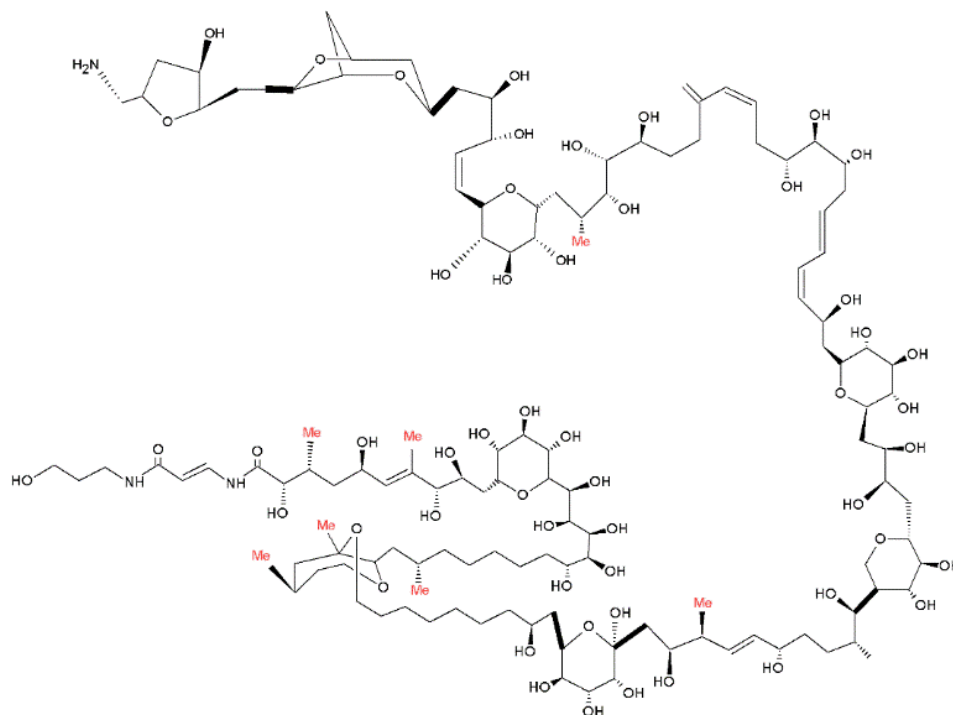
### 2.3 Estructura, propiedades físico-químicas de la Palytoxina y análogos

La palytoxina es una de las toxinas marinas no proteínicas más potentes (Uemura *et al.*, 1981). Las primeras investigaciones con la PLTX provienen de casos reportados de su presencia en contenidos estomacales (entre los que se determinó la presencia de restos de coral de *Palythoa tuberculosa*) de peces del género *Aluterina* en Okinawa y Saipan, Japón por lo que la toxina aislada se le describió originalmente como “aluterin” (Hashimoto *et al.*, 1969). Posteriormente esta toxina se encontró presente en el coral blando *Palythoa toxica* (de donde toma su nombre) en Hawái y fue descrita y caracterizada químicamente por primera vez por Moore y Scheuer (1971). Esta toxina es un sólido blanco, amorfo e higroscópico, no cristalizado, insoluble en cloroformo, éter y acetona, escasamente soluble en etanol y metanol, pero soluble en agua y piridina (Moore y Scheuer, 1971). Su estructura química fue elucidada por Uemura *et al.* (1981) y consiste de una molécula larga y compleja con regiones hidrofílicas y lipofílicas con cadenas largas de carbonos continuos (Fig. 3; Wang, 2008). Desde entonces se han identificado diferentes estructuras químicas de varios análogos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Propiedades químicas y biológicas de la palytoxina y análogos

<b>Especie</b>	<b>Toxina</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Peso molecular</b>
<i>P. toxica</i> , <i>P. tuberculosa</i> , <i>P. canarienses</i>	Palytoxina	C <sub>129</sub> H <sub>223</sub> O <sub>54</sub> N <sub>3</sub>	2680.14
<i>Palythoa</i> sp.	Homopalytoxina	C <sub>130</sub> H <sub>225</sub> O <sub>54</sub> N <sub>3</sub>	2659-2680
<i>Palythoa</i> sp.	Bishomopalytoxina	C <sub>131</sub> H <sub>227</sub> O <sub>54</sub> N <sub>3</sub>	2659-2680
<i>Palythoa</i> sp.	Neopalytoxina	C <sub>129</sub> H <sub>221</sub> O <sub>53</sub> N <sub>3</sub>	2659-2680
<i>P</i> cf. <i>toxica</i> , <i>P. heliodiscus</i>	Deoxypalytoxina	C <sub>129</sub> H <sub>223</sub> O <sub>53</sub> N <sub>3</sub>	2659-2680
<i>P</i> cf. <i>toxica</i> , <i>Trichodesmium</i> sp <i>P. canarienses</i>	42- Hydroxypalytoxina	C <sub>129</sub> H <sub>223</sub> O <sub>55</sub> N <sub>3</sub>	
<i>O. siamensis</i>	Ostreocin-A	C <sub>127</sub> H <sub>219</sub> N <sub>3</sub> O <sub>54</sub>	2649
<i>O. siamensis</i>	Ostreocin-B	C <sub>127</sub> H <sub>219</sub> N <sub>3</sub> O <sub>54</sub>	2649
<i>O. siamensis</i>	Ostreocin-D	C <sub>127</sub> H <sub>220</sub> O <sub>53</sub> N <sub>3</sub>	2636
<i>O. siamensis</i>	Ostreocin-E1	C <sub>127</sub> H <sub>217</sub> O <sub>53</sub> N <sub>3</sub>	2615
<i>O</i> cf. <i>ovata</i>	Isob-PLTX	C <sub>129</sub> H <sub>223</sub> O <sub>52</sub> N <sub>3</sub>	2678.47
<i>O. mascarenensis</i>	Mascarenotoxina		2500-2535
<i>O</i> cf. <i>ovata</i>	Ovatoxin-a	C <sub>129</sub> H <sub>223</sub> O <sub>52</sub> N <sub>3</sub>	2648.14
<i>O</i> cf. <i>ovata</i>	Ovatoxin-b	C <sub>131</sub> H <sub>227</sub> O <sub>53</sub> N <sub>3</sub>	2692.20
<i>O</i> cf. <i>ovata</i>	Ovatoxin-c	C <sub>131</sub> H <sub>227</sub> O <sub>54</sub> N <sub>3</sub>	2708.20
<i>O</i> cf. <i>ovata</i> , <i>O. fattorussoi</i>	Ovatoxin-d	C <sub>129</sub> H <sub>223</sub> O <sub>53</sub> N <sub>3</sub>	2664.14
<i>O</i> cf. <i>ovata</i> , <i>O. fattorussoi</i>	Ovatoxin-e	C <sub>129</sub> H <sub>223</sub> O <sub>53</sub> N <sub>3</sub>	2664.14
<i>O</i> cf. <i>ovata</i>	Ovatoxin-f	C <sub>131</sub> H <sub>227</sub> O <sub>52</sub> N <sub>3</sub>	2676.20
<i>O</i> cf. <i>ovata</i>	Ovatoxin-g	C <sub>129</sub> H <sub>223</sub> O <sub>51</sub> N <sub>3</sub>	2630.49
<i>O</i> cf. <i>ovata</i>	Ovatoxin-h	C <sub>129</sub> H <sub>225</sub> O <sub>51</sub> N <sub>3</sub>	
<i>Ostreopsis</i> sp, <i>O</i> cf. <i>ovata</i>	Ovatoxin-i	C <sub>131</sub> H <sub>225</sub> O <sub>53</sub> N <sub>3</sub>	2688
<i>Ostreopsis</i> sp, <i>O</i> cf. <i>ovata</i>	Ovatoxin-j	C <sub>131</sub> H <sub>225</sub> O <sub>54</sub> N <sub>3</sub>	2704
<i>Ostreopsis</i> sp, <i>O</i> cf. <i>ovata</i>	Ovatoxin-k	C <sub>131</sub> H <sub>225</sub> O <sub>55</sub> N <sub>3</sub>	2720

Peso molecular en Da



**Figura 3.** Estructura química de la palytoxina

#### 2.4 Toxicidad y perfil tóxico de especies de *Ostreopsis*.

Actualmente se sabe que seis de las 11 especies identificadas presentan PLTX ó algún análogo (Tabla 2). Norris *et al.* (1985) describieron por primera vez *O. heptagona* y determinaron una toxicidad de  $LD_{50} > 5 \times 10^6$  cel/kg mediante extractos inyectados intraperitonealmente en modelo en ratón. Después, Usami *et al.* (1995) reportaron por primera vez la presencia de análogos de PLTX a la que nombraron Ostreocina-D, en *O. siamensis*. La toxicidad  $LD_{50}$  de esta toxina fue de 0.75  $\mu$ g/kg en ratón por inyección intraperitoneal. Posteriormente, Ukena *et al.* (2001) elucidaron la estructura de Ostreocina-D y los componentes mayores de este análogo (2-hydroxy-3, 26-didemethyl-19, 44-dideoxypalytoxina). Recientemente se han descrito componentes menores Ostreocina-A, B y E1 (Terajima *et al.*, 2018). Otra especie tóxica es *O. mascaranensis*, ya que produce mascarenotoxinas-A y -B (McTx-A y -B) (Lenoir *et al.*, 2004). En ensayos murinos se observó que 20 min después de una inyección intraperitoneal se produjo la muerte de los ratones reportando un  $LD_{50}$  de 0.9 mg/kg, además de producir actividad hemolítica en el

ensayo con eritrocitos de ratón obteniendo como unidad hemolítica de PLTX  $8.00 \pm 0.01 \text{ ng mL}^{-1}$  (Lenoir *et al.*, 2004), sin embargo, hasta el momento no se tienen más registros de los efectos tóxico de esta especie.

En Puerto Rico, Ballantine *et al.* (1988) demostraron la toxicidad de *Ostreopsis lenticularis* a partir de extractos de muestras naturales conservadas en metanol. Los valores de toxicidad observados variaron de 0 a 182 UR cel<sup>-1</sup> ( $\times 10^6$ ) en donde se define la UR para palytoxina como la cantidad de toxina que mata a un ratón al cabo de 24 h desde su inyección i.p. Ashton *et al.* (2003) observaron que al incrementar la temperatura a  $\geq 29.5^\circ\text{C}$  a los cultivo de *O. lenticularis*, también se incrementaba su toxicidad hasta  $209 \pm 27$  UR.

En el Mar Mediterráneo *O. ovata* es una especie tóxica que produce florecimientos de forma recurrente constituyendo un problema de salud pública y ambiental, por lo que ha sido la especie más estudiada de este género (Ciminiello *et al.*, 2006; Deeds *et al.*, 2009; Shears *et al.*, 2009; Totti *et al.*, 2010). Se le atribuye la producción de una gran cantidad de ovotoxinas (OVTX-a-b-c-d-e-f-g-h-i-j-k-l) además de palytoxina-isobárica (Ciminiello *et al.*, 2006; Nascimento *et al.*, 2012; Brissard *et al.*, 2015; García-Altare *et al.*, 2015; Tartaglione *et al.*, 2016, 2017). La mayoría de los autores coinciden que el componente dominante (52%-56%) es OVTX-a y el resto varía entre los demás análogos. Sin embargo, estos perfiles de toxinas, así como el contenido de toxina por célula pueden cambiar dependiendo de las condiciones ambientales (Guerrini *et al.*, 2010).

Los bioensayos de toxicidad realizados en invertebrados (crustáceos y erizos) y vertebrados (peces juveniles) con extractos de *O. ovata* han demostrado ser tóxicos (Pezzolesi *et al.*, 2012; Ferrari *et al.*, 2013). Por ejemplo, Faimali *et al.* (2011) determinaron que *Artemia salina* es sensible a diferentes concentraciones de la toxina con valores de  $\text{LD}_{50} \leq 4 \text{ cel mL}^{-1}$ , mientras que en organismos juveniles de *Dicentrarchus labrax* la  $\text{LC}_{50}$  fue de  $540.71 \text{ cel mL}^{-1}$  después de 96 h. Pagliara *et al.* (2012) confirmaron estos resultados, utilizando nauplios de *A. salina* expuestos a extractos de *O. ovata* estimando una  $\text{LC}_{50}$  de  $0.03 \text{ mg mL}^{-1}$  después de 24 h de exposición. También reportaron que en embriones del erizo marino *Paracentrotus*

*lividus* el cigoto no se desarrollaba o la división celular era anómala en una concentración de 42 cel de *Ostreopsis* mL<sup>-1</sup>.

Las últimas especies descritas también han demostrado toxicidad. Accoroni *et al.* (2016) determinaron la presencia de concentraciones de OVTX-a-d-e  $\leq 15$  fg cel<sup>-1</sup> mediante LC-HRMS (Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a la Espectrometría de Masas) en la recientemente descrita *O. fattorussoi*.

Asimismo, Verma *et al.* (2016) demostraron la toxicidad de *O. rhodesae* a partir de ensayos en líneas celulares de branquias de pez. Estos experimentos mostraron una mortalidad del 98.5% de células al ser expuestas con esta especie. No obstante, no se detectó la presencia de PLTX y análogos mediante LC-MS/MS (Cromatografía de Líquidos con Espectrómetro de Masas).

En *O. marina*, *O. caribbeanus*, *O. labens* y *O. belizeanus* aún no hay trabajos que demuestren su toxicidad de estas especies.

## 2.5 Casos de intoxicación en humanos por palytoxinas

Existen varios vectores mediante los cuales una persona puede presentar una intoxicación por palytoxina o del síndrome conocido como “palytoxicosis” (Deed y Schwartz, 2010). Esta intoxicación sucede por el consumo de peces, cangrejos y algunos invertebrados marinos que han acumulado las toxinas mediante la cadena trófica (Yasumo *et al.*, 1978, 1986; Taniyama *et al.*, 2003).

La segunda vía de intoxicación es a través de la exposición a los aerosoles producidos por brisas marinas (Durando *et al.*, 2007; Scardala, 2011). En condiciones favorables, *O. ovata* puede proliferar en regiones costeras del Mar Mediterráneo y crear tapetes flotantes donde se acumulan masivamente las células. Estas masas quedan expuestas cerca de la superficie y debido a la lisis celular las toxinas son suspendidas en aerosoles marinos o pueden quedarse en el ambiente (Tichadou *et al.*, 2010).

Finalmente, existen casos de intoxicación vía tópica a través de la piel, oftálmica y respiratoria debido al manejo de pólipos del género *Palythoa* sp. como elementos de ornato en acuarios (Tartaglione *et al.*, 2016).

Actualmente no existe una regulación en cuanto a la forma de detectar la palytoxina en México, sin embargo, el Panel sobre Contaminantes en la Cadena Alimentaria (CONTAM) perteneciente a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó un estudio en el que analizaron las técnicas para la detección de palytoxina y análogos mencionando las ventajas y deficiencias de cada una. Sus recomendaciones señalan que una persona de 60 kg debe evitar una dosis oral de referencia aguda (ARfD) en una porción de 400 gr de carne de algún marisco, y proponen que ésta no debe de contener más de 12 µg en la suma de PLTX y *Ostreocin-D*; esto corresponde a 30 µg/kg en carne de mariscos (EFSA, 2009). En las costas del Mar Mediterráneo, en donde los casos por intoxicación con aerosoles han sido recurrentes, se han llevado a cabo monitoreos ambientales para detectar la presencia de *Ostreopsis* mediante una sistema de vigilancia de casos sospechosos por exposición de agua de mar o inhalación en coordinación con sectores de salud pública, científicos y médicos; además del uso de técnicas como el qPCR para cuantificar e identificar a *Ostreopsis* en muestras ambientales (Tichadou *et al.*, 2010; Casabianca *et al.*, 2014).

Los principales signos y síntomas por intoxicación con PLTX y análogos se presentan en la tabla 3. Los síntomas neurológicos más frecuentes son mareos, parestesia, ataxia, entumecimiento y convulsiones; en tracto respiratorio se presenta disnea, rinorrea, tos y dolor de garganta. Los síntomas gastrointestinales consisten en la sensación de sabor metálico, náuseas/vómitos y diarrea. En el sistema muscular se presentan mialgias, debilidad, espasmos, aumento en los niveles de creatinina fosfoquinasa y mioglobinuria; finalmente en el sistema cardiovascular se observan taquicardia y cianosis (Tartaglione *et al.*, 2016).



**Tabla 3.** Casos de intoxicación en humanos por palytoxina.

<b>Casos</b>	<b>Vector</b>	<b>Síntomas</b>	<b>Lugar</b>	<b>Método de detección</b>	<b>Referencia</b>
164 personas	<i>Mytilus edulis</i> y <i>Patinopecten yessoensis</i>	Diarrea, náuseas, vomito y dolor abdominal	Sanriku, 1976	Bioensayo en ratón (5-8.5 UR/g)	Yasumoto, <i>et al.</i> , 1978
Dos personas	<i>Lophozozymus pictor</i> y <i>Demania alcalai</i>			Cromatografía en capa fina Bioensayo en ratón Espectrofotómetro	Yasumoto <i>et al.</i> , 1986
Hombre de 49 años	<i>Demania reynaudii</i>	Náuseas, sabor metálico, diarrea vómito, bradicardia, cianosis, problemas respiratorios	Filipinas 1984	Bioensayo en ratón (800 UR/g) HPLC con detección UV	Alcala <i>et al.</i> , 1988
Dos personas	<i>Scarus ovifrons</i>	Disnea, mialgia, convulsiones, mioglobinuria, altos nivel de suero de CPK, AST y LDH	Japón 1986	Bioensayo en ratón (0.6-0.8 UR/g) Cromatografía Ensayo de hemólisis	Noguchi <i>et al.</i> , 1987
Una mujer	<i>Herklotsichtys quadrimaculatus</i>	Sabor metálico, vómito incontrolable, diarrea y malestar general	Madagascar 1994	Cromatografía Ensayo de hemólisis Espectrometría de masas Bioensayo en ratón (50 UR/g)	Onuma <i>et al.</i> , 1999
Once personas entre 27-57 años	Peces serránidos <i>Ephinephelus</i> sp.	Se presentaron dentro de las 3-36 horas orina negra dolor muscular	Japón 2000	Ensayo de hemólisis Bioensayo en ratón (0.5 UR/g)	Taniyama <i>et al.</i> , 2002
20 personas	<i>Scarus ovifrons</i>	Dolor muscular, rabdomiólisis, mioglobinuria, altos niveles de CPK	Japón 1953-1999	Extracción de la toxina de <i>Ostreopsis</i> y de pez loro (Bioensayo en ratón, prueba hemolítica)	Taniyama <i>et al.</i> , 2003
Una persona	<i>Demania</i> sp.	Diarrea, náuseas, vómito, hipersalivación, convulsiones,	Filipinas 1969	No reportada	Alcala y Halstead, 1970

		detención respiratoria			
Dos personas	<i>Lophozozymus picor</i>	Dolor abdominal, vómito, diarrea, cianosis, disnea	Filipinas 1975	No reportado	Gonzales y Alcalá, 1977
Una persona	<i>Lophozozymus picor</i>	Dolor, abdominal, diarrea, vómito, disnea y cianosis	No reportado	No reportado	Tan y Lee, 1988
52 personas	<i>Scarus ovifrons</i>	Mialgia severa, postración, parálisis, disnea, cianosis, mioglobinuria, niveles altos de CPK, AST, ALT, LDH, $\gamma$ -GT	Japón 1953-1983	No reportado	Fusetani <i>et al.</i> , 1985
Dos personas	<i>Scarus ovifrons</i>	Mioglobinuria, altos nivel en CPK y AST cambio en ECG	Japón 1988	No reportado	Tabata <i>et al.</i> , 1989
Hombre de 55 años	<i>Ypsiscarus ovifrons</i>	Debilidad, mialgia, mioglobinuria, niveles altos de CPK, AST, ALT, LDH, proteína c-reactiva, aldolasa, mioglobina	Japón 1996	Diagnóstico y características clínicas	Okano., <i>et al.</i> , 1998
Dos personas	<i>Scarus ovifrons</i>	Mialgia, disnea, anemia hemolítica, rabdomiólisis, niveles altos de CPK, AST, ALT, LDH	Japón 1999	No reportado	Yoshimire <i>et al.</i> , 2001
Dos personas	<i>Scarus ovifrons</i>	Niveles altos de CPK, AST, ALT, LDH	Japón 1986	No reportado	Ichida <i>et al.</i> , 1988
Una persona	<i>Decapterus macrosoma</i>	Debilidad, dolor abdominal, náuseas, diarrea, parestesia, espamos musculares, altos niveles en la sangre de CPK, AST, LDH, mioglobinuria.	Hawái 1986	Bioensayo en ratón HPLC y radio inmunoensayos	Kodama <i>et al.</i> , 1989
55 personas	<i>Tetraodon sp.</i>	Nauseas, vómito, dificultad respiratoria, mialgia, mioglobinuria, en 2 de los 55 incrementaron los niveles de CPK	Bangladesh 1988-1996	No reportado	Mahmud <i>et al.</i> , 2000
209 casos	<i>O. ovata</i>	Fiebre, dolor de garganta, disnea, náusea, diarrea,	Italia 2005	Bioensayo en ratón LC-MS	Durando <i>et al.</i> , 2007

		lacrimación, vómito, dermatitis, tos.			
19 casos	Inhalación <i>O. ovata</i>	Leucocitosis leve, tos, dolor de garganta, lacrimación, vómito	Italia 2006	Palytoxina putativa LC-MS	Durando <i>et al.</i> , 2007
100 casos	Inhalación <i>O. ovata</i>	Conjuntivitis, irritación en las vías respiratorias superiores	Italia 1998, 2000 y 2001	No reportada	Sansoni <i>et al.</i> , 2003
	inhalación <i>O. ovata</i>	Conjuntivitis, dermatitis, rinofaringitis,	Italia sur del mar Adriático	No reportada	Di Turi <i>et al.</i> , 2003
28 casos	Inhalación <i>O. ovata</i>	Rinofaringitis, dermatitis, conjuntivitis	Italia 2004	No reportada	Gallitelli <i>et al.</i> , 2005
200 casos	Inhalación <i>Ostreopsis</i> sp.	Rinorrea, irritación en la garganta, irritación en la garganta, dolor de cabeza	España 2006	No reportada	Kermarec <i>et al.</i> , 2008
57 casos	Inhalación <i>Ostreopsis</i> sp.	Estornudos, hipersecreción mucosa, rinorrea, dolor de cabeza, irritación en los ojos, fiebre, mialgia, disnea	España 2006	No reportada	Barroso-García <i>et al.</i> , 2008
4 casos	Inhalación-dérmico <i>O. ovata</i>	Labios y lengua irritados, dolor de cabeza, irritación en la garganta, fiebre, diarrea	Francia 2006	No reportada	Tichadou <i>et al.</i> , 2010
21 casos	Inhalación-dérmico <i>O. ovata</i>	Irritación en la piel, irritación mucosa (ojos, nariz y garganta)	Francia (Isla Frioul) 2008	No reportada	Tichadou <i>et al.</i> , 2010
4 casos	Inhalación-dérmico <i>O. ovata</i>	Irritación en la piel, irritación mucosa (ojos, nariz y garganta)	Francia 2008	No reportada	Tichadou <i>et al.</i> , 2010
11 casos	Inhalación-dérmico <i>O. ovata</i>	Irritación en la piel, irritación mucosa (ojos, nariz y garganta)	Francia 2009	No reportada	Tichadou <i>et al.</i> , 2010
7 casos	Inhalación-dérmico <i>O. ovata</i>	Irritación en la piel, irritación mucosa (ojos, nariz y garganta)	Mónaco 2008	No reportada	Tichadou <i>et al.</i> , 2010

Mujer de 25 años,	Manipulación de coral	Parestesia peribucal, disgeusia, intoxicación dermatológica	San Diego 2011	Diagnóstico y características clínicas	Nordt <i>et al.</i> , 2011
20 personas	Inhalación-dérmico <i>O. ovata</i>	Irritación en el tracto respiratorio, fiebre, rinorrea y disnea	Génova 2005	Identificación de <i>Ostreopsis</i> en la columna de agua	Scardala <i>et al.</i> , 2011
4 personas	Consumo de <i>Hemiodus quadrimaculatus</i>	Mialgia, artralgia, hipercalemia, hiperfosfatemia hipercolesterolemia	Taiwán, 2013	Bioensayo en ratón, LC-HR/MS, Actividad hemolítica	Ming-Ling <i>et al.</i> , 2014
Hombre, esposa e hija,	Inhalación-dérmico coral	Fiebre, estornudos, mialgia, taquicardia regular	Nueva York, 2015	Diagnóstico y características clínicas	Hall <i>et al.</i> , 2015
Hombre de 61 años	Inhalación <i>Palythoa</i>	Picazón en la garganta, mialgia, fiebre, niveles altos de CPK, infiltrados bilaterales (rayos X)	Danville 2016	Diagnóstico y características clínicas	Thakur y Jha, 2017
4 adultos entre 22 y 41 años	Consumo de cangrejo	Mialgia, rabdomiólisis	Hong Kong, 2016	Diagnóstico y química sanguínea	Wen-Xuan <i>et al.</i> , 2017
Hombre de 42 años	Toxicidad corneal <i>Palythoa</i> sp.	Dolor, fotofobia, visión borrosa, agudeza visual mejor corregida	España, 2018	Diagnóstico y características clínicas	Barbany <i>et al.</i> , 2018
Hombre de 30 años	Inhalación de <i>Palythoa</i> sp.	Disnea, fiebre, faringitis, mialgia, dolor de cabeza y taquicardia.	Estados Unidos	Diagnóstico y características clínicas	Wood <i>et al.</i> , 2018

CPK= Creatinina fosfoquinasa; AST= Aspartato aminotransferasa; LDH= Lactato deshidrogenasa;  $\alpha$ -GT=,  $\alpha$ - glutamil transpeptidasa; MU= Unidades Murinas

## 2.6 Mecanismos de acción de la palytoxina

Como ya se ha mencionado, dependiendo de la vía de administración la PLTX puede desencadenar una amplia gama de efectos tóxicos. Vicky y Whiles (1975), observaron que administrando PLTX por vía intravenosa o muscular era extremadamente tóxica en comparación con la vía intrarrectal ya que no observaron efectos tóxicos. Concluyeron que la PLTX actúa sobre el músculo liso de las paredes de los vasos sanguíneos causando una vasoconstricción por lo que se le considera un vaso-constrictor muy potente que disminuye el flujo del oxígeno al corazón.

Weidmann (1977) determinó que el tiempo de exposición y la concentración de la toxina puede tener una recuperación reversible o irreversible pues ésta entra en la membrana celular actuando de modo intracelular, por lo que el mecanismo de acción de la PLTX se ha relacionado con la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, provocando la inhibición del transporte activo del  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . Mientras que el aumento de  $\text{Ca}^+$  en el citosol interfiere con las funciones de la célula (Ramos *et al.*, 2010).

La muerte celular se registró en células aisladas y expuestas a PLTX, dando como resultado la ruptura de la membrana celular y la liberación de su contenido lo que representa un efecto tóxico (Belloci *et al.*, 2011).

## 3. JUSTIFICACIÓN

En el Caribe Mexicano se han reportado altas abundancias de dinoflagelados del género *Ostreopsis*, principalmente sobre macroalgas del género *Dictyota* que se presenta en la zona con altas coberturas. Actualmente hay registros de cuatro especies del género *Ostreopsis* en el sitio, dos de ellas con antecedentes en otros lugares de producir análogos de PLTX. Por lo tanto, es importante identificar inequívocamente a las especies del género *Ostreopsis*, presentes en el Caribe Mexicano, así como su toxicidad.

#### 4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuáles son las especies de *Ostreopsis* presentes en la zona Norte de Quintana Roo?
- ¿Son tóxicas estas especies de *Ostreopsis*?

#### 5. HIPÓTESIS

1. En el norte del Caribe Mexicano se ha registrado la presencia de cuatro especies del género *Ostreopsis*. Sin embargo, debido a la gran semejanza entre especies, es posible que haya especies no registradas o alguna nueva especie.
2. De las once especies registradas del género, seis han demostrado producir PTLX y/o análogos por lo que es posible que entre las especies de *Ostreopsis* de la zona haya alguna que presente toxicidad.

#### 6. OBJETIVO GENERAL

Identificar las especies de *Ostreopsis* presentes en la porción Norte del Caribe Mexicano y su toxicidad.

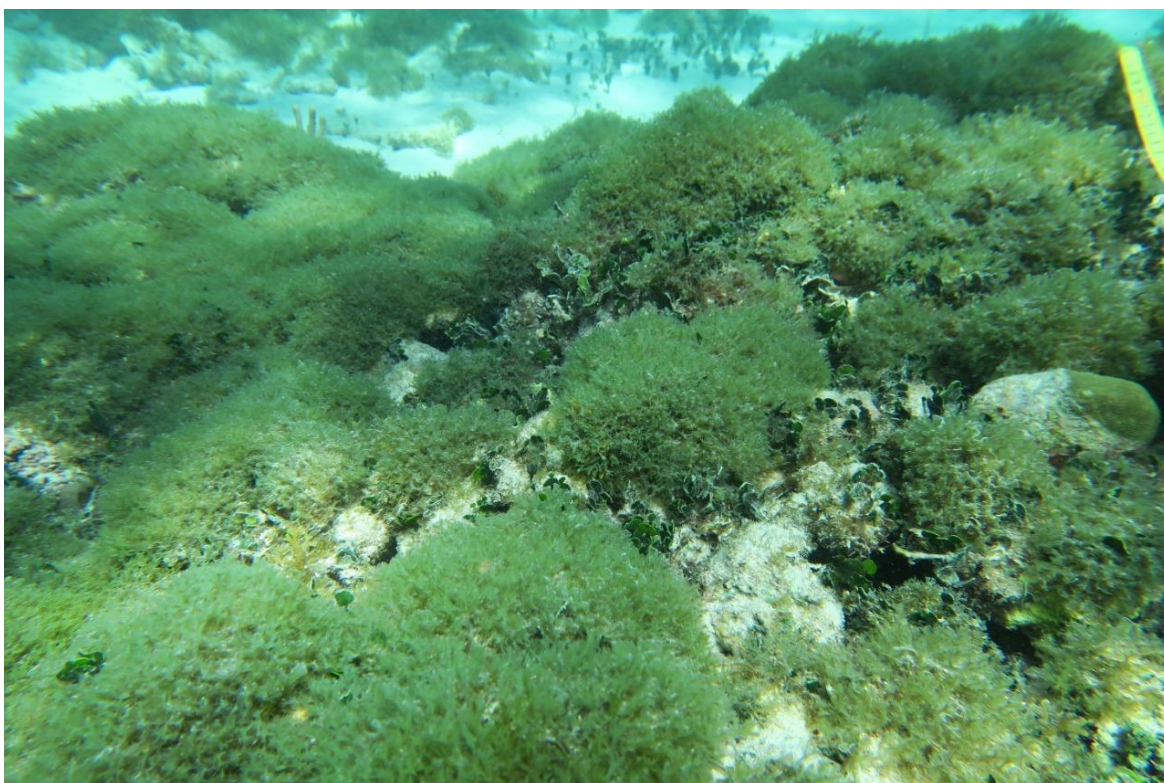
##### *5.1 Objetivos particulares*

1. Identificar las especies de *Ostreopsis* presentes en la costa norte de Quintana Roo mediante características morfométricas y métodos moleculares.
2. Evaluar la toxicidad en las células aisladas, mediante ensayos en modelo en ratón y *Artemia*.

## 7. ÁREA DE ESTUDIO

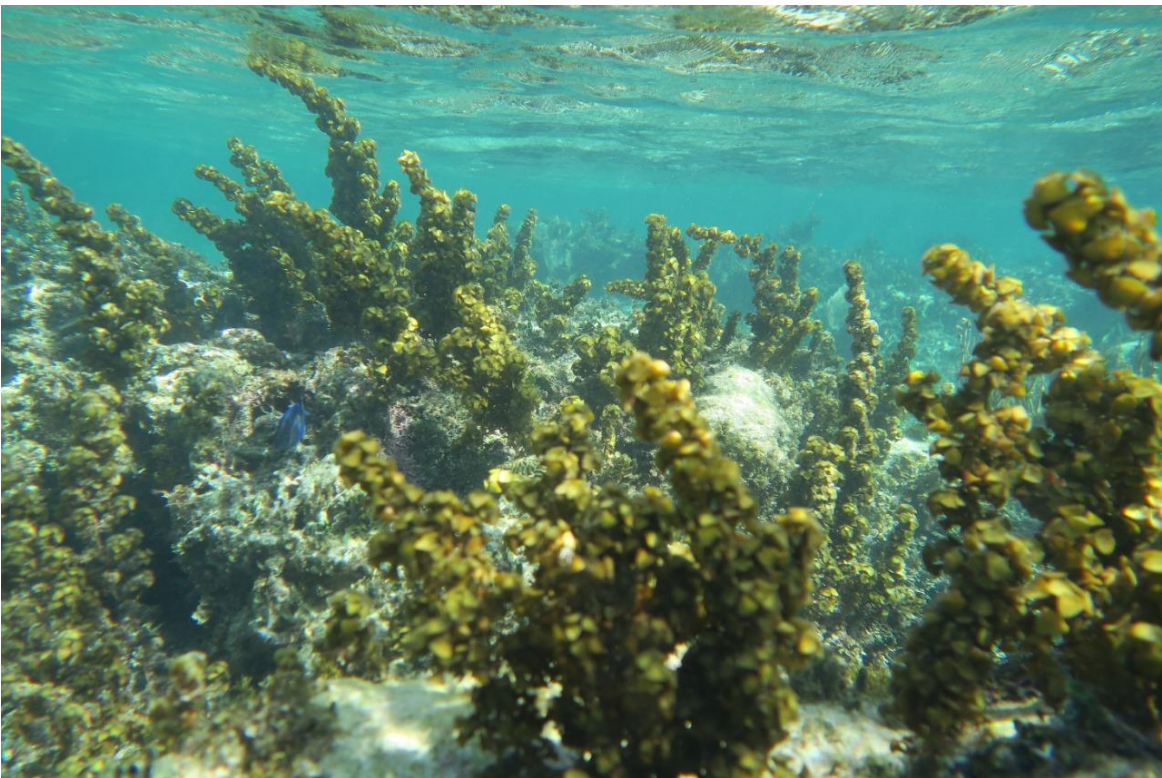
### 7.1 Sitios de muestreo.

Para la realización de esta investigación se seleccionaron dos zonas ubicadas en el norte del Caribe Mexicano: El arrecife Ixlaché, pertenecientes al Parque Nacional Isla Contoy, y los sitios La Bonanza y Cuevones localizados dentro del Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. El arrecife Ixlaché se encuentra al sur de Isla Contoy, en el estado de Quintana Roo a 30 km al norte de Isla Mujeres y a una distancia de 12.8 km de la costa noreste de la Península de Yucatán. Este sitio (Fig. 6) pertenece al conjunto de islas, bancos y arrecifes de la plataforma continental del Caribe Mexicano. Las coordenadas geográficas del área de estudio son: 21°27'40'' y 21°32'10'' latitud norte y 86°46'40'' y 86°47'50'' longitud oeste (SEMARNAP, 1997). El arrecife de Ixlaché experimenta de manera más intensa que el resto del litoral el efecto de los frentes fríos provenientes del norte, de corrientes litorales producidas por el efecto de la surgencia de Cabo Catoche, así como, oleaje, mareas y vientos del sureste (Salazar-Vallejo, *et al.*, 1993, Reséndiz-Colorado, 2019).



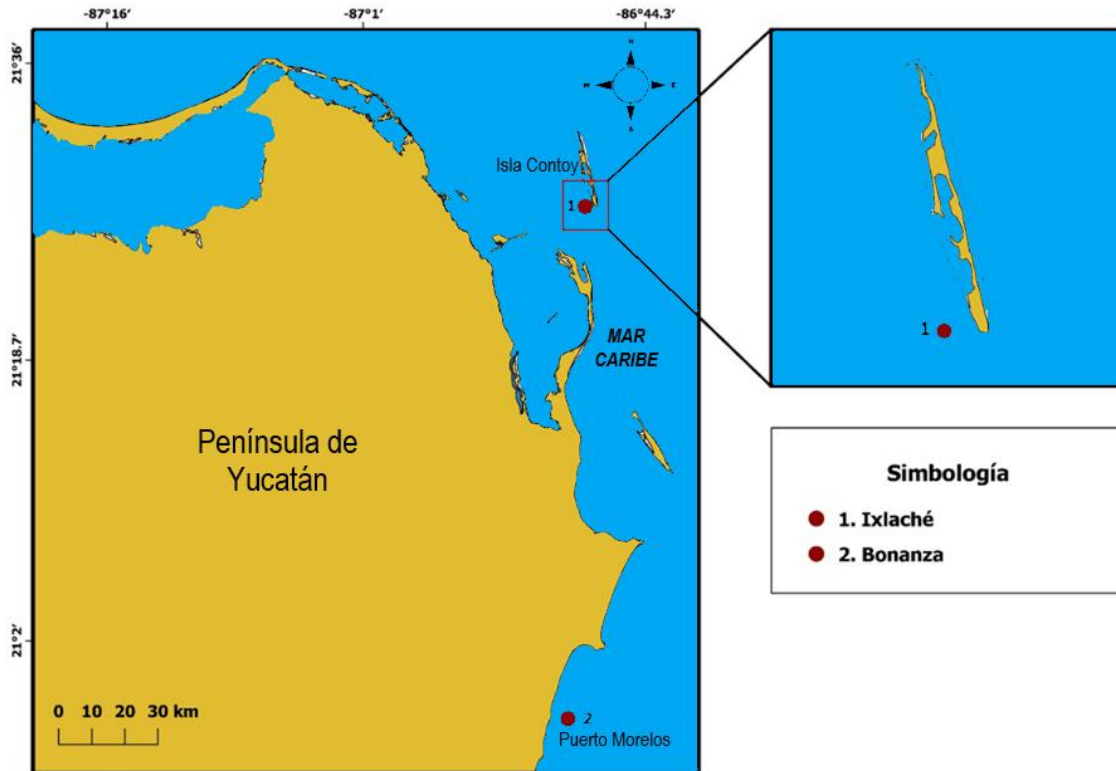
**Figura 4.** Altas coberturas de macroalgas en el arrecife de Ixlaché en la zona de Isla Contoy sobre las cuales se han reportado elevadas abundancias de *Ostreopsis*.

La región denominada Arrecife de Puerto Morelos (Fig. 6) forma parte de la barrera arrecifal denominada Gran Cinturón de Arrecifes del Atlántico Occidental considerada la segunda barrera más grande del mundo. Se ubica en la Costa del Caribe del municipio de Benito Juárez, frente al poblado de Puerto Morelos. Sus coordenadas geográficas son: 21°00' 00" y 20°48' 33" latitud norte y 86°52'30.6" longitud oeste (SEMARNAP, 2000). Dentro de los arrecifes de Puerto Morelos se encuentran los sitios La Bonanza, Jardines y la Bocana que tienen altas coberturas algales (Delgado-Pech, 2016); además de que en estudios anteriores se tienen registros de la presencia del género *Ostreopsis* (Almazán-Becerril *et al.*, 2015 y 2016; Irola-Sansores *et al.*, 2018).



**Figura 5.** Coberturas de macroalgas en La Bonanza en el Sistema Arrecifal de Puerto Morelos.





**Figura 6.** Ubicación de los sitios de muestreo en la zona de Puerto Morelos e Isla Contoy en el estado de Quintana Roo.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Trabajo de Campo

Se realizaron tres colectas en Puerto Morelos en mayo de 2018 en el sitio La Bonanza, y en el arrecife Ixlaché donde se colectaron muestras en noviembre de 2017 y de abril a junio de 2018.

La obtención de las muestras se realizó utilizando equipo de buceo autónomo SCUBA para áreas profundas y equipo de buceo libre “snorkel” para aguas someras (profundidad entre 0.5 y 1.5m). Aunque la colecta fue dirigida a *Dictyota* también se colectaron otras algas pardas y rojas de manera aleatoria que fueron colocadas en botes de plástico de 500 mL o en bolsas tipo “Ziploc”<sup>®</sup> con agua de mar, depositadas a su vez en una hielera con agua del sitio para mantenerlas resguardadas de la luz

y a temperatura ambiente para su posterior análisis en el Laboratorio de Ecología Costera de la Unidad de Ciencias del Agua del CICY.

### 8.2 Cuantificación de la abundancia de *Ostreopsis*

Se cuantificaron y examinaron 57 muestras de macroalgas del género *Dictyota* mediante el uso de la cámara de Sedgewick-Rafter. Para ello, las muestras fueron tratadas para desprender a los dinoflagelados de la superficie de la macroalga. El agua de estos lavados se juntó y se registró el volumen de agua de mar de cada una de las muestras con una Probeta graduada KIMAX de 500 mL y se concentró una parte (volumen definido 10-100 mL) fijándolas en formol al 4%.

Cada una de las muestras de macroalgas (Peso Húmedo de Macroalga) se pesó en una balanza digital AND EK-600i.

Para estimar la abundancia de dinoflagelados del género *Ostreopsis*, se realizaron los siguientes cálculos:

$$D = N \times \left( \frac{1000}{Cc} \right) \times \left( \frac{Vm}{Pm} \right)$$

Dónde:

$D$ = Densidad celular en (cél  $g^{-1}$ )

$N$ = Número de células contadas de una especie determinada

$Cc$ = Número de cuadros contados

$Vm$ = Volumen de la muestra original (mL)

$Pm$ = Peso húmedo de la macroalga (g)

### 8.3 Análisis morfológico de las especies del género *Ostreopsis*

Cada muestra colectada fue observada para determinar la composición de las comunidades epifito-bentónicas e identificar la presencia de dinoflagelados del género *Ostreopsis*. Para ello se tomaron muestras de las superficies de las macroalgas con una pipeta y se colocaron en un portaobjetos para observarlos bajo un Microscopio Invertido Modelo Axiovert 40 CFL. Una vez comprobada la presencia

de los dinoflagelados, estos fueron desprendidos de las algas mediante agitación. A continuación, se colectaron de 10 a 100 ml de muestra en frascos de plástico y se fijaron con formol al 4% para su posterior identificación taxonómica. Para la identificación de las especies de *Ostreopsis* se realizaron dos técnicas de observación microscópica para evaluar las características generales y particulares de cada especie.

- a) Microscopia de luz: Con una pipeta de plástico se tomó una alícuota de cada muestra previamente homogenizada y se colocó sobre un portaobjetos. Posteriormente se colocó un cubreobjetos y se procedió a su observación en un Microscopio Axiomager A2 de Carl Zeiss en contraste de fases a magnificaciones de 20x y 40x. Se obtuvieron imágenes de los especímenes seleccionados con la cámara AxioCam ICc 1 a los cuales se les tomaron medidas con el Software AxioVs 40 V 4.8.2.0. (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania).
- b) Microscopía de epifluorecencia: Para el análisis del patrón tabular de las placas de la hipoteca y epiteca, los especímenes fueron teñidos con una solución de calcoflúor M2R (SIGMA-ALDRICH) diluido 1:100 con agua Milli-Q estéril. Las células se examinaron con la técnica de epifluorescencia usando el filtro dicroico. Los montajes se realizaron tomando una alícuota de muestra sobre un portaobjetos y se le adicionaron de 10 a 20 g·mL<sup>-1</sup> de calcoflúor previamente diluido, posteriormente se colocó un cubreobjetos y se observó en el Microscopio Axiomager A2 de Carl Zeiss con lámpara UV con objetivos 20x y 40x a las que se les tomaron fotografías con la cámara AxioCam ICc 1 y se tomaron medidas con el Software AxioVs 40 V 4.8.2.0. (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania).

#### Caracteres morfológicos para la determinación del género *Ostreopsis*

Los dinoflagelados del género *Ostreopsis* fueron identificados de acuerdo a la forma de la célula, la posición de los flagelos, el diámetro dorso-ventral, transdiámetro, tamaños de poro, número y disposición de las placas que integran las tecas (Fig. 7 y 8). Todas las especies de este género presentan la misma fórmula  $Po, 4', 6'', 6C,$

7S, 5''', 2'''' (Fensome *et al.*, 1993; Hoppenrath, 2016). Para la identificación de las placas se utilizó la nomenclatura propuesta por Besada *et al.* (1982) que consiste en:

- Complejo del poro apical (CPA): Localizado paralelamente a la izquierda lateral al margen de la dorsal de la célula.
- Placas Apicales (x'): Están en contacto con las placas precingulares. Su numeración sigue una dirección contraria a las manecillas del reloj, las placas se abrevian: 2', 3' y 4'
- Placas Precingulares (x''): Rodean el *cingulum* y su secuencia va contraria a las manecillas del reloj se abrevian: 1'', 2'', 3'' (en adelante).
- Placas Postcingulares (x'''): Rodean al *cingulum* desde la hipoteca y se enumeran en sentido del reloj se abrevian: 1''', 2''', 3''' (en adelante).
- Placas Antapicales (x''''): Se encuentran en la parte central de la hipoteca y se abrevian: 1'''' y 2''''
- Las placas del *cingulum* (c): Las placas del *cingulum* son seis, son estrechas y se van en dirección de las manecillas del reloj cuando se observan en vista antapical y se abrevian C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> (en adelante)
- La interpretación de las placas del sulcus es:
  - Sa: Placa sulcal anterior
  - Ssa: Placa sulcal izquierda-anterior
  - Sda: Placa sulcal derecha-anterior
  - Sdp: Placa sulcal derecha-posterior
  - Sp: Placa sulcal posterior
  - Ssp: Placa sulcal izquierda-posterior
  - S.ac.a: Accesorio de la placa sulcal posterior
  - Vo: Entrada ventral

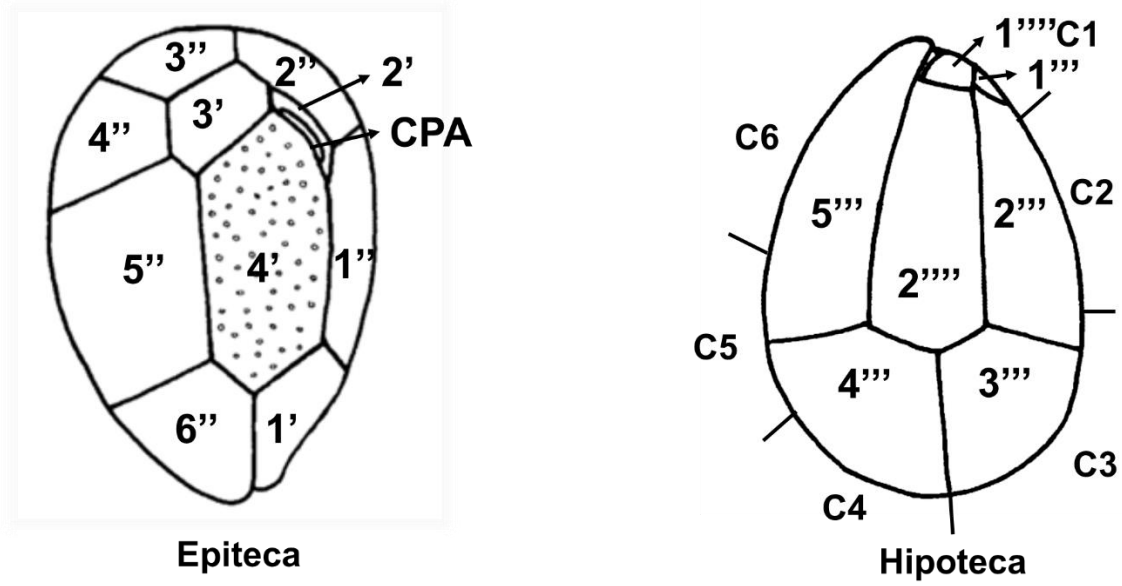


Figura 7. Patrón tabular de las tecas del género *Ostreopsis*. (Tomado de Fukuyo, 1981).

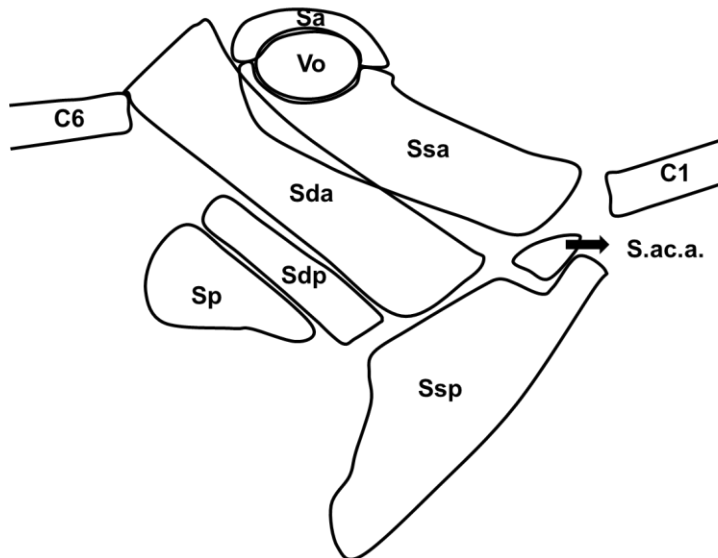


Figura 8. Interpretación de las placas del sulcus del género *Ostreopsis*. (Tomado de Accoroni *et al.*, 2016).

## 8.4 *Análisis filogenético de las especies de Ostreopsis*

### 8.4.1 *Extracción de ADN*

Para llevar a cabo la extracción de ADN, se aislaron células vivas de muestras de Puerto Morelos e Isla Contoy utilizando el método de capilaridad. Este método consiste en coleccionar las células desde un portaobjetos con un capilar de punta reducida utilizando un microscopio invertido Modelo Axiovert 40 CFL. Las células coleccionadas se transfirieron a cajas Petri con agua MilliQ, y posteriormente a tubos eppendorf en los que fueron congeladas a  $-15^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit DNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit de QIAGENT siguiendo el protocolo del fabricante con algunas modificaciones. Se tomaron 1000  $\mu\text{L}$  de muestra en un tubo eppendorf de 2 mL, 400  $\mu\text{L}$  de buffer API y 4  $\mu\text{L}$  de RNasa. La mezcla se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, invirtiendo el tubo 2-3 veces durante este periodo. Posteriormente se agregaron 130  $\mu\text{L}$  de buffer 3P. La mezcla se homogenizó e incubó en hielo por 5 minutos. El material lisado se transfirió a una columna QiAshredder spin column y se centrifugó a 14,000 rpm por 2 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces. Una vez concluido este paso, se transfirieron 900  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a un tubo nuevo sin perturbar el pellet con 1 mL del Buffer AW1. De esta mezcla, 650  $\mu\text{L}$  fueron colocados en una columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de colecta de 2 mL y se centrifugó por 1 minuto a 8,000 rpm. El filtrado se desechó. Este paso se repitió con el resto de la muestra. En el último paso se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de Buffer AE para aumentar la concentración del ADN centrifugando 1 minuto a 8000 rpm y desechando el filtrado. Este paso se repitió para tener un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ .

Para la cuantificación del ADN se midió la absorbancia en 1  $\mu\text{L}$  de cada una de las extracciones en un NanoDrop<sup>™</sup> 2000 de Thermo Fisher Scientific, utilizando como blanco 1.5  $\mu\text{L}$  del buffer en el que se disolvió la muestra (Buffer AE).

#### 8.4.2 Amplificación de Reacción en Cadena de Polimerasa

Para el análisis filogenético de las especies de *Ostreopsis* se amplificó un segmento de la región de los espaciadores internos (ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub>) y los dominios D1/D2 del ADN ribosomal (rDNA) de la subunidad grande (LSU). Los marcadores utilizados fueron el ITS-A *forward* (CCAAGCTTCTAGATCGTAACAAGGTHTCCTAGGT) e ITS-B *reverse* (CCTGCAGTCGACAKATGCTTAARTTCAGCRG), el producto obtenido fue de ~360 pb (Adachi *et al.*, 1994). Para la región del LSU se utilizó el 28S zoox-D1/D2 *forward* (CCTCAGTAATGGCGAATGAACA) y el 28S zoox-D1/D2 *reverse* (CCTCAGTAATGGCGAATGAACA) el producto final fue de ~600 pb (Loi, 1998).

Para obtener una concentración mayor de ADN se realizó una mezcla de 20 µL para PCR, agregando 4 µL de buffer, 0.8 µL de cada uno de los primers, 0.125 µL de My Taq™ DNA Polymerase de BIOLINE, ADN a una concentración de 10 ng y lo restante con H<sub>2</sub>O Sigma para cada reacción.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (Thermal Cycler T100™ de BIO-RAD®) con un ciclo térmico para el ITS que consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 30s a 94°C, 1 minuto a 54°C, 90s a 72°C, con 5 minutos a 72°C para la extensión final. La amplificación del 28S-zoox D1/D2 consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos seguido de 30-35 ciclos a 94°C, 1 minuto a 54°C y 105 segundos a 72°C con 5 minutos a 72°C para la extensión final (Efimova *et al.*, 2014).

Para determinar la concentración del ADN se utilizó el Thermo Scientific™ NANODROP 2000 Spectrophotometer de AccesoLab®, utilizando como blanco agua Milli-Q® de Sigma-Aldrich 1.5 µL y posteriormente 1 µL de cada una de las muestras extraídas.

Una vez que se obtuvieron las concentraciones de la muestra de ADN se tomaron 3 µL de muestra que se mezclaron con 1 µL GelRed® de Biotium para tinción. Esta mezcla se cargó en un gel de agarosa al 1% durante 40 minutos a 100 volts en una cámara de electroforesis. Una vez concluida la electroforesis el gel fue visualizado bajo luz UV en un ChemicDoc™ de BIO-RAD®. El marcador de peso molecular

utilizado fue HyperLadder™ de 1kb de Bioline, mezclando 1 µL del marcador y 2 µL de agua Milli-Q® Sigma-Aldrich, para visualizar el tamaño de las muestras obtenidas.

#### 8.4.3 *Análisis de las secuencias y reconstrucción fitogenética*

Los productos obtenidos por PCR de los espaciadores internos (ITS) y los dominios D1/D2 de la subunidad grande (LSU) del ADN ribosomal (rDNA), fueron enviados para secuenciación a la empresa Macrogen Inc. (Corea). Una vez obtenidas las secuencias éstas fueron introducidas en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information usando la herramienta blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) donde se confirmó que éstas pertenecían al género *Ostreopsis* sp.

Con la finalidad de conocer la relación de similitud entre las distintas secuencias de *Ostreopsis* provenientes de las zonas estudiadas con las secuencias obtenidas (regiones ITS y LSU), se realizó el alineamiento de secuencias en el programa MEGA 7. Posteriormente se generó un método para la construcción del árbol filogenético a partir de un modelo evolutivo acorde al marcador utilizado, y finalmente se realizó la comprobación de la fiabilidad del árbol realizado.

### 8.5 *Análisis de toxicidad*

#### 8.5.1 *Obtención de extractos*

Las células de *Ostreopsis* de las muestras de macroalgas, fueron tamizadas para separarlas de fragmentos más gruesos de otros materiales (macroalgas, zooplancton, rocas, restos de coral, etc.) con un tamiz de 200 µm. El volumen total de cada muestra se midió con probetas graduadas de vidrio Pyrex™ de 500 mL. Las macroalgas fueron pesadas en una balanza digital para determinar la cantidad aproximada de células por cada extracto obtenido. Las células de *Ostreopsis* fueron aisladas con el uso de capilares con punta reducida mediante el uso de un Microscopio Invertido Modelo Axiovert 40 CFL. Se colectó la mayor cantidad de células posibles y se transfirieron a tubos cónicos para centrifuga tipo Falcon™ de



15 mL, para posteriormente centrifugar por 15 min a 3000 rpm, eliminando el sobrenadante (agua de mar) sin perturbar la pastilla formada.

Haciendo uso de guantes de nitrilo dentro de una campana de extracción de gases se colocó una base de papel aluminio, plástico y papel absorbente por posibles derrames, teniendo siempre hipoclorito de sodio al 5% para desnaturalizar cualquier derrame de toxinas. Se resuspendió la pastilla y se le agregó metanol absoluto en una concentración 2:1 y posteriormente se filtró cada uno de los extractos a través de filtros de fibra de vidrio GF/F, WHATMAN®, estos fueron almacenados en frascos de vidrio ámbar con tapón de rosca de 5 mL, sellados con papel Parafilm y congelados a -15°C hasta su posterior análisis.

#### *8.5.2 Preparación de la muestra para bioensayos*

Cada uno de los extractos metanolicos se descongelaron, transfirieron a frascos vial tipo serológicos de vidrio, transparentes y evaporaron en una campana de extracción de gases a una temperatura constante de 40°C en un baño maría y fueron resuspendidos en 2 mL de solución salina inyectable (0.9 NaCl) con Tween 60 al 1%, la cual cuál se encontraba estéril y libre de pirógenos. Todos los extractos fueron cerrados, sellados y homogeneizados en un vortex en 3 pulsos de 30 c/u y depositados en refrigeración para su inmediata evaluación en el modelo en ratón y artemia.

#### *8.5.3 Toxicidad evaluada mediante el ensayo agudo en modelo en ratón (Mus musculus)*

Para la evaluación de la toxicidad mediante el modelo en ratón, se utilizaron ratones albinos machos de un peso entre 18-22 g cepa ICR (CD1) obtenidos de Harlan México<sup>MR</sup> y mantenidos para su uso en condiciones controladas a 22 °C de temperatura, humedad del 60% y alimentados con alimento balanceado (Teklad<sup>MR</sup>) estéril y agua acidulada al libitum en el Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), en La Paz, B. C. S. siguiendo las especificaciones de la NOM-062-200-1999, para la

producción y uso de animales de laboratorio, así como los protocolos de eutanasia (Feldman y Seelly, 1988; Hendrich *et al.*, 2004).

El análisis toxicológico consistió en la realización de un ensayo agudo (24 h) mediante la aplicación intraperitoneal (i.p.) de 0.5 mL del extracto en dos grupos de ratones solo con el vehículo (Sol. Salina con 1% de Tween 60) así como un protocolo positivo a los que se les inyectó un estándar con perfil de extracto del dinoflagelado *Prorocentrum lima* PRL-1 con toxinas diarreicas (ácido okadaico+dinofisitoxina-1) obtenido y proporcionado por (Lab. de Toxinas Marinas y Aminoácidos del CIBNOR). De obtener muestras positivas, que provocaran la mortalidad en los animales evaluados la concentración se obtendría en unidades ratón (entendiéndose como una Unida Ratón (1 UR) a la concentración suficiente de toxina(s) para causar la muerte en 24 h de un ratón de un peso de 20g). Una Unidad Ratón de PLTX es igual a 8 ng. Las unidades ratón se calculan con base al tiempo de muerte en horas. La relación entre la dosis y el tiempo de muerte fue calculada y descrita con base a una solución patrón de PLTX por Lewis *et al.* (1995) para cuantificar la toxicidad de cada extracto.

Cálculo de la toxicidad de PLTX y análogos en el ensayo en ratón.

Para la mezcla de PLTX y análogos de dinoflagelados esta relación según Lewis *et al.* (1995) se aproxima a la siguiente ecuación:

$$\log(UR) = 2.3 \log(1 + T - 1)$$

Donde:

UR= número de unidades ratón de PLTX inyectada

T= tiempo de muerte en horas

Después de la inyección los ratones se mantuvieron bajo observación para documentar los signos clínicos presentados tanto en los extractos problema para evaluar, así como los que se utilizaron como control.

Los signos clínicos por PLTX vía i.p. en este modelo consisten en hipotermia, parálisis de las extremidades posteriores, diarrea, arqueamiento corporal, disnea y

en casos concentrados, convulsiones y muerte por paro respiratorio (Fukui *et al.*, 1987; Lewis 1995) (Riobó y Franco, 2011). Riobó (2008) y Riobó *et al.* (2011) refinaron este bioensayo y describieron que en los primeros minutos en caso de que extractos con concentraciones subletales, dentro de los primeros 15 minutos después de la inyección, los ratones muestran un estiramiento característico de las extremidades posteriores, en la región lumbar se producen espasmos que la harán mostrarse cóncava debido a las contracciones musculares asociados a la columna vertebral. Si la supervivencia de los ratones es menor a una hora, estos mostrarán movimientos súbitos, estiramiento de las partes posteriores y de la parte inferior de la espalda, habrá debilitamiento de los miembros anteriores, ataxia, disminución de la locomoción, convulsiones, dificultad para respirar y finalmente la muerte.

#### 8.5.4 Ensayo toxicológico en modelo de *Artemia salina* (ARTOX)

Además del ensayo toxicológico en modelo en ratón también se trabajó un ensayo toxicológico agudo (24 h) en el modelo de *Artemia salina* en etapa adulta (ARTOX). Dichos organismos fueron suministrados de un cultivo realizado en el CIBNOR a partir de quistes comerciales de artemia (INVE Premium, Lote # 20150336342 E.U.). Los organismos se mantuvieron en un fotoperiodo de 16/8 h (luz:oscuridad) con aireación constante, temperatura de 23°C y alimentados hasta su uso con levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y microalgas (*Isochrysis* spp y *Chaetoceros* spp). En el análisis se seleccionaron 10 ejemplares adultos para cada tratamiento, de ambos sexos, de un tamaño homogéneo (10 mm aproximadamente de longitud), con motilidad, coloración, y nado normal activo y vigoroso. Como medio acuoso, se utilizó agua de mar filtrada (filtros de celulosa Millipore de 0.22 µm) y esterilizada por medio de una autoclave.

Cada tratamiento consistió en la presencia de 10 organismos por unidad, en viales de vidrio transparente con un volumen total de 10 mL (incluyendo 0.5 ml de cada extracto a evaluar). Se llevo acabo además un control negativo que contenía solo solución salina con 1% de Tween 60 y uno más de agua de mar filtrada y estéril.

El ensayo agudo duro 24 h, tiempo en el que se realizaron observaciones, videograbaciones y el registro del comportamiento (signos clínicos) de los organismos. Se llevó un registro de la mortalidad presentada a las 3, 6, 12 y 24 h. Se consideraron organismos muertos aquellos que se encontraron inmóviles (sin ninguna motilidad y sin movimiento branquial); los cuales se observaron en el fondo de los frascos y/o flotando en la parte superficial de los mismos. Al término de las 24 h los ejemplares de artemia evaluados tanto con muestras problema como controles fueron observados por Microscopía de Luz (objetivo 4 y 10x) y se tomaron fotografías de los mismos para documentar cambios en los tejidos presentados.

## 9. RESULTADOS

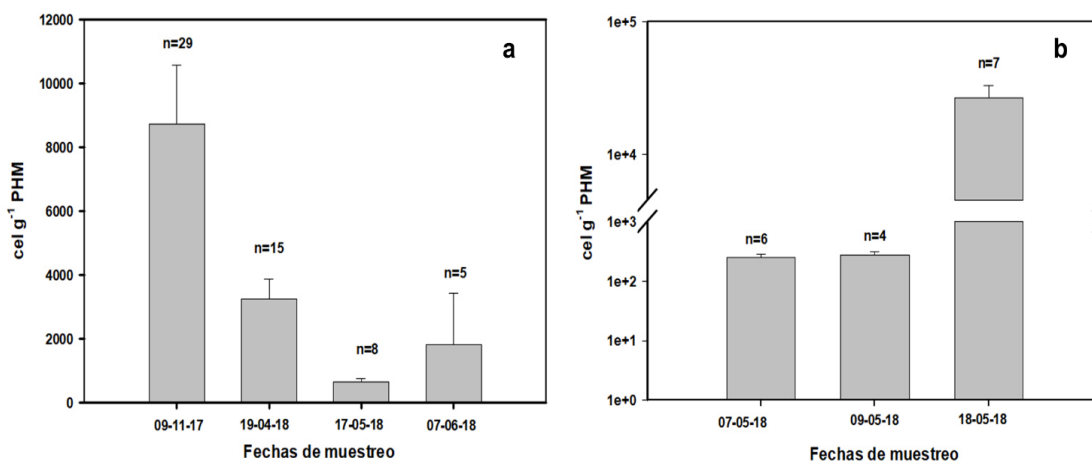
### 9.1 *Abundancias de Ostreopsis spp. sobre Dictyota.*

Se procesaron 57 muestras de macroalgas del género *Dictyota* colectadas en un periodo de cuatro meses en el arrecife de Ixlaché. La abundancia máxima se presentó en el mes de noviembre de 2017 con 34,907 cél g<sup>-1</sup> PHM (Peso Húmedo de Macroalga). En este mismo mes también se detectó la menor abundancia del periodo estudiado con 12 cél g<sup>-1</sup> PHM. En los meses de abril, mayo y junio de 2018 las máximas abundancias fueron 10,992 cél g<sup>-1</sup> PHM, 1,068 cél g<sup>-1</sup> PHM y 8,292 cél g<sup>-1</sup> PHM respectivamente (Tabla 4). De acuerdo a la figura 9, en los meses de noviembre y junio hubo mayor heterogeneidad en las abundancias, aunque el número de muestras fue diferente en ambos meses. Por el contrario, en mayo se registró la menor abundancia ( $p < 0.01$ , prueba de K-W). La salinidad y temperatura no fueron homogéneos (Tabla 4). La profundidad osciló entre los -1.2 y -1.5 m, además fue notorio el descenso de temperatura y salinidad entre los muestreos, lo que probablemente pueda reflejar los procesos meteorológicos y oceanográficos de la zona.

**Tabla 4.** Abundancias (cel g<sup>-1</sup> PHM) del género *Ostreopsis* en el alga *Dictyota* sp. en la zona norte del Caribe Mexicano.

Fecha	Sitio de muestreo	Abundancia ( $\bar{x} \pm SE_{\bar{x}}$ )	Máximo (cel g <sup>-1</sup> PHM)	Mínimo (cel g <sup>-1</sup> PHM)	n	T (°C)	S
9/11/17	Ixlaché	8730 ± 1840.1	34,907	12	29	28	37
19/04/18	Ixlaché	3251 ± 625.3	10,992	1,195	15	25.5	25
17/05/18	Ixlaché	641 ± 108.8	1,068	276	8	28.5	14
7/06/18	Ojo de Agua	248.5 ± 38.45	431	157	6	27.9	36
9/05/18	Cuevones	274.6 ± 37.43	385	225	4	24.3	30
18/5/18	La Bonanza	26948.2 ± 6173.2	45,842	4,880	7	30	32
07/06/18	Ixlaché	1812 ± 1620.4	8,292	97	5		

$\bar{x}$ = Media;  $SE_{\bar{x}}$ = Error Estándar; PHM= Peso Húmedo de Macroalga; n=Número de muestras; T=Temperatura; S=salinidad



**Figura 9.** Variaciones en las abundancias del género *Ostreopsis* en la macroalga *Dictyota* sp. en dos sitios del Caribe Mexicana. (a) Sitio de Ixlaché en los diferentes meses de muestreo. (b) Sitio de La Bonanza en el mes de mayo.

En el Sistema arrecifal de Puerto Morelos se realizaron tres muestreos en el mes de mayo en el arrecife La Bonanza, en un Ojo de agua y en Cuevones. La profundidad fue diferente en cada sitio, así como la salinidad y temperatura (Tabla 4).

El sitio con mayores abundancias fue La Bonanza con un máximo de 45,842 cél g<sup>-1</sup> PHM en un conglomerado de macroalgas de los géneros *Dictyota* y *Amphiroa* y la menor abundancia reportada fue de 157 cel g<sup>-1</sup> PHM para el sitio de Cuevones en

un conglomerado de macroalgas de los géneros *Dictyota* y *Briopsis* (Figura 9). En los sitios de Ojo de agua y Cuevones las abundancias no fueron tan heterogéneas en comparación con La Bonanza. La Bonanza fue uno de los sitios más someros presentando coberturas de algas mayores al 75%, en el Ojo de agua la profundidad no fue mayor a 6 metros y presentó mayor turbulencia en la columna de agua. El sitio Cuevones fue el más profundo entre 6.5-8 metros, ubicado cerca del frente arrecifal.

## 9.2 Análisis morfológico y morfométrico

Con base en la información morfológica y morfométrica obtenida mediante las técnicas de microscopía de luz (ML) y epifluorescencia (MEFL), se identificaron tres especies del género *Ostreopsis* (*O. lenticularis*, *O. heptagona* y *O. cf. siamensis*) en las muestras ambientales del Norte del Caribe Mexicano.

### ***Ostreopsis heptagona*** Norris, Bomber *et* Balech 1985

**Etimología:** el epíteto *heptagona* se refiere a los siete lados de la cuarta placa apical.

Las células de *O. heptagona* son ovaladas a oblongas y comprimidas antero-posteriormente, presentan un patrón de poros bien definido. La fórmula de las placas es CPA, 4', 6'', C (?), S (?), Vo, 5''', 2'''' (Fig. 10 y 11).

En la epiteca la longitud dorsoventral mide de 91.21-100.56  $\mu\text{m}$  y el transdiámetro de 57.01 a 69.32  $\mu\text{m}$ .

La primera placa apical (1') consta de cuatro lados irregulares es pequeña, y alargada, la rodean las placas 4', 1'', 6''. La segunda apical (2') es pequeña y elongada, se encuentra desplazada en la parte superior izquierda en contacto con la 4' y mide un poco menos de la mitad del lado en contacto con la 3'; dentro de esta placa se encuentra el CPA este es largo (18.77 a 21.73  $\mu\text{m}$ ) y estrecho en forma de hendidura. La tercera apical (3') es pentagonal se encuentra en la parte superior izquierda de la 4' y está en contacto con la 2', 2'', 3'' y 4'' (Fig. 10 A y B). La cuarta apical (4') es una placa diagnóstica, ocupa la mayor parte de la superficie de la

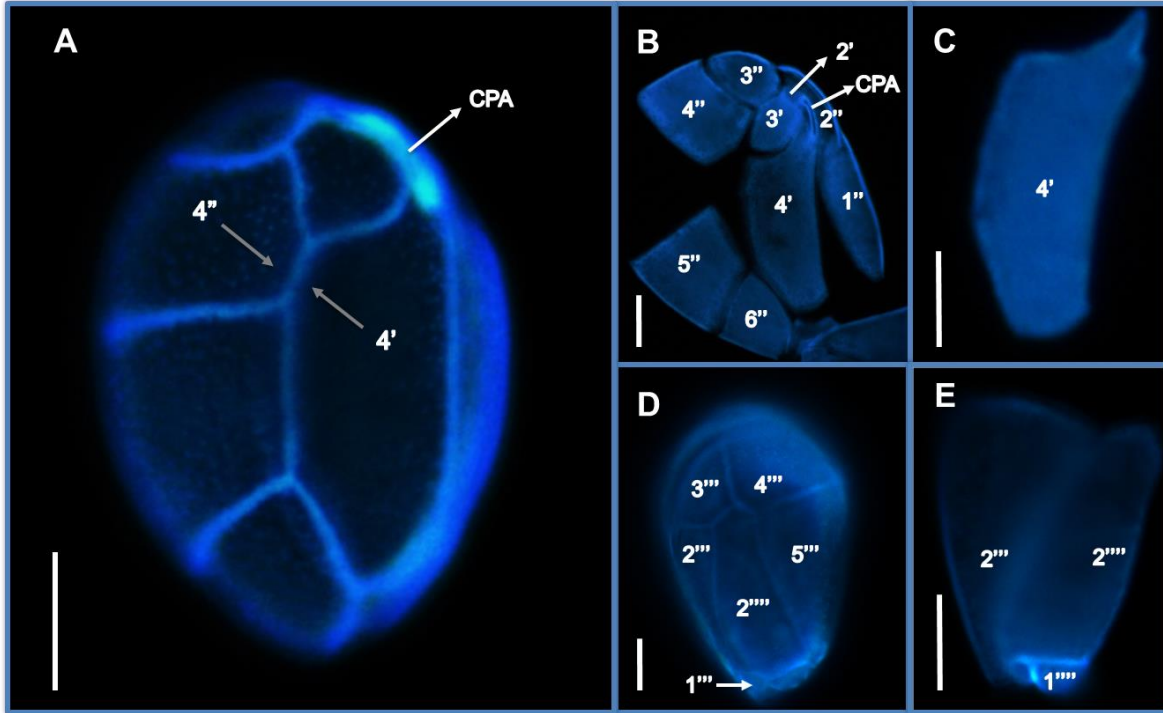
epiteca con un largo de 61.7 a 72.75  $\mu\text{m}$  y ancho de 26.22 a 31.7  $\mu\text{m}$ , su forma es alargada, irregular y heptagonal, se encuentra en contacto con la 4'' (Fig. 10-C).

Las 6 placas precingulares son asimétricas y de diferente tamaño: La primera precingular (1'') consta de 4 lados irregulares, estrecha y alargada ubicada en margen izquierdo de la epiteca, adyacente a las placas 1', 2', 4' y 2''. La segunda precingular (2'') es pequeña e irregular cercana al CPA. La tercera precingular (3'') es cuadrangular situada en la parte superior de la célula entre la 3', 2'' y 4''. La cuarta precingular (4'') es ancha de forma pentagonal y siempre está en contacto con la 4', siendo este uno de los rasgos distintivos de esta especie (Fig. 10 y 11). La quinta (5'') y sexta (6'') precingulares son placas cuadrangulares y alargadas, ambas en contacto con la 4' pero siendo más amplia la primera (Fig. 10-B).

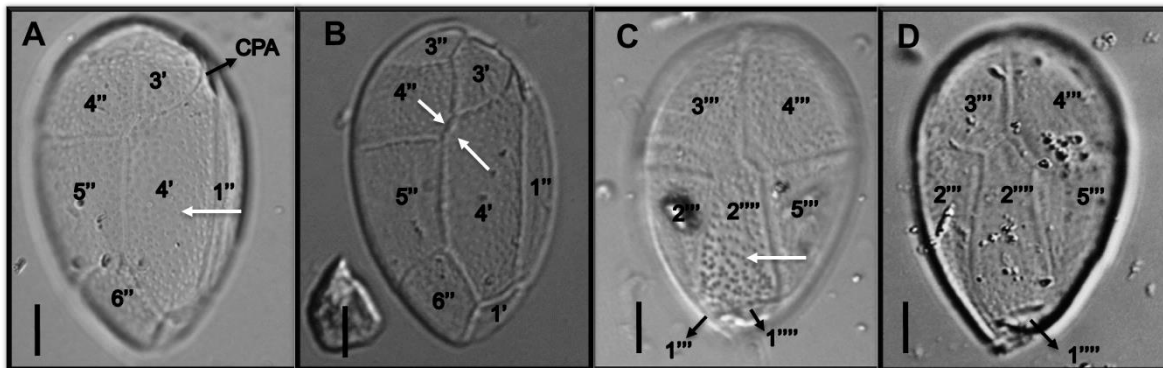
La hipoteca es un poco más reducida que la epiteca con un diámetro dorsoventral de 88.25 a 95.09  $\mu\text{m}$  y de 56.06 a 66.82  $\mu\text{m}$  de transdiámetro.

La primera placa postcingular (1''') es pequeña y triangular se encuentra entre la 1''', 2'''' y la 2''' (Figura 10-E). Las placas postcingulares 2''' y 5''' son triangulares y largas, ubicadas cerca del Vo. Las placas postcingulares 3''' y 4''' son cuadrangulares y casi del mismo tamaño, éstas abarcan la mayor parte de la hipoteca. La primera placa antapical (1''''') es pequeña y ancha en contacto con la región sulcal y las placas 2''''', 1''' (Fig. 11).

La segunda placa antapical (2''''') es considerada una placa diagnóstica ubicada en el centro de la hipoteca su forma es asimétrica pentagonal, alargada y en terminación "v" puede medir entre 54.73-44.47  $\mu\text{m}$  de largo y de 20.3-26.8 de ancho.



**Figura 10.** Imágenes en microscopía de epifluorescencia de *O. heptagona*. (A) Célula ovalada y oblonga. Las flechas grises muestran el contacto entre las placas 4' y 4'' de epiteca. (B) Patrón tabular de la epiteca. (C) Forma heptagonal de la 4'. (D-E) Patrón tabular de la hipoteca con diferente enfoque. Escala= 20  $\mu$ m.



**Figura 11.** Imágenes de microscopía de luz de *O. heptagona*. (A) Patrón tabular de la epiteca. La flecha de color blanco señala la presencia de poros. (B) Patrón tabular en donde se observa la sutura que une a las placas. Las flechas blancas señalan el contacto entre la 4' y 4''. (C-D) Tabulación de la hipoteca en diferentes enfoques. La flecha blanca señala la presencia de poros. Escala= 20  $\mu$ m.



***Ostreopsis lenticularis*** Fukuyo, 1981

**Etimología:** El epíteto *lenticularis*, se refiere a la forma lenticular del cuerpo de la célula, orientada ventralmente y comprimida antero-posteriormente.

Las células de *O. lenticularis* están comprimidas antero-posteriormente, en general es ovalada a semicircular. La epiteca y la hipoteca son similares en tamaño. La superficie de las tecas se encuentra cubierta uniformemente por dos tipos de tamaño diferente de poro (Fig. 12 y 13).

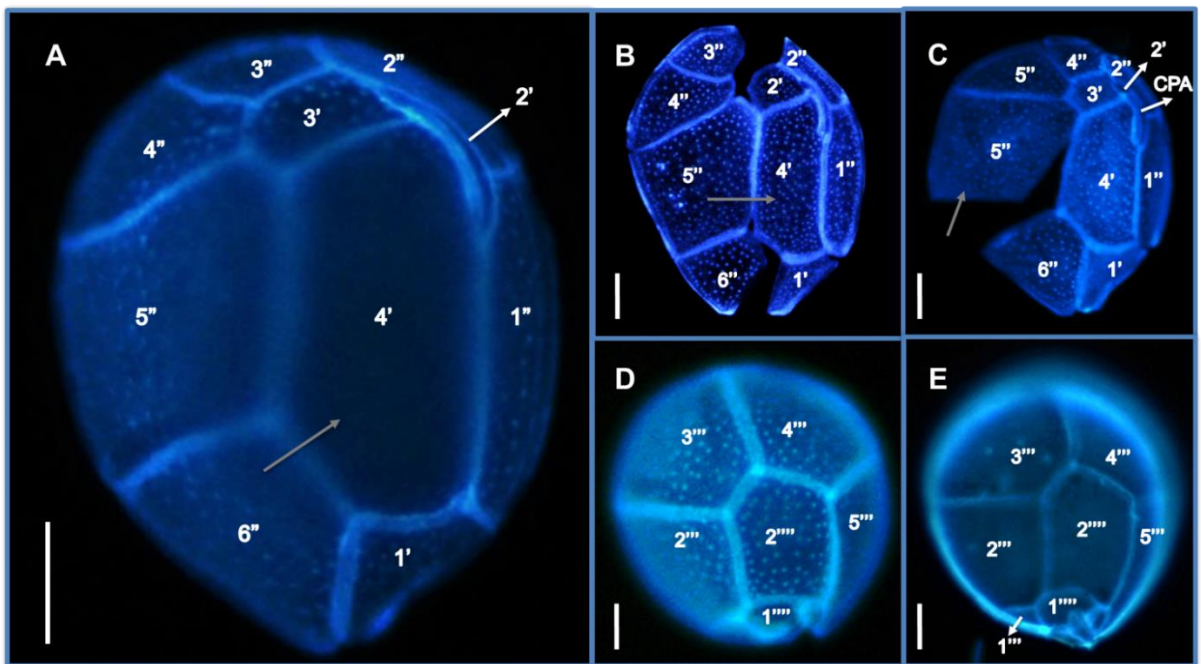
La interpretación de las placas de *O. lenticularis* es CPA, 4', 6'', C (?), S (?), Vo, 5''' y 2'''''. En la epiteca las dimensiones en el diámetro dorsoventral son de= 91.21 a 106.4  $\mu\text{m}$ ; transdiámetro de 75.85 a 90.76  $\mu\text{m}$ .

Las placas de la epiteca son asimétricas: La primera apical (1') se encuentra desplazada en el margen izquierdo inferior, su forma es cuadrangular y la rodean las placas 1'', 4' y 6''. La segunda apical (2') es pequeña y alargada ubicada en el centro izquierdo de la célula y traslapa con un extremo de la 3'. El CPA se encuentra dentro de la 2' es estrecho y curvo, oscila entre los 18.77 y 21.73  $\mu\text{m}$  de largo. La tercera placa apical (3') es hexagonal y pequeña adyacente a las placas 2', 4', 3'', 4'' y 5''. La cuarta apical (4') se encuentra en el centro de la epiteca, es de forma hexagonal y es la más grande con un rango de dimensiones que va de 50.4 a 68.68  $\mu\text{m}$  de largo y de 25.77 a 31.7  $\mu\text{m}$  de ancho (Fig. 12).

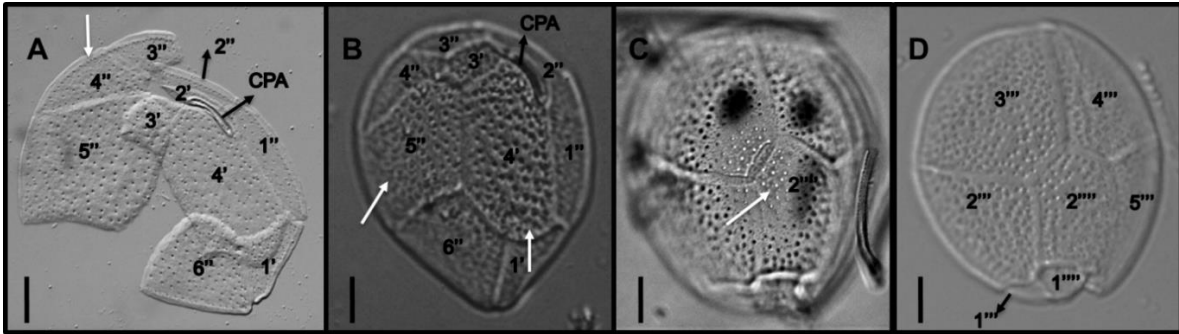
Las placas precingulares se ubican en el margen de la célula. La primera placa precingular (1'') es oblonga y cuadrangular y está en contacto con las placas 1', 2', 4' y 2''. La segunda precingular (2'') tiene una forma cuadrangular pequeña y alargada en contacto con la 2' y el CPA. Las precingulares tercera (3''), cuarta (4'') y sexta (6'') son trapezoidales. La quinta (5'') precingular se encuentra en el margen derecho de la epiteca, siendo la más amplia de las placas de esta serie y su forma es pentagonal asimétrica (Fig. 12). La banda intercalar es lisa con presencia de poros (Fig. 13-A).

Las dimensiones de la hipoteca no varían demasiado en relación con las de la epiteca, su diámetro dorsoventral está entre 90.99 a 104.21  $\mu\text{m}$  y el transdiámetro de 79.13 a 93.27  $\mu\text{m}$ .

Las placas postcingulares se encuentran en el margen de la hipoteca. La primera postcingular (1''') es pequeña y triangular cerca de la 1'' y la entrada ventral (Vo). La segunda placa postcingular (2''') se encuentra en la parte inferior izquierda, es cuadrangular y subyace con las placas 1''', 3''' y 2''. Las placas postcingulares 3''' y 4''' son cuadrangulares e irregulares, entre estas dos placas abarcan más de la mitad de la hipoteca. La quinta precingular (5''') es cuadrangular y elongada, adyacente entre las placas 4' y 2''. La primera antapical (1''''') es pequeña y triangular considerándola una placa diagnóstica se encuentra ubicada cerca de la entrada ventral (Vo) y la 1''. La segunda antapical (2''''') es asimétrica y pentagonal, el rango de su diámetro es de 42.41 a 49.94  $\mu\text{m}$  y transdiámetro entre 28.05 a 33.07  $\mu\text{m}$  adyacente entre todas las postcingulares y la 1'''' (Fig. 13 C y D).



**Figura 12.** Imágenes en microscopía de epifluorescencia de *O. lenticularis*. (A) Célula grande y amplia. La flecha gris apunta a la 4' que abarca la mayor parte de la epiteca. (B-C) Patrón tabular de la epiteca en diferentes enfoques. Se observa dos patrones de poros. Las flechas grises señalan las placas más grandes de la superficie 4' y 5''. (C-D) Patrón tabular de la hipoteca, vista de la antapical. Escala= 20  $\mu\text{m}$ .



**Figura 13.** Imágenes de microscopía de luz de *O. lenticularis*. (A) Tabulación de las placas de la epiteca. Vista del CPA. La flecha blanca señala la placa intercalar lisa y la presencia de poros marginales. (B) Célula entera. Separación de las placas por bandas. Las flechas blancas muestran la posición de las placas 4' y 5''. (C-D) Vista de la hipoteca en diferente enfoque. La flecha blanca indica la presencia de dos tipos de poros. Patrón tabular de la hipoteca. Escala= 20  $\mu$ m.

### ***Ostreopsis cf. siamensis***

**Etimología:** el epíteto *siamensis* se refiere al Golfo de Siam en Tailandia, sitio donde fue originalmente colectada la especie.

Las células presentan forma de lágrima alargada, comprimida antero-posteriormente. La textura de las placas es lisa y solo se logra observar un patrón de poros superficiales. La fórmula de las placas es Po, 4'; 6'', C(?), S(?), 5''', 2'''' (Fig. 14).

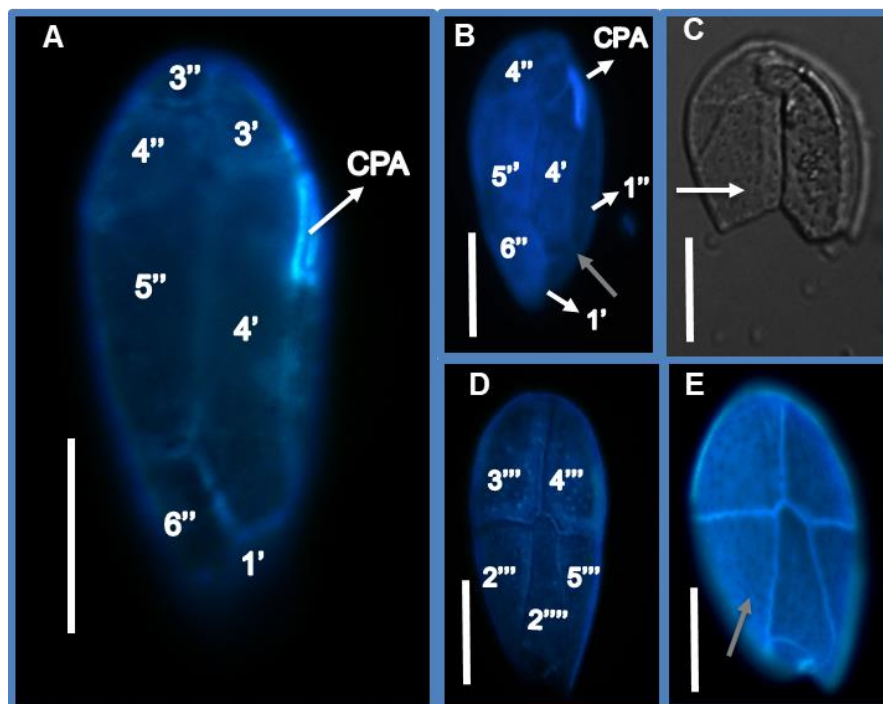
Las medidas del diámetro dorsoventral de la epiteca variaron entre 45.61 y 63.58  $\mu$ m y de 29.08 a 47.73  $\mu$ m de transdiámetro.

Todas las placas son asimétricas. La primera placa apical (1') es cuadrangular ubicada en la parte inferior de la 1''. La segunda apical (2') es alargada y estrecha ubicada en la parte superior izquierda de la 4' en contacto con la 3', 1'' y 2''; dentro de esta placa se encuentra el CPA su forma es curva y estrecha, llegando a medir entre 8.55 y 11.28  $\mu$ m de largo. La tercera apical (3') es pentagonal, en contacto con la 2', 4', 3'', 4'' y 5''. La cuarta apical (4') ubicada en el centro de la epiteca tiene una forma hexagonal, alargada (29.08 a 47.73  $\mu$ m) y estrecha (9.52 a 15.51  $\mu$ m).

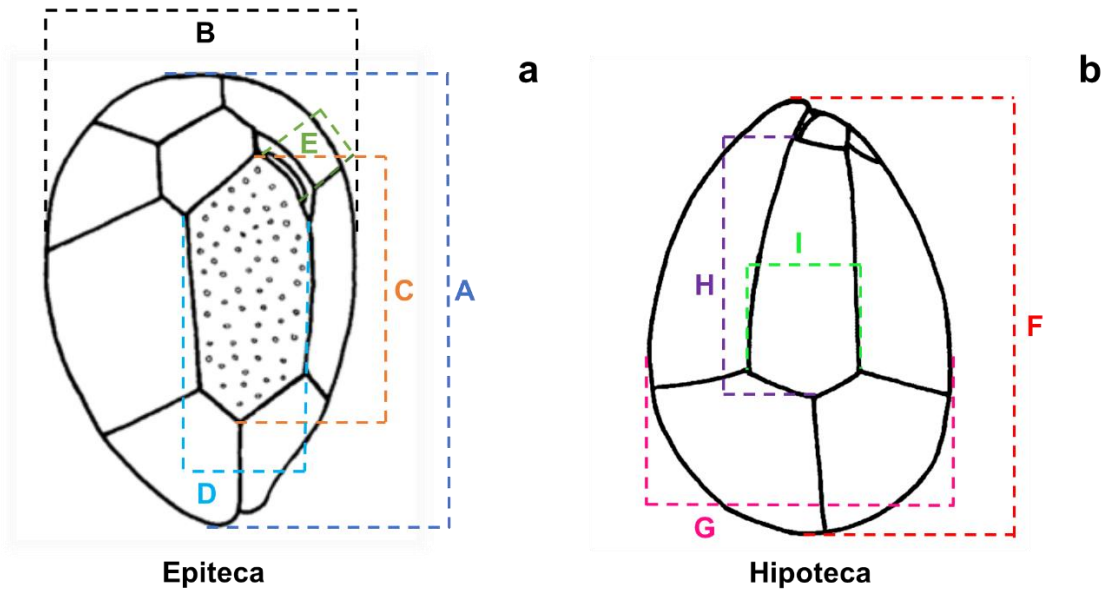
La primera precingular (1'') es alargada y cuadrangular se encuentra en el margen izquierdo de la epiteca. La segunda precingular (2'') es pequeña y cuadrangular. Las placas precingulares 3'', 4'' y 6'' son cuadrangulares y asimétricas. La quinta precingular (5'') es pentagonal y es la más amplia de la epiteca (Fig 14 A y B).

Las dimensiones de la hipoteca variaron poco con respecto a las de la epiteca, obteniendo un diámetro dorsoventral de 49.49 a 64.78- $\mu\text{m}$  y un transdiámetro entre 24.73 y 39.45  $\mu\text{m}$ .

Las placas postcingulares 2''', 3''', 4''' y 5''' son cuadrangulares y abarcan 2/3 partes de la hipoteca (Fig. 14-C). La segunda antapical (2''') es pentagonal asimétrica y se observó en el centro; es alargada (24.86 a 36.71  $\mu\text{m}$ ) y estrecha (9.12 a 18.24  $\mu\text{m}$ ), en contacto con todas las placas postcingulares. La primera postcingular (1''') y la primera antapical (1''') son triangulares, esta última ubicada en la parte posterior de la 2'''' además de ser mayor en dimensiones.



**Figura 14.** Imágenes en microscopía de epifluorescencia y microscopía de luz de *O. cf. siamensis*. (A-B) Tabulación de las placas de la epiteca. Vista del CPA. La flecha gris indica la posición de la 4' hexagonal. (C) Patrón de poros. (D-E) Patrón tabular de la hipoteca. La flecha gris indica la presencia de un patrón de poros. Escala= 20  $\mu\text{m}$ .



A= Diámetro dorsoventral de la epiteca

B= Transdiámetro

C= Largo de la 4' apical

D= Ancho de la 4' apical

E= Largo del Complejo del Poro Apical (CPA)

F= Diámetro dorsoventral de la hipoteca

G= Transdiámetro de la hipoteca

H= Largo de la 2''' antapical

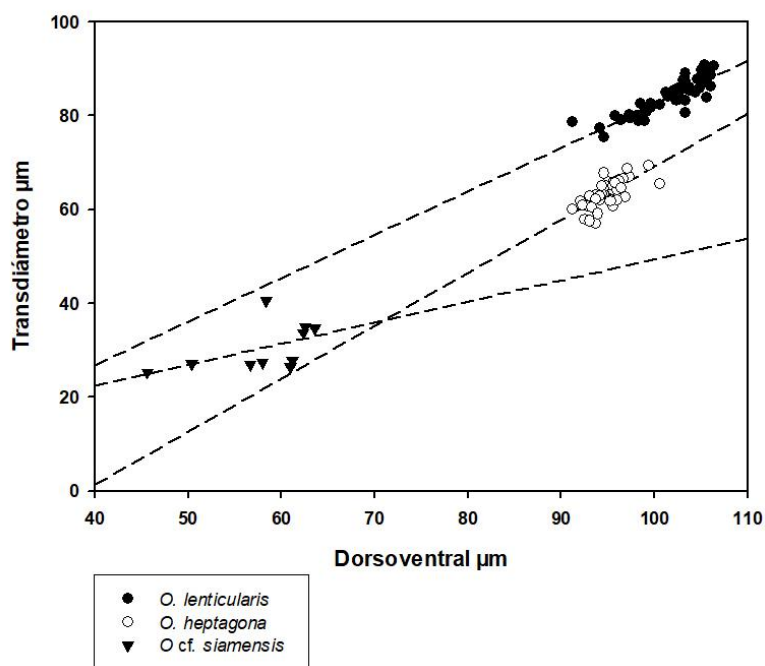
I= Ancho de la 2''' antapical

**Figura 15.** Esquemas en donde se representan las variables morfométricas de la epiteca (a) y de la hipoteca (b) para la identificación de las especies (Imagen tomada de Fukuyo, 1981).

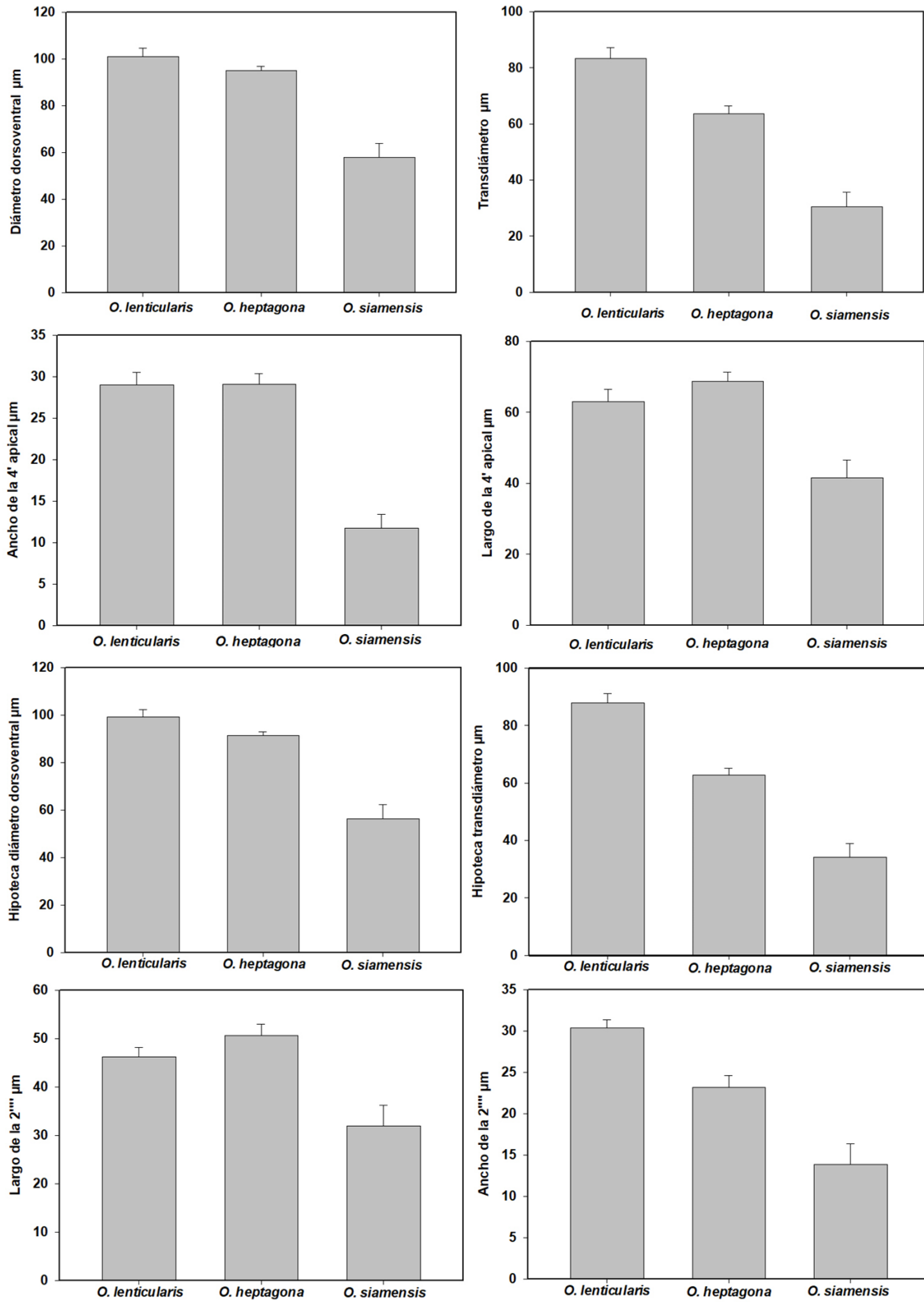
De acuerdo a los datos morfométricos de DV-TA *O. lenticularis* fue la especie más grande y de forma ovalada; *O. heptagona* es alargada, más estrecha, y oblonga, mientras que la más reducida en sus dimensiones es *O. cf. siamensis* mostrado una forma más ovoide. En la figura 16 se observa la correlación entre la longitud dorsoventral y el transdiámetro, y en la figura 17 las diferencias en cada una de las variables morfométricas para las tres especies.

**Tabla 5.** Tamaño de tres especies del género *Ostreopsis* de la zona norte del Caribe mexicano.

	<i>O. lenticularis</i> ( $\bar{x} \pm SD_{\bar{x}}$ ) n=50	<i>O. heptagona</i> ( $\bar{x} \pm SD_{\bar{x}}$ ) n=50	<i>O cf. siamensis</i> ( $\bar{x} \pm SD_{\bar{x}}$ ) n=10
(A) Epiteca DV	100.96 ± 3.65	95.13 ± 1.75	57.96 ± 1.83
(B) Epiteca TD	83.31 ± 3.80	63.68 ± 2.79	30.50 ± 1.60
(A/B) Radio	1.21 ± 0.003	1.49 ± 0.007	1.92 ± 0.07
(C) Largo 4'	62.97 ± 3.46	68.81 ± 2.48	41.52 ± 1.57
(D) Ancho 4'	29.01 ± 1.48	29.10 ± 1.28	11.68 ± 0.54
(C/D) Radio	2.17 ± 0.017	2.36 ± 0.012	3.59 ± 0.16
(E) CPA	20.15 ± 0.63	17.52 ± 0.10	10.38 ± 0.26
(F) Hipoteca DV	99.1 ± 4.14	91.49 ± 1.60	56.28 ± 1.87
(G) Hipoteca TD	87.82 ± 3.25	62.63 ± 2.39	34.09 ± 1.55
(F/G) Radio	1.128 ± 0.003	1.46 ± 0.007	1.67 ± 0.07
(H) Largo 2'''	46.21 ± 1.93	50.66 ± 2.30	31.99 ± 1.33
(I) Ancho 2'''	30.37 ± 0.98	23.18 ± 1.40	13.85 ± 0.79
(H/I) Radio	1.52 ± 0.008	2.19 ± 0.021	2.37 ± 0.16



**Figura 16.** Relación entre la longitud dorsoventral ( $\mu\text{m}$ ) y el transdiámetro ( $\mu\text{m}$ ) de las tres especies de *Ostreopsis*: *O. lenticularis* (círculos negros), *O. heptagona* (círculos blancos) y *O. cf. siamensis* (triángulos negros) reportadas en el norte del Caribe mexicano.



**Figura 17.** Relación de cada una de las variables morfométricas de *Ostreopsis*: *O. lenticularis*, *O. heptagona* y *O. cf. siamensis*

Para establecer relaciones isométricas de las especies de *Ostreopsis* se realizaron regresiones lineales con las variables morfométricas. Bajo este contexto. Los valores del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) indicarían la fuerza de la relación entre estas variables. El valor máximo de  $r^2=0.79$  se observó en *O. lenticularis* entre A y B; ( $p<0.001$ , Tabla 6). En *O. heptagona* el mayor valor de  $r^2$  fue de 0.50  $p<0.001$  nuevamente entre las variables A y B (Tabla 7).

Los valores en el coeficiente de determinación de *O. cf. siamensis* fueron opuestos a las dos anteriores ya que el valor más alto entre las variables F y H fue de 0.8 ( $p<0.001$ ; Tabla 8).

Al analizar los valores del coeficiente de determinación entre las variables restantes de las tres especies observamos que los valores son menores a 0.5 (Tablas 6-8)

**Tabla 6.** Valores del coeficiente de determinación entre las variables morfométricas de *O. lenticularis*.

<b>A</b>								
<b>B</b>	<b>0.790</b>							
<b>C</b>	0.562	0.448						
<b>D</b>	0.380	0.488	0.177					
<b>E</b>	0.246	0.268	0.247	0.187				
<b>F</b>	0.028	0.018	0.034	0.0005	0.001			
<b>G</b>	0.047	0.028	0.111	0.007	0.005	0.662		
<b>H</b>	0.005	0.003	0.022	0.039	0.009	0.463	0.209	
<b>I</b>	0.005	0.019	0.007	0.023	<b>0.00002</b>	0.224	0.200	0.185
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>

A=Dorsoventral de la epiteca; B=Transdiámetro de epiteca; C=Largo de la 4' apical; D=Ancho de la 4' apical; E=Largo del Complejo del Poro Apical; F=Dorsoventral de la hipoteca; G=Transdiámetro de la hipoteca; H=Ancho de la 2'''; I=Ancho de la 2''' (n=50). Los valores resaltados en negro son el máximo y mínimo de las relaciones isométricas.



**Tabla 7.** Valores del coeficiente de determinación entre las variables morfométricas de *O. heptagona*.

<b>A</b>								
<b>B</b>	<b>0.503</b>							
<b>C</b>	0.194	0.136						
<b>D</b>	0.209	0.191	0.325					
<b>E</b>	0.446	0.241	0.056	0.1				
<b>F</b>	0.035	0.022	0.034	0.007	<b>.000008</b>			
<b>G</b>	0.094	0.071	0.007	0.027	0.016	0.219		
<b>H</b>	0.0001	0.016	0.092	0.013	0.0024	0.020	0.028	
<b>I</b>	0.029	0.0006	0.007	0.057	0.008	0.102	0.134	0.030
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>

A=Dorsoventral de la epiteca; B=Transdiámetro de epiteca; C=Largo de la 4' apical; D=Ancho de la 4' apical; E=Largo del Complejo del Poro Apical; F=Dorsoventral de la hipoteca; G=Transdiámetro de la hipoteca; H=Ancho de la 2'''; I=Ancho de la 2''''(n= 50). Los valores resaltados en negro son el máximo y mínimo de las relaciones isométricas.

**Tabla 8.** Valores del coeficiente de determinación entre las variables morfométricas de *Ostreopsis cf. siamensis*

<b>A</b>								
<b>B</b>	0.265							
<b>C</b>	0.592	0.150						
<b>D</b>	0.084	0.534	0.114					
<b>E</b>	0.305	0.195	0.274	0.348				
<b>F</b>	0.396	0.053	0.084	0.004	0.001			
<b>G</b>	0.018	0.236	0.011	0.361	0.247	0.209		
<b>H</b>	0.330	<b>0.0002</b>	0.081	0.127	0.020	<b>0.796</b>	0.463	
<b>I</b>	0.122	0.733	0.018	0.413	0.135	0.086	0.286	0.002
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>

A=Dorsoventral de la epiteca; B=Transdiámetro de epiteca; C=Largo de la 4' apical; D=Ancho de la 4' apical; E=Largo del Complejo del Poro Apical; F=Dorsoventral de la hipoteca; G=Transdiámetro de la hipoteca; H=Largo de la 2'''; I=Ancho de la 2''''(n=10). Los valores resaltados en negro son el máximo y mínimo de las relaciones isométricas.

### 9.3 Análisis filogenético de las especies de *Ostreopsis*.

La amplificación obtenida de los productos de PCR únicamente se pudo realizar en la región ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> de la muestra ambiental de Isla Contoy, obteniendo una secuencia de 385 pares de bases (pb). La secuencia se alineó con 23 secuencias obtenidas del Gen-Bank (Tabla 9) con el software MEGA 7, utilizando la herramienta de CLUSTALW. El método empleado para la construcción del árbol fue de Máxima

Verosimilitud, con el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano y el método de validación Bootstrap (1000 repeticiones). Se utilizaron secuencias de los dinoflagelados *Coolia malayensis* y *Alexandrium minimum* como grupo externo (Fig. 18).

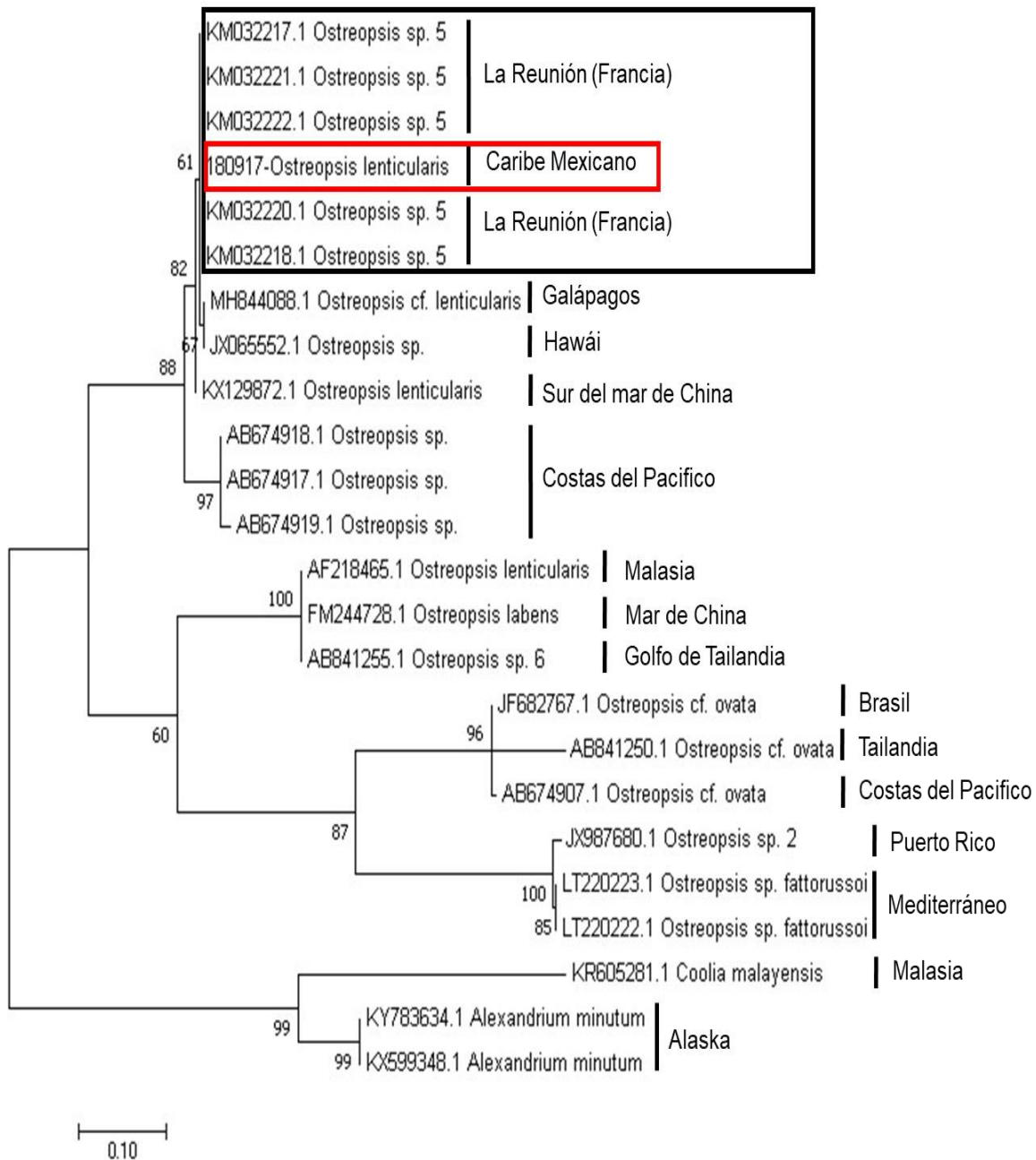
En el recuadro de color rojo de la figura 18 es posible apreciar a la muestra identificada como *O. lenticularis* colectada en la zona norte de Quintana Roo posicionarse dentro del clado que contiene cinco muestras de cultivo de la isla La Reunión Francesa (Carnicer *et al.*, 2015) las cuales son nombradas como *Ostreopsis* sp 5. La muestra descrita en este trabajo (apartado 9.2), corresponde con las descripciones morfométricas, forma y patrón de las placas de las cepas KM032222.1, KM032217.1, KM033221.1, KM032220.1 y KM032218.1.

Entre las cinco muestras alineadas con la muestra ambiental del presente trabajo no se observan cambios significativos en las bases de los nucleótidos ya que solo hubo dos variaciones en la alineación en los sitios 82 (GAP) y 279 (N) dentro de la región del ITS. La secuencia KM032222.1 mostró la mayor similitud (99%) con la del presente estudio, aunque la secuencia comparada se compone de 279 pb, mientras que la del presente estudio cuenta con 385 pb (Fig. 18).

Al alinearse la muestra de las Galápagos (MH844088.1) con la secuencia de Hawái (JX065552.1) se observó un alto grado de identidad (100%), mientras que con la del Caribe Mexicano (180917) obtuvo una similitud del 99% presentando cambios en los sitios 92 (T:C) y 380 (C:T).

La secuencia KX129872.1 de cultivo identificada como *O. lenticularis* del mar de China mostró mayor divergencia al ser alineada con la muestra de Galápagos (MH844088.1) considerada la misma especie y con la secuencia del Caribe Mexicano (180917) donde se observó diferencias en 12 sitios obteniendo una similitud del 95% (Fig.18).

El alineamiento entre las secuencias de *O. cf ovata* (JF682767.1, AB841250.1, AB674907.1) de las Costas del Pacífico y de *O. fattorussoi* (LT220223.1, LT220222.1) del Mediterráneo, con la muestra *O. lenticularis* del Caribe Mexicano (180917) mostró una alta divergencia al presentar varios cambios en las bases nucleotídicas.



**Figura 18.** Árbol de máxima verosimilitud (ML) inferido a partir de secuencias del ITS del rDNA. Valores de Bootstrap ML superiores al 67% en 1000 repeticiones. El recuadro azul presenta la muestra de *Ostreopsis lenticularis* del presente estudio agrupada en un clado con las muestras de La Reunion Francesa y subgrupos de Costas del Pacifico, Mar de China, Hawái y Galápagos.

**Tabla 9.** Secuencias de especies de *Ostreopsis* utilizados en el árbol filogenético: aislamiento, ubicación, número de acceso en GenBank y referencia.

<b>Especie</b>	<b>Extracto</b>	<b>Origen geográfico</b>	<b>No. Acceso</b>	<b>Autor</b>
<i>O. cf lenticularis</i>		Galápagos	MH844088	Carnicer, (en proceso)
<i>Ostreopsis</i> sp. 1	CBA0203	Honolulu, N del Océano Pacífico, Hawái	JX065552	Pena <i>et al.</i> , 2014
<i>O. labens</i>	VGO897	Mar de China	FM244728	Penna <i>et al.</i> , 2010
<i>O. lenticularis</i>	2S1E10	Islas Hainan, Sur del Mar de China	KX129872	Zhang <i>et al.</i> , 2018
<i>Ostreopsis</i> sp.	P-079.2L	La Reunión (Francia), Océano Índico	KM032222	Carnicer <i>et al.</i> , 2015
<i>Ostreopsis</i> sp.	P-0107	La Reunión (Francia), Océano Índico	KM032217	Carnicer <i>et al.</i> , 2015
<i>Ostreopsis</i> sp.	P-79.1L	La Reunión (Francia), Océano Índico	KM033221	Carnicer <i>et al.</i> , 2015
<i>Ostreopsis</i> sp.	P-0108	La Reunión (Francia), Océano Índico	KM032220	Carnicer <i>et al.</i> , 2015
<i>Ostreopsis</i> sp.	P-109	La Reunión (Francia), Océano Índico	KM032218.1	Carnicer <i>et al.</i> , 2015
<i>Ostreopsis</i> sp.	MB80828_4	Meridional de Japón, Oeste del Océano Pacífico	AB674917	Sato <i>et al.</i> , 2011
<i>Ostreopsis</i> sp.	070421_1	Meridional de Japón, Oeste del Océano Pacífico	AB674918	Sato <i>et al.</i> , 2011
<i>Ostreopsis</i> sp.	070421_2	Meridional de Japón, Oeste del Océano Pacífico	AB674919	Sato <i>et al.</i> , 2011
<i>O cf. ovata</i>	LCA-E7	Armacas de Buzos, Río de Janeiro	JF682767	Nascimento <i>et al.</i> , 2012
<i>O cf. ovata</i>	TF4OS	Tailandia	AB841250	Tawong <i>et al.</i> , 2014
<i>Ostreopsis</i> sp.	TF29OS	Golfo de Tailandia	AB841255	Tawong <i>et al.</i> , 2014
<i>Coolia malayensis</i>	CCMP1345	Malasia	KR605281	Leaw <i>et al.</i> , 2016
<i>Ostreopsis</i> sp.	Dn110EHU	Puerto Rico	JX987680	David <i>et al.</i> , 2013
<i>O cf. ovata</i>	S70830_4	Costas del Pacífico Oeste	AB674907	Sato <i>et al.</i> , 2011
<i>Ostreopsis</i> sp.	L1000	Mar Mediterráneo	LT220223	Accoroni <i>et al.</i> , 2016
<i>Ostreopsis</i> sp.	C1005	Mar Mediterráneo	LT220222	Accoroni <i>et al.</i> , 2016
<i>O. lenticularis</i>	O1PR01	Pulao Redang, Malasia	AF218465	Pin <i>et al.</i> , 2001
<i>Alexandrium minutum</i>	AMP4	Alaska	KY783634	Sorenson, (en proceso)
<i>Alexandrium minutum</i>	CCMP 1888	Alaska	KX599348	Litaker <i>et al.</i> , 2016
<i>O. lenticularis</i>	180917	Ixlaché, Caribe Mexicano		Este estudio

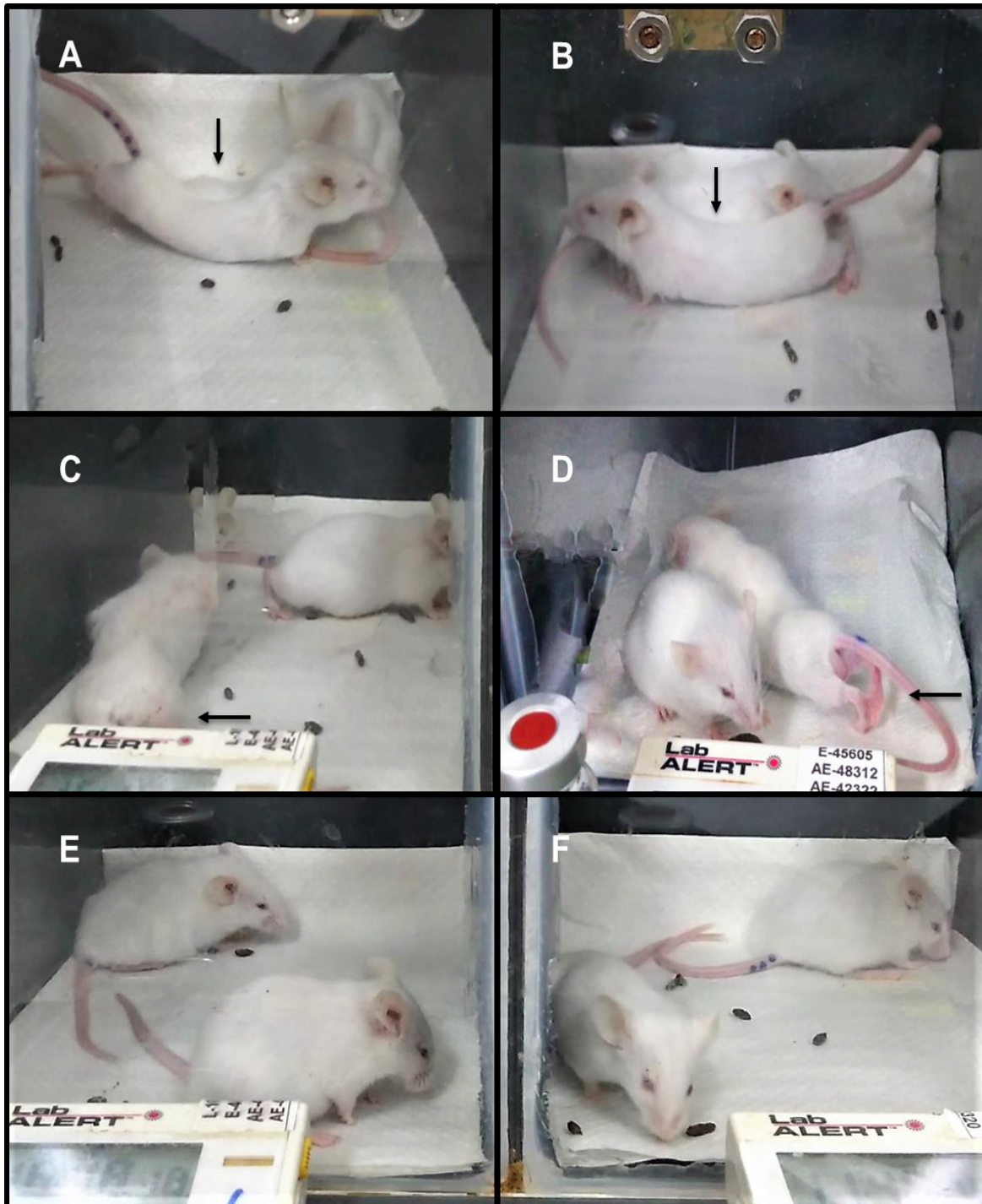
#### 9.4 Toxicidad en modelo en ratón

Se utilizaron un total de cinco extractos de Puerto Morelos y tres de Isla Contoy, procesados a partir del aislamiento de células de *Ostreopsis* sp. con diferentes concentraciones (Tabla 10).

**Tabla 10.** Concentración celular de cada uno de los extractos utilizados en este estudio.

Lugar y fecha de colecta (día/mes/año)	Clave	No. de células cel/mL
Isla Contoy, Ixlaché 19/04/18	IC11	60,000
19/04/18	IC12	33,300
19/04/18	IC13	49,600
Puerto Morelos, La Bonanza 18/05/18	PM1	251,200
18/05/18	PM2	211,200
18/05/18	PM4	51,168
18/05/18	PM5	129,315
18/05/18	PM6	48,837

En la tabla 11 se comparan los signos clínicos observados en el modelo en ratón en cada tratamiento y su respectiva toxicidad. Aunque ninguna de las muestras fue letal en este modelo, los extractos de *Ostreopsis* provocaron al menos un signo de intoxicación (con excepción del extracto IC12 el cual no provocó ningún cambio de comportamiento que indicara toxicidad por lo cual se considera una muestra inocua), siendo los extractos PM5 y IC13 los que provocaron la mayor cantidad de signos clínicos de intoxicación de moderados a severos, que consistieron en letargo, p<sup>á</sup>ralisis de los cuartos traseros, problemas de locomoción, arqueamiento corporal severo con hundimiento de la columna vertebral, espasmos y dificultad respiratoria. La variación en los signos puede deberse no solo a la concentración si no a la posible presencia de diversos derivados de la PLTX presente en los extractos. Los controles negativos no presentaron ningún signo de intoxicación durante el periodo observado (Fig. 19).



**Figura 19.** Signos clínicos observados durante el análisis toxicológico en modelo en ratón expuesto a extractos de *Ostreopsis* aislados de la zona norte del Caribe Mexicano. (A-B) Arqueamiento corporal severo, las flechas señalan el hundimiento en la columna vertebral, (C-D) Problemas de locomoción, con parálisis de los cuartos traseros. (E-F) Letargo en los individuos.

**Tabla 11.** Evaluación de la toxicidad de extractos de *Ostreopsis* de la zona Norte del Caribe Mexicano en modelo en ratón.

<b>Clave</b>	<b>Signos Clínicos</b>	<b>Concentración (UR)</b>
<b>IC11 (Isla Contoy)</b>	Arqueamiento corporal, espasmos, pérdida de locomoción en los cuartos traseros	<b>(&lt;UR)</b>
<b>IC12 (Isla Contoy)</b>	No se presentaron signos clínicos	<b>Negativo</b>
<b>IC13 (Isla Contoy)</b>	Parálisis de los cuartos traseros, problemas de locomoción, arqueamiento corporal severo con hundimiento en la columna vertebral, espasmos, dificultad respiratoria, letargo	<b>(&lt;UR)</b>
<b>PM1 (Puerto Morelos)</b>	Arqueamiento corporal, parálisis de los cuartos traseros	<b>(&lt;UR)</b>
<b>PM2 (Puerto Morelos)</b>	Arqueamiento corporal, espasmos	<b>(&lt;UR)</b>
<b>PM4 (Puerto Morelos)</b>	Arqueamiento corporal, parálisis de los cuartos traseros	<b>(&lt;UR)</b>
<b>PM5 (Puerto Morelos)</b>	Arqueamiento corporal, letargo, disnea, espasmos, perdida de locomoción en los cuartos traseros	<b>(&lt;UR)</b>
<b>PM6 (Puerto Morelos)</b>	Arqueamiento corporal, espasmos, problemas de locomoción, diarrea moderada.	<b>(&lt;UR)</b>

1 UR: es la concentración suficiente de PLTX (s) para causar la muerte en 24 h a un ratón de un peso de 20 g y es equivalente a 8 ng. \*Todos los animales evaluados con los extractos problemas se recuperaron después de las 24 h, por lo que se indican con concentraciones subletales.

### 9.5 Toxicidad en modelo en *Artemia*.

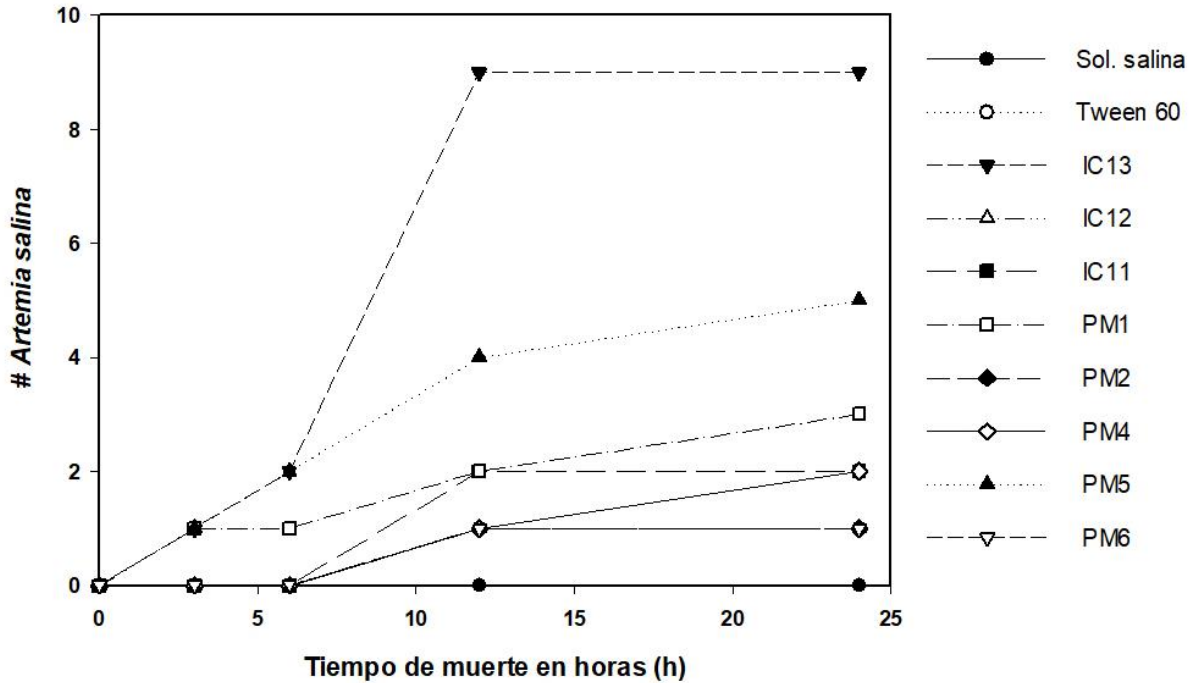
Se evaluó la toxicidad en los mismos extractos de *Ostreopsis* analizados en el modelo en ratón (Tabla 10). Los principales signos clínicos de intoxicación observados en este modelo fueron en nado errático y lento, giros, golpeteo de las paredes de los recipiente y cambios en la coloración de las artemias (se obscurecieron) así como al final movimiento lento de las branquias y muerte. El tratamiento IC13 de Ixlaché produjo desde la primera lectura (3 h) mortalidad de organismos y un 90% al final del ensayo toxicológico agudo (24 h) por lo que la muestra resulto muy toxica para este modelo (Fig. 20). El extracto PM5 de Puerto Morelos también fue tóxica provocando la mortalidad en 50%. La mortalidad en los controles negativos fue nula con agua de mar filtrada y estéril y muy baja (10%) con Sol.Salina con 1% de Tween. En la Tabla 12 se indican los porcentajes de mortalidad en los demás tratamientos.

**Tabla 12.** Toxicidad aguda de *Artemia salina* de extractos de *Ostreopsis* spp de la zona norte del Caribe Mexicano.

Lugar Clave	Especie	Mortalidad (número)	Mortalidad (%)	Toxicidad
Isla Contoy (IC11)	<i>Ostreopsis</i> spp	1	10	+
Isla Contoy (IC12)	<i>Ostreopsis</i> spp	2	20	+
Isla Contoy (IC13)	<i>Ostreopsis</i> spp	9	90	++++
Puerto Morelos (PM1)	<i>Ostreopsis</i> spp	3	30	++
Puerto Morelos (PM2)	<i>Ostreopsis</i> spp	1	10	+
Puerto Morelos (PM4)	<i>Ostreopsis</i> spp	2	20	+
Puerto Morelos (PM5)	<i>Ostreopsis</i> spp	5	50	++
Puerto Morelos (PM6)	<i>Ostreopsis</i> spp	1	10	+
Control (-)	Sol. Salina	0	0	Negativo
Control (-)	Sol. Salina 1% Tween 60	1	10	+

10-20% mortalidad: Poco tóxico (+); 21-50% mortalidad: Medianamente tóxico (++); 51-80% mortalidad: tóxico (+++); 81-100% mortalidad: muy tóxico (++++).





**Figura 20.** Mortalidad de *A. salina* (adultos) expuestos durante 24(h) a extractos de *Ostreopsis* spp. aislados en la zona norte del Caribe Mexicano.

#### 9.5.1 Cambios morfológicos en *A. salina* expuestos a extractos de *Ostreopsis* spp.

Ejemplares de artemia muertos por los tratamientos con los extractos de *Ostreopsis* spp. IC13 y PM5 durante los tiempos de exposición así como los controles negativos (con agua salina y solución salina con 1% de Tween 60) fueron observados en detalle por ML para evaluar los cambios morfológicos y documentar posibles daños. Se comprobó en las artemias evaluadas con los extractos IC13 y PM5 cambios en la coloración (obscuramiento de los organismos), pérdida estructural, necrosis, en las hembras el desprendimiento del saco ovigero y en ambos sexos hubo pérdida de extremidades (tóraxopodos). En la figura 21 (A-B) se describe y compara estos cambios morfológicos en los que se documentó daños de moderados a severos respecto a los controles negativos.



**Figura 21.** Imágenes de *Artemia salina* expuestos a extractos de *Ostreopsis* spp de la zona del norte del Caribe Mexicano (A-B) Individuos del control negativo, en donde se observa el color normal del tejido, estructura morfológica normal y transparente así como la presencia de extremidades. (C-D) Organismos del tratamiento IC-13 en donde las flechas indican cambios de la coloración (oscurecimiento), necrosis, desarreglo estructural y pérdida de las extremidades.

## 10. DISCUSIÓN

### 10.1 Abundancias de *Ostreopsis* spp. sobre *Dictyota*.

En Isla Contoy y Puerto Morelos las máximas abundancias de *Ostreopsis* spp fueron de 34,907 cél g<sup>-1</sup> PHM y 45,842 cél g<sup>-1</sup> PHM, respectivamente. Estas abundancias coinciden con lo reportado por Irola-Sansores *et al.* (2018) ya que sus máximas abundancias en Puerto Morelos fueron de las especies *O. heptagona* (53,231 cel g<sup>-1</sup> PHM) y *O. marina* (46,462 cel g<sup>-1</sup> PHM) en macroalgas del género *Dictyota*. En el Caribe se han realizado estudios previos para determinar las abundancias del género *Ostreopsis*. Ballantine *et al.* (1988) estudiaron la dinámica poblacional de

*Ostreopsis lenticularis* en Puerto Rico durante tres años y su máxima abundancia reportada fue cuatro veces mayor que las presentadas en este estudio con 235,803 cel g<sup>-1</sup> PHM en el mismo sustrato, aunque la media observada de sus dos años de estudios fue 16,000 cel g<sup>-1</sup>.

En el arrecife de coral de Belice, Morton y Faust (1997) mencionan densidades de *O. heptagona* de 70 cel g<sup>-1</sup> PHM y abundancias de *O. lenticularis* de 400 cel g<sup>-1</sup> PHM, sin embargo, sus densidades más altas contrastan con las reportadas en este estudio, esto puede deberse al corto tiempo de muestreo ó la cantidad de muestra obtenida de la macrófita.

Altas abundancias de *Ostreopsis* sp. también fueron reportadas en Cuba por Moreira *et al.* (2012) con 7.9x10<sup>4</sup> cel g<sup>-1</sup> PHM en *Dictyota*, asimismo sus poblaciones nunca fueron menores a 2.0x10<sup>4</sup> cel g<sup>-1</sup> PHM.

En otras regiones, estudios en diferentes sustratos demuestran las altas concentraciones de este género de dinoflagelado. Por ejemplo, en el Caribe Oriental, en Isla Guadalupe se detectaron abundancias de *Ostreopsis* sp. 1,669±1,027 cél g<sup>-1</sup> PHM (Bosnoir *et al.*, 2018) sobre la macrófita *Halophila stipulacea*. En el mar Mediterráneo, sobre sustratos duros, Totti *et al.* (2010) registraron 11,123±3,230 cél cm<sup>-2</sup> y en conchas de moluscos 2,752±1,217 cél cm<sup>-2</sup>) de *Ostreopsis ovata*. En sitios como el mar Mediterráneo donde son frecuentes los florecimientos, en la columna de agua se han reportado en las costas de Toscana (Italia) abundancias de hasta 113,000 cel/L de *O. ovata* (Ciminiello *et al.*, 2014).

Accoroni *et al.* (2015) mencionaron que la relación entre *Ostreopsis* y su asociación por grupos específicos de macroalgas depende de la alta disponibilidad de nutrientes, ya que si estos fueran limitados el éxito sería solo para las macroalgas, además que estas pueden liberar metabolitos que pudieran ser aprovechados por *Ostreopsis*.

Entre los resultados de las proliferaciones de *Ostreopsis* se destacó el efecto negativo de la profundidad ya que cuando esta aumenta las poblaciones de *Ostreopsis* tienden a disminuir, esta distribución se observó con las abundancias en Puerto Morelos, así como en estudios de Totti *et al.* (2010) y Bosnoir *et al.* (2018).

Otras variables que pueden tener un efecto importante en la abundancia de este género son la temperatura y la salinidad ya que las máximas abundancias reportadas en este estudio se encontraron cuando la temperatura estuvo entre 28° y 30°C y la salinidad entre 32 y 37. Esta relación es similar a lo que reportaron Irola-Sansores *et al.* (2018), ya que las máximas abundancias en ambos sitios de estudio se dieron entre los 27° y 28°C y corresponde a estudios previos realizados en entornos naturales donde las abundancias más altas se registraron cuando la temperatura varió entre 27°C y 29°C y la salinidad entre 38.14 y 39.43 (Ballantine *et al.*, 1988; Mangialajo *et al.*, 2008; Accoroni *et al.*, 2016; Bosnoir *et al.*, 2018).

## 10.2 Análisis morfológico y morfométrico

De acuerdo a la forma de la célula, las dimensiones y las formas de las placas se registraron tres especies del género *Ostreopsis* para la zona Norte del Caribe Mexicano: *O. heptagona*, *O. lenticularis* y *O. cf. siamensis*.

### ***Ostreopsis heptagona.***

Actualmente son pocos los registros de la especie de *O. heptagona*, en este estudio mostró un rango de tamaño DV: 91.21-100.56 µm y de TD: 57.01-69.32 µm que coincide con las medidas reportadas por Almazán-Becerril *et al.* (2016) para el mismo sitio de estudio y en otros sitios donde ya sido identificada (Tabla 14). En las relaciones morfométricas las variables del diámetro-dorsoventral y el trandiámetro se observó que existe una relación isométrica, por lo que conociendo el valor de cualquiera de ellas se puede estimar el valor de la otra con una alta confianza estadística.

Norris *et al.* (1985) describieron por primera vez esta especie y recalcaron dos particularidades, 1) la forma heptagonal de la 4' apical, 2) esta placa se encuentra en contacto con la 4' precingular que se encuentra desplazada en el margen derecho de la célula. Ambas características son iguales a las que se observan para la especie descrita en este trabajo y por Almazán-Becerril *et al.* (2016). Recientemente Accoroni *et al.* (2016) describieron a *O. fattorussoi* y mencionan que la 4' apical es heptagonal por lo que ya no es considerada una característica

diagnostica para *O. heptagona*, sin embargo, en esta especie las placas 4' y 4'' no hacen contacto, además de ser más pequeña (DV: 42.5-72.5  $\mu\text{m}$ ; TA: 26.3-50  $\mu\text{m}$ ).

### ***Ostreopsis cf. siamensis***

En el presente estudio se identificó a *O cf. siamensis* con un rango en sus dimensiones de DV= 46-63.4  $\mu\text{m}$  y TA= 25.2-40.5  $\mu\text{m}$  siendo un poco más pequeña que la descrita por Fukuyo (1981), pero similar a lo reportado por otros autores (Tabla.13). Sin embargo, algunos autores mencionan que la similitud entre los tamaños para las especies de *O. siamensis*, *O. ovata* y *O. rhodesae* dificulta distinguir a cada una (David *et al.*, 2013, Verma *et al.*, 2016), haciendo énfasis en la forma y dimensiones de las placas.

Las placas que se consideraron diagnosticas en este estudio fueron la 4' apical que tiene forma hexagonal, asimétrica y alargada; y la 2'''' anteroposterior de forma pentagonal, su tamaño rebasa poco más de la mitad de la hipoteca en terminación "V"; estas descripciones fueron similares a lo reportado por Rhodes *et al.* (2000) y Verma *et al.* (2016); sin embargo, los datos morfométricos difieren mucho en tamaño por lo que entre estas variables no existe una interdependencia; David *et al.* (2013) llegaron a la misma conclusión y mencionan que es difícil distinguir a esta especie debido a las diferencias en las dimensiones, sin embargo observan diferencias en la forma de la célula al ser más ovala y estrecha que *O. ovata*. Penna *et al.* (2005) describieron que al observarla en vista lateral *O. siamensis* no muestra ondulaciones, una característica que se observó en este estudio.

Otra especie que tiene dimensiones similares en los ejes dorsoventral y transapical a *O. siamensis* es *O. rhodesae*, sin embargo, se observa que la 2' apical es dos veces más grande que el complejo del poro y separa completamente la 3' apical de la 2'' precingular (Verma *et al.*, 2016).

### ***Ostreopsis lenticularis***

La primera descripción de *O. lenticularis* fue realizada por Fukuyo (1981) donde resalta la falta de ondulación en el *cingulum* y dos patrones de poros dispersos en

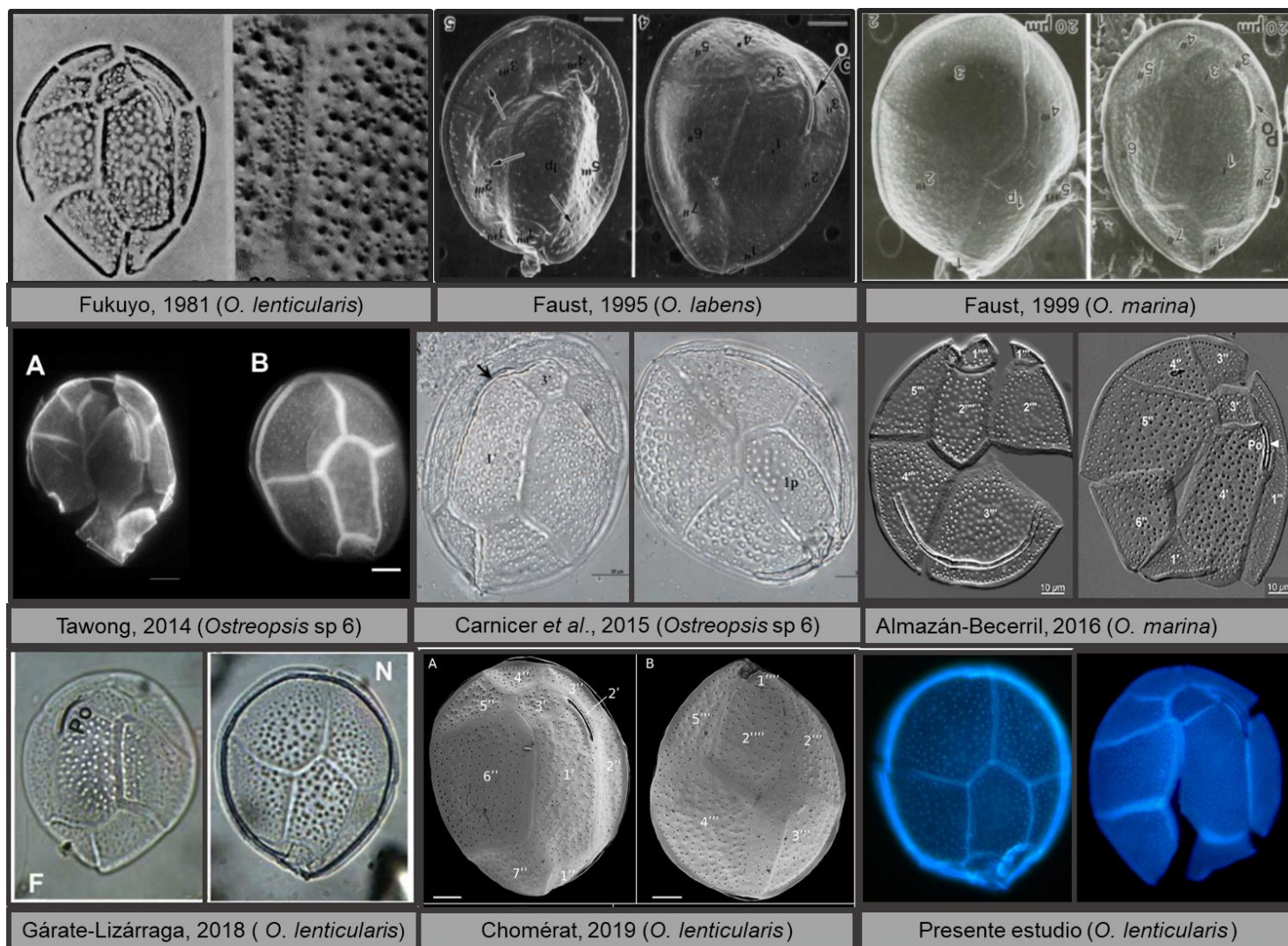
ambas placas. Ambas características se observaron en la especie descrita en este estudio.

La especie descrita como *O. marina* por Faust (1999) es similar a *O. lenticularis*, sin embargo, los argumentos más relevantes que esta autora consideró para establecer que ambas especies son distintas recaen en dos observaciones: que las dimensiones del DV y TD son menores en *O. lenticularis* y la segunda es que el CPA es más grande en *O. marina*, pero basándonos en los datos morfométricos de este estudio y de otras regiones donde identifican a *O. lenticularis* podemos observar que existe una variabilidad en tamaños tanto en muestras ambientales como de cultivo (Tabla 12). Algunos autores como Gárate-Lizárraga *et al.* (2018) y Chomérat *et al.* (2019) mencionan que la diferencia morfológica entre estas dos especies es la forma hexagonal de la 3' apical, sin embargo, esto depende de la interpretación que se les dé a las placas 2' y la 2'' (Figura 22). Al describir a *O. lenticularis* ambos estudios mencionaron la presencia de dos tipos de poros en todas las placas, la forma pentagonal y elongada de la 4' apical ubicada principalmente del lado izquierdo de la epiteca, y la 5'' precingular de forma pentagonal siendo el ancho mayor al resto de estas placas. Todas estas observaciones son semejantes a las que se describen en este trabajo.

Los datos morfométricos que se obtuvieron de *O. lenticularis* en este estudio fueron similares a los reportados por Zhang *et al.* (2018) y en ambos casos se observó que solo existe una relación isométrica entre el DV y el TD, pero en ninguna de las otras mediciones existe una relación isométrica.

En el Caribe se han realizado estudios descriptivos de especies morfológicamente similares a *O. lenticularis* (Figura 22). Moreira *et al.* (2012) describen a *Ostreopsis* sp. como una célula de forma lenticulada, grande y con un solo tipo de poro. En el norte del Caribe Mexicano se describió morfológicamente al morfotipo *O. marina* (Almazán-Becerril *et al.*, 2016; Irola-Sansores *et al.*, 2018), sin embargo, sus características tanto morfológicas como morfométricas, así como la secuencia obtenida de la región ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> de la muestra ambiental en este trabajo indican que la especie que se encuentra en la zona del Caribe Mexicano es *O. lenticularis*.

Actualmente surge la posibilidad de que algunas especies descritas anteriormente como *O. labens*, *O. marina*, *O. caribbeanus* y *O. belizeanus* pueden considerarse dudosos debido a que después de su primera descripción (Faust 1995 y 1999) no se han reportado nuevamente, además, este género tiene una alta plasticidad fenotípica por lo que sus características morfológicas pueden variar (Rhodes, 2000). Bajo este contexto, es posible que la *O. marina* de Faust (1999) e Irola-Sansores *et al.* (2018) sean en realidad *O. lenticularis*, por lo que es posible que ambos taxa sean sinónimos, sin embargo, para poder confirmar esto se debe 1) realizar muestreos más intensivos, 2) ampliar la zona de estudio 3) disponer de cultivos para corroborarlo morfológicamente y filogenéticamente.



**Figura 22.** Imágenes de especies morfológicamente similares a *Ostreopsis lenticularis*.



**Tabla 13.** Descripción de *Ostreopsis lenticularis* y taxa relacionados de acuerdo a diferentes autores.

<i>Especie</i>	<i>Forma</i>	<i>DV (µm)</i>	<i>TA (µm)</i>	<i>DV: TA radio</i>	<i>Poros Apical</i>	<i>Áreas de colecta</i>	<i>Referencia</i>
<i>O. lenticularis</i>	Célula lenticulada	60-100	45-80			Polinesia Francesa	Fukuyo, 1981
<i>O. labens</i>	Grandes, ampliamente ovoides	60-86	70-80	1.22	18	Belice	Faust y Morton, 1995
<i>O. marina</i>	Son grandes y ampliamente ovalados	83-111	73-85	1.29	24	Mar Caribe y Suroeste del océano Indico	Faust <i>et al.</i> , 1999
<i>Ostreopsis sp.</i>	Ampliamente ovalada, comprimida	60-85	50-67			Bahía de Cienfuegos en la costa centro-sur de Cuba	Moreira <i>et al.</i> , 2012
<i>Ostreopsis sp. 6</i>	Forma oblonga o en forma de lágrima	49.9-84.3	35.4-66.9	1.3	15	Tailandia	Tawong <i>et al.</i> , 2014
<i>Ostreopsis sp. 5</i>	Células grandes y ovoides	103.9	85.3			Isla de la Reunión (Océano Índico)	Carnicer <i>et al.</i> , 2015
<i>O. marina</i>	Células grandes y redondeadas	107.56	89			Caribe Mexicano	Almazán-Becerril <i>et al.</i> , 2016
<i>O. lenticularis</i>	Ampliamente ovaladas	65-100	50-80			Archipiélago de Revillagigedo.	Gárate-Lizárraga <i>et al.</i> , 2018
<i>O. lenticularis</i>	Forma de lágrima y puntiaguda	68-113.5	56.5-97.3	1.0-1.4	12.6-18.9	Isla de Hainan, Mar de China Meridional	Zhang <i>et al.</i> , 2018
<i>O. lenticularis</i>	Ampliamente ovaladas	60.5-89.3	56.1-73.4	1.08-1.36	16.2-19.3	Polinesia Francesa	Chomérat <i>et al.</i> , 2019
<i>O. lenticularis</i>	Amplia y ovalada	91.21-106.4	75.85-90.76	1.21	20.15	Norte del Caribe Mexicano	<b>Presente estudio</b>

**Tabla 14.** Descripción de *Ostreopsis siamensis* y taxa relacionados de acuerdo a diferentes autores.

<i>Especie</i>	<i>Forma</i>	<i>DV (µm)</i>	<i>TA (µm)</i>	<i>DV: TA radio</i>	<i>Poros Apical</i>	<i>Áreas de colecta</i>	<i>Referencia</i>
<i>O. siamensis</i>	Célula ampliamente ovoide	60-100	45-90			Polinesia Francesa y Nueva Caledonia	Fukuyo, 1981
<i>O. ovata</i>	Células de forma ovalada a lagrimal	50-56	25-35			Polinesia Francesa y Nueva Caledonia	Fukuyo, 1981
<i>O. siamensis</i>	Forma de lágrima a redonda	52-68	40-55			Nueva Zelanda	Rhodes <i>et al.</i> , 2000
<i>O cf. siamensis</i>	Forma ovalada o de lágrima	50-75	38-72	4		Mediterráneo, Mar Tirreno, Italia, Río de Janeiro	Penna <i>et al.</i> , 2005
<i>O cf. siamensis</i>	Ovaladas y alargadas	60-70	34-42			Archipiélago Azores, Portugal.	Bennouna <i>et al.</i> , 2010
<i>O cf. ovata</i>	Célula ovalada en forma de lágrima	18.75-75	12.5-60	1.5-3.43	10-31	Ancona, Mar Adriático Norte	Accoroni <i>et al.</i> , 2012
<i>O. siamensis</i>	Unas alargadas y delgadas y otras redondeadas y grandes	55-74.5	27-56	1.1-2.1	10.3-11.9	Costa Atlántica de la Península Ibérica	David <i>et al.</i> , 2013
<i>O. rhodesae</i>	Forma ovalada	32-53	23-42			Gran Barreara de Coral, Australia	Verma <i>et al.</i> , 2016
<i>O. siamensis</i>	Células ovales en forma de lágrima	87.5-90	75-80			Caribe Mexicano	Almazán-Becerril <i>et al.</i> , 2016
<i>O cf. ovata</i>	Células en forma de lágrima	39.9-56.4	30.4-47.4	1.1-1.4	7.1-9.7	Isla de Haina, Sur del Mar de China	Zhang <i>et al.</i> , 2018
<i>O siamensis</i>	Forma ovalada y alargado	45.-63.5	25.2-40.5			Norte del Caribe Mexicano	<b>Presente estudio</b>

**Tabla 15.** Descripción de *Ostreopsis heptagona* y taxa relacionados de acuerdo a diferentes autores.

<b>Especie</b>	<b>Forma</b>	<b>DV (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>TA (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>DV: TA radio</b>	<b>Poros Apical</b>	<b>Áreas de colecta</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>O. heptagona</i></b>	Células amplias y ovaladas	96-122	48-70			Knight Key, Florida	Norris <i>et al.</i> , 1985
<b><i>O. heptagona</i></b>	Ovaladas y amplias	80-73	55-53			Archipiélago Azores, Portugal.	Bennouna <i>et al.</i> , 2010
<b><i>O. heptagona</i></b>	Células largas, robustas y de forma ovalada	87.5-112.5	45-70			Caribe Mexicano	Almazán-Becerril <i>et al.</i> , 2016
<b><i>O. heptagona</i></b>	Ovaladas y oblongas	91.21-100.56	57.01-69.32	1.49		Norte del Caribe Mexicano	Presente estudio

### 10.3 Análisis de la region ITS

El uso de los marcadores moleculares permite contar con información más robusta o, al menos, complementar los análisis morfológicos, ya que cuando existe plasticidad fenotípica puede ofrecer una mejor aproximación de la identidad de las especies. Actualmente se han realizado estudios con diferentes marcadores moleculares para poder discernir entre las especies del género *Ostreopsis*. Entre estos se encuentran los espaciadores internos descritos (ADNr ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub>), los dominios (D1/D2) y (D8-D10) de la subunidad grande del ADN ribosomal (LSU ADNr) y los genes mitocondriales citocromo *c* oxidasa (COI) y el citocromo *b* (cob) (Pin *et al.*, 2001; Efimova *et al.*, 2014; Penna *et al.*, 2014).

Del segmento ITS<sub>1</sub>-5.8S-ITS<sub>2</sub> para especies del género *Ostreopsis* son pocas las secuencias que se tienen reportadas de las especies descritas: *O. ovata*, *O. siamensis*, *O. labens*, *O. lenticularis*, *O. rhodesae*, *O. fattorussoi* (David *et al.*, 2013; Accoroni *et al.*, 2016; García-Portela *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2016; Abdennadher *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Chomérat *et al.*, 2019).

La secuencia del Caribe Mexicano que se utilizó en este trabajo está relacionada estrechamente con la cepa denominada *Ostreopsis* sp 5 reportada por Carnicer *et al.* (2015). Morfológicamente los especímenes ilustrados en este trabajo son similares a los descritos por Chomérat *et al.*, (2019) como *O. lenticularis* a partir de muestras de cultivo provenientes de distintas partes de la Polinesia Francesa. Además, las secuencias de ambos sitios (Isla Reunión y Polinesia Francesa) se agrupan formando un grupo monofilético, sin embargo, no pudimos comparar nuestras secuencias con las secuencias de la Polinesia Francesa ya que aún no se encuentran disponibles en GenBank. Lo anterior implica que la secuencia del Caribe Mexicano estaría en el mismo clado monofilético descrito por Chomérat *et al.* (2019). La muestra de los Galápagos (Carnicer en proceso) y la muestra de Hawái (Penna *et al.*, 2014) se agruparon dentro del clado de *O. lenticularis*, sin embargo, las comparaciones morfológicas están pendientes, pues los trabajos no han sido publicados.

La identidad genética entre especies del género *Ostreopsis* no siempre es sencilla ya que es necesario contar con las descripciones morfológicas. Por ejemplo, las secuencias de *O. labens* y *O. lenticularis* del Pacífico son similares entre sí (Pin *et al.*, 2001; Penna *et al.*, 2010), y semejantes también a la cepa denominada *Ostreopsis* sp.6 reportado por Tawong *et al.* (2014) de Tailandia. No obstante, se necesitan datos morfológicos robustos para discernir si estas secuencias pertenecen a identidades taxonómicas diferentes o, sí pertenecen a especies ya descritas. Este problema también lo reportaron Sato *et al.* (2011) pues dos secuencias de extractos del Pacífico Oriental que fueron designadas como *Ostreopsis* sp. se agruparon con el clado de *O. lenticularis* y *O. labens*, pero no fueron descritas morfológicamente.

La misma problemática se puede observar en la especie *O. ovata*, ya que, aunque ha sido la especie más estudiada del género (Accoroni *et al.*, 2011), algunos trabajos muestran un clado robusto de *O. ovata*, subdivididos a su vez en subclados (Tawong *et al.*, 2014) relacionados con su variabilidad genética derivada con los orígenes de las cepas o muestras *in situ* (David *et al.*, 2013; Ariyawansa *et al.*, 2014). Debido a la falta de datos moleculares, morfológicos y morfométricos tanto en muestras *in situ* como de cultivo varios autores no les asignan a especies taxonómicamente válidas ya que existe una gran variabilidad filogenética entre diferentes cepas (Zhang *et al.*, 2018).

#### 10.4 Toxicidad en modelo en ratón

Los extractos de *Ostreopsis* analizados tuvieron un efecto neurotóxico en los animales evaluados. Siete de los ocho extractos (dos extractos de Isla Contoy y cinco de Puerto Morelos) utilizados en el presente estudio presentaron signos clínicos de toxicidad que consistieron en arqueamiento corporal con hundimiento de la columna vertebral (de moderado a severo en las muestras PM5 y IC13 respectivamente), parálisis de los cuartos traseros, pérdida de locomoción y letargo. Estos signos han sido descritos por Riobó (2008) y Riobó *et al.* (2010) en el que realizaron un estudio que incluyó el refinamiento del ensayo en ratón, en el que

analizaron muestras letales y subletales de PLTX. Estos signos coinciden a los signos clínicos característicos descritos para concentraciones subletales de análogos de PLTX durante los primeros minutos.

Ballaentine *et al.* (1988) reportaron concentraciones de hasta 182 UR con muestras ambientales de *O. lenticularis* con una concentración celular de  $149.8 (x10^6)$ , estos valores fueron similares a los reportados por Abdennadher *et al.* (2017) con muestras de cultivo de *O. cf. ovata* ( $3x10^7$ ) que causaron la muerte en ratones entre los 10 y 30 minutos, sin embargo, no reportaron valores de UR. Ambos trabajos reportaron concentraciones celulares 100 veces más altas que las encontradas en este estudio.

Tawong *et al.* (2014) reportaron concentraciones letales de dos extractos donde el tiempo de muerte varió entre 10 y 30 minutos después de la aplicación de extractos en concentraciones celulares de  $2.0x10^5$  cel con *Ostreopsis* sp. 6, mientras que con el extracto de *Ostreopsis* sp. 7 con una densidad de  $5.0x10^5$  cel se murieron los ratones varias horas después. Sin embargo, antes de registrarse la mortalidad, los animales presentaron signos clínicos similares a los descritos en este estudio así como en otros estudios en el que se utilizaron modelos murinos (Rhodes *et al.*, 2000; Aligizaki *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2011; Ciminiello *et al.*, 2012).

Una especie reportada en el presente estudio fue *O. heptagona*, actualmente solo se tienen pocos estudios toxicológicos de esta especie y no se conocen los tipos de análogos de PLTX presentes, sin embargo, es considerada una especie tóxica Norris *et al.* (1985) describieron concentraciones letales con extractos de esta especie ( $LD_{50} > 5x10^6$  cél/kg) en bioensayo en ratón, por lo que es de interés la realización de futuras investigaciones con la finalidad de determinar su composición química pues en el Caribe Mexicano se han reportado concentraciones de *O. heptagona* de hasta  $\sim 53,231$  cel  $g^{-1}$  PHM en Puerto Morelos (Irola-Sansores *et al.*, 2018) y en los extractos reportados en este estudio (Tabla. 13) los signos clínicos se asocian a síntomas de intoxicación por PLTX y/o análogos, sin embargo las densidades celulares de los extractos utilizados en este trabajo fueron menores.

La PLTX es muy tóxica por vía intravenosa en conejos, perros, monos, conejillos de indias y ratas. La  $LD_{50}$  se ha estimado entre 25 y 89 ng/kg, en dosis letales en

diversos modelos los animales mueren en minutos derivado de una intensa vasoconstricción, aumento de la presión arterial e insuficiencia cardiaca, entre otros signos (Patocka *et al.*, 2015; 2018). Los LD<sub>50</sub> por i.p. son similares, le siguen las inyecciones vía intramuscular y tópica. La PLTX también es altamente tóxica por vía intracraneal (Patocka *et al.*, 2015; 2018). La dosis letal de esta toxina en ratones por esta vía se encuentra alrededor de 2 µg/kg en dos horas. La PLTX es menos tóxica por vía oral en ratones (LD<sub>50</sub>: 651-767 ng/kg), se ha calculado aproximadamente en el orden tres veces menor que la vía i.p., esto podría ser derivado de su estructura molecular hidrofílica muy grande y que por lo tanto sea un poco más lenta su absorción a través del tracto gastrointestinal a través del peritoneo (Patocka *et al.*, 2015; 2018).

La PLTX induce en un ratón un aumento de los niveles de creatinina-fosfoquinasa (CPK), lactato deshidrogenasa (LDH) y trasaminasa acético glutámico-oxal (o) (GOT) (Sosa *et al.*, 2009). En la histopatología se ha observado en este modelo inflamación del estomago, hígado, páncreas, así como alteraciones estructurales en células del musculo cardiaco y esquelético (Terao *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 1996; Ito y Yasumoto, 2009; Del Favero *et al.*, 2013; Pelin *et al.*, 2014). Otros estudios han demostrado que esta toxina vía i.p. en ratones se adhiere al peritoneo, con dilatación y el intestino, también puede provocar necrosis unicelular en el intestino delgado y otras células. Estudios realizados en los que se utilizo microscopía electrónica se pudieron observar hinchazón de las mitocondrias y la separación de organelos, perdida de micro-vellosidades de los túbulos renales y vacuolización de las células acinares pancreáticas (Terao *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 1996; Ito y Yasumoto, 2009; Del Favero *et al.*, 2013; Pelin *et al.*, 2014). En relación con ello también es conocido que la PLTX en casos crónicos ha sido descrita como promotor tumoral de piel en modelos murinos (Fujiki *et al.*, 1983 y 1986; Wattenberg, 2007).

Otro punto de interés con las especies de *Ostreopsis* del presente estudio, está relacionado a la evaluación del efecto de la temperatura del agua de mar en su crecimiento así como en su toxicidad (tanto en estudios ambientales así como ecofisiológicos en condiciones controladas de laboratorio) ya que se ha descrito que en *O. lenticularis* y en *O. ovata*, el aumento en la temperatura de cultivo puede

incrementar o disminuir su toxicidad (Ballaentine *et al.* 1988; Ashton *et al.*, 2003; Granéli *et al.*, 2011). Ashton *et al.* (2003) describieron que las células de *Ostreopsis lenticularis* al ser expuestas a altas temperaturas (30-31°C) por un tiempo prolongado incrementaba la toxicidad. En otras especies de dinoflagelados bentónicos como *Gambierdiscus* y *Prorocentrum*, también se ha visto este efecto en condiciones de cultivo (Morton *et al.*, 1992; López-Rosales *et al.*, 2014). Para elucidar el efecto de la temperatura en la toxicidad de las especies presentes en la zona es necesario el establecimiento de cultivos de estas especies de esta zona del Caribe.

#### 10.5 Toxicidad en modelo de *Artemia salina*.

Los ensayos con *A. salina* son utilizados en estudios ecotoxicológicos debido a su amplia adaptabilidad en condiciones ambientales adversas y su alta sensibilidad a sustancias tóxicas (Faimali *et al.*, 2012). El ensayo de toxicidad en artemias se ha utilizado para evaluar la actividad tóxica de una gran diversidad de compuestos bioactivos como fármacos (sintéticos y de origen natural), extractos de plantas medicinales, tóxicos y toxinas (Persoone y Wells, 1987; Dvorak *et al.*, 2012). Entre las que se incluyen toxinas de origen acuático producidas por microalgas como cianobacterias y dinoflagelados marinos, entre otros (Rhodes y Syhre, 1995; Vezie *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1999; Metcalf *et al.*, 2002; Ajuzie, 2007; Neves *et al.*, 2017). Este método se basa en la evaluación de la signología presentada y la patofisiología en las artemias, pero particularmente en la mortalidad en ensayos agudos alrededor de 48 h (Dvorak *et al.*, 2012). Ejemplos sobre el uso de este modelo en la evaluación toxicológica de dinoflagelados béntónicos y sus toxinas han sido descritos en *P. lima* (Rhodes y Syhre, 1995). En este estudio, los autores evaluaron la actividad de toxinas DSP de una cepa de esta especie, la cual provocó la muerte de *A. salina* en menos de 20 h por el consumo de dicho dinoflagelado. Otros autores como Heredia-Tapia *et al.* (2002) y Campa-Córdova *et al.* (2009) describieron el efecto tóxico y mortalidad en adultos de *A. salina* utilizando distintas concentraciones celulares (2000 cel/mL provocaron una mortalidad de 100% en las primeras 5 h en una exposición aguda) de *P. lima* (PRL-1) aislada de la Isla el Pardito en el Golfo de



California. Recientemente Ajuzi (2007), describió los signos presentados en nauplios de *A. salina* expuestos a *P. lima* y los comparó con grupos control negativo. Describió el comportamiento de este grupo control con un nado activo utilizando los apéndices cefálicos, mientras que los nauplios expuestos a *P. lima* perdieron el equilibrio, nadaron erráticamente y se hundieron en la placa en donde estaban depositados hasta su muerte.

Otros autores como Neves *et al.* (2007), describieron que la exposición a dinoflagelados tóxicos, provoca un efecto directo en el comportamiento del nado y la sobrevivencia de *A. salina*, que en el caso de ácido okadaico y análogos, puede ser derivado de alteraciones fisiológicas en el metabolismo de *A. salina* que se centran en la pérdida de fluidos y el control en la dinámica de tales. Las artemias normales (saludables), son nadadores activos, por lo que cualquier afectación en su actividad natatoria se puede atribuir como resultado del efecto de agentes exógenos (Kelly *et al.*, 1992; Faimali *et al.*, 2012). En este caso por la acción de directas toxinas contenidas en los extractos de *Ostreopsis*.

En el presente estudio, se utilizaron artemias adultas, que por su tamaño y estructura de órganos permitieron una observación rápida y clara en el monitoreo de su signología, así como facilitó su contabilización durante las distintas lecturas que duró el ensayo. Cabe señalar que los extractos más tóxicos, *Ostreopsis* (en este estudio), utilizando este modelo, también lo fueron el ensayo en ratón, pues las muestras PM5 y IC13 presentaron la mayor toxicidad, siendo tóxica en el primer caso (50% mortalidad) y muy tóxica en el segundo (90% de mortalidad). El extracto IC12 (que contenía la concentración más baja de células) coincidentemente fue inocua en ambos análisis toxicológicos, por lo que en general se puede observar una relación entre ambos ensayos toxicológicos.

Autores como Vezje *et al.* (1996), encontraron una buena correlación entre el ensayo en ratón y el modeo en artemia, después de analizar dispersas cepas de cianobacterias productoras de hepatotoxinas, describieron que la mayoría de ellas fueron hepatotóxicas en los dos bioensayos toxicológicos. Sin embargo, estas relaciones se deben evaluar en cada caso con base en el tipo de toxinas.

En estos estudios semejantes, pero a partir de extractos de pescado con ciguatoxinas como el realizado por Granade *et al.* (1976); Ley-Martínez *et al.* (2017) y Ley-Martínez *et al.* (2018) evaluaron la toxicidad de extractos en ensayos con *A. salina* registrando mortalidades de entre el 20-100% en ensayos agudos de 24 h, mientras que los extractos menos tóxicos los porcentajes de mortalidad fueron alrededor del 5 al 10% entre las que se incluyen muestras del Caribe Mexicano.

De manera específica en el caso de la PLTX y análogos Ramos y Vasconcelos (2010) y Munday (2011) describieron datos más actuales sobre los efectos tóxicos de estas toxinas en diferentes modelos biológicos tanto en vertebrados como en invertebrados marinos, sin embargo, todavía es poco el conocimiento existente y este se relaciona principalmente con los efectos de la PLTX en equinodermos, moluscos, crustáceos y ranas. Recientemente también se evaluó la toxicidad de *O. ovata* en *A. salina* y otros invertebrados acuáticos (*Amphibalanus amphitrite* y *Tigriopus fuyus*) y vertebrados (*Dicentrarchus labrax*). El modelo de artemia fue muy sensible (incluso en concentraciones por debajo del umbral de alarma ambiental establecido por el Ministerio de Salud de Italia) a las toxinas de *Ostreopsis*, ya que presentaron los mayores porcentajes de mortalidad. Feimali *et al.* (2012) describieron que la sensibilidad de estos organismos puede deberse a que la PLTX y análogos ejercen una potente actividad biológica al alterar los mecanismos de la homeostasis iónica, interrumpiendo las funciones de la membrana celular, con una pérdida de regulación iónica, que puede llevar a un fallo osmorregulador. La bomba de Na/K, o Na K-ATPasa, es una enzima clave para la homeostasis de la presión ósmótica, el volumen celular y el mantenimiento de gradientes electroquímicos.

En la figura 21 se puede observar las lesiones en artemias producidas por los extractos de *Ostreopsis* utilizadas en este estudio, las cuales fueron severas en el caso del extracto IC13 que consistieron en cambios de coloración (oscurecimiento), desarreglo y fragmentación de los tejidos, daños en las branquias, aumento de volumen (posiblemente por el ingreso excesivo de agua, al verse afectada la bomba que regula la entrada y salida de líquidos), pérdida de extremidades y necrosis. Esta patología puede estar relacionada a la acción de PLTX y análogos por contacto (ruptura celular y liberación de contenido debido a

vasoconstricción, producción de hemolisis y muerte celular descrita en la literatura especializada (Munday 2011; Ramos y Vasconcelos, 2010; Patocka *et al.*, 2015; 2018) y concuerda con los posibles mecanismos de acción de PLTX y análogos descritos por Feimali *et al.* (2012).

Sin embargo, aun falta el desarrollo de investigaciones a nivel celular, bioquímico y genético, sobre las causas de esta alta sensibilidad de las artemias a las toxinas de *Ostreopsis*, ya que por su particular fisiología este modelo de estudio es de utilidad no solo en la detección de la PLTX y sus análogos sino posiblemente en la generación de conocimiento nuevo sobre los mecanismos de acción de estas toxinas en invertebrados acuáticos, también es recomendable el análisis histopatológico de las propias artemias adultas, al igual que el uso de otros extractos con concentraciones más altas de *Ostreopsis* spp tanto de muestras ambientales como de células cultivadas aisladas de esta zona del Caribe Mexicano, por lo que es necesario en un futuro el establecimiento de cultivos de este género para su evaluación.

## 11. CONCLUSIONES

- Las abundancias del género *Ostreopsis* sp. sobre *Dictyota* fueron mayores en el arrecife de Ixlaché en el mes de noviembre y en Puerto Morelos en el sitio de La Bonanza en el mes de mayo.
- La profundidad se correlacionó negativamente en *Ostreopsis* en el sitio de Puerto Morelos, ya que las abundancias disminuyeron en los sitios más profundos.
- Se identificaron mediante morfología y morfometría tres especies de *Ostreopsis*: *O. lenticularis*, *O. heptagona* y *O. cf. siamensis* en ambos sitios de estudio.
- En las pruebas morfométricas la relación isométrica entre el diámetro dorsoventral-transdiámetro fueron las mas altas para *O. lenticularis* y *O. heptagona*, sin embargo, para *O. cf. siamensis* la relación positiva se dio

entre el diámetro dorsoventral de la hipoteca y el largo de la segunda antapical (2''').

- Se obtuvo una secuencia de la región ITS del rDNA y se identificó a *O. lenticularis* en la zona Norte del Caribe Mexicano.
- Mediante el modelo en ratón, todos los extractos a excepción del IC12 (que contenía la menor concentración de células) de *Ostreopsis* spp. provocaron signos de intoxicación, siendo los extractos PM5 y IC13 que provocaron la mayor cantidad de signos de intoxicación de moderados a severos. Estos signos tuvieron un efecto predominante neurotóxico que es coincidente a los descritos para la presencia de PLTX y análogos en concentraciones subletales.
- En la artemia los extractos de *Ostreopsis* también provocaron toxicidad. Se observó nado errático y lento, golpeteo en las paredes del recipiente y obscurecimiento en las artemias, movimiento lento de branquias y muerte. Los extractos más tóxicos (al igual que el ensayo en ratón) fueron el PM5 de Puerto Morelos y el IC13 de Isla Contoy, los cuales causaron el 50% y 90% de mortalidad, siendo clasificados como tóxico y muy tóxico. Se documentó daños severos producidos por el extracto IC13 en la morfología de las artemias que consistieron en desarreglo estructural, fragmentación de tejido, branquias, aumento de volumen, pérdida de extremidades y necrosis, signos que son descritos en la fisiopatología de PLTX y análogos.

## 12. BIBLIOGRAFIA

Abdennadher, M., Zouari, A. B., Sahnoun, W. F., Alverca, E., Penna, A. y Hamza, A. (2017) *Ostreopsis* cf. *ovata* in the Gulf of Gabès (south-eastern Mediterranean Sea): morphological, molecular and ecological characterization. *Harmful Algae*, 63, pp. 56-67.

Accoroni, S., Percopo, I., Cerino, F., Romagnoli, T., Pichierri, S., Perrone, C. y Totti, C. (2015) Allelopathic interactions between the HAB dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* and macroalgae. *Harmful Algae*, 49, pp. 147-155.

Accoroni, S., Romagnoli, T., Colombo, F., Pennesi, C., Di Camillo, C. G., Marini, M., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Penna, A. y Totti, C. (2011) *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile. *Marine Pollution Bulletin*, 62, pp. 2515-2519.

Accoroni, S., Romagnoli, T., Penna, A., Capellacci, S., Ciminiello, P., Dell' Aversano, C., Tartaglione, L., Abboud-Abi, S. M., Giussani, V., Asnaghi, V., Chiantore, M. y Totti, C. (2016) *Ostreopsis fattorussoi* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic *Ostreopsis* species from the eastern Mediterranean Sea. *Journal Phycology*, 52, pp. 1064-1084.

Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierri, S., Colombo, F. y Totti, C. (2012) Morphometric analysis of *Ostreopsis* cf. *ovata* cells in relation to environmental conditions and blooms phases. *Harmful Algae*, 19, pp. 15-22

Adachi, M., Sako, Y. y Ichida, Y. (1994) Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). *Journal Phycology*, 30, pp. 857-863.

Adl, S. M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J.R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., Karpov, T., Karpov J., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., Mccourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. y Taylor, M. F. J. R. (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), pp. 399-451

Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. L., Lynn, D. H., Mcmanus., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. y Spiegel, F. W. (2012) The revised classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), pp. 429-493

Ajuzie, C. C. (2007) Palatability and fatality of the dinoflagellate *Prorocentrum lima* to *Artemia salina*. *Journal Applied Phycology*, 19, pp. 513-519.

Alcala, A. C., Alcala, L. C., Garth, J. S., Yasumura, D. y Yasumuto, T. (1988) Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon*, 26(1), pp. 105-107.

Alcala, A. C. y Halstead, B. W. (1970) Human fatality due to ingestion of the crab *Demania toxica* in the Philippines. *Clinical Toxicology*, 3, pp. 609.

Aligizaki, K., Katokou, P., Nikolaidis, G. y Panou, A. (2008) First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon*, 51, pp. 418-427.

Aligizaki, K. y Nikolaidis, G. (2006) The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the north Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae*, 5, pp. 717-730.

Almazán-Becerril, A., Escobar-Morales, S., Irola-Sansores, E. D. y Delgado-Pech, B. (2016) Morfología y taxonomía de los géneros *Ostreopsis* y *Coolia* en el Caribe Mexicano en: García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S. I., Olivos-Ortiz, A. y Núñez-Vázquez, E. (eds) 2016. *Florecimientos Algales Nocivos en México*. Ensenada, México. CICESE. pp. 379-392

Almazán-Becerril, A., Escobar-Morales, S., Rosiles-González, G. y Valadez, F. (2015) Benthic-epiphytic dinoflagellates from the northern portion of the Mesoamerican Reef System. *Botanica Marina*, 58(2), pp. 115-118.

Ashton, M., Tosteson, T. y Tosteson, C. (2003) The effect of elevated temperature on the toxicity of the laboratory cultured dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* (Dinophyceae). *Revista Biología Tropical*, 51(4), pp. 1-6.

Barbany, M., Rosell, M. y Salvador, A. (2018) Toxicidad corneal por exposición a palitoxina. *Archivos de la Sociedad Española de Oftamología*, 1426, pp. 1-4.

Ballentine, D. L., Tosteson, T. R. y Bardales, A. T. (1988) Population dynamics and toxicity of natural populations of benthic dinoflagellates in southwestern Puerto Rico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 119, pp. 201-212.

Barroso-García, P., Rueda de la Puerta, P., Parrón-Carreño, T., Marín-Martínez, P. y Guillén-Enríquez, J. (2008) Brote con síntomas respiratorios en la provincia de Almería por una posible exposición microalgas tóxicas. *Gaceta sanitaria*, 22(6), pp. 578-584.

Bennouna, A., El Attar, J., Abouabdellah, R., Palma, S., Penna, A. y Moita, M. T. (2010) First record of *Ostreopsis heptagona*, *O. cf siamensis* and *O. ovata* in the Azores archipiélago, Portugal. *Harmful Algae News*, 42, pp. 1-3.

Besada, E. G., Loeblich, L. A. y Loeblich III, A. R. (1982) Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas: *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. *Bulletin of Marine Science*, 32(3), pp. 723-735.

Blanfuné, A., Boudouresque, C. F., Gossel, H. y Thibaut, T. (2015) Distribution and abundance of *Ostreopsis* spp. and associated species (Dinophyceae) in the

northwestern Mediterranean: the region and the macroalgal substrate matter. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, pp. 12332-12346.

Boisnoir, A., Pascal, P.Y., Cordonnier, S. y Lemée. (2018) Depth distribution of benthic dinoflagellates in the Caribbean Sea. *Journal of Sea Research*, 135, pp 74-83.

Bravo, I., Vila, M., Casabianca, S., Rodríguez, F., Rial, P., Riobó, P. y Penna, A. (2012) Life cycle stages of the benthic palytoxin-producing dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 18, pp. 24-34.

Brissard, C., Hervé, F., Sibat, M., Séchet, V., Hess, P., Amzil, Z. y Herrenknecht, C. (2015) Characterization of ovotoxin-h, a new ovotoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovotoxin analysis and purification. *Journal of Chromatography A*, 1388, pp. 87-101.

Campa-Córdova, A. I., Núñez-Vásquez, E. J., Luna-Gonzales, A., Romero-Geraldo, M. J. y Ascencio, F. (2009) Superoxide dismutase activity in juvenile *Litopenaeus vannamei* and *Nodipecten subnodosus* exposed to the dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C*, 149 (3), pp. 317-322.

Carnicer, O., Tunin-Ley, A., Andree, K. B., Turquet, J., Diogène, J. y Fernández-Tejedor, M. (2015) Contribution to the genus *Ostreopsis* in Reunion Island (Indian Ocean): molecular, morphologic and toxicity characterization. *Cryptogamie Algologie*, 36(1), pp. 101-119.

Carnicer, O., De La Fuente, P., Canepa, A., Keith, I., Rebolledo-Monsalve, E., Diogène, J. y Fernández-Tejedor, M. (2019) Marine Dinoflagellate Assemblage in the Galápagos Marine Reserve. *Frontiers in Marine Science*, 6, pp. 235.



Casabianca, S. Perini, F., Casabianca, A., Battocchi, C., Giussani, V., Chiantore, M. y Penna, A. (2014) Monitoring toxic *Ostreopsis cf. ovata* in recreational waters using a qPCR-based assay. *Marine Pollution Bulletin*, 88, pp. 102-109.

Chang, F. H., Shimizu, Y. Hay, B., Steward, R., Mackay, C. y Taster, R. (2000) Three recently recorded *Ostreopsis* spp. (Dinophyceae) in New Zealand: temporal and regional distribution in the upper North Island from 1995 to 1997. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34, pp. 29-39.

Chomérat, N., Bilién, G., Derrien, A., Henry, K., Ung, A., Viallon, J., Darius, H. T., Gatti, C. M., Roué, M., Hervé, F., Réveillon, D., Amzil, Z. y Chinain, M. (2019) *Ostreopsis lenticularis* Y. Fukuyo (Dinophyceae, Gonyaulacales) from French Polynesia (South Pacific Ocean): A revisit of its morphology, molecular phylogeny and toxicity. *Harmful Algae*, 84, pp. 95-111

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G., Tartaglione, L., Grillo, C. y Melchiorre, N. (2006) The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry Method. *Analytical Chemistry*, 78(17), pp. 6153-6159.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C. y Melchiorre, N. (2008) Putative palytoxin and its new analogue, ovotoxin-a in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *Journal American Society for Mass Spectrometry*, 19, pp. 111-120.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D. Fattorusso, E., Forino, M. y Tartaglione, L. (2011) LC-MS of palytoxin and its analogues: State of the art and future perspectives. *Toxicon*, 57, pp. 376-389.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L. y Tartaglione, L. (2012) Isolation and structure elucidation of ovotoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. *Journal of the American Chemical Society*, 134, pp. 1869-1875.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Benedettini, G., Onorari, M., Serena, F., Battocchi, C., Casabianca, S. y Penna, A. (2014) First finding of *Ostreopsis cf. ovata* toxin in marine aerosols. *Environmental Science y Technology*, 48, pp. 3532-3540.

Córtes, M. C., Cortés- Altamirano, R., Sierra-Beltrán, A. y Reyes-Juárez, A. (2005) *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae) a new tycho planktonic record from Isabel Island National Park, Pacific Mexico. *Harmful Algae News*, 28, pp. 4-5.

David, H., Laza-Martínez, A., Miguel, I. y Orive, E. (2013) *Ostreopsis cf. siamensis* and *Ostreopsis cf. ovata* from the Atlantic Iberian Peninsula: Morphological and phylogenetic characterization. *Harmful Algae*, 30, pp. 44-55.

Deeds, J. y Schwartz, M. D. (2010) Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicon*, 56, pp. 150-162.

Del Favero, G., Beltramo, D., Sciancalepore, M; Lorenzon, P., Coslovich, T., Poli, M., Testai, E., Sosa, S. y Turbaro, A. (2013) Toxicity of palytoxin after repeated oral exposure in mice and *in vitro* effects on cardiomyocytes. *Toxicon*, 75, pp. 3-15.

Delgado, G., Lechuga-Devéze, C. H., Popowski, G., Troccoli, L. y Salinas, C. A. (2006) Epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera in the northwestern coast of Cuba. *Revista Biología Tropical*, 54, pp. 299-310.

Delgado-Pech, B. (2016) *Comunidades de macroalgas en arrecifes coralinos de Quintana Roo: composición taxonómica y patrones de colonización*. Tesis de

maestría. Cancún, Quintana Roo, México. Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Di Turi, L., Caputo, S., Marzano, M. C., Pastorelli, A. M., Pompei, M., Rositani, L. y Ungaro, N. (2003) *Ostreopsidaceae* (Dinophyceae) presence along the coastal area of Bari. *Biología Marina Mediterránea*, 10, pp. 675-678.

Dvorak, P., Benova, K. y Vitek, J. (2012) Alternative Biotest on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology*. Ghousia Begum (Ed.) InTech, Available.

Durando, P., Ansaldi, F., Oreste, P., Moscatelli, P., Marensi, L., Grillo, C., Gasparini, R. y Icardi, G. (2007) *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two-years syndromic surveillance, 2005-06, in north-west Italy. *Eurosurveillance* 12(23), pp. 3212.

Efimova, K. V., Orlova, T. Y. y Brykov, V. A. (2014) Phylogenetic characterization of cryptic species of the marine dinoflagellate, *Ostreopsis* sp. Schmidt, 1902, from Russian coastal waters, the Sea of Japan. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 5(4), pp. 317-332.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). (2009) Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish- Palytoxin group. *EFSA Journal*, 7(12), pp. 1393.

Escalera, L., Benvenuto, G., Scalco, E., Zingone, A. y Montresor, M. (2014) Ultraestructura features of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae). *Protist*, 165, pp. 260-274.

Faimali, M., Giussani, V., Piazza, V., Garaventa, F., Corra, C., Asnaghi, V., Privitera, D., Gallus, L., Cattaneo-Vietti, R., Mangialajo, L. y Chiantore, M. (2012) Toxic effects

of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Marine Environmental Research*, 76, pp. 76-97.

Faust, M. A. (1996) Further SEM study of marine dinoflagellates: The genus *Ostreopsis* (Dinophyceae). *Journal Phycology*, 32, pp. 1053-1065

Faust, M. A. (1999) Three new *Ostreopsis* species (Dinophyceae): *O. marinus* sp. nov., *O. belizeanus* sp. nov., and *O. caribbeanus* sp. nov. *Phycologia*, 38(2), pp. 92-99.

Faust, M. A. y Morton, S. L. (1995) Morphology and ecology of the marine dinoflagellate *Ostreopsis labens* sp. nov. (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, 31, pp. 456-463.

Feldman, D. B. y Seelly, J. C. (1988). Necropsy Guide: Rodents and the rabbit. *CRC Press*. Florida, U.S.A.

Fensome, R. A., Taylor, F. J. R., Norris, G., Sarjeant, W. A. A., Wharton, D. I. y Williams, G. L. (1993) A classification of living and fossil dinoflagellates. *Micropaleontology Special*, (7), pp. 1-337

Ferrari, A., Schiavetti, A., Bolognesi, C., Pavino, D. y Vivaldi, B. (2013) Capítulo 19: Interdisciplinary evaluation of toxicity in *Ostreopsis ovata*: Algal biotoxins en: Boiti, C. (eds) 2013. *Trends in Veterinary Sciences*. Berlin Heidelberg, pp. 103-107.

Franchini, A., Casarini, L. y Ottaviani, E. (2008) Toxicological effects of marine palytoxins evaluated by FETAX assay. *Chemosphere*, 73, pp. 267-271.

Fujiki, H., Masami, S., Nakayasu, M., Hakii, H., Horiuchi, T., Takayama, S. y Sugimura, T. (1986) Palytoxin is a non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate type

tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 7(5), pp. 07-710.

Fujiki, H., Suganuma, M., Tahira, T., Yoshioka, A., Nakayasu, M., Endo, Y., Shudo, K., Takayam, S., Moore, R. E. y Sugimura T. (1983) Nakahara memorial lectura. Nex classes of tumor promoters: teleocidin, aplysiatoxin, and palytoxin. *Princess Takamatsu Symposia*, 14, pp. 37-45.

Fukui, M., Murata, M., Inoue, A., Gawel, M. y Yasumoto, T. (1987) Occurrence of Palytoxin in triggerfish *Melichthys vidua*. *Toxicon*, 25, pp. 1121-1124.

Fukuyo, Y. (1981) Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in Coral Reefs. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47(8), pp. 967-978.

Fusetani, N., Sato, S. y Hashimoto, K. (1985) Ocurrance of a water soluble toxin in a parrotfish (*Ypsiscarus ovifrons*) which is probably responsible for parrotfish liver poisoning. *Toxicon*, 23(1), pp. 105-112.

Gallitelli, M., Ungaro, N., Addante, L. M., Procacci, V., Silver, N. G. y Carlo Sabbá. (2005) Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperature climate. *JAMA*, 293(21), pp. 2599-2600.

Gárate-Lizárraga, I., González-Armas, R. y Okolodkov, Y.B. (2018) Ocurrance of *Ostreopsis lenticularis* (Dinophyceae: Gonyaulacales) from the Archipiélago de Revillagigedo, Mexican Pacific. *Marine Pollution Bulletin*, 128, pp. 390-395.

García-Altare, M., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Carnicer, O., Iglesia, P., Forino, M., Diogéne, J. y Ciminiello, P. (2015) The novel ovotoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as a putative palytoxin) from *Ostreopsis cf. ovata* (NW Mediterranean Sea): structural insights by LC-high resolution MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, pp. 1191-1204.

García-Portela, M., Riobó, P., Franco, J. M. Bañuelos, R. M. y Rodríguez, F. (2016) Genetic and toxinological characterization of North Atlantic strains of the dinoflagellate *Ostreopsis* and allelopathic interactions with toxic and non-toxic species from the genera *Prorocentrum*, *Coolia* and *Gambierdiscus*. *Harmful Algae*, 60, pp. 57-69.

Ghinaglia, L. T., Herrera-Silveira, J. A. y Comín, F. A. (2004) Structural variations of phytoplankton in the coastal seas of Yucatan, Mexico. *Hydrobiologia*, 519, 85-102.

Gómez, F., Moreira, D. y López-García, P. (2011) Avances en el estudio de los dinoflagelados (Dinophyceae) con la filogenia molecular. *Hidrobiológica*, 21(3), pp. 343-364.

Gonzales, R. B. y Alcalá, A. C. (1977) Fatalities from crab poisoning on Negros Island, Philippines. *Toxicon*, 15, pp. 169-170.

Gránade, H. R., Cheng, P. C. y Doorenbos, N. J. (1976) Ciguatera I: Brine shrimp (*Artemia salina*) larval assay for ciguatera toxins. *Journal Pharmaceutical Sciences*, 65, pp. 1414-1415.

Granéli, E., Vidyarthna, N. K., Funari, E., Cumaranatunga, P. R. T. y Scenati, R. (2011) Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? *Harmful Algae*, 10, pp. 165-172.

Guerrini, F., Pezzolesi, L., Feller, A., Riccardi, M., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., Forino, M. y Pistocchi, R. (2010) Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon*, 55, pp. 211-220.

Hall, C., Levy, D. y Sattler, S. (2015) A case of palytoxin in a home aquarium enthusiast and his family. Hindawi Publishing Corporation, pp. 1-3.

Hashimoto, Y., Fusetani, N. y Kimura, S. (1969) Aluterin: A Toxin of Filefish, *Alutera scripta*, probably originating from a zoantharian *Palythoa tuberculosa*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 35 (11), pp. 1086-1093.

Heimann, K., Sparrow, L. y Blair, D. (2009) Interim report on the continuing development of the toxic dinoflagellate atlas. *June Interim Report (Part 1) to the Marine and Tropical Sciences Research Facility. Reef and Rainforest Research Centre Limited*, Cairns, pp. 26.

Hendrich, H. G., Bullock, P. y Petrusz, P. (2004) *The laboratory mouse. The handbook of experimental animals*. Elsevier Academic Press, pp. 600.

Heredia-Tapia, A., Arredondo-Vega, B. O., Núñez-Vázquez, E. J., Yasumoto, Y., Yasuda, M. y Ochoa, J. L. (2002) Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviaella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California Mexico. *Toxicon*, 40, pp. 1121-1127.

Hernández-Terrones, L., Rebolledo-Vieyra, M., Merino-Ibarra, M., Soto, M., Le-Cossec, A. y Monroy-Ríos, E. (2011) Groundwater pollution in a karstic region (NE Yucatan): baseline nutrient content and flux to coastal ecosystem. *Water Air Soil Pollution*, 218, pp. 517-528.

Hoppenrath, M. (2016) Dinoflagellate taxonomy - a review and proposal of a revised classification. *Marine Biodiversity*.

Ichida, S., Tawada, E., Watanabe, Y., Minami, S. y Horiba, M. (1988) Two cases of rhabdomyolysis induced by parrotfish liver poisoning. *Kidney Dialysis Japan*, 25, pp. 541-544.

Irola-Sansores, E.D., Delgado-Pech, B., García-Mendoza, E., Núñez-Vázquez, E., Olivos-Ortiz, A. y Almazán-Becerril, A. (2018) Population dynamics of benthic-epiphytic dinoflagellates on two macroalgae from Coral Reef System of the northern Mexican Caribbean. *Frontiers in Marine Science*, 5(487), pp. 1-14.

Ismael, A. y Halim, Y. (2012) Potentially harmful *Ostreopsis* spp. In the coastal waters of Alexandria – Egypt. *Mediterranean Marine Science*, 13(2), pp. 208-212.

Ito, E., Ohkusu, M. y Yasumoto T. (1996) Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice. *Toxicon*, 34 (6), pp. 643-652.

Ito, E. y Yasumoto, T. (2009) Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes. *Toxicon*, 54(3), pp. 244-251.

Kelly, A. M., Kohler, C. C. y Tindall. D. R. (1992) Are crustaceans linked to the ciguatera food chain? *Environmental Biology Fish*, 33, pp. 275-286.

Kerbrat, A. S., Amzil, Z., Pawlowies, R., Golubic, S., Sibat, M., Darius, H. T., Chinain, M. y Laurent, D. (2011) First evidence of palytoxin and 42-Hydroxy-palytoxin in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Marine Drugs*, 9, pp. 543-560.

Kermarec, F., Dor, F., Armengaud, A., Charlet, F., Kantin, R., Sauzade, D. y Haro, L. (2008) Les risques sanitaires liés à la présence d'*Ostreopsis ovata* dans les eaux de baignade ou d'activités nautiques. *Environnement, Risques y Santé*, 7(5), pp. 357-363

Kodama, A. M., Hokama, Y., Yasumoto, T., Fukui, M., Manea, S. J. y Sutherland, N. (1989) Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *Decapterus macrosoma* (Mackerel). *Toxicon*, 27(9), pp. 1051-1053.



Kofoed, C. A. (1909) On *Peridinium stenii* Jørgensen, with a note on nomenclature of the skeleton of *Peridinidae*. *Archiv für Protistenkunde*, 16, pp. 25-47

Leaw, C. P., Tan, T. H., Lim, H. C., Teng, S. T., Yong, H. L., Smith, K. F., Rhodes, L., Wolf, M., Holland, W. C., Vandersea, M. W., Litaker, R. W., Tester, P. A, Gu, H., Usup, G. y Lim, P. T. (2016) New scenario for speciation in the benthic dinoflagellates genus *Coolia* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 55, pp. 137-149.

Lee, T. H., Chen, Y. M. y Chou, H. N. (1999). Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. *Acta Zoologica Taiwanica*, 10 (1), pp. 1-8.

Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J. P., Bernard, C. y Hennion M. C. (2004) First evidence of playtoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in Southwestern Indian Ocean. *Journal of Phycology*, 40, pp. 1042-105.

Lewis, R. (1995) Detection of Ciguatoxins and related Benthic Dinoflagellate Toxins: in vivo and in vitro methods en: Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. D. y Enevoldsen, H. O. (eds) 1995 *Manual on Harmful Microalgae*, H. O. IOC- UNESCO

Ley-Martínez, T., (2018). *Identificación y cuantificación de ciguatoxinas en peces carnívoros de la Península de Yucatán*. Tesis de Maestría. La Paz, Baja California Sur, México. Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste.

Ley-Martínez, T., Núñez-Vazquez, E. J., Balart-Páez, E., Poot-Delgado, C., Band-Schmidt, C. J. y Almazán-Becerril, A. (2017) Identificación y cuantificación de ciguatoxinas en peces carnívoros de la Península de Yucatán Memorias del IV

Congreso Nacional de la SOMEFAN y de la II Reunión Internacional de la ALEAN. 23-27 de octubre de 2017. Cancún, Quintana Roo, México. pp 88.

Litaker, W. R., Vandesea, M. W., Kibler, S. R., Reece, K. S., Scott, G. P. y Tester, P. A. (2016) *Alexandrium* diversity in Alaska. *Center for Coastal Fisheries and Habitat Research*.

Loi, T. (1998) *Molecular diversity of the predominant clade C zooxanthellae from scleractinian corals of the Great Barrier Reef*. Honour's thesis. Sydney, Australia. Department of Microbiology, University of Sydney.

López-Rosales, L., Gallardo-Rodríguez, J. J., Sánchez-Mirón, A., Cerón-García, M. C., Hassan-Belarbi, E. I., García-Camacho, F. y Molina-Grima, E. (2014). Simultaneous effect of temperature and irradiance on growth and okadaic acid production from the marine dinoflagellate *Prorocentrum belizeanum*. *Toxicon*, 6(1), pp. 229-253.

Manhmud, Y., Arakawa, O. y Noguchi, T. (2000) An epidemic survey on freshwater puffer poisoning in Bangladesh. *Journal Natural Toxins*, 9(4), pp. 319-326.

Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lemee, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P. y Ruggieri, N. (2008) The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Marine Pollution Bulletin*, 56, pp. 1209-1214

Mangialajo, L., Fricke, A., Perez-Gutierrez, G., Catania, D., Jauzein, C. y Lemee, R. (2017) Benthic dinoflagellate integrator (BEDI): A new method for the quantification of Benthic Harmful Algal Blooms. *Harmful Algae*, 64, pp. 1-10.

Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Cattaneo-Vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D.,

Grossel, H., Marco-Miralles F., Masó, M., Reñé, A., Rossi, A. M., Sala, M. M., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M. y Lemée, R. (2011) Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coast. *Toxicon*, 57, pp. 408-420.

Malagoli, D., Casarini, L. y Ottaviani, E. (2008) Effects of the marine toxins okadaic acid and palytoxin on mussel phagocytosis. *Fish Shellfish Immunology*, 24, pp. 180-186.

Metcalf, J. S., Lindsay, J., Beattie, K., Birmingham, A. S., Saker, M. L., Törökne, A. K. y Codd, G. A. (2002) Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon*, 40, pp. 1115-1120.

Ming-Ling, W., Chen-Chang, Y., Jou-Fang, D. y Kuo-Yen, W. (2014) Hyperkalemia, hyperphosphatemia, acute kidney injury, and fatal dysrhythmias after consumption of palytoxin-contaminated goldspot herring. *Annals of Emergency Medicine*, 64(6), pp. 634-636.

Monti, M., Minocci, M., Beran, A. y Ljiljana, I. (2007) First record of *Ostreopsis* cf. *ovata* on macroalgae in the northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 54, pp. 598-601.

Moore, R. E. y Scheuer, P. J. (1971) Palytoxin: A new marine toxin from a coelenterate. *Science*, 172, pp. 495-498.

Moreira, A., Rodríguez, F., Riobó, P., Franco, J. M., Martínez, N., Chamero, D. y Alonso, C. (2012) Notes on *Ostreopsis* sp. from southern-central coast of Cuba. *Cryptogamie Algologie*, 33(2), pp. 217-224.

Morton, S. L., Norris, D. R. y Bomber, J. W. (1992) Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 157(1), pp. 79-90.

Munday, R. (2011) Palytoxin toxicology: animal studies. *Toxicon* 57 (3), pp. 470-477.

Nascimento, S. M., Corrêa, E. V, Menezes, M., Varela, D., Paredes, J. y Morris, S. (2012) Growth and toxin profile of *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil. *Harmful Algae*, 13, pp. 1-9.

Neves, R. A. F., Fernandes, T., Santos, L. N.D. y Nascimento, S. L. (2017) Toxicity of benthic dinoflagellates on grazing, behavior and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. *PLOS ONE*, 12(4), pp. 1-17.

Neves, R. A. F., Contins, M. y Nascimento, S. M. (2018) Effects of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* on fertilization and early development of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Marine Environmental Research*, 135, pp. 11-17

Noguchi, T., Hwang, D. F., Arakawa, O., Daigo, K., Sato, S., Ozaki, H., Kawai, N., Ito, M. y Hashimoto, K. (1987) Palytoxin as the causative agent in the parrotfish poisoning en: Gopalakrishnakone, P. y Tan, C. K. (eds). *Progress in Venom and Toxin Research: Proceedings of the first Asia-Pacific Congress on animal, plant and microbial toxins*. Faculty of Medicine, National University of Singapore, pp. 325-335.

Nordt, S. M., Wu, J., Zahller, S., Clark, R. F. y Cantrell, F. L. (2011) Palytoxin poisoning after dermal contact with zoanthid coral. *The Journal of Emergency Medicine*, 40(4), pp. 397-399.

Norris, D. R., Bomber, J. W. y Balech, E. (1985) Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida Keys. I. *Ostreopsis heptagona* sp. nov. en: Anderson,

D. M., White, A. W. y Baden, D. G. (eds) 1985. *Toxic Dinoflagellates*. New York, United States. Elsevier, pp. 39-44.

Núñez-Vázquez, E. J. (2005) *Biotoxinas Marinas en peces comestibles de Baja California Sur, México: origen, identificación y cuantificación*. Tesis de licenciatura. La Paz, Baja California Sur, México. Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Núñez-Vázquez, E. J., Hernández-Sandoval, E. F., Cordero-Tapia, A., Almazán-Becerril, A., Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, J., López-Cortés, D., Salinas-Zavala, C. A., Morales-Zárate, M. V., Mejía-Rebolledo, A. y Robles-Hernández, R. C. (2013) *Presencia de microalgas bénticas potencialmente nocivas y mortandad de peces asociadas al Parque Marino de Cabo Pulmo, B.C.S.* II Congreso de la Sociedad Mexicana para el Estudio de los florecimientos Algales Nocivos. SOMEFAN, Universidad de Colima. Manzanillo, Colima.

Núñez-Vázquez, E. J., Almazán-Becerril, A., López-Cortés, D., Heredia-Tapia, A., Hernández-Sandoval, F., Band-Schmidt, C. J., Bustillos-Guzmán, L., Gárate-Lizárraga, I., García-Mendoza, E., Salinas-Zavala, C. A. y Cordero-Tapia, A. (2019) Ciguatera in Mexico (1984-2013). *Marine Drugs*, 17 (1), pp. 1-28.

Okano, H., Masuoka, H., Kamei, S., Seko, T., Koyabu, S., Tsuneoka, K., Tamai, T, Ueda, K., Nakazawa, S., Sugawa, M., Susuki, H., Watabe, M., Yatani, R. y Nakano, T. (1998) Rhabdomyolysis and myocardial damage induced by palytoxin, a toxin of blue humphead parrotfish. *Internal Medicine*, 37(3), pp. 330-333.

Okolodkov, Y. B., Campos-Bautista, G., Gárate-Lizárraga, I., González-González, J.A., Hoppenrath, M. y Arenas, V. (2007) Seasonal changes of benthic and epiphytic dinoflagellates in the Veracruz reef zone, Gulf of Mexico. *Aquatic Microbial Ecology*, 47, pp. 223-237.

Okolodkov, Y. O., Merino-Virgilio, F. C., Aké-Castillo, J. A., Aguilar-Trujillo, A. C., Espinosa-Matías, S., Herrera-Silveira, J. A. (2014) Seasonal changes in epiphytic dinoflagellate assemblages near the northern coast of the Yucatan Peninsula, Gulf of Mexico. *Acta Botanica Marina*, 107, pp. 121-151.

Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H. y Yasumoto, T. (1999) Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon*, 37, pp. 55-65.

Pagliara, P. y Caroppo, C. (2012) Toxicity assesment of *Amphidinium carterae*, *Coolia cf. monotis* and *Ostreopsis cf. ovata* (Dinphyta) isolated from the northern Ionian Sea (Mediterranean Sea). *Toxicon*, 60, pp. 1203-1214.

Parsons, M. L. y Preskitt, L. B. (2007) A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai. *Harmful Algae*, 6, pp. 658-669.

Patocka, J., Gupta, R., Wu, Q. H. y Kuka. K. (2015) Toxic potential of palytoxin. *Journal Huazhong University of Science and Technology*, 35(5), pp. 773-778.

Patocka, J., Nepovimova, E., Wu, Q. y Kuca, K. (2018) Palytoxin congeners. *Archives of Toxicology*, 92(1), pp. 143-156.

Pelin, M., Sosa, S., Pacor, S., Tubaro, A. Florio, C. (2014) The marine toxin palytoxin induces necrotic death in HaCaT cells through a rapid mitochondrial damage. *Toxicology Letters*, 229, pp. 440-450.

Pelin, M., Sosa, S. y Tubaro, A. (2015) Palytoxins: Toxicological Profile. *Marine and Freshwater Toxins*, pp. 1-14.

Penna, A., Battocchi, C., Capellacci, S., Fraga, S., Aligizaki, K., Lemée, R. y Vernesi, C. (2014) Mitochondrial, but not rDNA, genes fail to discriminate dinoflagellate species in the genus *Ostreopsis*. *Harmful Algae*, 40, pp. 40-50.

Penna, A., Fraga, S., Battocchi, C., Casabianca, S., Giacobbe, M. G., Riobó, P. y Vernesi, C. (2010) A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Journal of Biogeography*, 37, pp. 830-841.

Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M. G., Andreoni, F., Riobó, P. y Vernesi, C. (2005) Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8 rDNA sequences. *Journal of Phycology*, 41, pp. 212-225.

Pezzolesi, L., Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E. D., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L. y Pistocchi, R. (2012). Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis* cf. *ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. *Water Research*, 46, pp. 82-92

Pin, L. C., Teen, L. P., Ahmad, A. y Usup, G. (2001) Genetic diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia. *Marine Biotechnology*, 3, pp. 246-255.

Quod, J. P. (1994) *Ostreopsis mascarenensis* sp. nov (Dinophyceae) dinoflagellé toxique associé à la ciguatera dans l'Océan Indien. *Cryptogamie Algologie*, 15(4), pp. 243-251.

Ramos, V. y Vasconcelos, V. (2010) Palytoxin and analogs: Biological and ecological effects. *Marine Drugs*, 8, pp. 2021-2037.

Reséndiz-Colorado, G. (2019) *Análisis de los transportes de agua en la laguna de Chacmochuch, Quintana Roo durante tres eventos contrastantes del periodo 2013-*

2014. Tesis de Maestría. Cancún, Quintana Roo, México. Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Riobó, A. (2008) *Palytoxinas, ensayos biológicos y métodos químicos para su determinación en organismos marinos*. Tesis Doctoral. Vigo, España. Universidad de Vigo, España.

Riobó, P., Paz, B., Franco, J.M., Vázquez, J. A., Murado, M.A. y Cacho, E. (2008) Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationships. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp. 2639-2647.

Riobó, P. y Franco, J. M. (2011) Palytoxins: Biological and chemical determination. *Toxicon*, 57, pp. 389-375.

Rhodes, L. (2011) World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon*, 57, pp. 400-407.

Rhodes, L., Adamson, J., Suzuki, T., Briggs, L. y Garthwaite, I. (2000) Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34, pp. 371-383.

Rhodes, L. L. y Syhre, M. (1995) Okadaic acid production by New Zealand *Prorocentrum lima* isolate. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, (29), pp. 367-370.

Rhodes, L. L. Towers, N., Briggs, L., Munday, R. y Adamson, J. (2002) Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae). *New Zealand Journal of Marine Freshwater Research*, 36, pp. 631-636.



Salazar-Vallejo, S., Zurita, J. C., Gonzáles, N. E., Pérez-Castillo, F. y Gamboa, H. C. (1993). Áreas costeras protegidas de Quintana Roo. *Biodiversidad marina y costera de México*. CONABIO-CIQRO. Chetumal, Q. Roo, 687-708.

Sato, S., Nishimura, T., Uehara, K., Sakanari, H., Tawong, W., Hariganeya, N., Smith, K., Rhodes, L., Yasumoto, T., Taira, Y., Suda, S., Yamaguchi, H. y Adachi, M. (2011) Phylogeography of *Ostreopsis* along West Pacific Coast, with special reference to a novel clade from Japan. *Plos One*, 6(12), pp. 1-14.

Sansoni, G., Borghini, B., Camici, G., Casotti, M., Righini, P. y Rustighi, C. (2003) Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales: Dinophyceae) un problema emergente. *Biologia Ambientale*, 17(1), pp. 17-23.

Scardala, S., Girolamo, I., Fattorusso, E., Funari, E., Gramaccioni, L., Bertolotto, R., Icardi, G., Mattei, D., Poletti, R. y Testai, E. (2011) Risk management of *Ostreopsis* spp. Blooms along Italian Coasts. *Journal of Coastal Research*, 61, pp. 435-439.

Schmidt, J. (1902) Peridiniales en: Schmidt, J (eds) 1902. *Flora of Koh Chang. Contribution to the knowledge of the vegetation in the Gulf of Siam. Botanisk Tidsskrift*. pp. 212-221

Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP). (1997) Programa de Manejo del Parque Nacional Isla Contoy. *Instituto Nacional de Ecología*, pp. 126.

Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP). (2000) Programa de Manejo Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. *Instituto Nacional de Ecología*, pp. 215

Selina, M. S. y Levchenko, E. V. (2011) Species composition and morphology of dinoflagellates (Dinophyta) of epiphytic assemblages of Peter the Great Bay in the Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 37(1), pp. 23-32.

Selina, M. S., Morozova, T. V., Vyshkvartsev, D. I. y Ourlova, T. Y. (2014) Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species. *Harmful Algae*, 32, pp. 1-10.

Sepúlveda-Villarraga, M. (2017) Dinoflagelados potencialmente tóxicos asociados a macroalgas en la Bahía de La Paz, B.C.S. Tesis de maestría. Instituto Interdisciplinario de Ciencias Marinas. La Paz, Baja California Sur, México.

Shears, N. T. y Ross, P. M. (2009) Bloom of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae*, 8, pp. 916-925.

Sierra, B. A., Cruz, A., Núñez-Vázquez, E., Del Villar, L. M., Cerecero, J. y Ochoa, J.L. (1998). An Overview of the Marine Food Poisoning in Mexico. *Toxicon*, 36 (11), pp. 1493-1502.

Sorenson, E., Lindehoff, E. y Legrand, C. (en proceso) Bacterial community composition of *Alexandrium ostenfeldii* and *Alexandrium minutum*.

Sosa, S., Del Favero, G, De Bortoli, M., Soranzo, M. R, Beltramo, D., Ardizzone, M. y Tubaro, A. (2009) Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice. *Toxicology Letters*, 191, pp. 253-259.

Tabata, H., Nanjo, H., Kokuoka, H., Machida, K. y Miyamura, K. (1989) Two cases of fish poisoning caused by ingesting parrotfish. *Internal Medicine*, 64, pp. 974-977.

Tan, C. T. T. y Lee, E. J. D. (1988) A fatal case of crab toxin (*Lophozozymus pictor*) poisoning. *Asia Pacific Journal of Pharmacology*, 3, pp. 7-9.

Taniyama, S., Arakawa, O., Terada, M., Nishio, S., Takatani, T., Mahmud, T. y Noguchi, T. (2003) *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon*, 42, pp. 29-33.

Taniyama, S., Mahmud, Y., Terada, M., Takatani, T., Arankawa, O. y Noguchi, T. (2002) Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. in Japan. *Journal of Natural Toxins*, 11(4), pp. 277-282.

Tartaglione, L., Iacovo, E. D., Mazzeo, A., Casabianca, S., Ciminiello, P., Penna, A. y Dell'Aversano, C. (2017) Variability in toxin profiles of the Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* and in structural features of the produced ovotoxins. *Environmental Science and Technology*, 51, pp. 13920-13928.

Tartaglione, L., Mazzeo, A., Dell' Aversano, C., Forino, M., Giussani, V., Capellacci, S., Penna, A., Asnaghi, V., Faimali, M., Chiantore, M., Yasumoto, T. y Ciminiello, P. (2016) Chemical, molecular, and eco-toxicological investigation of *Ostreopsis* sp. from Cyprus Island: structural insights into four new ovotoxins by LC-HRMS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, pp. 915-932.

Tartaglione, L., Pelin, M., Morpurgo, M., Dell'Aversano, C., Montenegro, J., Sacco, G, Sacco, G., Sosa, S., Reimer, J. D., Ciminiello, P. y Tubaro, A. (2016) An aquarium hobbyist poisoning: Identification of new palytoxins in *Palythoa* cf. *toxica* and complete detoxification of the aquarium water by activated carbon. *Toxicon*, 121, pp. 41-50.

Tawong, W., Nishimura, T., Sakanari, H., Sato, Shinya., Yamaguchi, H. y Adachi, M. (2014) Distribution and molecular phylogeny of the dinoflagellate genus *Ostreopsis* in Thailand. *Harmful Algae*, 37, pp. 160-171.

Taylor, F. J. R. M. (1999) Charles atwood kofoid his dinoflagellate tabulation system: an appraisal and evaluation of the phylogenetic value of tabulation. *Protist*, 150, pp. 213-220.

Terajima, T., Uchida, H., Abe, N. y Yasumoto, T. (2018) Simple structural elucidation of ostreocin-B, a new palytoxin congener isolated from the marine dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using complementary positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 38, pp.1001-1007

Terajima, T., Uchida, H., Abe, N. y Yasumoto, T. (2018) Structure elucidation of ostreocin-A and ostreocin-E1, novel palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using LC/Q-TOF MS. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, pp. 1-10

Terao, KK, Ito, E. y Yasumoto, T. (1992). Light and electron microscopic observation of experimental palytoxin poisoning in mice. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 85 (5), pp. 494-496.

Thakur, L. K. y Jha. K. K. (2017) Palytoxin-induced acute respiratory failure. *Respiratory Medicine Case Reports*, 20, pp. 4-6.

Tichadou, L., Glaizal, M., Armengaud, A., Grosseil, H., Lemée, R., Kantin, R., Lasalle J.I., Drouet, G., Rambaud, L., Malfait, P. y Haro, L. (2010) Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 of 2009. *Clinical Toxicology*, 48(8), pp. 839-844.

Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E. y Romagnoli, T. (2010) *Ostreopsis ovata* bloom along the Coneiro Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae*, 9, pp. 233-239.

Tubaro, A., Del Favero, G., Beltramo, D., Ardizzone, M., Forino, M., De Bortoli, M., Pelin, M., Poli, M., Bignami, G., Ciminiello, P. y Sosa, S. (2011) Acute oral toxicity in mice of a new palytoxin analog: 42-Hydroxy-palytoxin. *Toxicon*, 57, pp. 755-763.

Tubaro, A., Durando, P., Del Favero, G., Ansaldi, F., Icardi, G., Deeds, J. R. y Sosa, S. (2011) Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon*, 57(3), pp. 478-495.

Uemura, D., Ueda, K. y Hirata, Y. (1981) Further studies on Palytoxin. II. Structure of Palytoxin. *Tetrahedron Letters*, 22(29), pp. 2781-2784

Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Naoki, H., Fujita, T., Kan, Y. y Yasumoto, T. (2001) Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(11), pp. 2585-2588

Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y. y Yasumoto, T. (1995) Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *American Chemical Society*, 117(19), pp. 5389-5390.

Vale, C. y Ares, I. R. (2007) Biochemistry of palytoxins and ostreocinas en: Botana, L. M. (eds) 2007. *Phycotoxins, Chemistry and Biochemistry*. Ames, IA, USA. Blackwell Publishing. pp. 95-118.

Verma, A., Hoppenrath, M., Dorantes-Aranda, J. J., Harwood, D. T. y Murray S. A. (2016) Molecular and phylogenetic characterization of *Ostreopsis* (Dinophyceae)

and the description of a new species, *Ostreopsis rhodesae* sp. nov., from a subtropical Australian lagoon. *Hamful Algae*, 60, pp. 116-130.

Verma, A., Hoppenrath, M., Harwood, Tim., Brett, S., Rhodes, L. y Murray, S. (2016) Molecular phylogeny, morphology and toxigenicity of *Ostreopsis* cf. *siamensis* (Dinophyceae) from temperate south-east Australia. *Phycological Research*, 64, pp. 146-159.

Veze, C., Benoufella, F., Sivonen, K., Bertru, G. y La Planche, A. (1996) Detection of toxicity of cyanobacterial strain using *Artemia salina* and Microtox® assays compared with mouse bioassay results. *Phycologia* (Suplement), pp. 198-202.

Vick. J. A. y Wiles. J. S. (1975) The mechanism of action and treatment of palytoxin poisoning. *Toxicology and applied pharmacology*, 34, pp. 214-223.

Wang, D. Z. (2008) Neurotoxin from marine dinoflagellates: A brief review. *Marine Drugs*, 6, pp. 349-371.

Wen-Xuan, Y., Kit-Ling, F. y Ling-Pong, L. (2017) A cluster of patients with rhabdomyolysis after eating crayfish. *Canadian Journal of Emergency Medicine*, pp. 1-3

Weidmann, S. (1977) Effects of palytoxin on the electrical activity of dog and rabbit heart. Department of pharmacology, University of Puerto Rico, *Medical Science Campus*, San Juan, pp. 1487-1489.

Wettenberg, E. V. (2007) Palytoxin: exploiting a novel skin tumor promoter to explore signal transduction and carcinogenesis. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 292, pp. 24-32.

Wood, P., Alexis, A., Reynolds, T. y Blohm, E. (2018) Aerosolized palytoxin during home marine aquarium maintenance. *Toxicology Communications*, 2(1), pp. 49-52.

Yasumoto, T., Oshima, Y. y Yamaguchi, M. (1978) Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku District. *Bulletin of the Japanese Society of Science Fisheries*, 44(11), pp. 1249-1255.

Yasumoto, T., Yasumura, D., Ohizumi, Y., Takahashi, M., Alcala, A. C. y Alcala, L. C. (1986) Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50(1), pp. 163-167.

Yoshimire, K., Orita, S., Okada, S., Sonoda, K., Kubota, K. y Yonezawa, T. (2001) Two cases of parrotfish poisoning with rhabdomyolysis. *The Journal of the Japanese Society on Internal Medicine*, 90(7), pp, 1339-1341.

Zhang, H., Lu, S., Li, Y., Cen, J., Wang, H., Li, Q. y Nie, X. (2018) Morphology and molecular phylogeny of *Ostreopsis* cf. *ovata* and *O. lenticularis* (Dinophyceae) from Hainan Island, South China Sea. *Phycological Research*, 66, pp. 3-14