Instituto de Oceanología
Universidad de Valparaíso
Carrera de Biología Marina

CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE CLONES DE *Alexandrium catenella* (Pyrrophyta, Dinophyceae)

TESIS
Presentada al
Instituto de Oceanología
Universidad de Valparaíso

Para optar al Grado de Licenciado en Biología Marina

POR
MARIA ISABEL BAHAMONDE SANTOS

Director de Tesis:
NESTOR LAGOS W. Ph. D.

1997

Nº MARC 36892

M
B151c
1997

Caracterización Bioquímica de Clones de ***Alexandrium catenella*** *(Pyrrophyta, Dinophyceae)*

INSTITUTO DE OCEANOLOGIA
TOOM
BIBLIOTECA
5477
Universidad de Valparaíso

Tesis

Presentada al

Instituto de Oceanología

Universidad de Valparaíso

Para optar al grado de

Licenciado en Biología Marina y

al título de Biólogo Marino

Por

María Isabel Bahamonde Santos

1997

Esta Tesis es parte de los requisitos para obtener
el grado de
Licenciado en Biología Marina y al Título de Biólogo Marino

María Isabel Bahamonde Santos
Alumno

Aprobada por la Comisión de Tesis en Mayo de 1997

Néstor Lagos W. Ph. D.
Director de la Tesis

Prof. Gloria Collantes

Prof. Pablo Muñoz

TABLA DE CONTENIDOS

Página

AGRADECIMIENTOS ..... **vii**

LISTA DE TABLAS ..... **viii**

LISTA DE FIGURAS ..... **xi**

RESUMEN ..... **xvii**

INTRODUCCIÓN **1**

OBJETIVOS **8**

MATERIALES Y MÉTODOS **9**

1. CULTIVOS CELULARES. **12**

1.1 Medio de Cultivo **12**

1.1.1 Medio de Cultivo F/2-Si **12**

1.1.2 Medio de Cultivo ASP7 ..... **13**

1.1.2.a Mezcla Vitamínica (S-3) **14**

1.1.2.b Mezcla Metálica (PII). 15

2. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO 15

2.1 Constante de crecimiento 16

3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS. 17

3.1 Protocolo de Determinación de Proteínas 18

4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE). 19

4.1 Tratamiento de las Células de Dinoflagelados para la Cuantificación de Proteínas y SDS-PAGE. 21

4.2 Técnica de Electroforesis (SDS-PAGE) 23

4.2.1 Preparación de Reactivos y Soluciones para el SDS-PAGE en Cámara Mini Protean II. 23

4.2.1.a Solución Acrilamida-Bisacrilamida 24

4.2.1.b 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 24

4.2.1.c 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 24

4.2.1.d 10% SDS 24

4.2.1.e Colorante Marcador de Corrida 24

4.2.1.f Gel Separador 12.5% 25

4.2.1.g Gel Empaquetador 4% 25

4.2.1.h Tampón de la Muestra 25

4.2.1.i Estándar de proteínas de bajo peso molecular 26

4.2.1.j Tampón de corrida (10 veces concentrado) 26

4.2.1.k Solución de teñido 27

4.2.1.l Solución de desteñir 27
4.2.1.m Solución de secado 27
4.3 Geles Discontinuos 28
5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) 29
5.1 Método de Identificación de VPM 31
5.1.1 Estándar NLG 913 (1/50) 32
5.1.2 Estándar TOUC 915 32
5.1.3 Estándar NLM 913 (1/10) 33
5.2 Tratamiento de las Células para Determinación de Toxinas por HPLC. 33

RESULTADOS 34

1. CONSTANTES DE CRECIMIENTO Y CURVAS DE CRECIMIENTO 34
1.1 Alexandrium catenella-Magallanes (MAC8) 34
1.2 Alexandrium catenella-Aysén (AAC7) 38
1.3 Gyrodinium instriacum-Portugal (PGI) 42
1.4 Prorocemtrum lima (PL) 45
2. ELECTROFORESIS (SDS-PAGE) 47
2.1 Alexandrium catenella-Magallanes (MAC8) 47
2.2 Alexandrium catenella-Aysén (AAC7) 53
2.3 Comparación entre MAC8 y AAC7 59
2.4 Gyrodinium instriacum-Portugal (PGI) 61
2.5 Prorocemtrum lima (PL) 65
3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) 67

3.1 **Alexandrium catenella**-Magallanes (MAC8) 71

3.2 **Alexandrium catenella**-Aysén (AAC7) 78

3.3 **Gyrodinium instriacum**-Portugal (PGI) y **Prorocemtrum lima** (PL) 86

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES 87

REFERENCIAS 97

Agradecimientos

Por una permanente preocupación, apoyo, confianza y mucho amor, quiero agradecer en forma muy especial a mis Padres, Isabel y Nélson, los cuales han sido el pilar de mi formación personal y han hecho posible mi formación profesional. También quiero dar las gracias a todas mis amigas y amigos, los cuales de manera incondicional siempre me estuvieron alentando.

La realización de esta Tesis no hubiera sido posible, sin aquellos personas que estuvieron directamente participando de ella. Especialmente quiero agradecer a mi Director de Tesis, Dr. Néstor Lagos, quien desde un primer momento me brindó todo su apoyo, confianza y conocimiento. También quiero agradecer a mi Patrocinante de Tesis, Profesora Gloria Collantes, quien desde el inicio de esta Tesis mi brindó total ayuda. Quiero agradecer además, a todas las personas que conforman el Departamento de Fisiología y Biofísica, las que me brindaron su ayuda en toda la parte profesional, al personal del Laboratorio de Bioquímica de Membrana en el cual se realizó esta Tesis, en forma especial a Karime Salas, Dario Andrinolo, Deida Compagnon, Nathaly Ruiz-Tagle y Angélica Figueroa. Adicionalmente, agradezco al Dr. Jorge Hidalgo, Dr. Nicolás Guiliani y Rodrigo Palma, quienes fueron parte importante en el desarrollo de mi Tesis. Mis agradecimientos se extienden hacia Juan Carlos Uribe y Valeria Latorre (Hidrobiología, Universidad de Magallanes), los cuales me facilitaron la línea celular de Magallanes y al Dr. Benjamín Suaréz y Marcelo Fonseca (Laboratorio de Toxinas marinas, Universidad de Chile) por facilitarme la línea celular de Aysén clonada por Miriam Seguel en IFOP, Puerto Montt.

Lista de Tablas

Tabla Página

1. Conteo de células de **Alexandrium catenella** (Magallanes) MAC8, expresado en cél ml^{-1} 34

2. Determinación de la constante de crecimiento para conteos sucesivos en el clon MAC8. 36

3. Resultado del conteo de células de **Alexandrium catenella** (Aysén) para la obtención de la curva de crecimiento, expresado en cél ml^{-1} 38

4. Determinación de la constante de crecimiento para conteos sucesivos de **A. catenella** (Aysén). 40

5. Resultado del conteo de células de **G. instriacum** para la obtención de la curva de crecimiento, expresado en cél ml^{-1}. 42

6. Resultado del conteo de células de **P. lima** para la obtención de la curva de crecimiento, expresado en cél ml^{-1}. 45

7. Análisis de VPM por HPLC para 43.697 células de una muestra 0,46 ml de MAC8 en el T_0 (inyección de 10 µl) 72

8. Análisis de VPM por HPLC para 114.253 células de una muestra 0,44 ml de MAC8 en el T_3 (inyección de 10 µl) 74

9. Análisis de VPM por HPLC para 233.700 células de una muestra 0,55 ml de MAC8 en el T_6 (inyección de 10 µl) 75

10. Análisis de VPM por HPLC para 285.923 células de una muestra 0,53 ml de MAC8 en el T_9 (inyección de 10 µl) 77

11. Análisis de VPM por HPLC para 6.000 células de una muestra 0,08 ml de AAC7 en el T_0 (inyección de 10 µl) 78

12. Análisis de VPM por HPLC para 7.280 células de una muestra 0,43 ml de AAC7 en el T_3 (inyección de 10 µl) 80

13. Análisis de VPM por HPLC para 117.928 células de una muestra 0,5 ml de AAC7 en el T_{13} (inyección de 10 µl) 81

14. Análisis de VPM por HPLC para 150.072 células de una muestra 0,36 ml de AAC7 en el T_{17} (inyección de 10 µl) 83

15. Análisis cromatográfico del promedio de las muestras de MAC8 en las distintas fases de crecimiento. 84

16. Análisis cromatográfico del promedio de las muestras de AAC7 en las distintas fases de crecimiento. 84

17. Hoja de cálculo para análisis de VPM por HPLC en una muestra de cholga (14 de Marzo de 1994) del Seno Martínez (XII^a Región). 96

Lista de Figuras

Figura — Página

1.- AAC7 (Aysén, **A. catenella**), 90x 10

2.- MAC8 (Magallanes, **A. catenella**), 90x 10

3.- PL (CCMP686, **Prorocentrum lima**), 90x 10

4.- PGI (Portugal, **Gyrodinium instriacum**), 90x 10

5.- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) 30

6.- Curva de crecimiento de MAC8 35

7.- Estimación gráfica de la constante de crecimiento de MAC8 37

8.- Curva de Crecimiento de AAC7 39

9.- Estimación gráfica de la constante de crecimiento de AAC7 41

10.- Curva de Crecimiento de PGI 43

11.- Estimación gráfica de la constante de crecimiento de PGI 44

12.- Curva de Crecimiento de PL 46

13.- Estimación gráfica de la constante de crecimiento de PL 46

14.- SDS-PAGE 12,5% **Alexandrium catenella** (MAC8, Magallanes) 48

15.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de Estándar de Proteínas de Bajo Peso Molecular 49

16.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8a 50

17 .- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8b 50

18.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8c 51

19.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8d 51

20.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8e 52

21.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8f.....52

22.- Comparación entre Densitometrías SDS-PAGE 12,5% de Estándar de Proteínas y MAC8 53

23.- SDS-PAGE 12,5% **Alexandrium catenella** (AAC7, Aysén).....54

24.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de Estándar de Proteínas de Bajo Peso Molecular 55

25.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7a.....56

26.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7b.....56

27.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7c.....57

28.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7d.....57

29.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7e.....58

30.- Comparación entre Densitometría SDS-PAGE 12,5% de Estándar y AAC7.....58

31.- SDS-PAGE 12,5% **Alexandrium catenella** (Aysén y Magallanes) 59

32.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8 60

33.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7 60

34.- SDS-PAGE 12,5% **Alexandrium catenella** sin PMSF (Aysén y Magallanes) 61

35.- SDS-PAGE 12,5% de **Gyrodinium instriacum** 62

36.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de Estándar de Proteínas de Bajo Peso Molecular 63

37.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de PGIa 64

38.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de PGIb 64

39.- SDS-PAGE 12,5% **Prorocentrum lima** 65

40.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de PL 66

41.- Comparación entre Densitometrías SDS-PAGE 12,5% de Estándar y PL 67

42.- Cromatograma del Estándar C1-C2 1/25 para determinación de toxinas del grupo C1-C4 68

43.- Cromatograma de MAC8 al T_0 para determinación de C1-C4 68

44.- Cromatograma del Estándar NLM913 1/10 para determinación de toxinas del grupo STXs 69

45.- Cromatograma de MAC8 al T_9 para determinación de STXs 69

46.- Cromatograma del Estándar NLG913 1/50 para determinación de toxinas del grupo GTXs 70

47.- Cromatograma de MAC8 al T_3 para determinación de GTXs 70

48.- Perfil de toxicidad del clon MAC8 en el T_0 73

49.- Perfil de toxicidad del clon MAC8 en el T_3 74

50.- Perfil de toxicidad del clon MAC8 en el T_6 76

51.- Perfil de toxicidad del clon MAC8 en el T_9 77

52.- Perfil de toxicidad del clon AAC7 en el T_0 79

53.- Perfil de toxicidad del clon AAC7 en el T_3 80

54.- Perfil de toxicidad del clon AAC7 en el T_{13} 82

55.- Perfil de toxicidad del clon AAC7 en el T_{17} 83

56.- Perfil de toxicidad promedio y desviación estándar de MAC8 en las fases de crecimiento analizadas. 85

57.- Perfil de toxicidad promedio y desviación estándar de AAC7 en las fases de crecimiento analizadas. 85

58.- Comparación entre perfiles de toxicidad promedios de MAC8 y AAC7 en las fases de crecimiento analizadas. 86

Resumen

En esta Tesis se estudia la composición toxicológica de **Alexandrium catenella** por el método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y se caracterizan las proteínas totales mediante Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con detergente aniónico (SDS-PAGE). Para esto, se utilizan cultivos clonales de **A. catenella** de las Regiones XI^{a} (clon AAC7) y XII^{a} (clon MAC8) en condiciones controladas de laboratorio. Adicionalmente, se utilizan como control, dos clones de dinoflagelados: **Prorocentrum lima** (CCMP686) y **Gyrodinium instriacum** (Portugal). Se presentan las curvas de crecimiento y se determinan las constantes de división celular (k) para cada clon.

En todas las fases de crecimiento de los clones de **A. catenella,** existe una alta proporción del epímero C1/C2 de las N-sulfocarbamoilsaxitoxinas, siendo C2 la toxina mayoritaria en ambos clones. Además de este epímero, existen otras 6 toxinas, donde las pertenecientes al grupo de las gonyaulatoxinas son las que aparecen en mayor cantidad

La composición toxicológica de ambos clones de **A. catenella** es semejante, presentando variaciones en la cantidad de cada una de las toxinas, presentando AAC7 el doble de cantidad de toxinas por célula. Se demuestra que un perfil toxicológico es un buen marcador bioquímico de caracterización de clones productores de Veneno Paralizante de Molusco (VPM).

En relación al análisis de proteínas totales, ambos clones presentan a lo menos 8 bandas de proteínas que se pueden diferenciar con azul de coomassie. El peso molecular (PM)

relativo de las bandas se determina por densitometría, y éstas se denominan según su PM.

Podemos concluir que ambos clones presentan un patrón de proteínas común y un perfil de toxinas similar en todas las fases de crecimiento. Estas características bioquímicas son propias de la especie **Alexandrium** sp. Siendo totalmente diferenciadas de otros dinoflagelados.

INTRODUCCIÓN

La proliferación de una determinada especie de organismo planctónico portador de toxinas puede llevar a la intoxicación de una comunidad marina local, lo que es conocido como Florecimientos de Algas Nocivas (FAN) o Mareas Rojas Tóxicas, contaminar a los animales que sirven de alimento y afectar la calidad del agua que sirve como recreación para el hombre. En ciertas ocasiones la especie predominante en una marea roja inocua produce mortandad de organismos de la comunidad afectada, debido a la hipoxia que ocurre en las aguas como consecuencia de la descomposición de materia orgánica de las microalgas por bacterias aeróbicas. Otros organismos pueden producir irritación en el epitelio branquial de peces, que lleva a una intensa producción de mucus y problemas respiratorios que pueden provocarle la (Freitas 1995).

Factores como la temperatura y la salinidad (Watras **et al.** 1982), surgencias y poca circulación de las aguas, que aumentan la eutroficación local (Sweeney 1976) o aún alteraciones en la composición del plancton como reducción de herbívoros, y el aumento de la carga de compuestos fosfatados y nitrogenados pueden contribuir a la producción del fenómeno.

En los últimos años, a nivel mundial y nacional el fenómeno FAN ha cobrado una connotación alarmante, tanto por las altas toxicidades como por la frecuencia y prolongación con que se presentan estos eventos en el litoral marino (Hallegraeff 1993).

Los responsables de algunos de estos FAN en Chile, son los organismos denominados *Dinoflagelados*; éstos se ubican en la División *Pyrrophyta* (*Pyrrhophyta*) ó *Dinophyta* (*Dinophycophyta*) en el sistema botánico, y en el orden *Dinoflagellida* ó *Dinoflagellata* en el

sistema zoológico. Las únicas clases o subdivisiones existentes se separan entre sí sobre la base de la posición de inserción del flagelo. De acuerdo a algunos autores, no existe una distinción ultraestructural básica entre los dos grupos y proponen que éstos deben unirse (Dodge 1984 **fide** Dodge & Bibby 1973). Por lo tanto, otros autores usan solamente una clase, *Dinophyceae* (Dodge 1984 **fide** Parke & Dixon 1976, Dodge 1984 **fide** Dodge 1982). Finalmente y siguiendo este esquema se introduce una nueva clase, *Syndiniophyceae*, para géneros de dinoflagelados parásitos intracelulares (Dodge 1984 **fide** Loeblich 1976).

Los dinoflagelados son organismos unicelulares, eucarióticos, incluyendo a miembros fotosintéticos y no fotosintéticos (Fukuyo & Taylor 1989). Los dinoflagelados marinos son un grupo de microorganismos exitosos, adaptados a una gran variedad de habitats pelágicos y bentónicos extendiéndose desde mares boreales hasta tropicales. Muchas especies son cosmopolitas y probablemente representan un mismo linaje geográfico (Steidinger & Baden 1984).

Se conocen del orden de 20 especies de dinoflagelados marinos tóxicos, entre las aproximadamente 2000 especies hasta hoy descritas y los 2000 fósiles encontrados (Fukuyo & Taylor **op. cit.**). Estos organismos tóxicos se caracterizan porque son fotosintéticos, estuarinos o neríticos, producen estados de resistencia sexual bentónicos, la mayoría son capaces de producir florecimientos monoespecíficos o cercanos a monoespecíficos, presentan ventajas competitivas a través de exclusión y todos producen bioactivos denominadas ficotoxinas. Estas sustancias pueden ser solubles en agua o liposolubles, presentando diferentes efectos en un amplio espectro de seres vivos, tales como reacciones hemolíticas, neurotóxicas y gastrointestinales. La actividad tóxica de cada compuesto está estrechamente relacionada con la

estructura química de la molécula, su estado de conversión, dosis, receptor blanco donde ejerce su acción y por último la susceptibilidad del organismo afectado.

Los dinoflagelados tóxicos planctónicos, poseen estados de resistencia bentónicos y al ser ingeridos por animales filtradores, tales como los moluscos bivalvos, estos pueden acumular las toxinas y subsecuentemente causar intoxicaciones en la cadena alimenticia natural, además, estos dinoflagelados tóxicos pueden afectar a una amplia gama de organismos incluyendo zooplancton, larvas de moluscos, peces, aves, mamíferos marinos y también al hombre (Yasumoto 1990, Yasumoto et al. 1978, Geraci et al. 1989, Borison et al.1980, Vergara 1995)

Dentro de los FAN conocidos, los de mayor impacto son los relacionados con los que producen toxinas. Se han descrito hasta ahora seis venenos. De éstos, cuatro son concentrados por los moluscos por lo que se conocen como Veneno de Molusco, estos son el Paralizante (VPM), Diarreico (VDM), Neurotóxico (VNM) (Yasumoto & Murata. 1993) y Amnésico (VAM) (Subba-Rao et al. 1988, Todd 1990). Adicionalmente, se ha descrito las ciguateras acumuladas por peces (Yasumoto **op. cit.**) y las microcistinas, producidas por las cianobacterias (Park et al. 1993).

Las toxinas del Veneno Paralizante de Molusco (VPM), son un grupo de toxinas producidas por dinoflagelados de distintos géneros entre los que figuran: **Alexandrium** (**A. catenella**, **A. tamarensis**, **A. polyedra**, **A. monilata**, **A. lusitanicum**, **A. excavata** y **A. acatenella**), **Gymnodinium** (**G. catenatum**) y **Pyrodinium** (**P. phoneus** y **P. bahamense** var **compressa**).

Las toxinas que forman parte del VPM son derivados nitrogenados dibásico de la tetrahidropurina, potente toxina neuromuscular que tiene acción específica y directa sobre nervios

periféricos y músculos esqueléticos inhibiendo el aumento temporal de la permeabilidad al sodio en la membrana excitable de la célula (Catterall **et al.** 1979). EL VPM se encuentra formado a lo menos por 18 componentes. El más conocido de ellos es la Saxitoxina (STX), el primero tipificado y más estudiado. Hoy se sabe que de estos 18 componentes, a lo menos 12 de ellos pueden causar la muerte, siendo seis de toxicidad similar a STX (Oshima **et al.** 1989, Oshima 1995).

Estas toxinas se pueden clasificar en tres grupos dependiendo de la carga que ellas presenten a pH neutro. Las del grupo de las STXs con carga +2, las gonyaulatoxinas (GTXs) carga neta +1 y las sulfocarbamoilsaxitoxinas (C1-C4) con carga neta 0.

Las toxinas VPM son termoestables en medio ácido, pero extremadamente inestables y fácilmente oxidadas en medio alcalino.

La transformación bioquímica de las GTXs y de la neosaxitoxina (neoSTX) a Saxitoxina (STX), tiene lugar por la acción de bacterias y por la maquinaria metabólica de los moluscos. La velocidad de conversión es mayor en condiciones aeróbicas y tiene lugar en el propio molusco. Esto se ha visto demostrado, al comparar los perfiles toxicológicos de las muestras de aguas (dinoflagelados) y la de los moluscos contaminados del mismos ecosistema (Oshima **et al.** 1990, Lagos et al. 1996), indicando que la composición toxicológica es característica de cada especie de dinoflagelado.

Los métodos más usados para determinar la presencia de estas toxinas en muestras de moluscos son, el bioensayo de ratón (Sommer & Meyer 1937, Williams 1984) y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección fluorimétrica en línea (Sullivan & Wekell 1987, Oshima et al. 1989, Lawrence & Ménard 1991, Thielert **et al.** 1991, Oshima 1995).

El método del bioensayo es semicuantitativo y consiste en cuantificar una mezcla de toxinas, con una sensibilidad de 0,2 μg de STX (Schantz **et al.** 1958), presentado un error experimental de un 25 % (Sommer & Meyer **op. cit.**). Por otro lado el método de HPLC, es una técnica analítica, que presenta una sensibilidad de nanogramos (ng) y un error experimental menor que 5 %. Se debe tener presente que, el bioensayo de ratón, es el método oficial en la mayor parte de los países donde se origina este tipo de fenómenos.

El mecanismo de acción de las toxinas presentes en el VPM actúan con distinta afinidad sobre las membranas excitables, bloqueando selectivamente los canales de sodio, inhibiendo el paso de éstos hacia la célula siguiendo su gradiente electroquímico. Este bloqueo inhibe la generación del impulso eléctrico (Catterall **et al.** 1979).

Este mecanismo explica los efectos de estas toxinas en diferentes organismos, incluídos los mamíferos, ya que estas sustancias inhiben la generación de impulsos nerviosos a nivel de los nervios periféricos y de los músculos esqueléticos, observándose un efecto de depresión central sobre los centros vasomotores y sobre los centros respiratorios (Andrinolo 1997).

Así como los mamíferos sufren los efectos de estas toxinas, todos los organismos que presenten canales de sodio se ven afectados igualmente, incluídos los moluscos, en los cuales se han observado alteraciones en el movimiento de las valvas, pérdida de la movilidad, incapacidad para la fijación, disminución en el consumo de oxígeno, disminución de la velocidad de filtración, aumento/disminución de los impulsos cardíacos e incluso aumento de la mortalidad en las larvas.

La intoxicación por toxinas del VPM en el ser humano, produce dependiendo de su concentración, desde parestesia labial, hasta una parálisis total y muerte por insuficiencia respiratoria o paro cardíaco (Hallegraff 1993, Andrinolo & Lagos 1997).

En este contexto, se estudió en esta Tesis a **A. catenella** (Pyrrophyta, Dinophyceae), un dinoflagelado altamente tóxico y productor de VPM. Esta especie es, además, la responsable de la presencia de VPM en las dos rediones más australes de nuestro país (Campodónico & Guzmán 1974, Muñoz **et al.** 1992).

A. catenella se encuentra dentro de la familia Gonyaulaceae y originalmente fue descrita bajo el género **Protogonyaulax** Taylor, pero actualmente de acuerdo a Balech (1990), se denomina **Alexandrium** Halim, compartiendo este género, entre otras especies, con **A. tamarensis, A. excavatum** y **A. lucitanicum** (Dodge 1984).

A. catenella se caracteriza morfológicamente por presentar una estructura corporal de largas placas, que pueden ser vistas naturalmente bajo microscopio óptico y en organismos cuya movilidad ha sido bloqueada con formalina. Posee una constricción ecuatorial ligeramente descendente (cingulum), que lo rodea completamente, y un sulcus extendido hacia el ápex. Su forma es ovoide, con una coloración pardo-rojiza. Longitud total, entre 28-40 μ y ancho 24-37 μ. Por lo general se encuentra formando cadenas de hasta 40 células (Lembeye &Guzmán 1982). Su distribución es prácticamente global y cada día aparecen más lugares geográficos donde se documenta su presencia (Hallegraef 1993).

En nuestro país esta especie fue descrita por primera vez en la XII^{a} Región en un florecimiento ocurrido en 1972 (Campodónico & Guzmán 1974). En 1992, Muñoz **et al.** describen su presencia frente a la Isla Churrecue, hacia la boca del Fiordo Aysén, en la XI^{a} Región.

Un modelo experimental que permite estudiar las características de las proliferaciones, es reproducir las condiciones ambientales encontradas en el hábitat natural, mediante la simulación

artificial de las condiciones en un laboratorio.

Virtualmente todos los cultivos de dinoflagelados están sometidos a técnicas de clonación de un determinado organismo. En la literatura existen trabajos que describen clones de distintas especies del género **Alexandrium** (Ogata **et al.** 1990, Doucette & Trick 1995, Sako **et al.**1995, Cembella **et al.**1990, Franca **et al.** 1995). Debido a que en Chile recientemente se ha aislado y cultivado la especie presente en nuestras aguas (Seguel **et al.**1995a, Lagos **et al.** 1996, Uribe **et al.**1996), hemos decidido la utilización de estos cultivos clonales en los experimentos a realizar en la Tesis, para hacer su caracterización bioquímica. Ahora, si los clones de **A. catenella** de la XI^{a} y XII^{a} Región presentaran características comunes, entonces, estaríamos demostrando que en ambas regiones a lo menos existe una especie común productora de VPM, que respondería metabólicamente, dependiendo de los factores ambientales propios del lugar geográfico en que se encuentre.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Caracterizar bioquímicamente clones de **A. catenella** del extremo austral de Chile y compararlos con otras especies controles (**Prorocentrum lima** y **Gyrodinium instriacum**) de dinoflagelados.

Objetivos específicos.

1.- Mantener cultivos clonales, a partir de cultivos preexistentes, bajo condiciones controladas.

2.- Determinar la constante de crecimiento y tiempos de duplicación en los cultivos.

3.- Determinar la toxicidad específica en relación a VPM, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de cada clon.

4.- Determinar el perfil toxicológico por HPLC de cada clon en la fase exponencial y en la fase estacionaria de la curva de crecimiento de cada cultivo.

5.- Caracterizar el perfil de proteínas totales de cada clon, utilizando Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en presencia de Detergente Aniónico (PAGE-SDS).

MATERIALES Y MÉTODOS

De la especie **A. catenella** se utilizaron los siguientes clones: AAC7 (Aysén, **A. catenella** clon 7, Figura 1) obtenido de ACC07 (Aysén, Canal Costa clon 07) de la XI^a Región en el verano de 1995 (Seguel **et al.**1995b) y MAC8 (Magallanes, **A. catenella** clon 8, Figura 2) obtenido del Clon 8 Bahía Nash de la XII^a Región en el verano de 1996 (facilitado en colaboración científica por la Universidad de Magallanes). Como controles fueron utilizadas dos especies, una productora de VDM **Prorocentrum lima** CCMP686 (Center for the Culture of Marine Phytoplankton, Figura 3) y uno no tóxico **Gyrodinium instriacum** (PGI, Portugal **G. instriacum**, facilitado por el Instituto Nacional de Saúde, Lisboa, en colaboración científica, Figura 4). Estas especies fueron cultivadas y mantenidas en el Laboratorio de Bioquímica de Membrana, Departamento de Fisiología y Biofísica de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, a partir de Junio de 1997.



Figura 1.- AAC7 (Aysén, **A. catenella**), 90x



Figura 2.- MAC8 (Magallanes, **A. catenella**), 90x



Figura 3.- PL (CCMP686, **Prorocentrum lima**), 90x



Figura 4.- PGI (Portugal, **Gyrodinium instriacum**), 90x

De acuerdo a condiciones de cultivo consideradas óptimas en laboratorio, todos los cultivos fueron mantenidos en una incubadora en un rango de temperatura de 19 - 21 °C, con un fotoperíodo (luz/oscuridad) 14:10 hrs, pH de 7,0-7,5 y una salinidad de 36 ‰ con medio de cultivo ASP7 (Provasoli 1963), para los clones **Gyrodinium instriacum** y **P. lima** y, medio de cultivo f/2 sin silicato (SIGMA), y de 35 ‰ de salinidad para los clones **A. catenella** (Guillard 1973).

Las curvas de crecimiento resultaron de los conteos en cámara de Neubauer, que reune las características necesarias para un buen recuento de estos dinoflagelados: rango adecuado para células del tamaño de las estudiadas en esta Tesis, buena capacidad para células grandes al considerar todos los cuadrantes de la cámara , conteo fácil y el requerimiento de una mínima cantidad de muestra para esta operación. Las constantes de crecimiento de los cultivos fueron calculadas de acuerdo a Guillard (1973).

Una vez que los clones de todas las especies estuvieron en fase de crecimiento exponencial, se realizaron extractos para la determinación de la curva de proteínas (Bradford 1976), para los geles de poliacrilamida (Laemmli. 1970) y para la determinación de VPM mediante HPLC (Oshima 1995, Lagos et al. 1996).

1. CULTIVOS CELULARES.

1.1 Medio De Cultivo

1.1.1 Medio De Cultivo F/2-Si.

REACTIVOS	CONCENTRACIONES
$CoCl_2 \times 6H_2O$ (Cloruro de Cobalto Hexahidratado)	0.010 mg L^{-1}
$CuSO_4 \times 5H_2O$ (Sulfato Cúprico Pentahidratado)	0.010 mg L^{-1}
EDTA $Na_2 \times 2H_2O$ (EDTA Sodio Dihidratado)	4.360 mg L^{-1}
$FeCl_3$ (Cloruro Férrico Anhidro)	1.890 mg L^{-1}
$MnCl_2 \times 4H_2O$ (Cloruro de Manganeso Tetrahidratado)	0.180 mg L^{-1}
NaH_2PO_4 (Fosfato de Sodio Monobásico)	4.3470 mg L^{-1}
$NaMoO \times 2H_2O$ (Molibdato de Sodio Dihidratado)	0.0060 mg L^{-1}
$NaNO_3$ (Nitrato de Sodio)	75.00 mg L^{-1}
$ZnSO_4 \times 7H_2O$ (Sulfato de Zinc Heptahidratado)	0.0220 mg L^{-1}

Para obtener un litro de medio de cultivo se agrega 0,086 g de este producto en 950 ml de agua de mar filtrada (0,45 µ); antes de enrasar a un litro, se le agrega un suplemento vitamínico en la misma proporción que la utilizada en la preparación del medio ASP7 (10 ml L^{-1}). Luego el medio es llevado a pH 7.5 con una solución de HCl 1N y posteriormente es enrasado a un litro. Para esterilizar el medio, éste se filtra en una unidad con una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µ de tamaño de poro y 47 mm de diámetro, dentro de la sala de cultivo previamente esterilizada. Este medio es guardado en el refrigerador a - 4 °C para su conservación.

1.1.2 Medio De Cultivo ASP7

REACTIVOS	CANTIDADES
NaCl (Cloruro de Sodio)	25 g
KCl (Cloruro de Potasio)	0.7 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$ (Sulfato de Magnesio Heptahidratado)	9 g
Ca (como Cl^-)	0.3 g (0.8325 de $CaCl_2$)
$NaNO_3$ (Nitrato de Sodio)	50 mg
$C_3H_7O_6PNa_2 \times 6H_2O$ (Glicerofosfato de Sodio Pentahidratado)	20 mg
$Na_2SiO_3 \times 9H_2O$ (Metasilicato de Sodio Nonahidratado)[1]	70 mg (52.2 mg de 5 H_2O)
PII (Mezcla Metálica)	30 ml
B_{12} (Cianocobalamina)	1 mg (0.2 ml de solución a 1mg ml^{-1})
S-3 (Mezcla Vitamínica)	10 ml
$C_6H_9NO_6$ (Ácido Nitilotriacético (NTA))	70 mg
$C_4H_{11}NO_3$ Tris (Hidroximetiloaminometano)	1 g

Es importante tener dos cosas en consideración: El ácido nitilotriacético es insoluble en agua y, por lo tanto, se debe disolver en una solución concentrada (0.5 M) de $NaHCO_3$ (Bicarbonato de Sodio) y por último los compuestos $CaCl_2$ y $Na_2SiO_3 \times 9H_2O$ se deben

---

1 La utilización de Metasilicato de sodio nonahidratado no es necesaria para los dinoflagelados, pero fue considerada para no alterar las proporciones del medio ASP7.

adicionar al final de la preparación del medio de cultivo debido, a que estos pueden precipitar.

A continuación se detallará la preparación de las mezclas vitamínicas y metálica. La cantidad de cada compuesto está dada para la preparación de 200 ml de cada mezcla.

1.1.2.a Mezcla Vitamínica (S-3).

REACTIVOS	CANTIDADES
$C_{12}H_{17}ClN_4OS_xHCl$ (Tiamina HCl)	10 mg
$C_6H_5NO_2$ (Ácido Nicotínico)	2 mg (2 ml de solución a 1mg ml^{-1})
$C_9H_{16}NO_5x1/2$ Ca (Pantotenato de Calcio)	2 mg (2 ml de solución a 1mg ml^{-1})
$C_7H_7NO_2$ (Ácido p-aminobenzoico)	200 µg (1ml de solución a 0.2 mg ml^{-1})
$C_{10}H_{16}N_2O_3S$ (d-Biotina)	20µg (0.1 ml de solución 0.2 mg ml^{-1})
$C_6H_{12}O_6$ (Myo-Inositol)	100 mg
$C_{19}H_{19}N_7O_6$ (Ácido Fólico)	40 µg (0.8 ml de solución 0.05 mg ml^{-1})
$C_5H_6N_2O_2$ (Timina)	60 mg

Hay que tener en consideración que el ácido fólico es insoluble en agua, por lo que hay que disolverlo en NaOH 0,001 N.

1.1.2.b Mezcla Metálica (PII).

REACTIVOS	CANTIDADES
EDTA $Na_2 \times 2H_2O$	0.2 g
Fe (Como Cl^-)	2 mg (9.68 mg de $FeCl_3 \times 6H_2O$)
B (Como H3BO3)	40 mg (228.5 mg H_3BO_3)
Mn (Como Cl^-)	8 mg (28.8 mg de $MnCl_2 \times 4H_2O$)
Zn (Como Cl^-)	1 mg (1ml de solución 2.08 mg de $ZnCl_2$)
Co (Como Cl^-)	200 µg (1 ml de solución 0.8 mg ml^{-1}de $CoCl_2 \times 6H_2O$)

2. *DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO*

Para determinar la curva de crecimiento de los clones **A. catenella** se sembró entre 2.000 a 2.500 cél ml^{-1} en 9 frascos que contenían 25 ml de medio de cultivo. El conteo se realizó cada tres días eligiendo al azar un frasco por cada conteo; se consideró el tiempo 0 (t_0) el mismo día en que fueron sembradas las células en los frascos. La totalidad de las células de un frasco elegido al azar eran peleteadas a 2.000 x g durante 10 min (BHG 1100, Segurita). Las células sedimentadas fueron resuspendidas en 1 ml de medio de cultivo y colocadas en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. El conteo se realizó con un contador de células Neubauer, que presentaba dos cámaras de

conteo; cada cámara era llenada con 10 µl y se contaba la totalidad de nueve cuadrantes, con un volumen de 0.1 mm^3 (10^{-4} cm^3) por cada uno. El número de cél ml^{-1} se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$\textbf{Cél ml}^{-1} = \textbf{Conteo celular promedio por cuadrante} \times \textbf{Factor de dilusión} \times 10^4/25$$

Para obtener promedios de los recuentos, los conteos de cada muestra se hicieron por triplicado. Los 940 µl de muestra restante fueron etiquetados y congelados inmediatamente, para ser utilizados posteriormente en el análisis de toxinas por HPLC.

De esta misma manera se obtuvieron las curvas de crecimiento para **P. lima** y **G. instriacum**, con la variante de que se utilizaron placas con 24 pocillos, con una capacidad de 2 ml por pocillo, sembrándose aproximadamente 6.000 cél ml^{-1}. La resuspensión de las células después de la centrifugación se hizo en 100 µl. Los recuentos celulares se realizaron diariamente.

2.1 Constante de crecimiento

En un crecimiento constante, en condiciones adecuadas, un cultivo de microorganismos crece de manera que la tasa de adición de células es proporcional al número presente (Crecimiento Exponencial).

El tiempo de división o duplicación está determinado por la siguiente fórmula:

$$dN/dt = K_e N$$

donde N= Número de células en cultivo; **t** = Tiempo; K_e = Constante de crecimiento (Número de unidades de aumento por día).

$$K_e = \ln (N_1/N_2)/(t_1-t_2)$$

Además de presentarse la Constante de Crecimiento como logaritmo en base **e**, también se puede expresar como logaritmo en base 10 (K_{10}) y como logaritmo en base 2 (**k**), por lo que las diferentes unidades se pueden interconvertir usando la relación entre logaritmos de cualquier número a dos bases.

Por lo tanto, la fórmula utilizada para el cálculo de **k** a partir de conteos sucesivos es:

$$k = [3.322/(t_2-t_1)] \times \log(N2/N1)$$

Además, se estimó la constante de crecimiento mediante un método gráfico, en el cual los datos del conteo celular fueron transformados a datos logarítmicos, ajustados a una línea recta (solamente se consideraron los datos que correspondían a un crecimiento exponencial). Determinada la línea recta, se obtuvo la constante de crecimiento, correspondiendo ésta a la pendiente de la recta.

3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

El contenido de proteína total de las muestras de dinoflagelados fue determinado utilizando un método colorimétrico (Bradford 1976). Este método se basa en la medición del máximo de Absorbancia que alcanza una solución ácida de Coomassie brillant blue G-250, al unirse a proteínas. Este colorante cambia su máximo de Absorbancia, de 495 nm a 595 nm cuando ocurre

la unión a la proteína.

Para la cuantificación de las proteínas se utiliza una proteína estándar, que en este caso es una proteína plasmática purificada, Albúmina de suero de bovino (BSA). La propiedad de este estándar, es que la tinción desarrollada es significativamente mayor con BSA que con otras proteínas.

3.1 Protocolo De Determinación De Proteínas

Se desarrolló el método de microensayo en el rango de 1-20 µg de proteínas totales.

Las mediciones de Absorbancia fueron hechas en un Espectrofotómetro Beckman Model 25 de doble haz, utilizando cubetas de polyestireno de 1 ml, atendiendo el siguiente procedimiento:

1.- Se preparan varias diluciones del estándar de proteínas (BSA mg ml^{-1}): 4 µg μl^{-1}, 6 µg μl^{-1},8 µg μl^{-1}, 12 µg μl^{-1} y 14 µg μl^{-1} (estas diluciones se hacen por duplicado y luego son promediadas para confeccionar la curva de proteínas).

2.- Estas diluciones son llevadas a un volumen final de 800 µl con agua bidestilada, desionizada y filtrada[2].

3.- Las diluciones se agitan usando un Vortex-Genie 2, evitando el exceso de espuma.

---

[2] Este tipo de agua se utilizó en todos los experimentos de esta Tesis (reactivos y preparaciones) y de ahora se denominará agua solamente.

4.- Finalmente, se adiciona a cada dilución de BSA, 200 µl de la solución de colorante.

5.- Se utiliza como blanco una muestra con 800 µl de agua y 200 µl de la solución de colorante. Este blanco también se hace por duplicado.

6.- Después de agitar, se espera 5 minutos y se mide la Absorbancia a 595 nm.

Se restan los controles blancos y se promedian las muestras. Para la cuantificación se grafica la Absorbancia versus la cantidad en $\mu g\ \mu l^{-1}$ de proteínas, de la regresión lineal se obtienen los valores de las cantidades de las muestras.

4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE).

La electroforesis es el estudio del movimiento de las moléculas cargadas en un campo eléctrico. Esta técnica es aplicable a la caracterización y análisis de polímeros cargados. La migración molecular en un campo eléctrico depende de la carga de la molécula. La electroforesis en geles de poliacrilamida permite analizar y purificar proteínas, cuyas cargas sean homogéneas (Boyer 1993a).

En la Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE), el gel formado por la polimerización de acrilamida sirve para el análisis de proteínas, porque cumple las siguientes características :

1.- Gran poder de resolución para proteínas pequeñas y de tamaño moderado, en un rango de 10.000 a 200.000 Da. de peso molecular.

2.- Permite aplicar muestras de proteínas del orden de los 10-100 μg de proteína total.

3.- La acrilamida no presenta interacción con las proteínas.

4.- La acrilamida presenta una gran estabilidad física.

El principio de separación en SDS-PAGE se basa en hacer migrar las proteínas homogéneamente cargadas negativamente, desde un polo negativo a un polo positivo, a través de una matriz rígida y porosa formada por el polímero acrilamida. Los geles pueden ser preparados con diferentes tamaños de poros. Para esto se utiliza diferentes concentraciones de un agente de entrecruzamiento, N, N'- metilen-bis-acrilamida . A mayor concentración del agente de entrecruzamiento y de la acrilamida, menor es el tamaño del poro de la matriz. Por lo tanto, el poder de resolución y la capacidad de separación por tamaño, que presenta un gel, depende de la concentración de acrilamida y bis-acrilamida. La polimerización de estos geles es un proceso químico controlado por catalizadores, como el persulfato de amonio (APS) y el N, N, N', N'-tetrametilen, etilen, diamina (TEMED).

Para que todas las proteínas presentes en una muestra adquieran una carga negativa neta y puedan migrar hacia el polo positivo, éstas son solubilizadas en presencia de un detergente aniónico altamente denaturante, Dodecil sulfato de sodio (SDS). El detergente ayuda a la separación de las cadenas polipeptídicas, rompiendo las estructuras cuaternarias, terciarias y secundarias de tal manera que se obtengan cadenas polipeptídicas separadas, las cuales quedan con todas sus cargas positivas neutralizadas por el SDS, cuya carga neta es negativa. El resto de las cargas negativas de la proteína o cadena polipeptídica, quedan expuesta generando proteínas o cadenas polipeptídicas con carga neta negativa. Conjuntamente con la adición de SDS se

agrega un agente reductor de puentes disulfuros, el β-mercaptoetanol, para permitir la separación de posibles subunidades que forman una proteína. Cada banda de proteína que se visualiza, una vez que el gel es teñido, corresponde a una proteína de una sola cadena o a una subunidad de una proteína formada por varias subunidades (Boyer 1993a).

Esta técnica, además de mostrarnos un perfil de proteínas que caracteriza a las muestras, nos permite estimar el peso molecular de las subunidades de proteínas.

4.1 Tratamiento De Las Células De Dinoflagelados Para La Cuantificación De Proteínas Y SDS-PAGE.

Una vez que las células se sedimentaron y se contaron, éstas se lavaron exhaustivamente en una solución denominada de lavado: 5 mM EDTA, 1 mM $CaCl_2$, NaN_3, 4 mM Tris pH 8.0 (Michea et al. 1995). Se sedimentaron por centrifugación del orden de 1 millón de células por muestra.

Protocolo.

1.- Las células sedimentadas fueron lavadas 5 veces con la solución de lavado dilusión 1/2 que contenía un inhibidor de proteasa, Fluoruro de fenil,metil sulfonato (PMSF, Sigma) en una concentración final de 0,005 mg/ml. En cada lavado las células fueron sedimentadas por centrifugación 6.000 × g por 2 min (Sorvall MC12V, Dupont).

2.- Después del último lavado, las células fueron resuspendidas en 500 µl de la Solución de lavado dilución ½, en presencia de 0,005 mg ml^{-1} de PMSF y β-mercaptoetanol al 5 %

(v/v)

3.- Esta resuspención fue sonicada en un sonicador de bástago (Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole Palmer Instrument Co.) cuatro veces durante 30 seg a 90 unidades cada vez, con intermedios de 20 seg, colocando la muestra en hielo-agua (0-4 °C) para evitar calentamiento.

4.- Las células rotas fueron centrifugadas a 10.000 x g x 10 min (Sorvall MC 12V, Dupont). Se guarda el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 300 µl de solución de lavado, diluída 1/2 con β-mercaptoetanol y PMSF. Se toman alícuotas y se mide proteínas mediante el método Bradford.

5.- El sobrenadante y el resto de las células sedimentadas en el paso anterior, fueron nuevamente sedimentados a alta velocidad y en vacío a 102.000 x g durante 1 hora (Ultracentrifuga Combi, Dupont, rotor T-865.1). Se juntaron los sobrenadantes y los sedimentos por separados.

6.- El sedimento de 102.000 x g fue resuspendido en solución de lavado diluída 1/2 con β-mercaptoetanol y PMSF, hasta completar un volumen de 500 µl. Nuevamente se sonica con bástago y se dializan las muestras en bolsas de diálisis de 12.400 daltons de "cut off", contra la solución de lavado diluída 1/2 con β-mercaptoetanol, PMSF y 10 % SDS. El tampón de diálisis fue una dilución de 1/10 de la solución anterior. Finalmente, se concentran las muestras a sequedad usando un Speed Vac Plus SC210A, SAVANT. Se resuspende el sedimento seco en el tampón de la muestra (la composición se describe en la técnica de SDS-PAGE), hasta conseguir una concentración de 1,5 - 2,0 µg de proteínas μl^{-1}.

7.- Estas muestras se sonican en un baño sonicador durante 10 min (Branson 2200), calentándose posteriormente por 5 min a 95 °C. Luego se toma una alícuota de 20 µl y se centrifuga a 6000 × g durante 2 min (Sorvall, MC12V, Dupont), de estos 20 µl se aplican 15 µl de sobrenadante a la SDS-PAGE.

Este protocolo fue utilizado para todos los clones, con la variante de que en los clones **G. instriacum** y **P. lima** no se utilizó PMSF en la preparación de las muestras.

4.2 Técnica De Electroforesis (SDS-PAGE)

La técnica utilizada es la descrita por Laemmli (1970), con la modificación de utilizar la técnica con la cámara Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad). Esta técnica permite un análisis más rápido y de menor costo para un gran número de muestras de proteínas (hasta 16 muestras por corrida).

4.2.1 Preparación De Reactivos Y Soluciones Para El SDS-PAGE En Cámara Mini Protean II.

Para la preparación del gel discontinuo se procedió de la siguiente manera:

4.2.1.a Solución Acrilamida-Bisacrilamida

Acrilamida	14.6 g/50 ml H_2O
N' N'-Bis-metilen-acrilamida	0.4 g/50 ml H_2O

4.2.1.b 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

Tris base	18.15 g/100 ml H_2O
HCl 2N	16 ml

4.2.1.c 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

Tris base	6.06 g/100 ml H_2O
HCl 2N	10 ml

4.2.1.d 10% SDS

SDS	2.5 g/25 ml H_2O

4.2.1.e Colorante Marcador de Corrida

Glicerol 10%	10 ml
Tris-HCl 1.5M pH 8.0	600 µl (20 mM)
EDTA 0.1M	1 ml (2 mM)

H_2O	38.4 ml

4.2.1.f Gel Separador 12.5%

H_2O	1592 µl
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	1250 µl
SDS 10%	50 µl
Acrilamida-bisacrilamida	2083 µl
APS 10%	25 µl
TEMED	3 µl

4.2.1.g Gel Empaquetador 4%

H_2O	763 µl
Tris HCl 0.5 M pH 6.8	325 µl
SDS 10%	13 µl
Acrilamida-bisacrilamida	163 µl
APS 10%	6 µl
TEMED	3 µl

4.2.1.h Tampón de la Muestra

Colorante marcador de corrida	120 µl

SDS 10%	80 µl
2-β-mercaptoetanol	40 µl
Azul de bromofenol 0.05%	20 µl

4.2.1.i Estándar de proteínas de bajo peso molecular

Para determinar el peso molecular de las proteínas presentes en los dinoflagelados, éstos se comparan con pesos moleculares de proteínas conocidas, las cuales corresponden a estándares comercialmente disponibles.

A los estándares liofilizados se les solubiliza en la siguiente solución:

Colorante marcador de corrida+ glicerol + Tampón	80 µl
10% SDS	50 µl
2-β-mercaptoetanol	50 µl
H_2O	20 µl

4.2.1.j Tampón de corrida (10 veces concentrado)

Tris 0.25M	7.57 g/250 ml H_2O
Glicina 0.92M	36.05 g/250 ml H_2O

SDS 1 g 10 %	2.5 g/250 ml H_2O

4.2.1.k Solución de teñido

10% Ácido acético	20 ml/200 ml
40 % Metanol	80 ml/200 ml
0.1 % Coomasie blue R-250	0.2 g/200 ml
50% H_2O	100 ml/200 ml

4.2.1.l Solución de desteñir

40% Ácido acético	200 ml/500 ml
10% Metanol	50 ml/500 ml
50% H_2O	250 ml/500 ml

4.2.1.m Solución de secado

25% Metanol	125 ml/500 ml
25% Ácido acético	125 ml/500 ml
50% H_2O	250 ml/500 ml

4.3 Geles Discontinuos

Los geles discontinuos están formados por un gel separador donde se separan las proteínas y un gel empaquetador ubicado sobre el primero, siendo de menor concentración de polímeros y por lo tanto de mayor poro. El gel empaquetador actúa concentrando los grandes volúmenes de muestras, dando como resultado una mejor resolución de las bandas.

Una vez que el gel está polimerizado, sobre éste se aplican las muestras de proteínas y los estándares en pocillos individuales. Luego se conecta la cámara a una fuente de poder aplicando 200 V, por 35 min. Al término de la electroforesis, se desconecta la fuente de poder y se desensambla el gel. Para visualizar las proteínas es necesario teñirlas, para ésto se sumerge el gel en una solución de teñido durante 20 minutos con una agitación permanente. Como el colorante penetra en todo el gel, es necesario desteñir el gel hasta visualizar las bandas de proteínas sobre un fondo incoloro. Por último, se procede a secar el gel.

Para la determinación de los pesos moleculares de las muestras, se utilizó el programa computacional Gel-Perfect 5.2 . Este programa permite analizar una imagen captada por un "scanner", como archivo de interfase gráfica. Esto permite trabajar con el gel y hacer un análisis densitométrico de cada banda. Utilizando los patrones de proteínas con pesos moleculares conocidos, es posible determinar el peso molecular de cada banda en las muestras.

5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La Cromatografía es una técnica efectiva para aislar y purificar todo tipo de moléculas. Todos los tipos de cromatografía están basados en el mismo principio. Las muestras a ser examinadas interactúan con dos entidades físicas diferentes: una **fase móvil** y una **fase estacionaria**. La fase móvil llamada **solvente** mueve los componentes de la muestra hacia la región que contiene la fase estacionaria. La fase estacionaria tiene la habilidad de retener algunos compuestos. Los componentes se distribuyen entre la fase móvil y la estacionaria. Si algunos de los componentes de la muestra se une preferentemente a la fase estacionaria, ellos son retenidos en la fase estacionaria por más tiempo, así se retarda su elución a través del sistema de cromatografía. Las moléculas que muestran poca afinidad por la fase estacionaria permanecen más tiempo en la fase móvil y eluyen primero del sistema. En resumen, las moléculas son separadas porque difieren en su partición entre la fase móvil y la fase estacionaria (Boyer 1993b).

El HPLC, como una especialización de la cromatografía líquida, aporta ciertas características como método que la hacen una técnica muy poderosa, fundamentalmente porque aumenta la rapidez de separación (15 a 20 min una corrida), aumenta la cantidad de muestra a analizar y aumenta la resolución en la separación de los compuestos. Un equipo de HPLC está formado por los siguientes componentes: Una bomba de alta presión, que proporciona un flujo reproducible y constante del solvente a través de la columna; un inyector donde se introduce la muestra en la columna de una manera eficiente y reproducible; una columna donde se encuentra la fase estacionaria; un detector que mantiene un continuo monitoreo del eluído de la columna,

detectando la presencia de compuestos; por último un registrador que recibe la información del detector y traza un perfil cromatográfico de la elución, siendo estos datos útiles para análisis cualitativos o cuantitativos (Figura 5). Los parámetros que se miden en el HPLC son los tiempos de retención, los cuales son característicos de cada compuesto bajo esas condiciones cromatográficas, y el área bajo la curva que es directamente proporcional a la masa del compuesto.

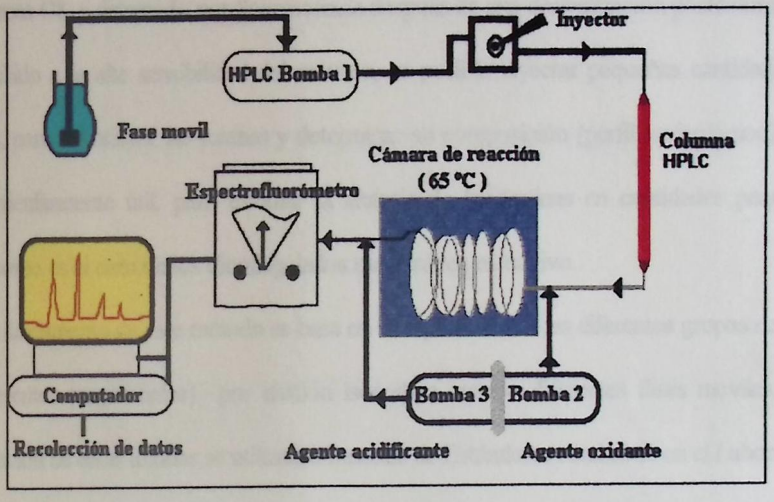


Figura 5.- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

En nuestro caso la adquisicíon de datos se realizó a través de un computador, lo que permite además un análisis posterior de la información.

5.1 *Método De Identificación De VPM*

El método de análisis por HPLC para la determinación de las toxinas del VPM fue el descrito por Oshima (1995) y modificado por Lagos **et al.** (1996). Esta técnica presenta una sensibilidad de 10-30 pg de cada una de las toxinas presentes en el VPM. El método de HPLC utilizado para medir estas toxinas, es una cromatografía de par iónico y fase reversa utilizando una columna C8, y detectado por flourescencia después de una derivatización postcolumna.

Debido a la alta sensibilidad del método, es posible inyectar pequeñas cantidades de las muestras, para cuantificar las toxinas y determinar su composición (perfil toxicológico). Esto lo hace particularmente útil, para estudiar la síntesis de las toxinas en cantidades pequeñas de células, como es el caso de los dinoflagelados mantenidos en cultivo.

El fundamento de este método se basa en la separación de las diferentes grupos de toxinas (con diferentes cargas netas) por elución isocrática usando diferentes fases móviles. Para la cuantificación de estas toxinas se utilizaron mezclas de Estándares Analíticos en el Laboratorio de Bioquímica de Membrana, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Estos estándares se han preparado usando certificación de Espectroscopía de Masa y comigración por HPLC, con los estándares producidos en Japón. Estos estándares son: Saxitoxina (STX), Neosaxitoxina (neoSTX), Decarbamoilsaxitoxina (dcSTX), Gonyaulatoxinas (GTX1/4, GTX2/3, GTX5) y sulfocarbamoil saxitoxinas (C1/2, C3/4).

La descripción de los estándares utilizados es la siguiente:

5.1.1 Estándar NLG 913 (1/50)

TOXINAS	CONCENTRACIÓN µM
GTX4	0.52
GTX1	1.52
GTX5	0.70
GTX3	0.15
GTX2	0.44

5.1.2 Estándar TOUC 915

TOXINAS	CONCENTRACIÓN µM
C1	0.556
C2	0.144
C3	0.906
C4	0.204

La concentración de las toxinas fue determinada por la comparación de las áreas de los picos de cada toxina, con aquellos de los estándares certificados.

5.1.3 Estándar NLM 913 (1/10)

TOXINAS	CONCENTRACIÓN µM
neoSTX	0.947
decSTX	0.265
STX	0.450

5.2 Tratamiento De Las Células Para Determinación De Toxinas Por HPLC.

La extracción de VPM se realizó de la siguiente manera: Se cosechó alícuotas de los clones de los dinoflagelados en cultivo. Las células se sedimentaron a 2.000 x g durante 10 min (Sorvall MC12V, Dupont). Se contaron las células. El sedimento celular fue extraído químicamente utilizando un nuevo método descrito recientemente por Ruiz-Tagle **et al.** (1997). Enseguida10 µl del extracto acuoso ácido final se inyecta al equipo de HPLC, inmediatamente, o de lo contrario los extractos eran congelados en nitrógeno líquido y guardados en un congelador a -20 °C, para ser inyectados posteriormente.

RESULTADOS

1. CONSTANTES DE CRECIMIENTO Y CURVAS DE CRECIMIENTO

1.1 **Alexandrium catenella-*Magallanes* *(MAC8)***

Los resultados del conteo del clon MAC8 se muestra en la Tabla 1 y la Curva de Crecimiento de Crecimiento obtenida con estos datos, en la Figura 6

Tabla 1.- Conteo de células de **Alexandrium catenella** (Magallanes) MAC8, expresado en cél ml^{-1}.

DÍAS	RECUENTOS
0	2185
3	4570
6	9348
9	11437
12	30619
15	59241
18	65165
21	62764
24	63906

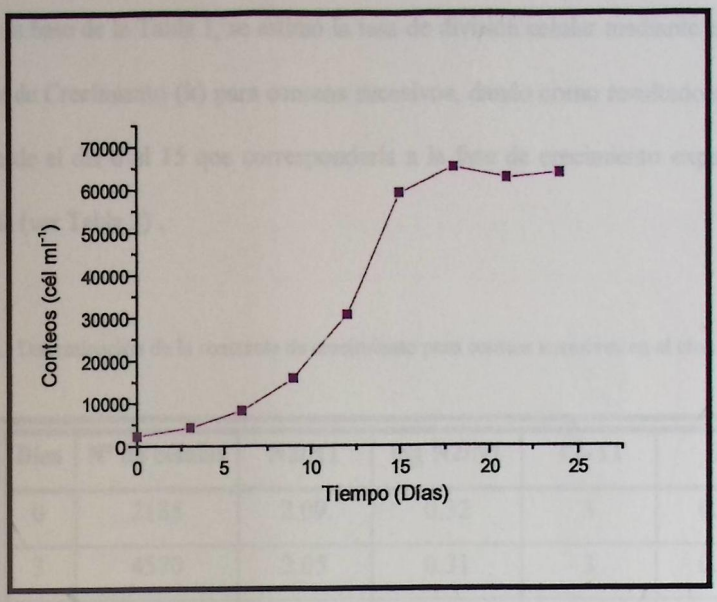


Figura 6.- Curva de crecimiento de MAC8

De acuerdo a la Curva de Crecimiento se puede visualizar que esta especie presenta un crecimiento exponencial a partir del día 6 (equivalente al tiempo 6) hasta el día 15.

Sobre la base de la Tabla 1, se estimó la tasa de división celular mediante el cálculo de la Constante de Crecimiento (k) para conteos sucesivos, dando como resultado el promedio de las k (desde el día 6 al 15 que correspondería a la fase de crecimiento exponencial) de 0.24 div./día (ver Tabla 2) .

Tabla 2.- Determinación de la constante de crecimiento para conteos sucesivos en el clon MAC8.

Días	N° de células	N2/N1	log N2/N1	T2-T1	k
0	2185	2.09	0.32	3	0.35
3	4570	2.05	0.31	3	0.34
6	9348	1.22	0.09	3	0.10
9	11437	2.68	0.43	3	0.47
12	30619	1.93	0.29	3	0.32
15	59241	1.10	0.04	3	0.05
18	65165	0.96	-0.02	3	-0.02
21	62764	1.02	0.01	3	0.01
24	63906	0	0	0	0

Mediante la estimación gráfica de la contante de crecimiento el resultado de ésta es de 0.28 div./día (Figura 7). Con esto se puede estimar una tiempo de duplicación celular de aproximadamente 4 días.

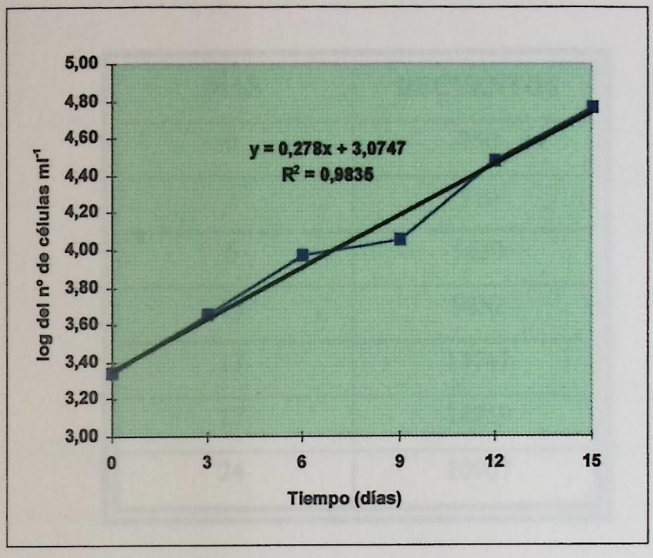


Figura 7.- Estimación gráfica de la constante de crecimiento de MAC8

1.2 Alexandrium catenella-*Aysén (AAC7)*

La Tabla 3 muestra los resultados del conteo de AAC7.

Tabla 3.- Resultado del conteo de células de **Alexandrium catenella** (Aysén) para la obtención de la curva de crecimiento, expresado en cél ml^{-1}

DÍAS	RECUENTOS
0	750
3	910
6	5630
10	9852
13	14741
17	18759
24	10907

Según estos datos se trazó la Curva de Crecimiento para el clon AAC7, la cual se muestra en la Figura 8

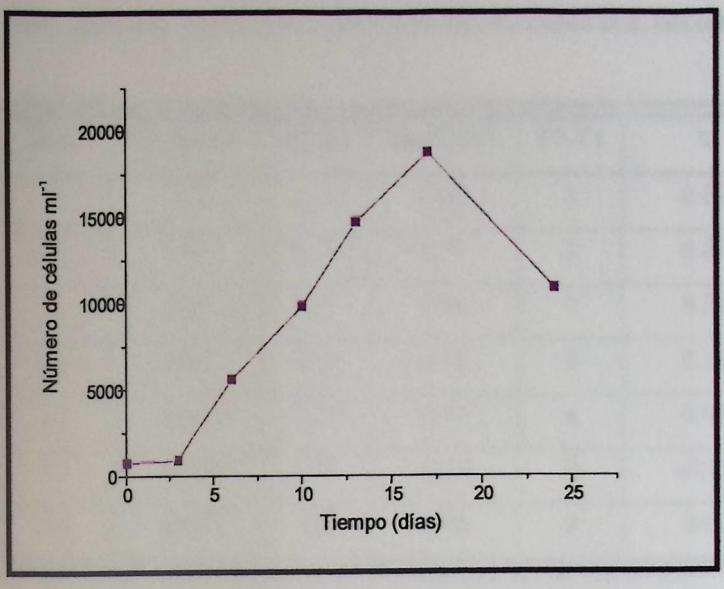


Figura 8.- Curva de Crecimiento de AAC7

Según los datos de la Tabla 3, se estructuró la tabla para la determinación de la Constante de Crecimiento (ver Tabla 4).

Tabla 4.- Determinación de la constante de crecimiento para conteos sucesivos de **A. catenella** (Aysén).

Días	N° de cel.	N2/N1	log N2/N1	T2-T1	k
0	750	1.21	0.08	3	0.09
3	910	6.19	0.79	3	0.88
6	5630	1.75	0.24	4	0.20
10	9852	1.50	0.18	3	0.19
13	14741	1.27	0.10	4	0.09
17	18759	0.58	-0.24	7	-0.11
24	10907	0.00	0.00	0	0.00

Se calculó la Constante de Crecimiento, contabilizando desde el día 3 hasta el 17. Mediante el promedio de las constantes de crecimiento durante estos tiempos, se obtuvo que k presentaba un valor de 0.25 div/día.

La Figura 9 también muestra la estimación de la curva de crecimiento, pero mediante la transformación logarítmica de los datos de la curva de crecimiento.

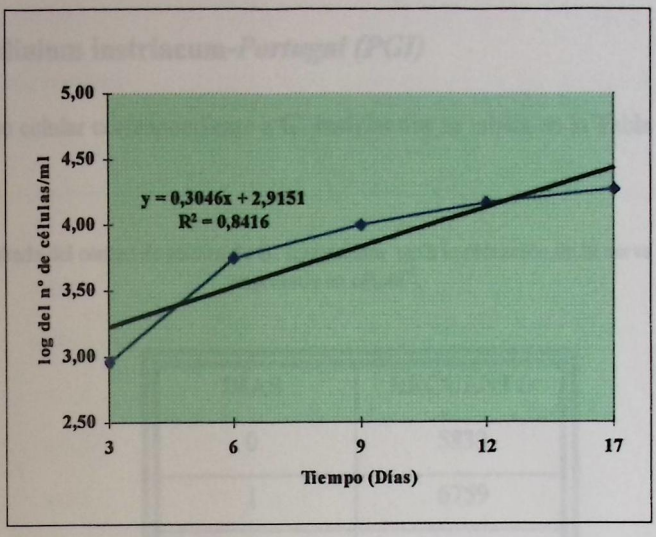


Figura 9.- Estimación gráfica de la constante de crecimiento de AAC7

Según la pendiente de la Fig. 9, correspondiente a la constante de crecimiento, se obtuvo un valor de 0,30 div/día. Con esto se corrobora que el Tiempo de duplicación celular es de 3- 4 días .

1.3 Gyrodinium instriacum-*Portugal (PGI)*

El conteo celular correspondiente a **G. instriacum** se tabula en la Tabla 5.

Tabla 5.- Resultado del conteo de células de **G. instriacum** para la obtención de la curva de crecimiento, expresado en cél ml^{-1}.

DÍAS	RECUENTO
0	5833
1	6759
2	11426
3	16133
4	20188
5	26083
6	27917
7	30042
8	30750
9	33063
10	37624
12	44917
14	57750
16	63375
18	62708
20	62083

La curva de crecimiento correspondiente a esta especie se presenta en la Figura 10

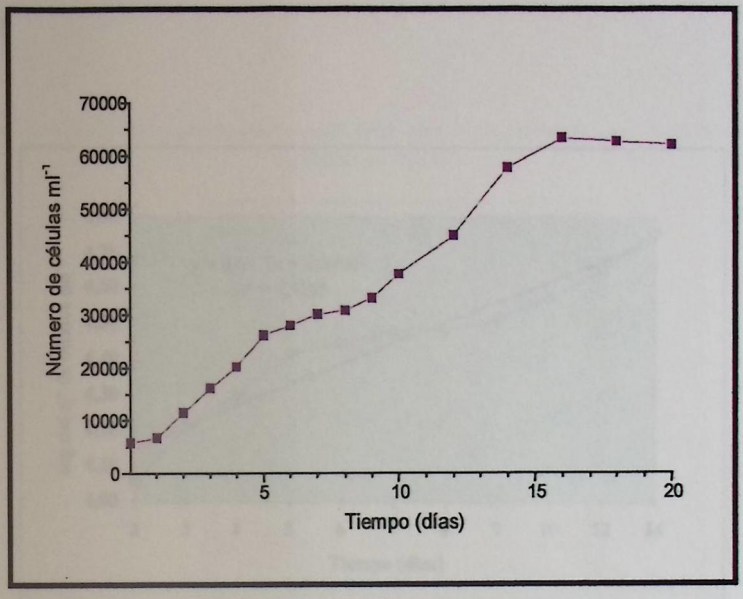


Figura 10.- Curva de Crecimiento de PGI

De acuerdo al número de cél ml^{-1} correspondientes a la Tabla 5, se calculó la constante de crecimiento (considerando del T_2 al T_{14}) para **G. instriacum,** sólo mediante la estimación gráfica, siendo ésta de 0,06 div/día, con un tiempo de duplicación de 16 días (ver Figura 11)

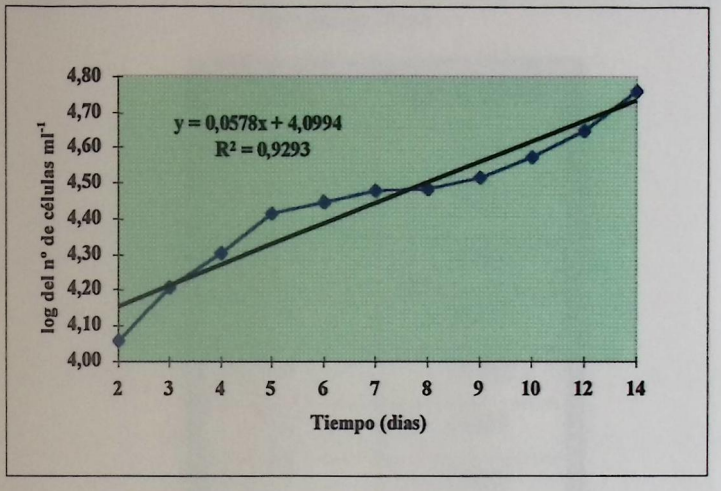


Figura 11.- Estimación gráfica de la constante de crecimiento de PGI

1.4 Prorocemtrum lima *(PL)*

Los datos que muestran los resultados del conteo celular de PL se tabulan en la Tabla 6 y se grafican en la Figura 12

Tabla 6.- Resultado del conteo de células de **P. lima** para la obtención de la curva de crecimiento, expresado en cél ml^{-1}.

DÍAS	RECUENTO
0	6611
1	5315
2	6463
3	10233
4	11792
6	14833
7	17083
8	20750
9	24213
11	32625
13	35063
15	44625
17	56417
19	55438
21	70432

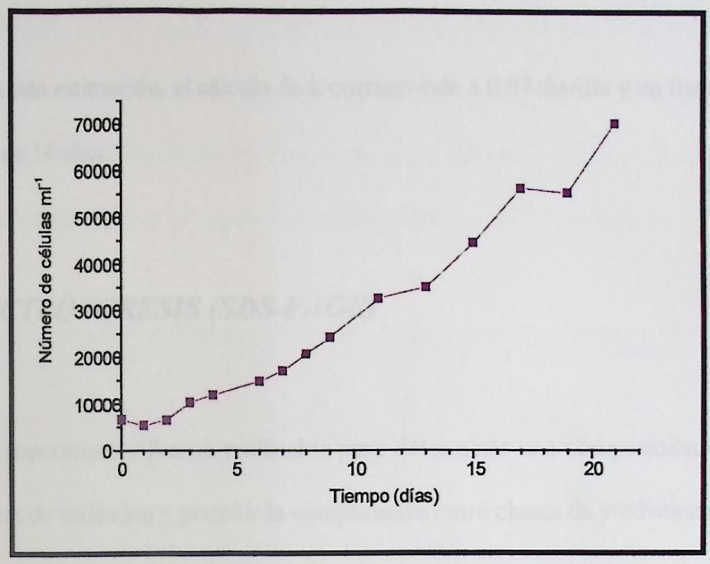


Figura 12.- Curva de Crecimiento de PL

Al igual que para PGI, en la Figura 13 se muestra la estimación gráfica de k mediante la pendiente de la recta, considerando la fase de crecimiento exponencial desde el T_6 al T_{21}.

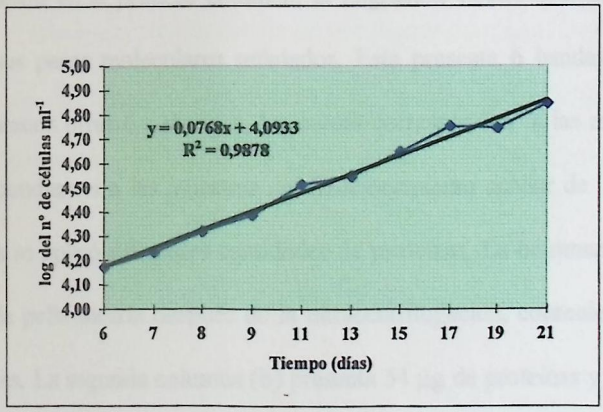


Figura 13.- Estimación gráfica de la constante de crecimiento de PL

Según esta estimación, el cálculo de k corresponde a 0.07 div/día y un tiempo de duplicación de 14 días.

2. *ELECTROFORESIS (SDS-PAGE)*

Estos experimentos fueron realizados para determinar una composición de proteínas características de cada clon y permitir la comparación entre clones de y/odistintas especies.

2.1 Alexandrium catenella-*Magallanes (MAC8)*

La Figura 14 muestra el resultado del gel para el clon MAC8. Mirando de derecha a izquierda, se muestra en la primera columna, la migración electroforética de las proteínas estándares con sus pesos moleculares señalados. Esta presenta 6 bandas de proteínas. A continuación aparecen otras 6 columnas, las cuales corresponden a las migraciones de las proteínas correspondientes a las muestras del fraccionamiento celular de **A. catenella**. En cada una de ellas se aplicó diferentes cantidades de proteínas. La columna **a** corresponde a una muestra de la pella sacada después de la ultracentrifugación, conteniendo esta muestra 11 µg de proteínas. La segunda columna (**b**) presenta 54 µg de proteínas y corresponde a la pella al finalizar el proceso de diálisis. En la columna **c** se visualiza una muestra de la pella

antes de la diálisis, con 11 µg de proteínas. La siguiente (**d**) corresponde al sobrenadante sin dialización, con una cantidad de 39 µg de proteínas. En **e** se muestra el homogenizado inicial recién sonicado (16 µg de proteínas). Finalmente en la columna **f**, con 16 µg de proteínas, se presenta una muestra de pella después de la centrifugación a baja velocidad.

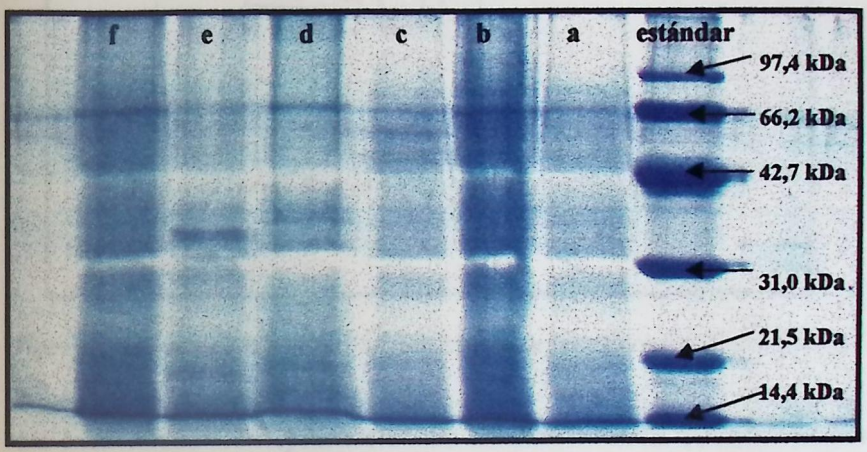


Figura 14.- SDS-PAGE 12,5% **Alexandrium catenella** (MAC8, Magallanes)

La Figura 15 muestra la Densitometría de la columna correspondiente a los estándares de proteínas del gel de la Figura 14, anteriormente descrito. Claramente se observan que existen 6 picos correspondientes a las 6 bandas de proteínas, con sus correspondientes pesos moleculares.

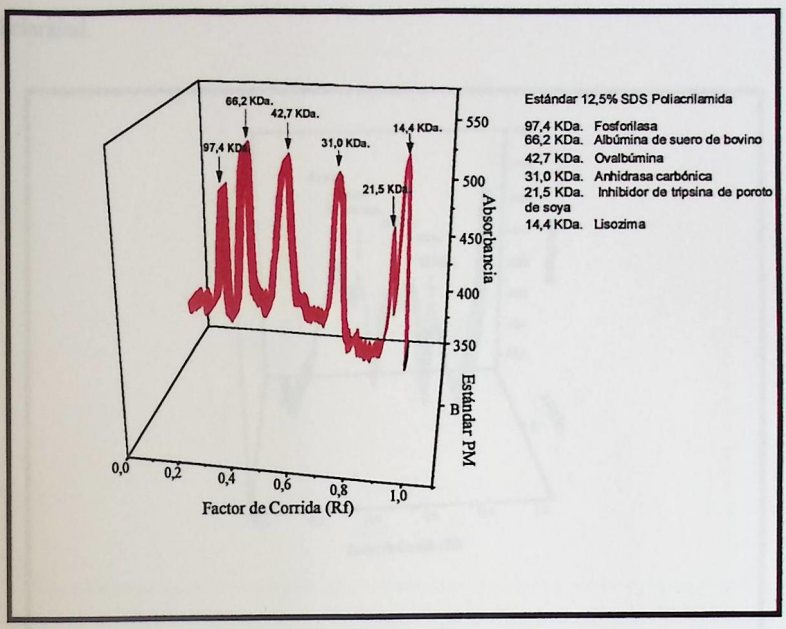


Figura 15.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de Estándar de Proteínas de Bajo Peso Molecular

Las densitometrías correspondientes a las muestras **a-f** están representadas por las Figuras 16 - 21 respectivamente. Como resultado del análisis de las figuras se puede señalar que existen a lo menos 7 bandas de proteínas que están presentes en las muestras, con mayor o menor intensidad. El peso molecular de cada una de ellas, fue determinado mediante la comparación del peso molecular de las bandas del estándar. Según el peso molecular que presentaron, cada banda fue denominada usando la abreviación de su origen más el valor de su peso molecular: MAC69 kDa. [Factor de corrida (Rf) = 0,23]; MAC60 kDa. (Rf = 0,3); MAC50 kDa. (Rf = 0,37); MAC39 kDa. (Rf = 0,5); MAC35 kDa. (Rf = 0,58); MAC30 kDa. (Rf = 0,68) y MAC17 kDa. (Rf = 0,92). Además, se debe señalar que la banda MAC23 kDa. (RF = 0,86) no se colocó en las densitometrías, debido a que su graficación no tenía

una total claridad.

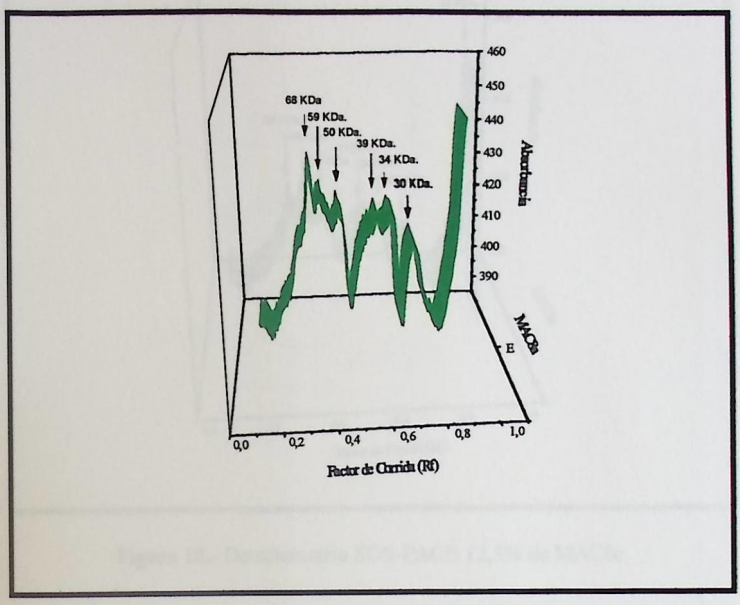


Figura 16.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8a

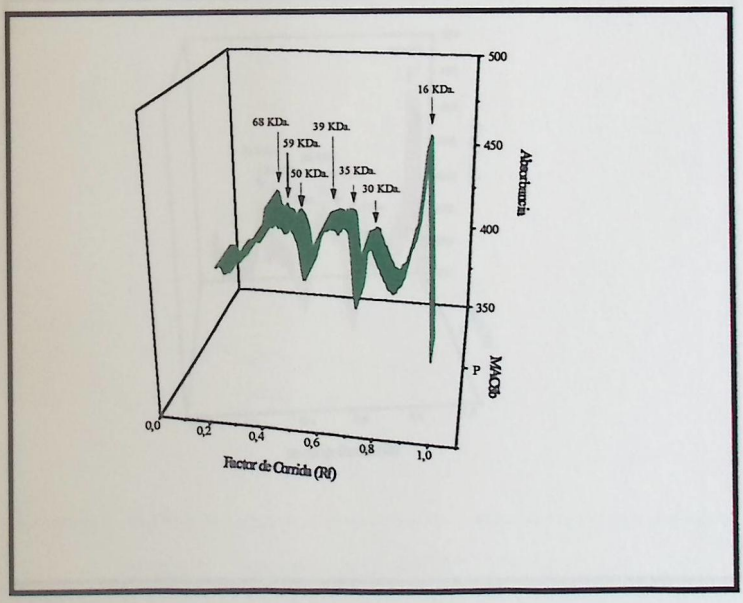


Figura 17 .- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8b

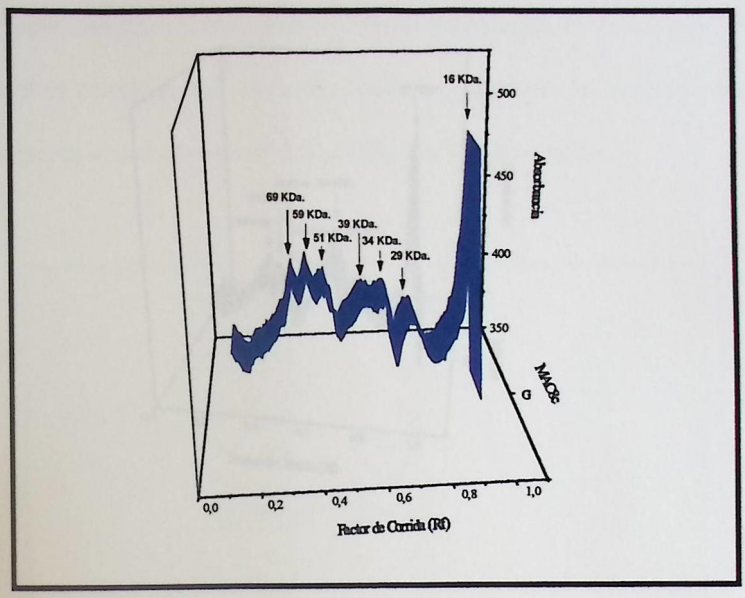


Figura 18.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8c

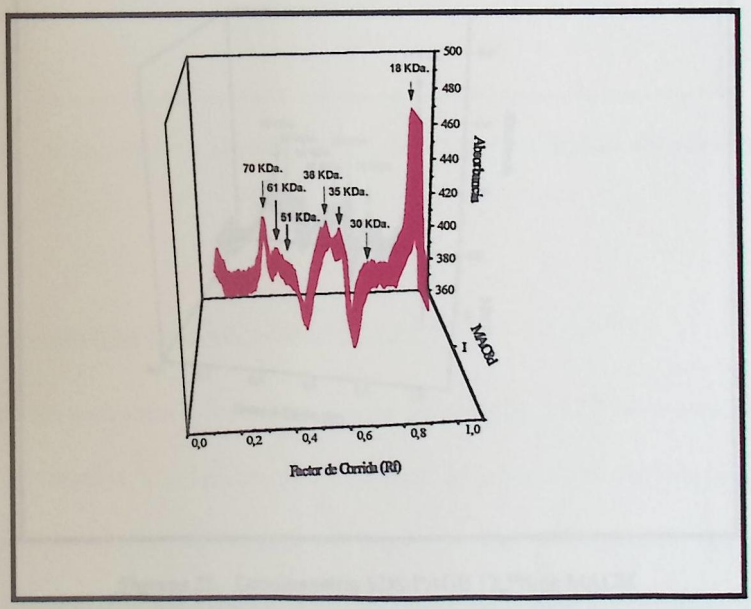


Figura 19.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8d

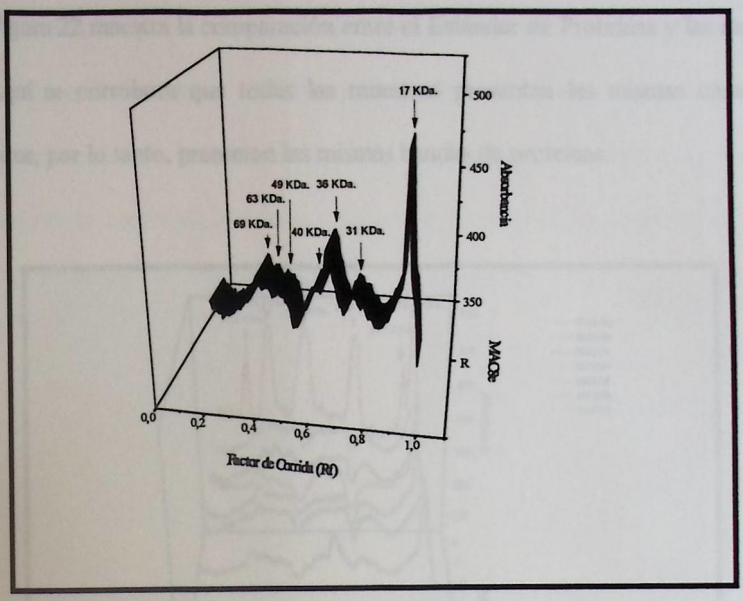
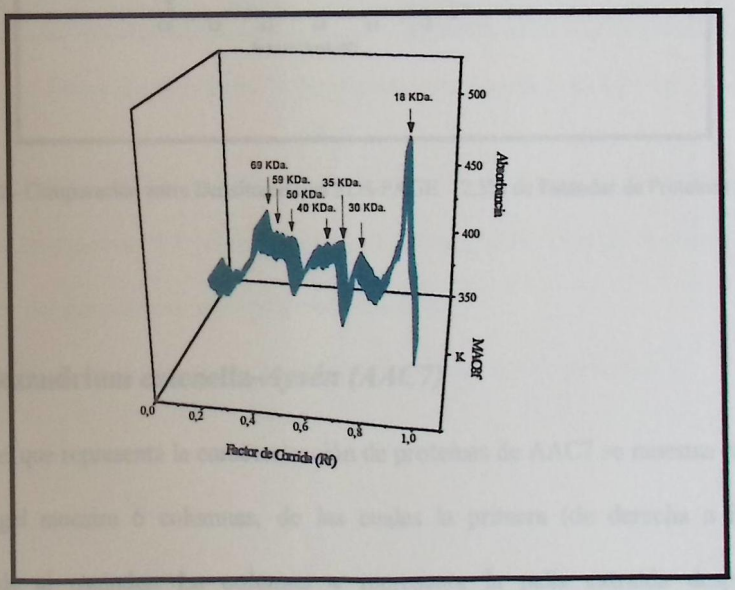


Figura 20.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8e



Figuras 21.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8f

La Figura 22 muestra la comparación entre el Estándar de Proteínas y las muestras de MAC8. Aquí se corrobora que todas las muestras presentan las mismas características gráficas y que, por lo tanto, presentan las mismas bandas de proteínas.

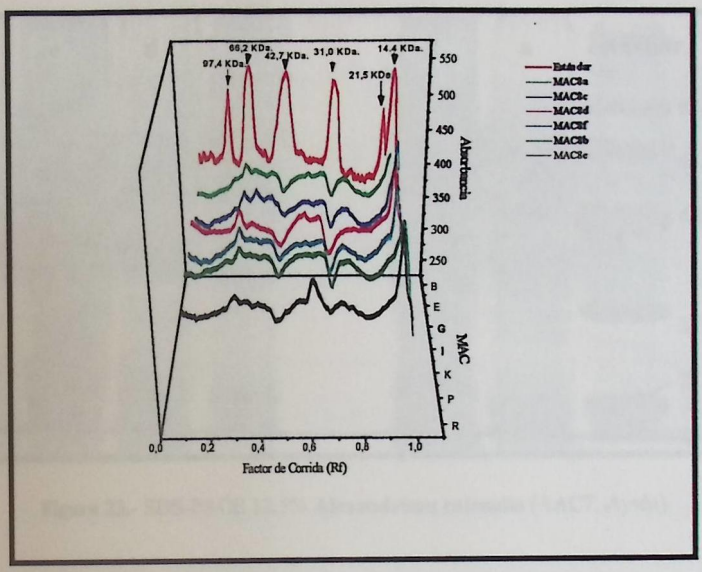


Figura 22.- Comparación entre Densitometrías SDS-PAGE 12,5% de Estándar de Proteínas y MAC8

2.2 Alexandrium catenella-*Aysén (AAC7)*

El gel que representa la caracterización de proteínas de AAC7 se muestra en la Figura 23. Este gel muestra 6 columnas, de las cuales la primera (de derecha a izquierda) corresponde al estándar. La columna **a** representa la pella extraída después de la ultracentrifugación, con una cantidad de 10 µg de proteínas.. En **b** se visualiza la pella con

50 µg de proteínas, después de dializar. La tercera columna (**c**) representa un sobrenadante sin diálisis (36 µg de proteínas). Con 16 µg de proteínas se observa en la columna **d** una muestra de pella antes de la ultracentrifugación. Por último, la corrida **e** es una muestra extraída luego de la centrifugación a baja velocidad y contiene 12 µg de proteínas.

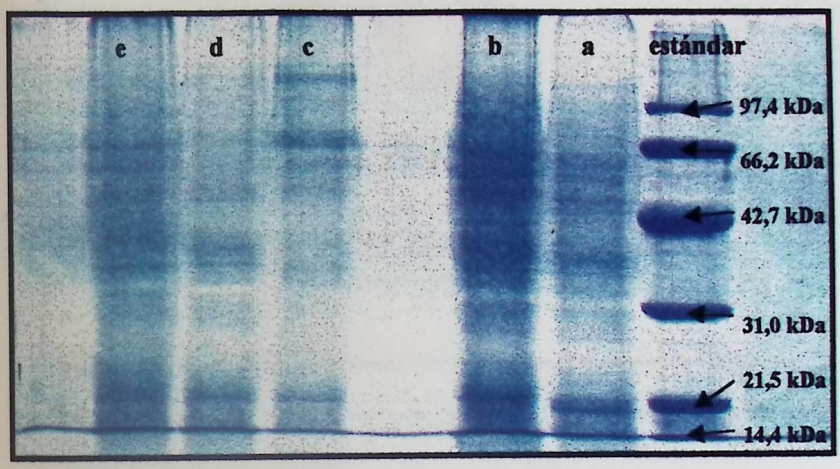


Figura 23.- SDS-PAGE 12,5% **Alexandrium catenella** (AAC7, Aysén)

Análogamente a como se hizo con el clon MAC8, se realizaron las densitometrías de cada una de las columnas del gel de la Figura 23, correspondiente al perfil electroforético de las proteínas del fraccionamiento celular del clon AAC7.

En la Figura 24 se muestra la densitometría del estandar de proteínas.

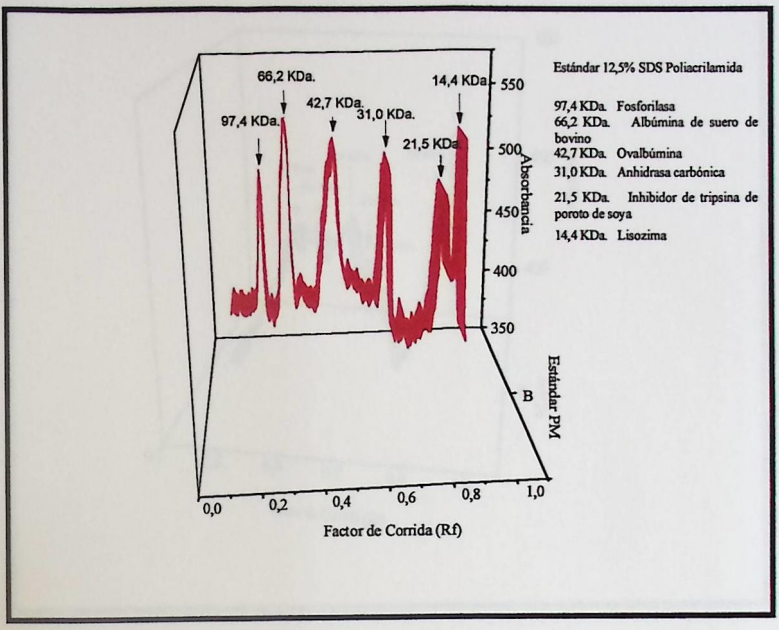


Figura 24.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de Estándar de Proteínas de Bajo Peso Molecular

De acuerdo a las densitometrías de las columnas de las muestras de AAC7 representads en las Figuras 25 a la 29, se pueden visualizar a lo menos 8 bandas de proteínas correspondientes al promedio de las muestras de este clon. Igualmente estas fueron denominadas según su peso molecular y corresponden a: AAC68 kDa. (Rf = 0,21); AAC60 kDa. (Rf = 0,26); AAC51 kDa. (Rf = 0,33); AAC39 kDa. (Rf = 0,46); AAC35 kDa. (Rf = 0,52); AAC31 kDa. (Rf = 0,59); AAC22 kDa. (Rf = 0,8) y AAC15 kDa. (Rf = 0,88).

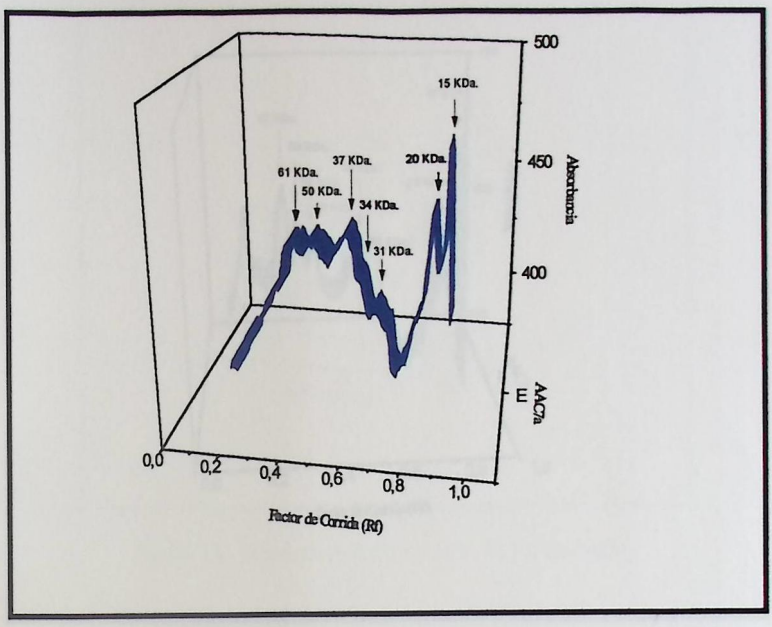


Figura 25.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7a

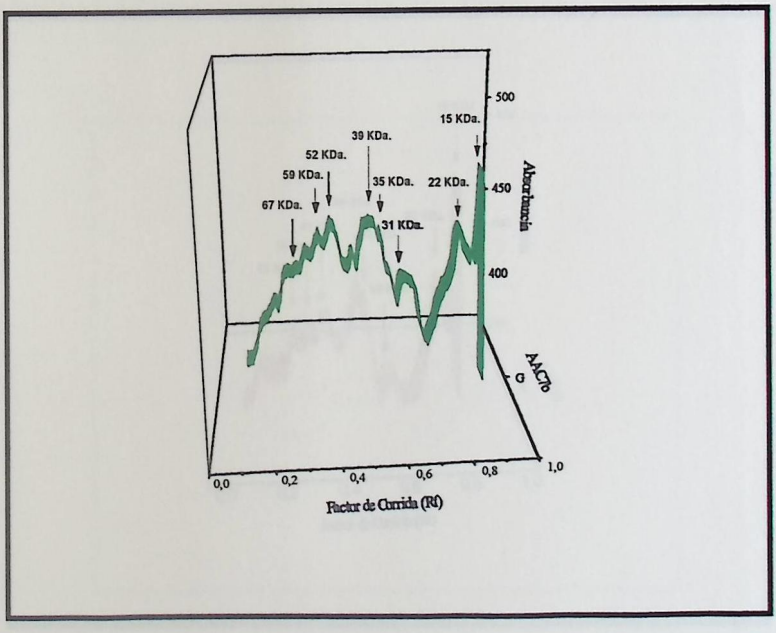


Figura 26.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7b

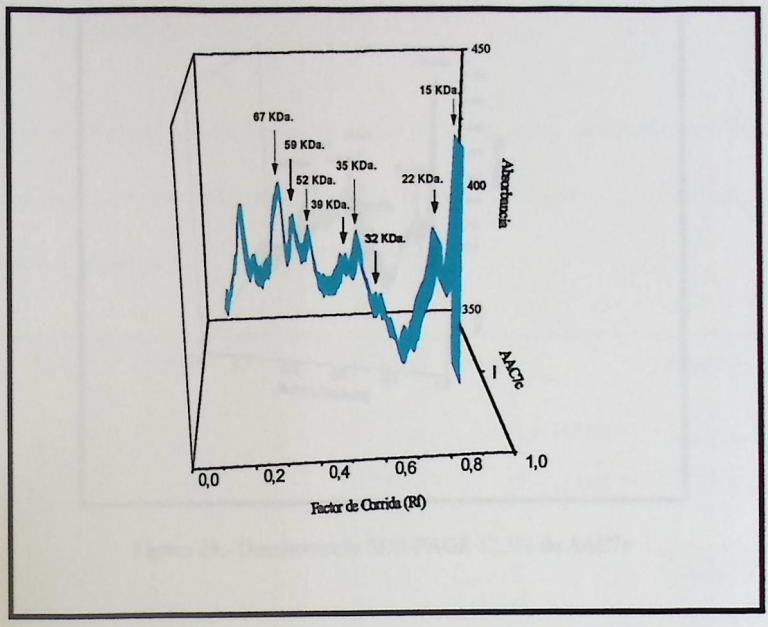


Figura 27.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7c

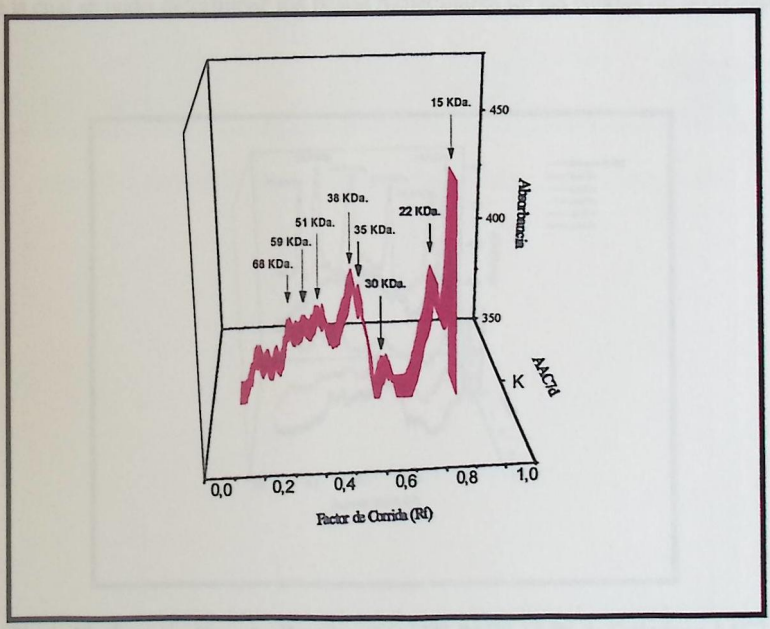


Figura 28.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7d

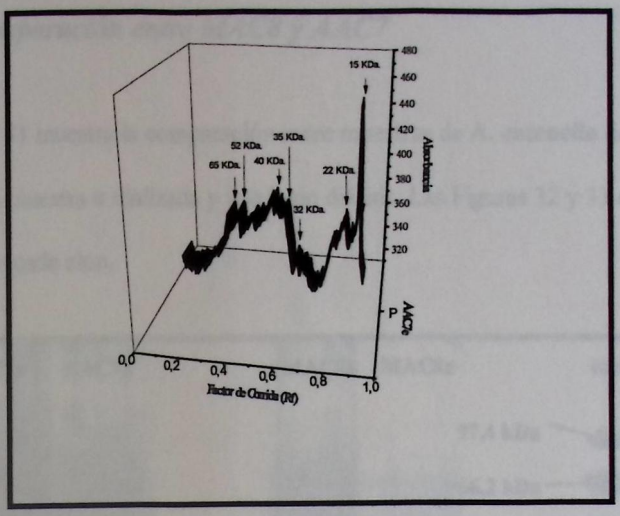


Figura 29.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7e

En la Figura 30 se presenta la comparación entre el estándar y las muestras de AAC7, mediante la cual se pudo determinar los pesos moleculares de las bandas de proteínas.

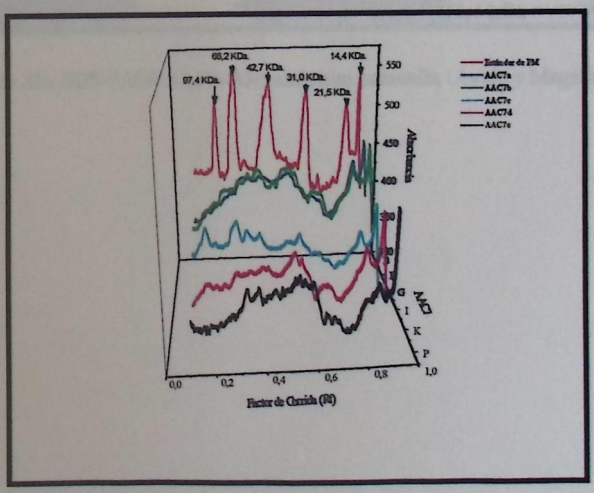


Figura 30.- Comparación entre Densitometría SDS-PAGE 12,5% de Estándar y AAC7

2.3 Comparación entre MAC8 y AAC7

La Figura 31 muestra la comparación entre muestras de **A. catenella** de Magallanes y Aysén , con una muestra **a** dializada y una **b** sin diálisis. Las Figuras 32 y 33 ejemplifican una densitometría de cada clon.

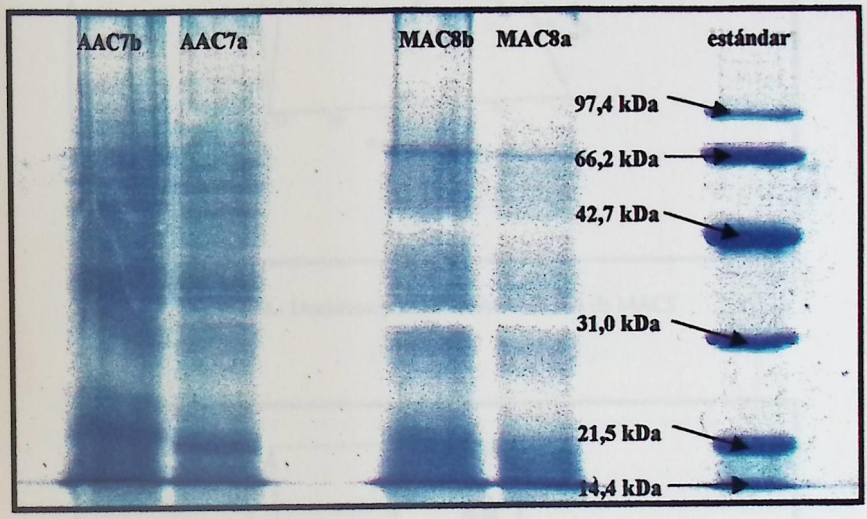


Figura 31.- SDS-PAGE 12,5% **Alexandrium catenella** (Aysén y Magallanes)

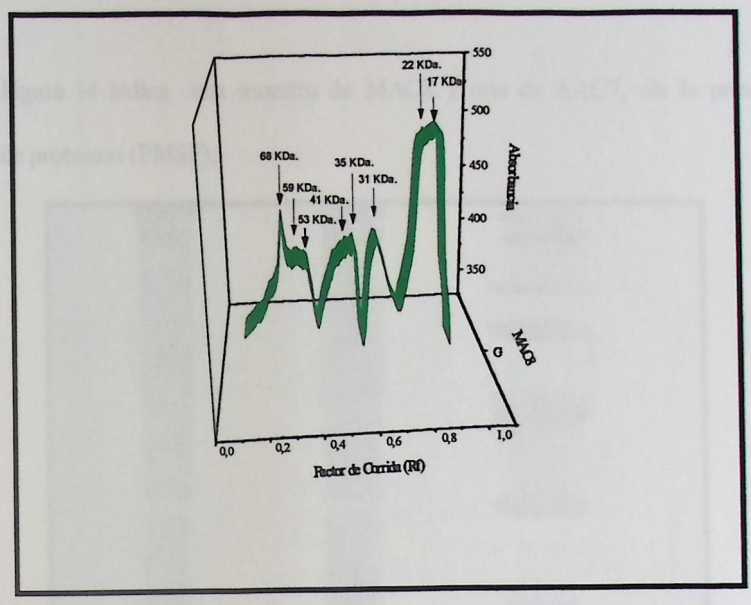


Figura 32.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de MAC8

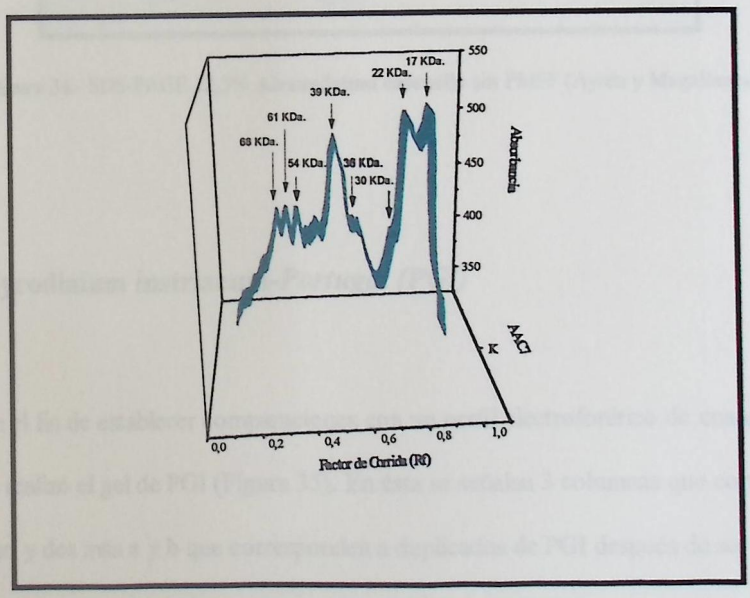


Figura 33.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de AAC7

La Figura 34 indica una muestra de MAC8 y una de AAC7, sin la presencia del inhibidor de proteasas (PMSF).

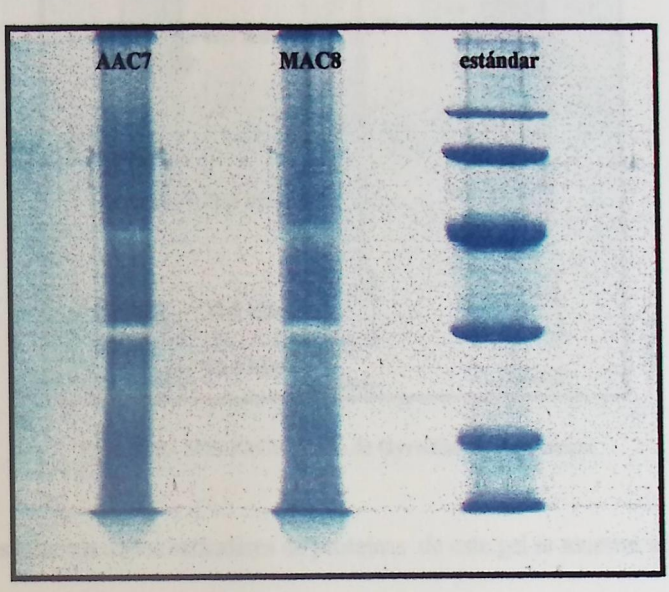


Figura 34.- SDS-PAGE 12,5% **Alexandrium catenella** sin PMSF (Aysén y Magallanes)

2.4 Gyrodinium instriacum-*Portugal (PGI)*

Con el fin de establecer comparaciones con un perfil electroforético de una especie no tóxica, se realizó el gel de PGI (Figura 35). En ésta se señalan 3 columnas que corresponden al estándar, y dos más a y b que corresponden a duplicados de PGI después de ser dializadas (28 µg de proteínas cada una).

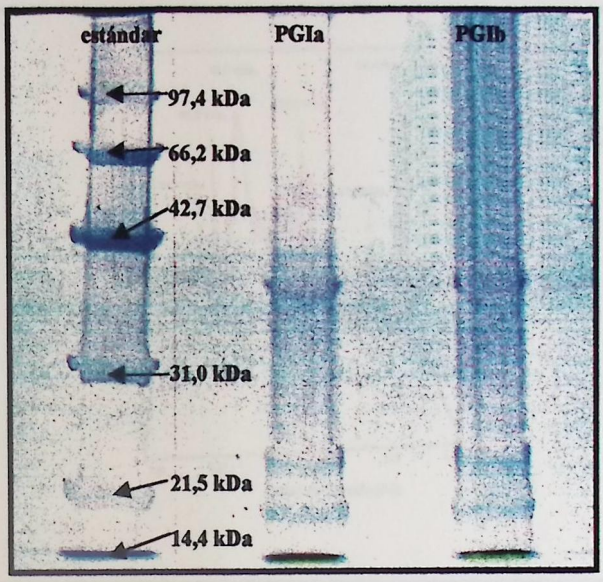


Figura 35.- SDS-PAGE 12,5% de **Gyrodinium instriacum**

La densitometría de los estándares de proteínas de este gel se muestra en la Figura 36.

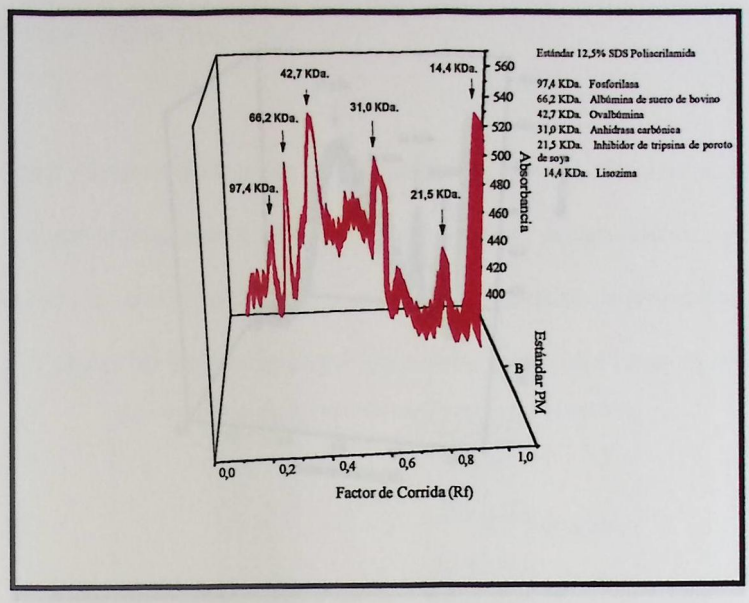


Figura 36.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de Estándar de Proteínas de Bajo Peso Molecular

La densitometría promedio indica que para este clon existen a lo menos 4 bandas de proteínas propias de PGI. Al igual que para los otros clones, las bandas fueron denominadas según su peso molecular. El resultado del análisis determinó la existencia de las bandas PGI37 kDa. (Rf = 0,41); PGI28 kDa. (Rf = 0,63); PGI24 kDa. (Rf = 0,75) y PGI20 kDa. (Rf = 0,87) (ver las Figuras 37 y 38).

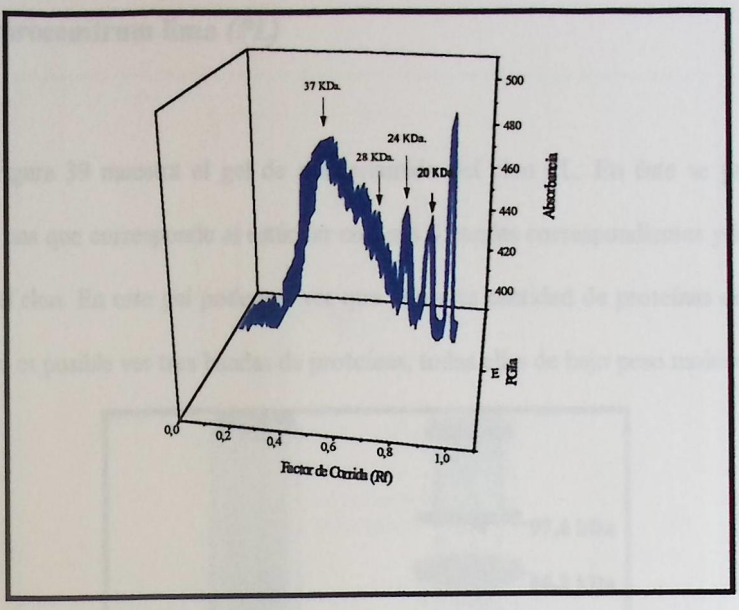


Figura 37.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de PGIa

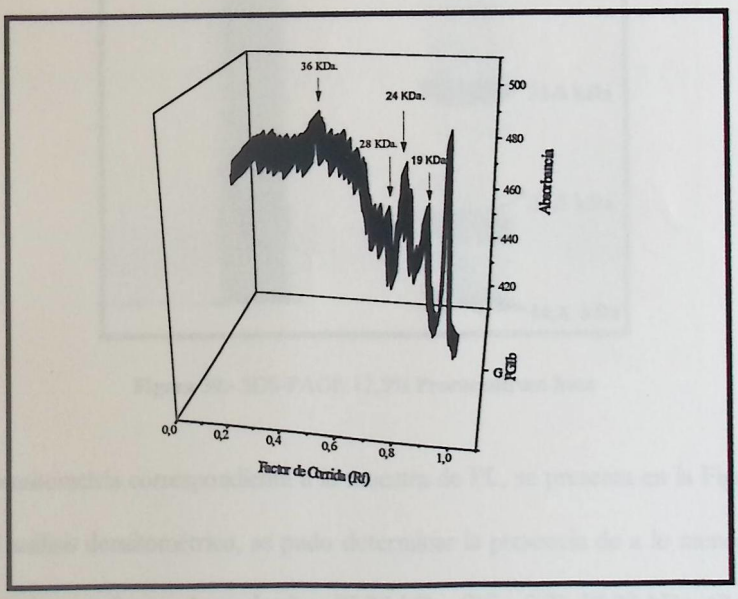


Figura 38.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de PGIb

2.5 Prorocemtrum lima *(PL)*

La Figura 39 muestra el gel de poliacriamida del clon PL. En éste se presentan 2 columnas, una que corresponde al estándar con sus 6 bandas correspondientes y la otra a la muestra del clon. En este gel podemos ver que con esta cantidad de proteínas del extracto de PL, sólo es posible ver tres bandas de proteínas, todas ellas de bajo peso molecular.

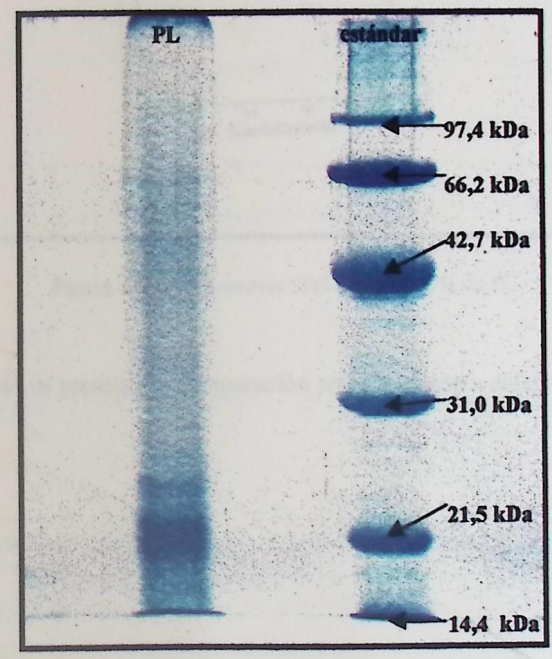


Figura 39.- SDS-PAGE 12,5% **Prorocentrum lima**

La densitometría correspondiente a la muestra de PL, se presenta en la Figura 40. De acuerdo al análisis densitométrico, se pudo determinar la presencia de a lo menos 3 bandas de proteínas, las que fueron denominadas: PL24 kDa. (Rf = 0,7); PL23 kDa. (Rf = 0,75) y

PL22 kDa. (Rf = 0,79).

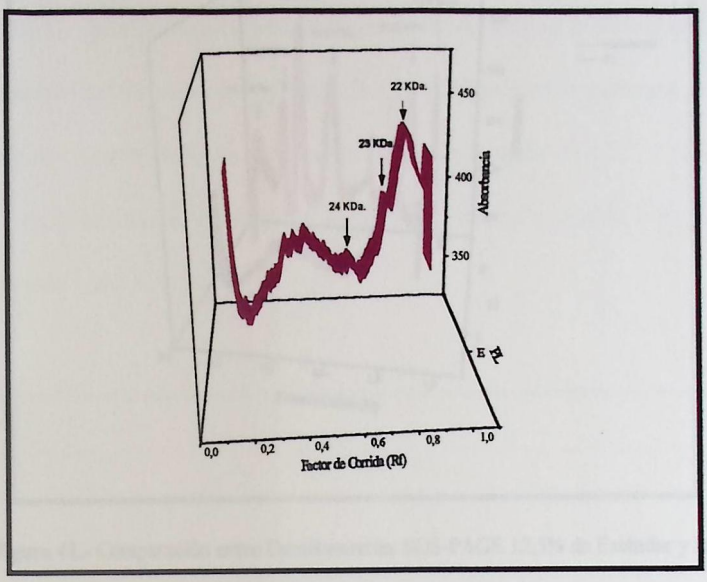


Figura 40.- Densitometría SDS-PAGE 12,5% de PL

En la Figura 41 se presenta la comparación entre la muestra del clon PL y el estándar.

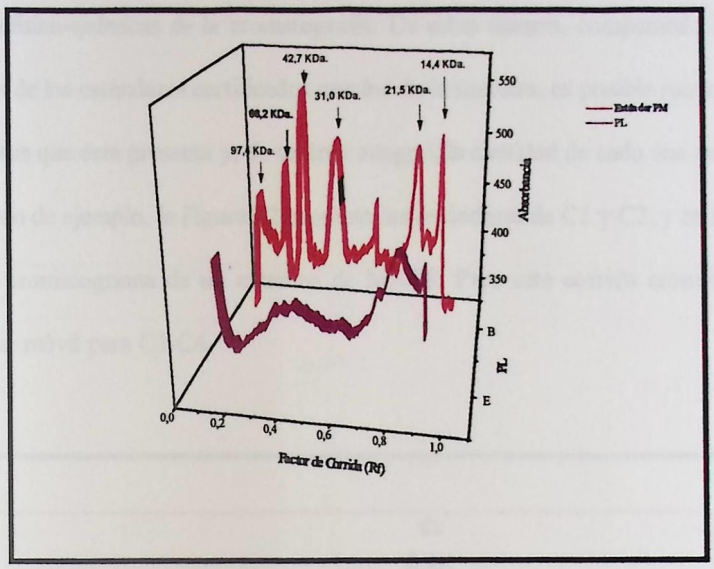


Figura 41.- Comparación entre Densitometrías SDS-PAGE 12,5% de Estándar y PL

3. *CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)*

Los datos que entrega el HPLC son en forma de cromatogramas y para cada fase móvil hay estándares que se utilizan para la determinación de los perfiles de toxinas. Cada sustancia que es eluída de una columna cromatográfica presenta su elución en la forma de un pico. Igualmente, los estándares presentan esta representación gráfica, por lo tanto tienen un área que es directamente proporcional a la concentración de la sustancia que representa. Adicionalmente, cada pico presenta una constante que le es característica y que corresponde al tiempo de retención. Este siempre es igual y característico bajo las mismas

condiciones físico-químicas de la cromatografía. De estas manera, comparando los tiempos de retención de los estándares certificados con los de la muestra, es posible reconocer cuales son las toxinas que ésta presenta y, de su área integral, la cantidad de cada una de ellas.

A modo de ejemplo, la Figura 42 presenta los estándares de C1 y C2, y en la Figura 43 muestra el cromatograma de un extracto de MAC8. Para esta corrida cromatográfica se utilizó la fase móvil para C1-C4.

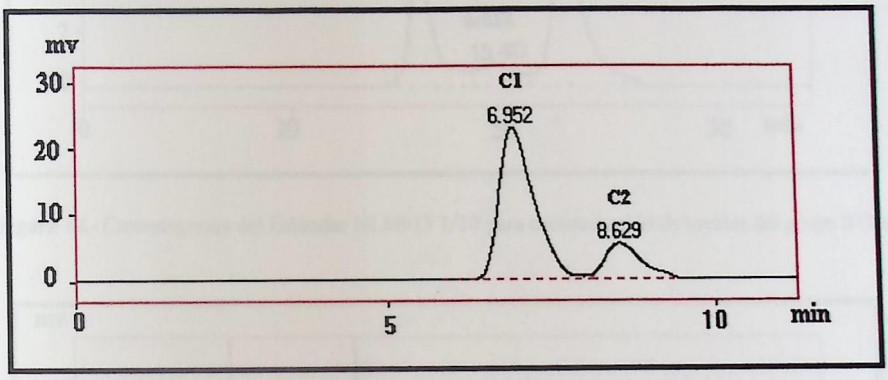


Figura 42.- Cromatograma del Estándar C1-C2 1/25 para determinación de toxinas del grupo C1-C4

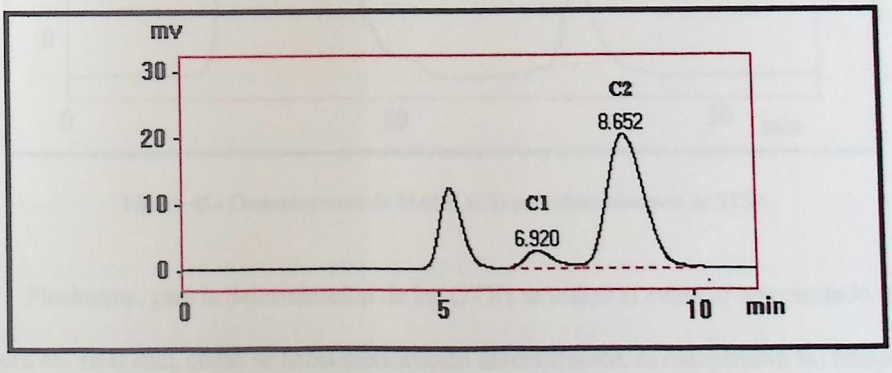


Figura 43.- Cromatograma de MAC8 al T_0 para determinación de C1-C4

La Figura 44 muestra el cromatograma del estándar del grupo de las STXs, utilizando la fase móvil para este grupo de toxinas. El cromatograma correspondiente a un extracto de MAC8 para la determinación de estas toxinas, se muestra en la Figura 45.

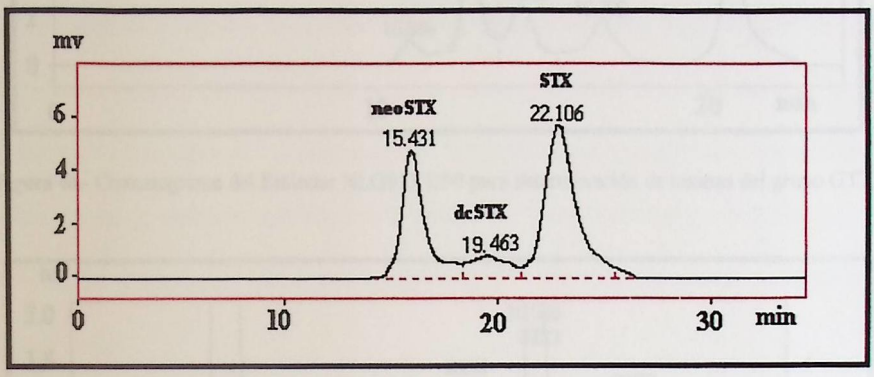


Figura 44.- Cromatograma del Estándar NLM913 1/10 para determinación de toxinas del grupo STXs

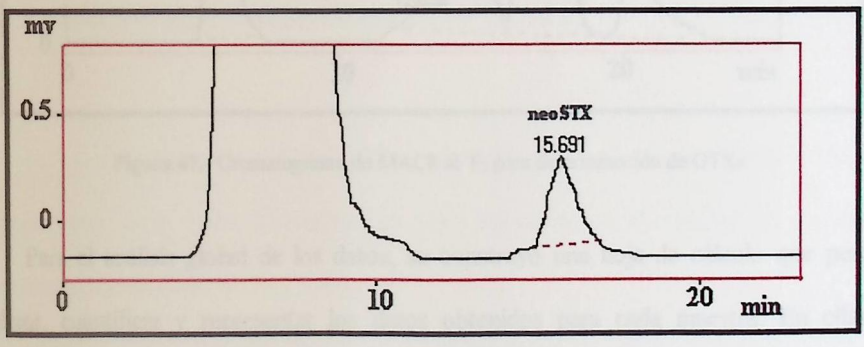


Figura 45.- Cromatograma de MAC8 al T_9 para determinación de STXs

Finalmente, para la determinación de las GTXs se utilizó el estándar representado en la Figura 46, en el cual, como se había mencionado anteriormente, se compararon los tiempos de retención de éste con los de la muestra de MAC8 (Figura 47).

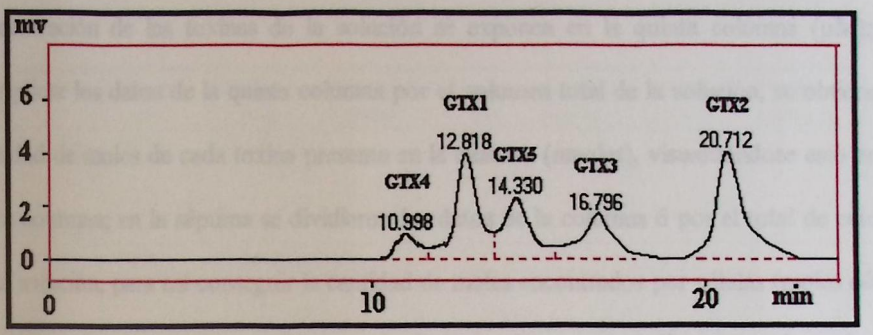


Figura 46.- Cromatograma del Estándar NLG913 1/50 para determinación de toxinas del grupo GTXs

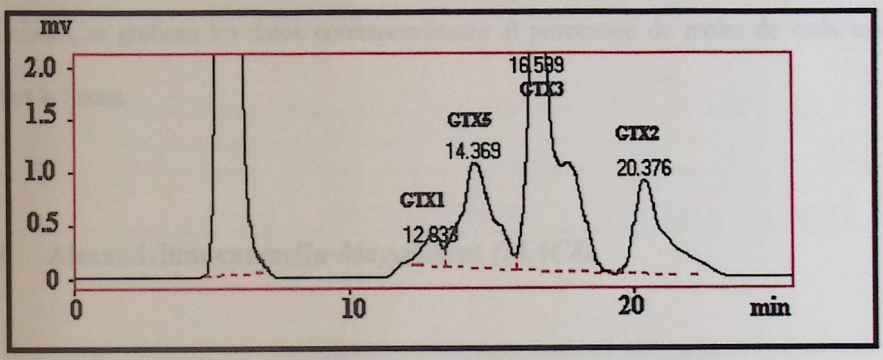


Figura 47.- Cromatograma de MAC8 al T_3 para determinación de GTXs

Para el análisis global de los datos, se construyó una hoja de cálculo que permite analizar, cuantificar y representar los datos obtenidos para cada muestra. En ellas se encuentran los datos correspondientes a los cromatogramas. El diseño de esta hoja de cálculo presenta 8 columnas: la primera dentificaba las toxinas a analizar del VPM; la segunda mostraba la concentración de los diferentes estándares utilizados (µM); en la tercera se colocaron las áreas integrales correspondientes a los estándares de la columna 2;

en la cuarta se colocan las áreas de las toxinas encontradas en la muestra en estudio; la concentración de las toxinas de la solución se exponen en la quinta columna (μM); al multiplicar los datos de la quinta columna por el volumen total de la solución, se obtiene la cantidad de moles de cada toxina presente en la muestra (nmoles), visualizándose esto en la sexta columna; en la séptima se dividieron los datos de la columna 6 por el total de células de la solución, para así conseguir la cantidad de moles encontrados por células (moles $cél^{-1}$); por último, la octava muestra el porcentaje de los moles correspondientes a cada toxina en relación al total de moles encontrados en la solución. Para obtener el perfil toxicológico de los clones, se grafican los datos correspondientes al porcentaje de moles de cada toxina versus la toxina.

3.1 Alexandrium catenella-*Magallanes (MAC8)*

La Tabla 7 muestra el análisis de VPM efectuado para un extracto del clon MAC8 en la etapa inicial de la curva de crecimiento (T_0). En esta etapa de crecimiento las células presentaron una cantidad de 15,7 fmoles $cél^{-1}$.

Tabla 7.- Análisis de VPM por HPLC para 43.697 células de una muestra 0,46 ml de MAC8 en el T_0 (inyección de 10 µl)

Toxinas	STD-conc. uM	STD-Ar. x 1000	Muestra Ar x1000	Conc-Sol uM	nmoles totales	moles/cel x 10-15	Perfil moles %
(C1-C4)	STD=	C1-C2 1/25					
C1	1,96	890	55	0,12	0,06	1,28	8,1
C2	0,44	241	521	0,95	0,44	10,01	63,7
Subtotal							72
(GTXs)	STD=	TUMG913 (I/50)					
GTX4	0,52	42	0	0,00	0,00	0,00	0,0
GTX1	1,52	193	0	0,00	0,00	0,00	0,0
GTX5	0,70	132	37	0,20	0,09	2,07	13,1
GTX3	0,15	129	93	0,11	0,05	1,14	7,2
GTX2	0,44	251	5	0,01	0,00	0,09	0,6
Subtotal							20,98
(STXs)	STD=	TUMS913 1/10					
neoSTX	0,977	57	5	0,09	0,04	0,90	5,7
dcSTX	0,265	41	2	0,01	0,01	0,14	0,9
STX	0,450	54	1	0,01	0,00	0,09	0,6
Subtotal							7,2
Total				1,49	0,69	15,71	100,0
			TOXINAS VPM/CEL=		15,7 X10-15MOLES/CEL		

El perfil toxicológico correspondiente a esta muestra se observa en la Figura 48, indicando la presencia de 8 toxinas del VPM. Los epímeros C1-C2 y GTX2/GTX3 son los mayoritarios, y muestran una gran cantidad de GTX5.

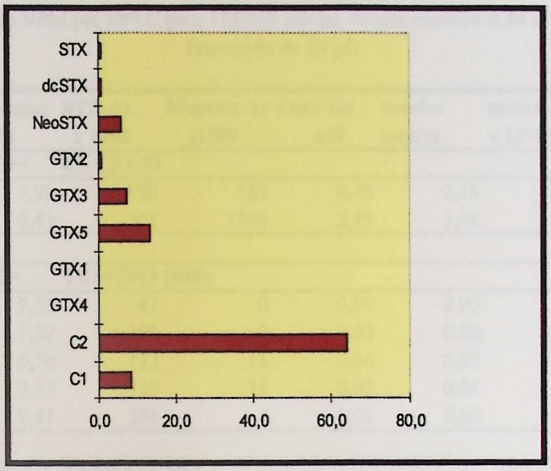


Figura 48.- Perfil de toxicidad del clon MAC8 en el T_0

En el tercer día (T_3) de la curva de crecimiento de MAC8, estas células presentaron 11,6 fmoles $cél^{-1}$ (Tabla 8). El perfil toxicológico correspondiente, para esta etapa de crecimiento, se muestra en la Figura 49.

Tabla 8.- Análisis de VPM por HPLC para 114.253 células de una muestra 0,44 ml de MAC8 en el T_3 (inyección de 10 µl)

Toxinas	STD-conc. uM	STD-Ar. x 1000	Muestra Ar x1000	Conc-Sol uM	nmoles totales	moles/cel x 10-15	Perfil moles %
(C1-C4)	STD=	C1-C2 1/25					
C1	1,96	890	181	0,40	0,18	1,54	13,2
C2	0,44	241	1341	2,45	1,08	9,43	81,1
Subtotal							94
(GTXs)	STD=	TUMG913 (I/50)					
GTX4	0,52	42	0	0,00	0,00	0,00	0,0
GTX1	1,52	193	0	0,00	0,00	0,00	0,0
GTX5	0,70	132	11	0,06	0,03	0,22	1,9
GTX3	0,15	129	18	0,02	0,01	0,08	0,7
GTX2	0,44	251	4	0,01	0,00	0,03	0,2
Subtotal							2,86
(STXs)	STD=	TUMS913 1/10					
neoSTX	0,977	57	5	0,09	0,04	0,33	2,8
dcSTX	0,265	41	0	0,00	0,00	0,00	0,0
STX	0,450	54	0	0,00	0,00	0,00	0,0
Subtotal							2,8
Total				3,02	1,33	11,63	100,0
			TOXINAS VPM/CEL=		11,6 X10-15MOLES/CEL		

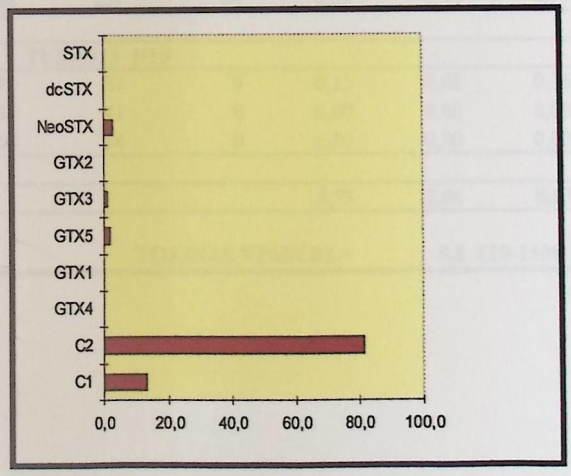


Figura 49.- Perfil de toxicidad del clon MAC8 en el T_3

La Tabla 9 muestra los datos del extracto de MAC8 a comienzos de la fase exponencial (seis días, T_6). Como resultado del análisis de esta muestra, se obtuvo que en este tiempo hay 8,8 fmoles $cél^{-1}$. El perfil toxicológico para esta etapa se representan en la Figura 50.

Tabla 9.- Análisis de VPM por HPLC para 233.700 células de una muestra 0,55 ml de MAC8 en el T_6 (inyección de 10 µl)

Toxinas	STD-conc. uM	STD-Ar. x 1000	Muestra Ar x1000	Conc-Sol uM	nmoles totales	moles/cel x 10-15	Perfil moles %
(C1-C4)	STD=	C1-C2 1/25					
C1	1,96	890	181	0,40	0,22	0,94	10,6
C2	0,44	241	1341	2,45	1,35	5,76	65,2
Subtotal							**76**
(GTXs)	STD=	TUMG913 (I/50)					
GTX4	0,52	42	0	0,00	0,00	0,00	0,0
GTX1	1,52	193	11	0,09	0,05	0,20	2,3
GTX5	0,70	132	59	0,31	0,17	0,74	8,3
GTX3	0,15	129	233	0,27	0,15	0,64	7,2
GTX2	0,44	251	46	0,08	0,04	0,19	2,1
Subtotal							**20,02**
(STXs)	STD=	TUMS913 1/10					
neoSTX	0,977	57	9	0,15	0,08	0,36	4,1
dcSTX	0,265	41	0	0,00	0,00	0,00	0,0
STX	0,450	54	0	0,00	0,00	0,00	0,0
Subtotal							**4,1**
Total				**3,75**	**2,06**	**8,83**	**100,0**
			TOXINAS VPM/CEL=		**8,8 X10-15MOLES/CEL**		

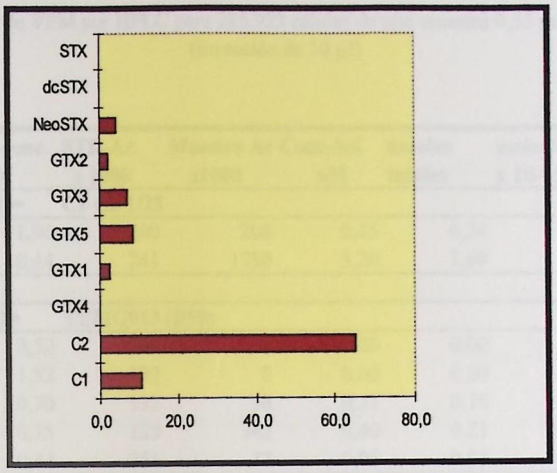


Figura 50.- Perfil de toxicidad del clon MAC8 en el T_6

Una segunda muestra en la fase exponencial (nueve días, T_9) se representa en la Tabla 10, resultando una cantidad de 8,6 fmoles $cél^{-1}$ para el clon MAC8. El perfil toxicológico del porcentaje de moles está indicado en la Figura 51.

Tabla 10.- Análisis de VPM por HPLC para 285.923 células de una muestra 0,53 ml de MAC8 en el T_9 (inyección de 10 µl)

Toxinas	STD-conc. uM	STD-Ar. x 1000	Muestra Ar x1000	Conc-Sol uM	nmoles totales	moles/cel x 10-15	Perfil moles %
(C1-C4)	STD=	C1-C2 1/25					
C1	1,96	890	206	0,45	0,24	0,84	9,8
C2	0,44	241	1750	3,20	1,69	5,92	69,1
Subtotal							79
(GTXs)	STD=	TUMG913 (I/50)					
GTX4	0,52	42	0	0,00	0,00	0,00	0,0
GTX1	1,52	193	0	0,00	0,00	0,00	0,0
GTX5	0,70	132	58	0,31	0,16	0,57	6,7
GTX3	0,15	129	342	0,40	0,21	0,74	8,6
GTX2	0,44	251	37	0,06	0,03	0,12	1,4
Subtotal							16,65
(STXs)	STD=	TUMS913 1/10					
neoSTX	0,977	57	12	0,21	0,11	0,38	4,4
dcSTX	0,265	41	0	0,00	0,00	0,00	0,0
STX	0,450	54	0	0,00	0,00	0,00	0,0
Subtotal							4,4
Total				4,62	2,45	8,57	100,0
			TOXINAS VPM/CEL=			8,6 X10-15MOLES/CEL	

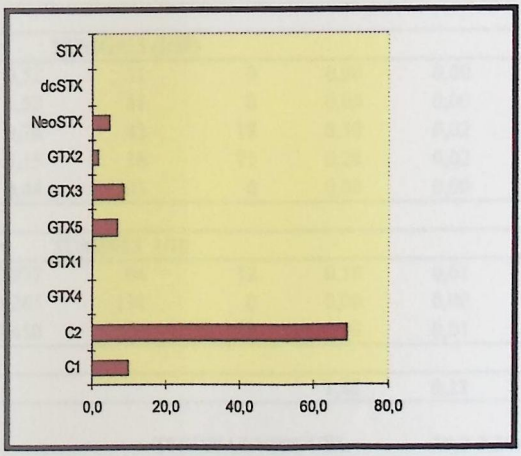


Figura 51.- Perfil de toxicidad del clon MAC8 en el T_9

3.2 **Alexandrium catenella-*Aysén*** (AAC7)

Al igual que para el clon MAC8, el clon AAC7 fue caracterizado toxicológicamente ,tanto en la fase estacionaria como en la fase exponencial.

Para la fase estacionaria se consideró una primera muestra, correspondiendo al T_0. En ésta se pudo determinar, por el análisis de la Tabla 11, que a este tiempo la cantidad de toxinas producidas era de 18,8 fmoles $cél^{-1}$. Su perfil toxicológico se muestra en la Figura 52.

Tabla 11.- Análisis de VPM por HPLC para 6.000 células de una muestra 0,08 ml de AAC7 en el T_0 (inyección de 10 µl)

Toxinas	STD-conc. uM	STD-Ar. x 1000	Muestra Ar x1000	Conc-Sol uM	nmoles totales	moles/cel x 10-15	Perfil moles %
(C1-C4)	STD=	TUMG915					
C1	0,556	860	14	0,01	0,00	0,12	0,6
C2	0,144	177	675	0,55	0,04	7,32	39,0
Subtotal							40
(GTXs)	STD=	TUMG913 (I/50)					
GTX4	0,52	31	0	0,00	0,00	0,00	0,0
GTX1	1,52	81	0	0,00	0,00	0,00	0,0
GTX5	0,70	42	18	0,30	0,02	4,00	21,3
GTX3	0,15	38	71	0,28	0,02	3,74	19,9
GTX2	0,44	103	0	0,00	0,00	0,00	0,0
Subtotal							41,21
(STXs)	STD=	TUMS913 1/10					
neoSTX	0,977	64	12	0,18	0,01	2,44	13,0
dcSTX	0,265	138	0	0,00	0,00	0,00	0,0
STX	0,450	156	30	0,09	0,01	1,15	6,1
Subtotal							19,2
Total				1,41	0,11	18,78	100,0
			TOXINAS VPM/CEL=		18,8 X10-15MOLES/CEL		

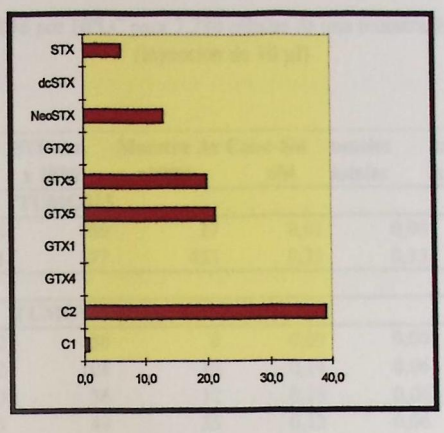


Figura 52.- Perfil de toxicidad del clon AAC7 en el T_0

Una segunda muestra, también en la fase estacionaria de la curva de crecimiento (T_3), mostró una cantidad de 51,3 fmoles $cél^{-1}$ (Tabla 12). El perfil del porcentaje de moles, mostró que el clon en esta fase presentaba 8 toxinas de las 18 conocidas para el VPM, aumentando en dos toxinas respecto al T_0 (Figura 53).

Tabla 12.- Análisis de VPM por HPLC para 7.280 células de una muestra 0,43 ml de AAC7 en el T_3 (inyección de 10 µl)

Toxinas	STD-conc. uM	STD-Ar. x 1000	Muestra Ar x1000	Conc-Sol uM	nmoles totales	moles/cel x 10-15	Perfiles moles %
(C1-C4)	STD=	TUMG915					
C1	0,556	860	17	0,01	0,00	0,65	1,3
C2	0,144	177	433	0,35	0,15	20,81	40,5
Subtotal							42
(GTXs)	STD=	TUMG913 (I/50)					
GTX4	0,52	36	0	0,00	0,00	0,00	0,0
GTX1	1,52	108	10	0,14	0,06	8,31	16,2
GTX5	0,70	56	12	0,15	0,06	8,86	17,3
GTX3	0,15	40	35	0,13	0,06	7,75	15,1
GTX2	0,44	132	4	0,01	0,01	0,79	1,5
Subtotal							50,08
(STXs)	STD=	TUMS913 1/10					
neoSTX	0,977	60	2	0,03	0,01	1,92	3,7
dcSTX	0,265	31	0	0,00	0,00	0,00	0,0
STX	0,450	71	6	0,04	0,02	2,25	4,4
Subtotal							8,1
Total				0,87	0,37	51,34	100,0
			TOXINAS VPM/CEL=		51,3 X10-15MOLES/CEL		

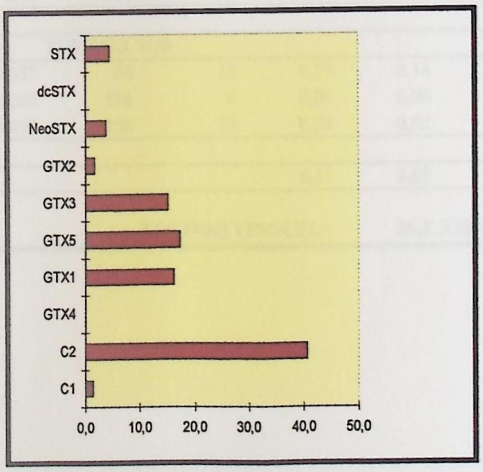


Figura 53.- Perfil de toxicidad del clon AAC7 en el T_3

En relación a la fase de crecimiento exponencial, se puede señalar que la muestra correspondiente al T_{13} presentó 26,2 fmoles $cél^{-1}$ (Tabla 13). En esta fase aparece GTX4 que no se había detectado en las fases anteriores, y tampoco en el clon MAC8 en ningunas de sus fases. Esto se visualiza claramente en el perfil toxicológico mostrado en la Figura 54.

Tabla 13.- Análisis de VPM por HPLC para 117.928 células de una muestra 0,5 ml de AAC7 en el T_{13} (inyección de 10 µl)

Toxinas	STD-conc. uM	STD-Ar. x 1000	Muestra Ar x1000	Conc-Sol uM	nmoles totales	moles/cel x 10-15	Perfil moles %
(C1-C4)	STD=	TUMG915					
C1	0,556	860	165	0,11	0,05	0,45	1,7
C2	0,144	177	3441	2,80	1,40	11,87	45,3
Subtotal							47
(GTXs)	STD=	TUMG913 (I/50)					
GTX4	0,52	31	18	0,30	0,15	1,28	4,9
GTX1	1,52	81	4	0,08	0,04	0,32	1,2
GTX5	0,70	42	106	1,77	0,88	7,49	28,6
GTX3	0,15	38	196	0,77	0,39	3,28	12,5
GTX2	0,44	103	9	0,04	0,02	0,16	0,6
Subtotal							47,87
(STXs)	STD=	TUMS913 1/10					
neoSTX	0,977	64	18	0,27	0,14	1,17	4,5
dcSTX	0,265	138	0	0,00	0,00	0,00	0,0
STX	0,450	156	13	0,04	0,02	0,16	0,6
Subtotal							5,1
Total				6,17	3,09	26,18	100,0
			TOXINAS VPM/CEL=			26,2 X10-15MOLES/CEL	

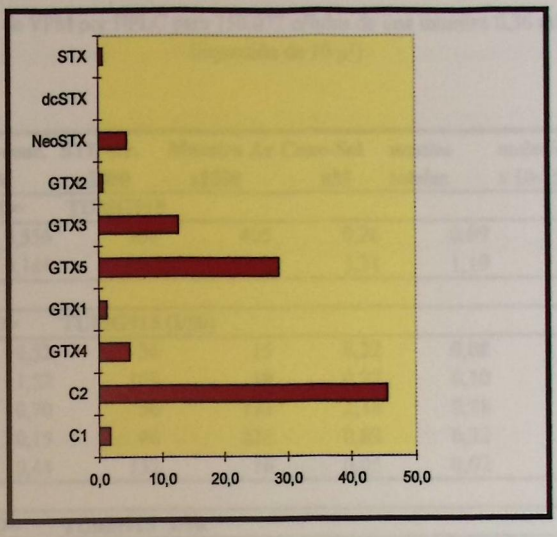


Figura 54.- Perfil de toxicidad del clon AAC7 en el T_{13}

Como una segunda muestra en la fase de crecimiento exponencial, se analizó la solución correspondiente al T_{17}. En ésta la producción de toxinas fue de 18,4 fmoles $cél^{-1}$ (ver Tabla 14). En el perfil toxicológico se mantuvo el mismo número de toxinas presentes en la muestra anterior, variando la proporción de éstas (ver Figura 55).

Tabla 14.- Análisis de VPM por HPLC para 150.072 células de una muestra 0,36 ml de AAC7 en el T_{17} (inyección de 10 µl)

Toxinas	STD-conc. uM	STD-Ar. x 1000	Muestra Ar x1000	Conc-Sol uM	nmoles totales	moles/cel x 10-15	Perfil moles %
(C1-C4)	STD=	TUMG915					
C1	0,556	860	405	0,26	0,09	0,63	3,4
C2	0,144	177	4072	3,31	1,19	7,95	43,3
Subtotal							47
(GTXs)	STD=	TUMG913 (I/50)					
GTX4	0,52	36	15	0,22	0,08	0,52	2,8
GTX1	1,52	108	19	0,27	0,10	0,64	3,5
GTX5	0,70	56	173	2,16	0,78	5,19	28,3
GTX3	0,15	40	235	0,88	0,32	2,11	11,5
GTX2	0,44	132	16	0,05	0,02	0,13	0,7
Subtotal							46,79
(STXs)	STD=	TUMS913 1/10					
neoSTX	0,977	60	22	0,36	0,13	0,86	4,7
dcSTX	0,265	31	0	0,00	0,00	0,00	0,0
STX	0,450	71	22	0,14	0,05	0,33	1,8
Subtotal							6,5
Total				7,65	2,76	18,36	100,0
			TOXINS VPM/CEL=			18,4 X10-15MOLES/CEL	

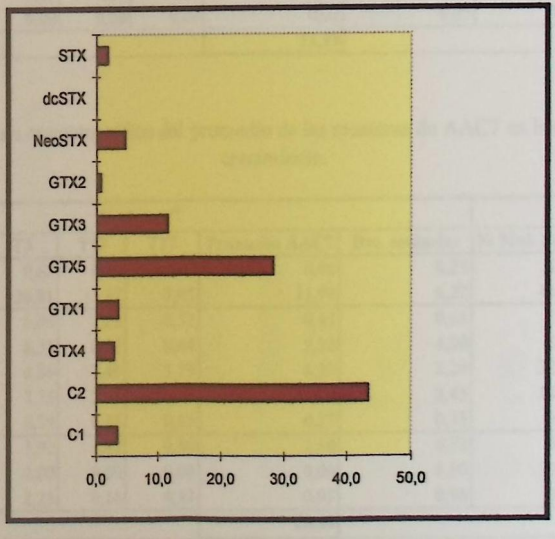


Figura 55.- Perfil de toxicidad del clon AAC7 en el T_{17}

Una vez determinados los perfiles cromatográficos de ambos clones de **Alexandrium**, se confeccionaron para cada clon, las tablas que presentan el promedio de los fmoles/cél de los puntos de la fase de crecimiento medidos, con sus correspondientes desviaciones estándar, las cuales corresponden a un análisis cuantitativo de la producción de cada toxina de acuerdo a su cantidad en masa, determinado por HPLC (Tabla 16 y 17).

Tabla 16.- Análisis cromatográfico del promedio de las muestras de MAC8 en las distintas fases de crecimiento.

	fmoles $cél^{-1}$							
Toxinas	**T0**	**T3**	**T6**	**T9**	**Promedio MAC8**	**Des. estándar**	**% Mol. Prom.**	**% Mol. Prom.Tot.**
C1	1,28	1,54	0,94	0,84	1,15	0,32	10,28%	79,80%
C2	10,01	9,43	5,76	5,92	7,78	2,25	69,53%	
GTX4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00%	
GTX1	0,00	0,00	0,20	0,00	0,05	0,10	0,45%	
GTX5	2,07	0,22	0,74	0,57	0,90	0,81	8,04%	15,26%
GTX3	1,14	0,08	0,64	0,74	0,65	0,44	5,81%	
GTX2	0,09	0,03	0,19	0,12	0,11	0,07	0,96%	
neoSTX	0,90	0,33	0,36	0,38	0,49	0,27	4,40%	
dcSTX	0,14	0,00	0,00	0,00	0,04	0,07	0,31%	4,92%
STX	0,09	0,00	0,00	0,00	0,02	0,05	0,20%	
Total					11,19			

Tabla 17.- Análisis cromatográfico del promedio de las muestras de AAC7 en las distintas fases de crecimiento.

	fmoles $cél^{-1}$							
Toxinas	**T0**	**T3**	**T13**	**T17**	**Promedio AAC7**	**Des. estándar**	**% Mol. Prom.**	**% Mol. Prom.Tot.**
C1	0,12	0,65	0,45	0,63	0,46	0,25	1,61%	43,44%
C2	7,32	20,81	11,87	7,95	11,99	6,22	41,83%	
GTX4	0,00	0,00	1,28	0,52	0,45	0,61	1,57%	
GTX1	0,00	8,31	0,32	0,64	2,32	4,00	8,09%	
GTX5	4,00	8,86	7,49	5,19	6,39	2,20	22,28%	47,60%
GTX3	3,74	7,75	3,28	2,11	4,22	2,45	14,72%	
GTX2	0,00	0,79	0,16	0,13	0,27	0,35	0,94%	
neoSTX	2,44	1,92	1,17	0,86	1,60	0,72	5,57%	
dcSTX	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00%	8,97%
STX	1,15	2,25	0,16	0,33	0,97	0,96	3,39%	
Total					28,66			

Los gráficos que representan los resultados del análisis anterior, se muestran en las Figuras 56 y 57, correspondiendo a MAC8 y AAC7 respectivamente.

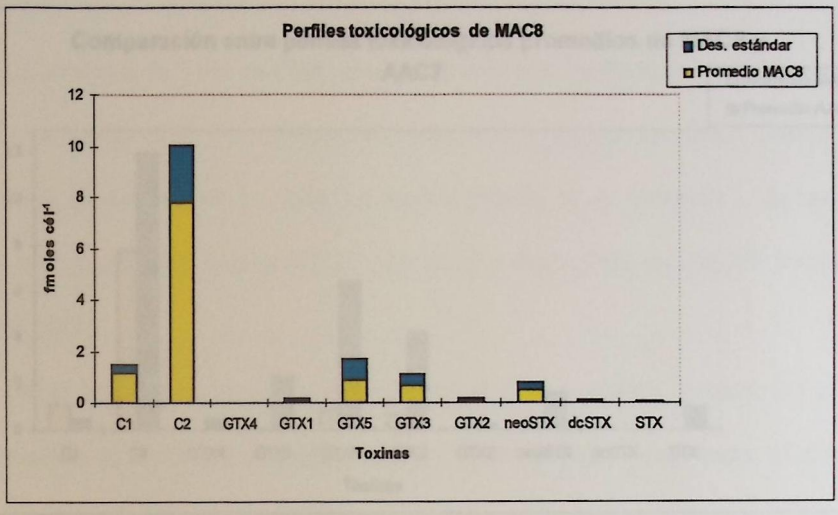


Figura 56.- Perfil de toxicidad promedio y desviación estándar de MAC8 en las fases de crecimiento analizadas.

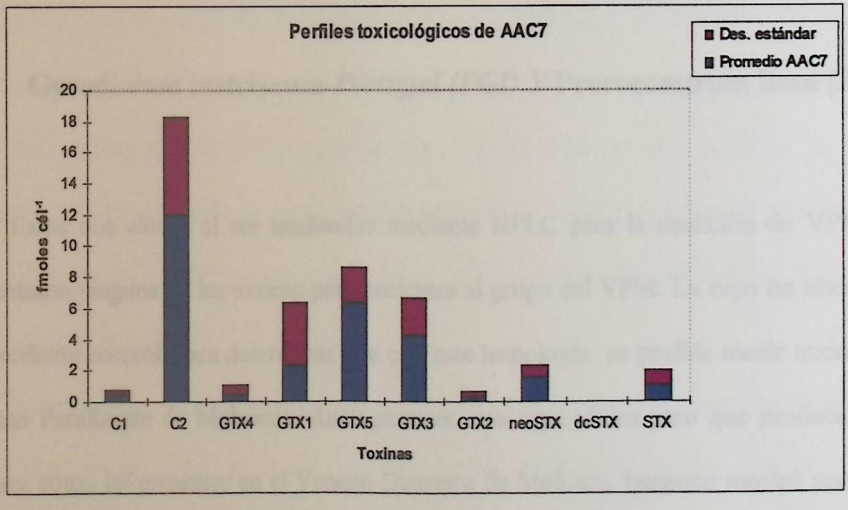


Figura 57.- Perfil de toxicidad promedio y desviación estándar de AAC7 en las fases de crecimiento analizadas.

En la Figura 58, se comparan las cantidades promedios de cada toxina para ambos clones.

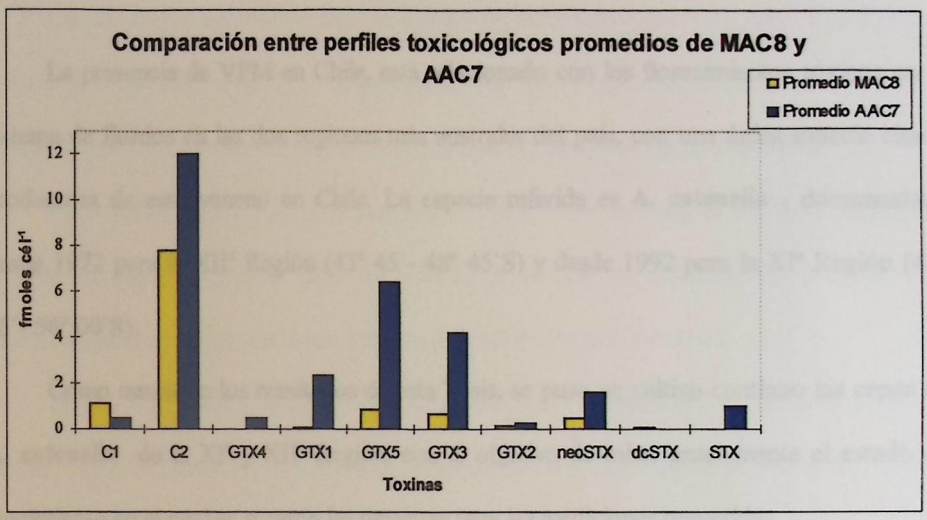


Figura 58.- Comparación entre perfiles de toxicidad promedios de MAC8 y AAC7 en las fases de crecimiento analizadas.

3.3 Gyrodinium instriacum-*Portugal (PGI) Y* Prorocemtrum lima *(PL)*

Estos dos clones al ser analizados mediante HPLC para la medición de VPM, no presentaron ninguna de las toxinas pertenecientes al grupo del VPM. La cepa no tóxica fue un excelente control, para determinar que con esta tecnología es posible medir toxinas del Veneno Paralizante de Moluscos. Análogamente, una cepa tóxica pero que produce otras toxinas, como las presentes en el Veneno Diarreico de Molusco, tampoco mostró presencia de toxina del VPM como era de esperar.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La presencia de VPM en Chile, está relacionado con los florecimientos tóxicos en el sistema de fiordos en las dos regiones más australes del país, con una única especie citada productora de este veneno en Chile. La especie referida es **A. catenella** , documentada desde 1972 para la XII^a Región (43° 45`- 48° 45`S) y desde 1992 para la XI^a Región (48° 45´- 56° 00´S).

Como muestran los resultados de esta Tesis, se puso en cultivo continuo las cepas de **A. catenella** de la XI^a y XII^a Región, con el objetivo de saber exactamente el estado de crecimiento en el cual se sacaron las muestras para las mediciones requeridas.

Las curvas de crecimiento de MAC8 y AAC7 obtenidas, revelan una constante de duplicación de 0,28 y 0,30 div. día^{-1} respectivamente (obtenidos de los ajustes de rectas de las correspondientes Figuras 7 y 9) a 20 °C. Estos valores están dentro del rango de los descritos por Seguel et al. (1995b) para la cepa ACCO7 (0,24 div. día^{-1} a 20 °C), de la cual se obtuvo el clon utilizado en la presente investigación (AAC7). A temperaturas menores, esta constante es menor, presentando valores de 0,10 - 0,16 div. día^{-1} entre 5° y 15 °C (Seguel et al. op. cit.).

La constante de crecimiento determinada para MAC8 cae en el rango de las descritas por Uribe et al 1996, a 11 °C en un cultivo multiclonal. Estos autores señalan

que esta especie es euriterma y eurihalina, y que la tasa de crecimiento variaría según la salinidad, entre 0,42 y 0,25 div. día^{-1}.

Las curvas de crecimiento efectuadas para **G. instriacum** (0,06 div. día^{-1}, Fig. 11) y **P. lima** (0,07 div. día^{-1}, Fig. 13), demostraron que las constantes de duplicación de estas especies están en un orden de magnitud menor que las que presenta **A. catenella**.

En la determinación de proteínas se observó que en los lavados celulares había una pérdida de μg de proteína. Esto se rectificó al realizar la SDS-PAGE, con muestras concentradas de los sobrenadantes obtenidos luego del primer lavado celular.

Después de analizar los geles de las Fig. 14 y 23 y comparando las densitometrías de las columnas, se puede señalar que se obtienen bandas nítidas y visibles de proteínas, cuando se aplican entre 10 y 40 μg de proteínas.

En general, el procedimiento de diálisis de las muestras se utiliza en bioquímica para mejorar la migración electroforética de las proteínas en la técnica de SDS-PAGE. Por esa razón nosotros la utilizamos aquí, con el objetivo de eliminar las sales de la muestra. Sin embargo, se pudo observar que no era necesaria en el protocolo de tratamiento de las células, ya que se obtenían los mismos resultados que en muestras no dializadas.

En la SDS-PAGE al 12,5 % se pudo observar que los clones de **A. catenella** de la XI^{a} y XII^{a} Regiones presentaban patrones de proteínas semejantes, expresándose las proteínas con mayor o menor grado de intensidad, dependiendo de la concentración de la muestra (ver Figuras 31, 32 y 33). En total pudieron visualizarce 8 bandas mayoritarias, todas ellas aparecen en ambos clones, indicando claramente que deben ser componentes estructurales de las células. Esto indica claramente que ambos clones pertenecen al mismo género y casi

con seguridad, a la misma especie, y descarta la posibilidad que su composición proteíca estructural varíe de acuerdo a factores ambientales.

Las Figuras 14 y 23 que muestran los geles con inhibidor de proteasas (PMSF), comprueban que en parte se evitó la degradación de proteínas provocadas por proteasas existentes, efecto que también se visualiza en la Figura 31 .

Cuando se corrieron las muestras, que habían sido preparadas en ausencia de PMSF, se observó degradación de proteínas, lo cual se visualiza en la Figura 34, donde no es posible la observación de bandas nítidas de proteínas para ambos clones. Podemos concluir que para cualquier tipo de preparación de dinoflagelados, donde se pretenda estudiar las proteínas, es necesario agregar inhibidores de proteasas, y entre ellos, PMSF.

A pesar de que los clones PL y PGI no fueron tratados con PMSF, se pudo determinar en éstos algunas bandas de proteínas propias de cada clon y que son claramente muy disímiles a **A. catenella**. Estos resultados apoyan la conclusión anterior, donde se demostraba que los patrones de proteínas estructurales de dinoflagelados de una misma especie son iguales. Sin embargo, el patrón de especies distintas como el caso de **G. instriacum** y **P. lima**, no presentan bandas comunes de ningún tipo, ni entre ellos y tampoco con los clones de **Alexandrium**.

Debido a que no existe literatura citada en relación a patrones de proteínas totales de **A. catenella**, este estudio se convierte en un avance en la utilización de electroforesis para la caracterización bioquímica de esta especie. Siendo, además, las primeras investigaciones científicas relacionadas en esta área del conocimiento.

En cuanto a los estudios que han utilizado métodos cromatográficos para la

cuantificación de las toxinas del VPM, se ha señalado que la composición de toxinas es relativamente estable, constituyendo una propiedad conservativa en las especies de **Alexandrium** (Oshima **et al.** 1990, Anderson 1990, Lagos **et al.** 1996). Por otro lado, si las condiciones de crecimiento celular son alteradas o modificas, estos cambios se reflejan en la composición de las toxinas (Anderson 1990, Ruiz-Tagle **et al.** 1997).

En el análisis del clon MAC8 se observó que en todas las fases de crecimiento existía una elevada proporción de los derivados N-sulfocarbamoil (C_1-C_2). Este par de epímeros siempre es mayor al 72 % de los moles totales de la muestra, siendo C2 el responsable de sobre el 60 % las toxinas. Luego, siguen las gonyaulatoxinas, con proporciones mayores de GTX5 y los epímeros GTX3/GTX2, y bajísima cantidad de GTX1. A continuación con menos de 7% de los moles totales se presenta el grupo de las saxitoxinas, siendo en éstas la mayoritaria neoSTX, con inusuales ocurrencias de STX y decSTX. Siempre STX es la minoritaria y algunas veces no se encuentra presente en los clones de **A. catenella** chilenos (ver Tabla 16 y Figura 56).

El perfil toxicológico que presenta este clon de MAC8 es diferente al perfil anteriormente descrito por Uribe **et al.** (1996), en el cual se muestra que las toxinas más importantes para **A. catenella** de Magallanes son GTX3, GTX4, neoSTX y STX, presentando mayor importancia GTX3, con un porcentaje molar siempre superior al 30 %. Es destacable que en el perfil de toxicidad de MAC8 se encuentre GTX5, que es citado por primera vez en el trabajo de Uribe **et al. op. cit.** para la Región de Magallanes. Las diferencias observadas entre estos dos perfiles (ambos provenientes de la XII^a Región), podrían estar entre las siguientes razones: La primera, relacionada con la extracción y

preparación de los extractos de dinoflagelados. Hasta 1995 estos eran extraídos en forma similar a como se hacía para la extracción de VPM de moluscos. Es decir en HCl 0,1 N y calentándose a 100 °C por 5 min. Este procedimiento produce una transformación de las sulfocarbamoilsaxitoxinas (C1-C4) en STX y GTXs, razón por la cual en esos perfiles no se observan las C1-C4 y, por el contrario, aparecen GTXs y STX como las mayoritarias. En nuestro caso estamos utilizando un nuevo procedimiento de extracción, donde la extracción es con partición de fase y en frío. Con este nuevo procedimiento no se produce alteración de la composición química de las toxinas presentes en la muestra (Ruiz-Tagle **et al. op. cit.**). Por otro lado, es importante destacar que las muestras descritas por Uribe et al. 1996, corresponden a extractos de cultivo multiclonal.

Al comparar el perfil toxicológico mostrado por MAC8 con los de otras especies productoras de VPM descritos en la literatura, tal como **G. catenatum** en Australia, España y Japón, se observan ciertas semejanzas. En relación a esto, Oshima **et al.** (1989) señala que **G. catenatum** presenta una gran proporción (> 59%) de toxinas n-sulfocarbamoil-11-hidroxisulfatos (C1, C2, C3 y C4), siendo los mayoritarios el epímero C1/C2, los cuales varían entre 31 al 71 del porcentaje de moles totales. Presenta, además, GTX5 aunque en menor proporción que el clon chileno. Por otro lado, MAC8 no muestra la presencia de GTX6, dcGTX2 y tampoco dcGTX3 (Oshima **et al.** 1990). Estas dos últimas toxinas no han sido detectadas en dinoflagelados y solamente han sido descritas como productos de hidrólisis enzimática en algunos bivalvos. En 1993, Oshima **et al.**, presentaron un segundo estudio de la composición de las toxinas presentes en **G. catenatum**, de dos lugares de Japón, Tasmania y España. En este trabajo, corrigen las composiciones descritas en 1990.

Lo más importante a destacar, es que sin duda los 4 clones estudiados presentaban C1-C2 como las toxinas mayoritarias en todos los casos, siendo su porcentaje molar muy similar al descrito en nuestro MAC8.

En relación a la composición del resto de las toxinas, esta especie presenta una composición totalmente diferente a MAC8, pues **G. catenatum** presenta como las toxinas mayoritarias que siguen a las sulfocarbamoilsaxitoxinas,las toxinas GTX6 y GTX5. En cambio MAC8 presenta GTX5 y los epímeros GTX2/GTX3, sin mostrar GTX6.

En relación a otra especie productora de VPM, Oshima **et al.** (1990) describen para **Pyrodinium bahamense** var. **compresa** (Sureste de Asia), un perfil de toxicidad muy diferente a MAC8 y a los citados anteriormente.

Este mismo autor señala que **A. catenella** de Japón presenta elevadas proporciones de C1-C4 seguidas de las gonyaulatoxinas con los epímero GTX2/3 y GTX1/4, GTX5, GTX6 y dcGTX3 y finalmente neoSTX. La composición descrita para **Alexandrium tamarensis** (Japón) presenta un perfil de toxinas muy parecido al de **A. catenella** (Japón), sin embargo existen grandes variaciones en las cantidades de estas toxinas.

En forma similar al clon MAC8 de Magallanes, el clon AAC7 de Aysén analizado en esta Tesis, presentó elevadas proporciones de C2 (> al 39 del porcentaje molar), aunque en conjunto con su epímero C1, presentaron una menor proporción que el grupo de las gonyaulatoxinas. Este grupo de toxinas pasó a ser el grupo mayoritario, pues la suma de GTX5 y los epímeros GTX3/GTX2 y GTX1/GTX4 siempre dieron mayor proporción que C1/C2 (ver Tabla 17 y Figura 57). Otro aspecto importante es que este clon presentó un 9 % promedio, en relación al porcentaje molar total, al sumar neoSTX y STX (1,57

fmoles/cél). Esta cantidad es tres veces la cantidad de neoSTX y STX presente en MAC8 (0,51 fmoles/cél). Por otro lado MAC8, prácticamente no presenta STX, siendo esta una toxina totalmente inusual en su perfil, en nuestras condiciones de cultivo (ver Figura 58). Al comparar las cantidades de toxinas encontradas en los perfiles toxicológicos de los clones chilenos, podemos verificar entonces, que las cantidades encontradas en AAC7 son generalmente mayores que las de MAC8.

Las composiciones y perfiles de toxinas del VPM presente en dinoflagelados productores de este veneno, publicadas desde 1987, en los origenes de la utilización de la técnica de HPLC, se han ido corriguiendo y presentan gran variedad entre un trabajo y otro, siendo las razones fundamentales de esta variabilidad las modificaciones y mejoramientos de la técnica. Por ejemplo, la derivatización post columna utilizada en esta Tesis, es considerada actualmente como la que entrega más información y con más exactitud; adicionalmente, los métodos de extracción también han sido modificados, pues se ha encontrado que existen alteraciones químicas según la metodología que se use (Noguchi **et al.** 1990, Ruiz-Tagle **et al. op. cit.**). Por último, las diferencias observadas tanto en el perfil toxicológico como en las cantidades de cada toxina, siempre podrán ser explicadas en función de los medios de cultivo y las condicions de temperatura, salinidad, intensidad y ciclo de luz a las cuales crecieron las células.

Sin duda la composición toxicológica de cada especie productora de las toxinas del VPM, siempre dependerá de las condiciones del cultivo y/o del medio ambiente de donde se ha recolectado la muestra de agua, en el caso de los monitoreos en terreno. Por lo tanto las comparaciones sólo son importantes en el hecho de visualizar las mayores semejanzas y

diferencias. De esto, podemos concluir que las toxinas de los epímeros C1/C2 son las toxinas mayoritarias en los clones del género **Alexandrium** aislados de las aguas chilenas, los cuales además presentan otras 6 toxinas en donde las GTXs son las más representativas. Además, podemos decir que no hay diferencias significativas en la cantidad de toxinas, tanto en la fase inicial y fase exponencial de la curva de crecimiento de **A. catenella** de Chile.

Retomando la cantidad máxima de toxinas producidas por los dos clones chilenos en cultivo: 15,7 fmoles $cél^{-1}$ para MAC8 y 51,3 fmoles $cél^{-1}$ para AAC7, e intentando buscar una explicación racional de las altas toxicidades, encontradas en los bivalvos contaminados en los fiordos chilenos, las mayores del mundo hasta hoy descritas, realizamos el siguiente análisis.

Normalmente nuestros cultivos presentaron en toda la fase de crecimiento una cantidad de toxina relativamente constante. Si consideraramos que para el caso de MAC8 en que 15,7 fmoles $cél^{-1}$ fueron producidos por 2.481 cel ml^{-1} (2.481.000 cel L^{-1}) y simuláramos un florecimiento provocado por esta cantidad de células, considerando que un chorito (**Mytilus** sp.), a lo menos, filtra en promedio 20 litros de agua al día, tendríamos entonces que en el transcurso de 10 días, un chorito filtraría una cantidad de 490.620.000 células, y como cada célula produce 15,7 fmoles, entonces el bivalvo acumularía 7,8 μmoles de toxinas del VPM en 10 días. Ahora, si consideramos que en promedio un chorito pesa 33 g, 3 de estos moluscos representarían aproximadamente 100 g de carne. Por lo tanto tendríamos en total 23,4 μmoles de toxinas totales en 100 g de carne. Según el bioensayo de ratón, 100 g de carne se extraen con 200 ml de HCl 0,1 N; por lo tanto, para tener la concentración de toxinas de esta muestra, se debe llevar la cantidad de moles a un litro, con

lo que se tendría una concentración de toxinas del VPM de 117 μM. Este valor supera considerablemente a los valores promedios de muestras de bivalvos contaminados, medidas para la XII[a] Región mediante HPLC en los últimos tres años. A modo de ejemplo, se presenta una muestra de cholga (**Aulacomya ater**) colectada en el Seno Martínez (XII[a] Región) en 1994 y analizada por N. Lagos W. Ph. D. (ver Tabla 15). En la hoja de cálculo respectiva podemos observar que la concentración total de toxinas de VPM es de 18,54 μM, dándonos cuenta que esta muestra presenta una toxicidad de 1.579 μg de STX / 100 g de carne, importante es de destacar que el límite sanitario permitido es de 80 μg de STX/100 g de carne.

Este análisis nos muestra cómo los cultivos desarrollados en esta Tesis responden a la supuesta filtración de los moluscos (extracción de 100 g de carne), con una concentración seis veces mayor a la concentración de VPM encontrada en los moluscos en su ambiente natural, y por lo tanto, podríamos explicar las altas toxicidades encontradas en estos organismos, después de un florecimiento de **A. catenella,** en la zona austral de nuestro país (Guzmán **et al.** 1975, Lembeye **et al.** 1975 , Benavides **et al.** 1995).

Tabla 15.- Hoja de cálculo para análisis de VPM por HPLC en una muestra de cholga (14 de Marzo de 1994) del Seno Martínez (XII[a] Región).

Toxinas	Sp. Tox. MU/umoles	STD-conc. uM	STD-Ar. x 1000	Muest-Ar x1000	Conc-Sol uM	ConcMol nmoles/g	Perfil moles %	Toxicidad MU/g	MU %
(C1-C4)	STD=	TUOC915							
C1	15	1,96	1322	91	0,13	0,27	0,7	0,00	0,0
C2	239	0,44	502	71	0,06	0,12	0,3	0,03	0,0
C3	33	3,63	980	0	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0
C4	143	0,82	292	0	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0
(GTXs)	STD=	TUMG913 (1/50)							
GTX4	1803	0,52	42	152	1,88	3,76	10,2	6,79	9,9
GTX1	2468	1,52	230	1047	6,92	13,84	37,3	34,15	49,7
GTX5	160	0,7	87	0	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0
GTX3	1584	0,15	133	1584	1,79	3,57	9,6	5,66	8,2
GTX2	892	0,44	457	5070	4,88	9,76	26,3	8,71	12,7
GTX6	1803	0,52	42	0	0,00	0,00	0,0	0,00	0,0
dcGTX3	1872	0,15	133	53	0,06	0,12	0,3	0,22	0,3
dcGTX2	1617	0,44	457	30	0,03	0,06	0,2	0,09	0,1
(STXs)	STD=	TUMS913 1/10							
neoSTX	2295	0,977	129	240	1,82	3,64	9,8	8,34	12,1
dcSTX	1274	0,265	117	21	0,05	0,10	0,3	0,12	0,2
STX	2483	0,45	224	456	0,92	1,83	4,9	4,55	6,6
Total					18,54	37,07	100,0	68,67	100
TOXICIDAD TOTAL DE LA MUESTRA								1579 STX ug /100 g	

La importancia de conocer el perfil de toxinas y composición de ellas en las especies propias de aguas chilenas, adquiere particular relevancia, pues nos permite conocer y caracterizar bioquímicamente las especies de dinoflagelados con las cuales tenemos que convivir. Al mismo tiempo, estos primeros estudios constituyen una valiosa referencia científica en este campo, para investigaciones posteriores. El objetivo primordial adicional que se logró en esta Tesis, fue el sentar las bases de una metodología de estudio, aplicada en una área del conocimiento recientemente desarrollada en nuestro país, y de múltiples proyecciones.

REFERENCIAS

Anderson, D. M. 1990. Toxin variability in **Alexandrium** species. In: Granéli, E.; Sudström, B.; Edler, L. & D. M. Anderson (eds.). Toxic Marine Phytoplankton, pp. 41-51. Elsevier Science Publishing Co., Inc.

Andrinolo, D. 1997. Efectos y farmacocinética de saxitoxina en gatos. Tesis de Magister. Programa Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Fisiología. Universidad de Chile.

Andrinolo, D. & N. Lagos. 1997. Toxic effects, pharmacokinetic and urinary excretion of saxitoxin, a component of Paralytic Shellfish Poison (PSP). VII International Conference on Harmful Algae. Vigo, España. June 25-29.

Balech, E. 1990. A short diagnostic description of **Alexandrium**. In: Granéli, E.; Sudström, B.; Edler, L. & D. M. Anderson (eds.). Toxic Marine Phytoplankton, pp. 77. Elsevier Science Publishing Co., Inc.

Benavides, H.; Prado, L.; Díaz, S. & J. I. Carreto. 1995. An exceptional bloom of **Alexandrium catenella** in the Beagle Channel, Argentina. In: Lassus, P.; Arzue, G.; Erard, E.; Gentien, P. & C. Marcaillou (eds.). Harmful Marine Algal Blooms, pp. 113-119.

Tecnique et documentation. Lavoisier Intercept Ltd.

Borison, H. L.; Culp, W. J.; Gonsalves, S. F. & L. E. McCarthy. 1980. Central respiratory and circulatory depression caused by intravascular saxitoxin. Br. Journal Pharmacol 58: 301-309.

Boyer, R. F. 1993a. Characterization of Proteins and Nucleic Acids by Electrophoresis. Modern Experimental Biochemistry. Second Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 4: 115-145.

Boyer, R. F. 1993b. Separation and Purification of Biomolecules by Chromatography . Modern Experimental Biochemistry. Second Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 3: 59-113.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the for the quantitation of microgram quantitaties of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochemistry 72, 248-254.

Campodónico, I. & L. Guzmán. 1974. Marea roja producida por **Amphidoma sp.** en el Estrecho de Magallanes. Anales del Instituto de la Patatagonia V (1-2): 209-213.

Catterall, W. A.; Morrow, C. S. & R. P. Hartshorne. 1979. Neurotoxin binding to receptor sites associated with voltage - sensitive sodium channels in intact, lysed, and detergent - solubilized brain membranes. The Journal of Biological Chemistry 254 (22): 11379-11387.

Cembella, A. D.; Destombe, C. & J. Turgeon. 1990. Toxin composition of alternative life history stages of **Alexandrium**, determined by higt-performace liquid chromatography. In: Granéli, E.; Sudström, B.; Edler, L. & D. M. Anderson (eds.). Toxic Marine Phytoplankton, pp. 333-338. Elsevier Science Publishing Co., Inc.

Dodge, J. D. 1984. Dinoflagellate taxonomy. In: Spector, D (ed.). Dinoflagellates, pp. 17-38. Academic Press. Inc. Orlando, Florida.

Doucette, G. J. & C. G. Trick. 1995. Characterization of bacteria associated with different isolated of **Alexandrium tamarensis** . In: Lassus, P.; Arzue, G.; Erard, E.; Gentien, P. & C. Marcaillou (eds.). Harmful Marine Algal Blooms, pp. 33-38. Tecnique et documentation. Lavoisier Intercept Ltd.

Franca, S.; Viegas, S.; Mascarenhas, V.; Pinto, L. & G. I. Dougette. 1995. Prokaryotes in association with a toxin **Alexandrium lusitanicum** in culture. In: Lassus, P.; Arzue, G.; Erard, E.; Gentien, P. & C. Marcaillou (eds.). Harmful Marine Algal Blooms, pp. 45-51. Tecnique et documentation. Lavoisier Intercept Ltd.

Freitas, J. C. 1995. Toxinas de Algas Fitoplanctónicas. En: Alveal, K.; Ferrario, M. E.; Oliveira, E. C. & E. Sar (eds.). Manual de Métodos Ficológicos, pp. 311-327. Universidad de Concepción. Concepción-Chile.

Fukuyo, Y. & F. J. R. Taylor. 1989. Morphological characteristics of dinoflagellates. In: Hallegraeff, G. M. & J. L. Maclean (eds.). Biology, epidemiology and management of **Pyrodinium** red tides, pp. 201-205. ICLARM Conference Proceedings. Fisheries Department, Ministry of Development, Brunei Darussalam, and International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines.

Geraci, J. R.; Anderson, D. M.; Aubin, D. J. Std.; Early, G. A.; Prescott, J. H. & C. A. Mayo. 1989. Humpback whales (**Megaptera novaeangliae**) fatlly poisoned by dinoflagellates toxin. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 46: 1895-1898.

Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. In: Stein, J. R. (ed.). Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements, pp. 289-311. Cambrige University Press, London and New York.

Guzmán, L.; Campodónico, I. & J. Hermosilla. 1975. Estudios sobre un florecimiento tóxico causado por **Gonyaulax catenella** en Magallanes. I.- Distribución espacial y temporal de **G. catenella**. Anales del Instituto de la Patagonia VI (1 y 2): 173-183.

Hallegraeff, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. Phycologia 32 (2): 79-99

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the Assembly of the Head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lagos, N.; Compagnon, D.; Seguel, M. & Y. Oshima. 1996. Paralytic shellfish toxin composition: a quantitative analysis in chilean plankton and mussels. In: Yasumoto, T.; Oshima, Y. & Y. Fukuyo, pp. 121-124. Harmful and Toxic Algal blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.

Lawrence, J.F. & C. Ménard. 1991. Liquid chromatographic determination of paralytic shellfish poison in shellfish after prechromatografic oxidation. Journal of the Association of official Analytical Chemists 74, 1006-1012.

Lembeye, G. & L. Guzmán. 1982. ¿Qué son las mareas rojas?. Anales del Instituto de la Patagonia 1, 12 .

Lembeye, G.; Guzmán, L. & I. Campodónico. 1975. Estudios sobre un florecimiento tóxico causado por **Gonyaulax catenella.** III- Fitoplancton asociado. Anales del Instituto de la. Patagonia VI (1-2): 197-208.

Michea, L.; Andrinolo, D.; Ceppi, H. & N. Lagos. 1995. Bioquemical Evidence for Adhesion-Promoting Role Of Major Intrinsic Protein Isoleted from Both Normal and Cataractous Human Lenses. Experimental Eye Research 61, 293-301.

Muñoz, P.; Avaria, S.; Sievers, H. & R. Prado. 1992. Presencia de dinoflagelados tóxicos del género **Dinophysis** en el Seno Aysén, Chile. Revista de Biología Marina, Valparaíso 27 (2): 187-212.

Noguchi, T.; Asakawa, M.; Arakawa, O.; Fukuyo, F.; Nishio, S.; Tanno, K. & K. Hashimoto. 1990. First occurrence of **Alexandrium catenella** in Funka Bay. Hokkaido, along with its unique toxin composition. In: Granéli, E.; Sudström, B.; Edler, L. & D. M. Anderson (eds.). Toxic Marine Phytoplankton, pp. 493-498. Elsevier Science Publishing Co., Inc.

Ogata, T.; Kodama, M.; Komaru, K.; Sakamoto, S.; Sato, S. & U. Simidu. 1990. Production of paralytic Shellfish Toxins by bacteria isolated from toxic dinoflagellates. In: Granéli, E.; Sudström, B.; Edler, L. & D. M. Anderson (eds.). Toxic Marine Phytoplankton, pp. 311-315. Elsevier Science Publishing Co., Inc.

Oshima, Y. 1995. Postcolumn Derivatization Liquid Chromatographic Method for Paralytic Shellfish Toxins. Journal OF AOAC International 78 (2): 528-532.

Oshima, Y.; Sugino, K. & T. Yasumoto. 1989. Latest advances in HPLC analysis of Paralytic Shellfish Toxins. In: Natori, S.; Hashimoto, K. & Y. Veno, pp. 319-326. Mycotoxins and Phycotoxins. Elsevier Science Publishers BV. Amsterdam.

Oshima, Y.; Sugino, K.; Itakura, H.; Hirota, M. & T. Yasumoto. 1990. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: Granéli, E.; Sudström, B.; Edler, L. & D. M. Anderson (eds.). Toxic Marine Phytoplankton, pp. 391-396. Elsevier Science Publishing Co., Inc.

Oshima, Y.; Itakura, H.; Lee, K.; Yasumoto, T.; Brackburn, S. & G. Hallegraeff. 1993. Toxin production by the dinoflagellate **Gymnodinium catenatum.** In: Smayda, T. J. & Y. Shimizu (eds.). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea, pp. 907-912. Elsevier Science Publishers. B. V.

Park, H.; Watanabe, M. F.; Harada, K.; Nagai, H.; Suzuki, M.; Watanabe, M. & H. Hayashi. 1993. Hepatotoxin (Microcystin) and Neurotoxin (Anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from japanese freshwaters. Natural Toxins 1: 353-360.

Provasoli, L. 1963. Growing Marine Seaweeds. Reprinted from Proceedings of the 14Th International Seaweed Symposium. Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, pp. 9-17

Ruiz-Tagle, N.; Compagnon, D.; Salas, K. & N. Lagos. 1997. Nueva metodología de extracción de las toxinas del VPM de Alexandrium catenella en cultivo: Efectos de la temperatura y uso de ácidos. XVII Congreso de Ciencias del Mar. Santiago, 13-16 Mayo.

Sako, Y.; Naya, N.; Yoshida, T.; Kim, C.; Uchida, A. & Y. Ishida. 1995. Studies on stability and heredity of PSP toxin composition in the toxic dinoflagellate **Alexandrium**. In: Lassus, P.; Arzue, G.; Erard, E.; Gentien, P. & C. Marcaillou (eds.). Harmful Marine Algal Blooms, pp. 345-350. Tecnique et documentation. Lavoisier Intercept Ltd.

Schantz, E. J.; McFarren, E. F.; Schafer, M. L. & K. H. Lewis. 1958. Purifield Shellfish Poison for Bioassay Standardization. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists 41: 160-168

Seguel, M.; Loyola, H.; Compagnon, D.; Lagos, N.; Nuñez, M. & G. Lembeye. 1995a. Tasa de crecimiento y evaluación toxicológica de **Alexandrium catenella** en cultivo. XV Jornadas de Ciencias del Mar. Coquimbo, 24-26 Mayo.

Seguel, M.; Loyola, H. & M. Nuñez. 1995b. Sexto Informe Técnico. Proyecto FONDEF (2-37). Toxinas Marinas.

Sommer, H. & K. Meyer. 1937. Paralytic Shellfish Poison. Archives Pathology, 24, 562-598.

Steidinger, K. A. & D. G. Baden. 1984. Toxic Marine Dinoflagellates. In: Spector, D (ed.). Dinoflagellates, pp. 201-248. Academic Press. Inc. Orlando, Florida.

Subba Rao, D. V.; Quillian, M. A. & R. Pocklington. 1988. Domoic acid- A neurotoxic amino acid produced by the marine diatom Nitzschia pungens in culture. Canadian Journal of Fisheries and. Aquatic Sciences 45, 2076-2077.

Sullivan, J. J. & M. M. Wekell. 1987. The application of HPLC in a monitoring program. In: Kramer, D. E. & J. Liston (eds.).Seafood quality determination, pp. 357-371. New York.

Sweeney, B. M. 1976. Red Tides. Natural History 85: 78-83

Thielert, G.; Kaiser, I. & B. Luckas. 1991. HPLC determination of PSP toxins. Proceedings of Symposium on Marine Biotoxins, Paris, France, 30-31 January, pp. 121-125.

Tood, E. C. 1990. Amnesic Shellfish Poison-A new seafood toxin syndrome. In: Granéli, E.; Sudström, B.; Edler, L. & D. M. Anderson (eds.). Toxic Marine Phytoplankton, pp. 504-508. Elsevier Science Publishing Co., Inc.

Uribe, J. C.; Latorre, V.; Oyarzún, S.; Lagos, N. & D. Andrinolo. 1996. Efecto de salinidad y temperatura en la tasa de crecimiento y la producción de toxinas en **Alexandrium catenella** en condiciones de laboratorio. XVI Jornadas de Ciencias del Mar. Concepción, 28-31 Mayo.

Vergara, L. R. 1995. Marea roja un fenómeno natural. Departamento Programas sobre el Ambiente. Servicio Salud Magallanes. Ministerio de Salud, pp. 1-10.

Watras, C. J.; Chisholm, S. S. W. & D. M. Anderson. 1982. Regulation of growth in an estuarine clone of **Gonyaulax tamarensis** labour: salinity-dependt temperature response. Journal of the Experimental Marine Biology and Ecology 62: 25-37

Williams, S. 1984. Paralytic Shellfish Poison. In: Arlington V. A. (ed.). Official Meethod. Annalytic 14 th, pp. 18086-18092. AOAC. Sec. Washington DC.

Yasumoto, T. 1990. Marine microorganisms toxins-an overview. In: Granéli, E.; Sudström, B.; Edler, L. & D. M. Anderson (eds.). Toxic Marine Phytoplankton, pp. 504-508. Elsevier Science Publishing Co., Inc.

Yasumoto, T. & M. Murata. 1993. Marine Toxins. Chemical Reviews pp. 1897-1909

Yasumoto, T.; Oshima, Y. & M. Yamaguchi. 1978. Occurrence of a new type of

shellfish poisoning in the Tohoku District. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 44 (11): 1249-1255.