

3. Intoxicación Diarreica por Mariscos (DSP)

Las toxinas diarreicas (DSP) son compuestos liposolubles que se acumulan en los tejidos adiposos de los bivalvos, como mejillones, vieiras, ostras y almejas. La ingestión de estos mariscos contaminados por acumulación de toxinas causa, en el ser humano, la Intoxicación Diarreica por Mariscos (DSP), cuyos síntomas incluyen diarrea, náuseas, vómitos y dolores abdominales. Los síntomas aparecen entre 30 minutos y algunas horas luego de la ingestión; la recuperación completa se observa dentro de los tres días. Las toxinas DSP se clasifican según su estructura química. El primer grupo incluye las toxinas ácidas e incluye el ácido ocadaico (AO) y sus derivados, las dinofisistoxinas (toxinas DTX); el segundo grupo las toxinas neutras y compuestos tipo poliéter lactona del grupo de las pectenotoxinas (toxinas PTX); y el tercero los poliéteres sulfatados y sus derivados, las yesotoxinas (toxinas YTX) (ver las Figuras 3.1 y 3.2).

Los productores de toxinas DSP son, generalmente, los dinoflagelados del género *Dinophysis* spp., aunque también se determinó que el género *Prorocentrum* produce toxinas DSP. La producción de toxinas DSP varía considerablemente según la especie de dinoflagelado y los morfotipos estacionales y regionales dentro de una misma especie. También se observó que la cantidad de células de dinoflagelado por litro, necesaria para contaminar los mariscos es variable. Las áreas más afectadas parecen ser Europa y Japón, aunque, se observa una tendencia creciente en la incidencia de las DSP, o al menos en la presencia de toxinas DSP, ya que con frecuencia se informa de algas productoras de toxinas DSP y de bivalvos tóxicos en zonas nuevas.

3.1 Estructuras químicas y propiedades

Todas las toxinas DSP son poliéteres termoestables lipófilos, aisladas de distintas especies de mariscos y de dinoflagelados (Draisci *et al.*, 1996a) (ver las Figuras 3.1 y 3.2). Si bien la diarrea es el síntoma de intoxicación más característico, existen muchos otros que parecen importantes ya que algunas de las toxinas del complejo DSP (por ejemplo, las PTX e YTX) no producen tipo alguno de diarrea (Van Egmond *et al.*, 1993). Según Quilliam (1998a) una segunda evaluación de su toxicidad las eliminaría del grupo de las toxinas DSP. Los distintos tipos químicos de toxinas asociados al síndrome DSP incluyen:

- a) El primer grupo de toxinas ácidas, formado por varios compuestos lipófilos que se acumulan en el tejido adiposo de los mariscos: el ácido ocadaico (AO) y sus derivados, las dinofisistoxinas (las toxinas DTX: la DTX1, la DTX2 y la DTX3). Estos compuestos son potentes inhibidores de la fosfatasa, propiedad que está relacionada a la inflamación del tracto intestinal y a la diarrea en los seres humanos (Van Apeldoorn *et al.*, 1998 y Hallegraef *et al.*, 1995). Draisci *et al.*, (1996a) y Van Egmond *et al.* (1993) indican que en sistemas de ensayo con animales se observó que el AO y la DTX1 son también tumorigénicos. La DTX1 se detectó por primera vez en Japón, en la especie *Dinophysis fortii*, y la DTX2 se identificó en mariscos de Irlanda durante un episodio de DSP (Van Egmond *et al.*, 1993). La DTX2 también se aisló a partir de biomasa de fitoplancton marino, formado principalmente por *Dinophysis acuta* (James *et al.*, 1999). James *et al.* (1997) informan que se aisló e identificó un nuevo isómero de la DTX2, denominado DTX2B, de extracto de mejillones irlandeses. En un principio, la denominación DTX3 describía a un grupo de derivados de las toxinas DSP en los que el grupo 7-OH de la DTX1 estaba unido a grupos acilo grasos, saturados o insaturados. Sin embargo, recientemente se determinó que cualquiera de las toxinas progenitoras, es decir el AO, la DTX1 y la DTX2, pueden estar aciladas con una serie de ácidos grasos, saturados e insaturados, desde el C₁₄ al C₁₈ (Hallegraef *et al.*, 1995; Wright, 1995). El informe de una reunión de la UE menciona que la longitud de la cadena del ácido graso puede variar entre C₁₄ y C₂₂ y que el número de insaturación varía entre 0 y 6. También se determinó que el ácido graso predominante en la DTX3 es el ácido palmitoílico (EU/SANCO, 2001). Estos compuestos acilados presentan también actividad tóxica y, como solo se han detectado en la glándula digestiva de mariscos contaminados, se cree que quizás sean productos metabólicos de las microalgas productoras de toxinas y no *de novo* (Wright, 1995). Suzuki *et al.* (1999) probaron

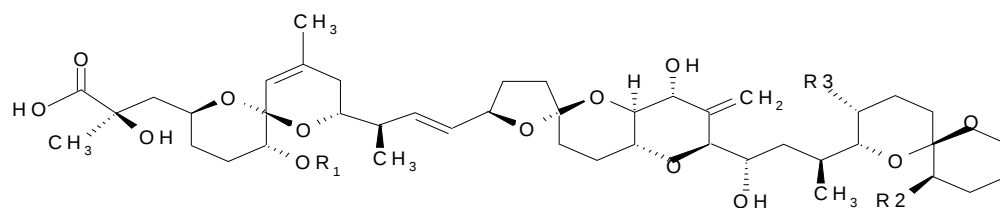
que en la vieira *Patinopecten yessoensis*, la DTX1 se transforma en 7-oxo-acil-DTX1 (DTX3). En los compuestos acilados, el enlace éster se puede hidrolizar calentando en una solución de NaOH 0,5 M y metanol al 90 por ciento a 75 °C durante 40 minutos. La lipasa y la colesterol esterasa también hidrolizan fácilmente el enlace éster de la DTX3 (EU/SANCO, 2001).

Dos ésteres diólicos, derivados éster naturales, que *in vitro* no inhiben la fosfatasa, se aislaron de especies de *Prorocentrum*. Sin embargo, estos ésteres diol-alílicos son, en cierta medida, lábiles y al hidrolizarse se obtiene la toxina DSP progenitora activa (Hallegraeff *et al.*, 1995). Draisci *et al* (1998) indican que se detectó otro isómero del AO, denominado DTX2C, aislado de *D. acuta* de aguas irlandesas, cuya estructura aún no se ha determinado.

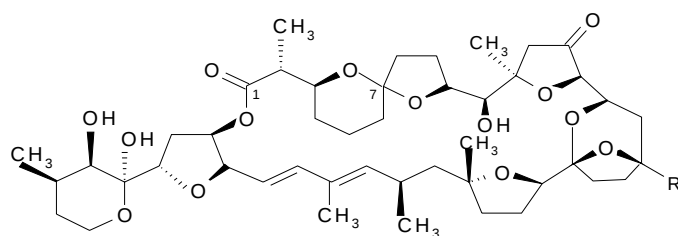
- b) El segundo grupo de toxinas, las neutras, está compuesto por lactonas poliéter del grupo de las pectenotoxinas (toxinas PTX). A la fecha se han aislado diez toxinas PTX y seis de ellas las PTX1, -2, -3, -4, -6 y -7 se han identificado químicamente. La PTX2 (PTX2, CH₃) solo se ha detectado en fitoplancton (*D. fortii* en Japón y en Europa), pero nunca en mariscos, por lo que se cree que se oxida en el hepatopáncreas de los mariscos y produce otras toxinas PTX (PTX1, CH₂OH; PTX3, CHO; PTX6, COOH) (Draisci *et al.*, 1996a; Yasumoto *et al.*, 2001 y citado de Van Apeldoorn *et al.*, 1998). Suzuki *et al.* (1998) demostraron la oxidación de la PTX2 a PTX6 en vieiras, *Patinopecten yessoensis*. Sasaki *et al.* (1998) identificaron a las PTX4 y PTX7 como isómeros espirocetales de la PTX1 y PTX6, *epi*-PTX1 y *epi*-PTX6, respectivamente. Se aislaron también dos compuestos nuevos, la PTX8 y PTX9, cuyas estructuras no se determinaron aún. Daiguji *et al.* (1998) aislaron dos pectenotoxinas a partir del mejillón de Nueva Zelanda, *Perna canaliculus* y de *D. acuta* de Irlanda y determinaron sus estructuras como ácido pectenotoxina 2-secoico (PTX2SA) y ácido 7-*epi*-pectenotoxina-2-secoico (7-*epi*-PTX2SA), respectivamente. Suzuki *et al.* (2001) demostraron que en el mejillón de Nueva Zelanda, *Perna canaliculus*, la PTX2 se transforma en PTX2SA y 7-*epi*-PTX2SA (los dos homólogos más importantes en este marisco). En el mejillón común, *Mitylus galloprovincialis*, se espera observar la misma transformación pues la PTX2SA es también el homólogo predominante de la PTX.
- c) El tercer grupo comprende un compuesto sulfatado denominado yesotoxina (YTX), un poliéter tipo brevetoxina y su derivado la 45-hidroxiyesotoxina (45-OH-YTX) (Draisci *et al.*, 1996a; Van Egmond *et al.*, 1993). La yesotoxina se aisló por primera vez en Japón, a partir de los órganos digestivos de vieiras, *Patinopecten yessoensis* (Ciminiello *et al.*, 1999) y se cree que es producida por las microalgas. La yesotoxina no causa diarrea. En ratones se observó que una administración intraperitoneal de yesotoxina afecta el músculo cardíaco, mientras que la yesotoxina desulfatada daña el hígado (Van Egmond *et al.*, 1993). Ciminiello *et al.* (1997; 1999) trabajaron con la glándula digestiva del mejillón mediterráneo, *Mitylus galloprovincialis*, e identificaron, además de la yesotoxina, dos análogos nuevos: la homoyesotoxina y la 45-hidroxihomoyesotoxina. Tubaro *et al.* (1998) también detectaron la presencia de la homoyesotoxina en *M. galloprovincialis* del Mar Adriático durante una floración de *Gonyaulax polyhedra* (= *Lingulodinium polyedrum*). Satake *et al.* (1997) y Satake *et al.* (1999) aislaron la YTX y la 45,46,47-trinoryesotoxina a partir de células de cultivo de *Protoceratium reticulatum*, un dinoflagelado marino y observaron que la producción de yesotoxinas en esta especie difiere según la cepa. Ciminiello *et al.* (1998) detectaron otro análogo nuevo de la YTX, la adriatoxina (ATX), en la glándula digestiva de mejillones mediterráneos infectados con DSP y recolectados en 1997 en la costa italiana (en Emilia Romagna). En el mejillón mediterráneo, *M. galloprovincialis*, se identificaron además cuatro análogos más de la yesotoxina: la carboxiyesotoxina (un grupo COOH en el C₄₄ de la YTX en lugar de un enlace doble), la carboxihomoyesotoxina (un grupo COOH en el C₄₄ de la homoYTX en lugar del enlace doble) (Ciminiello *et al.*, 2000a; 2000b), la 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxo YTX y la 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxohomo YTX (Ciminiello *et al.*, 2001; 2002).

- d) Una toxina nueva ($C_{47}H_{71}NO_{12}$), denominada provisoriamente toxina-3 Killary o KT3 se aisló luego de una intoxicación no explicada en seres humanos, con síntomas tipo DSP, ocurrida en Irlanda en 1995 al ingerir mejillones de Killary (Satake *et al.*, 1998a). Esta toxina se denominó azaspiracida (ver el Capítulo 6).

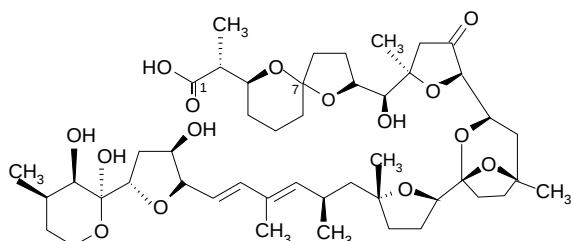
Figura 3.1 Estructuras químicas del ácido okadaico, de las dinofisistoxinas y de las pectenotoxinas



	R1	R2	R3
okadaic acid (OA)	H	H	CH ₃
dinophysistoxin-1 (DTX1)	H	CH ₃	CH ₃
dinophysistoxin-2 (DTX2)	H	CH ₃	H
dinophysistoxin-3 (DTX3)	acyl	CH ₃	CH ₃



	R	C-7
pectenotoxin-1 (PTX1)	CH ₂ OH	R
pectenotoxin-2 (PTX2)	CH ₃	R
pectenotoxin-3 (PTX3)	CHO	R
pectenotoxin-4 (PTX4)	CH ₂ OH	S
pectenotoxin-6 (PTX6)	COOH	R
pectenotoxin-7 (PTX7)	COOH	S



	C-7
pectenotoxin-2 seco acid (PTX2SA)	R
7-epi-PTX2SA	S

Fuente: Yasumoto *et al.*, 2001

CC(C)=CC(O)C(R)C(=O)C=C 1 yessotoxin
CC(C)=CC(O)C(R)C(=O)C=C 2 homoyessotoxin
CC(C)=CC(O)C(R)C(=O)C=C 1 45-hydroxyessotoxin
CC(C)=CC(O)C(R)C(=O)C=C 2 45-hydroxyhomoyessotoxin
CC(C)=CC(O)C(R)C(=O)C=C 1 carboxyessotoxin
CC(C)=CC(O)C(R)C(=O)C=C 2 carboxyhomoyessotoxin
CC(C)=CC(O)C(R)C(=O)C=C 1 45,46,47 trinyessotoxin
CC(C)=CC(O)C(R)C(=O)C=C 1 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxo YTX
CC(C)=CC(O)C(R)C(=O)C=C 2 42,43,44,45,46,47,55-heptanor-41-oxohomo YTX

adriatoxin

56

3.2 Métodos de análisis

3.2.1 Bioensayos

ensayos in vivo

bioensayo en ratón

El bioensayo en ratón del Ministerio de Salud y Bienestar de Japón (Yasumoto *et al.*, 1978; Japanese Ministry of Health and Welfare, 1981) es el método usado comúnmente. Consiste en extraer las toxinas con acetona del tejido de marisco, evaporar y disolver el residuo obtenido en un volumen pequeño de 1% Tween 60. El extracto se inyecta intraperitonealmente a ratones de 20 g de peso corporal y se registra la supervivencia entre 24 y 48 horas. Una unidad ratón (UR) es la cantidad mínima de toxina necesaria para causar la muerte de un ratón en 24 horas. La toxicidad de la muestra (UR/g de tejido entero) se determina a partir de la dosis más pequeña que causa la muerte de dos o más ratones, de un grupo de tres, en 24 horas. En muchos países, el límite reglamentario se fijó en 0,05 UR/g de tejido entero. Este ensayo probablemente detecta todos los componentes DSP, incluidas aquellas toxinas DSP que no causan diarrea (las PTX e YTX) y cuya toxicidad en seres humanos se desconoce. En algunos casos, otros grupos de toxinas desconocidas con propiedades icotóxicas y hemolíticas pueden ser la causa de la muerte de los ratones.

Las principales desventajas de este ensayo son, la falta de especificidad (no hay diferenciación entre los distintos componentes de las toxinas DSP), la subjetividad del tiempo de muerte de los animales y la necesidad de contar con animales de laboratorio para sacrificarlos posteriormente. Además, el ensayo requiere mucho tiempo, es costoso y puede resultar en falsos positivos por interferencias de otros lípidos (Suzuki *et al.*, [1996] comprobaron que los ácidos grasos libres son muy tóxicos para los ratones). Por último, cabe mencionar que los resultados de los extractos de cuerpo entero y de hepatopáncreas no son uniformes (Botana *et al.*, 1996 y Van Egmond *et al.*, 1993).

En la actualidad, distintos países utilizan distintas versiones del bioensayo en ratón pues la versión original de Yasumoto *et al.* (1978) sufrió varias modificaciones tendientes a solucionar algunos de los problemas que presentaba (Yasumoto *et al.*, 1984a; Lee *et al.*, 1987; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1990). En el afán de normalizar la situación, la UE aprobó una directiva para las toxinas del complejo DSP, que incluye pautas referentes al procedimiento a utilizar en el bioensayo en ratón (EU, 2002a). El Laboratorio Comunitario de Referencia para Biotoxinas Marinas de la UE se embarcó en un estudio de intercalibración cuyos resultados mostraron que los distintos Laboratorios de Referencia Nacionales coinciden razonablemente en el procedimiento que utilizan para el bioensayo en ratón con extractos de mariscos de origen desconocido (CRL, 2001).

Fernández *et al.* (1996) advierten que algunos bioensayos incluyen lavados con hexano para evitar falsos positivos ante la presencia de ácidos grasos libres. Los autores mencionan la conveniencia de volver a evaluar los lavados con hexano, considerando las posibles pérdidas de toxinas DSP de baja polaridad que pueden solubilizarse en la capa de hexano. También es necesario omitir el lavado con hexano si se trata de muestras de origen desconocido, cuyos perfiles de toxinas DSP no se conocen.

ensayo con ratones de cuatro o cinco días de edad

El procedimiento consiste en la administración intragástrica de un extracto de tejido de marisco a ratones de cuatro o cinco días de edad. Se determina el grado de acumulación de fluidos en el tracto gastrointestinal luego de transcurridas cuatro horas, calculando la relación entre la masa intestinal y el resto del cuerpo. La reacción es positiva si los valores son superiores a 0,8 y 0,9. Si bien el tiempo de este ensayo es más corto que el del bioensayo en ratón, la cuantificación de los resultados es mucho más difícil ya que solo producen reacciones positivas las sustancias que causan diarrea (AO y toxinas DTX). Los límites de detección para el AO y la DTX1 son de 0,05 y 1 UR, respectivamente (Hallegraeff *et al.*, 1995 y Van Egmond *et al.*, 1993).

bioensayo en ratas

Este ensayo utiliza la inducción de diarrea en ratas. El procedimiento consiste en alimentar a los animales (sometidos a ayuno prolongado) con tejido de marisco sospechoso mezclado en la dieta. Las ratas se observan durante 16 horas para detectar signos de diarrea, evaluar la consistencia de las heces o el rechazo al alimento. En el mejor de los casos, el método es semicuantitativo y no detecta las toxinas PTX ni las YTX (Hallegraeff *et al.*, 1995 y Van Egmond *et al.*, 1993). El ensayo se utiliza de forma rutinaria en los Países Bajos y es uno de los procedimientos permitidos por la legislación de la UE.

ensayo con *Daphnia magna*

Vernoux *et al.*, (1994) desarrollaron un ensayo con *Daphnia magna* para analizar el AO en extractos de mejillón. Los autores concluyeron que el método es sensible y poco costoso. Además, puede utilizarse en lugar del bioensayo en ratón para separar el ácido ocadaico y algunas toxinas coextractantes en el mejillón. El método de extracción utilizado permite determinar el ácido ocadaico y la DTX1. El bioensayo con *Daphnia* mide concentraciones de AO hasta 10 veces inferiores al umbral del bioensayo en ratón.

ensayos en asas intestinales

La acumulación de fluidos en el intestino de ratones y conejos intactos es otro método utilizado para detectar las toxinas DSP. El procedimiento consiste en inyectar una suspensión de toxinas DSP en una solución salina de 1% Tween 60 en las asas intestinales. El resultado es positivo si la relación entre el volumen de fluido acumulado, expresado en ml, y la longitud del asa, expresada en cm, es superior a 1,0 (Hungerford y Wekell, 1992).

Edebo *et al.* (1988a) trabajaron con un método para determinar cuantitativamente la actividad diarreica de las toxinas de las algas en el mejillón común, utilizando asas intestinales ligadas de rata. El procedimiento consiste en desintegrar por presión en frío el hepatopáncreas de mejillones tóxicos, homogeneizar el tejido y suspenderlo en cantidades iguales (p/v) de un agente tampón o del líquido obtenido luego de cocerlos al vapor. La suspensión se inyecta en asas ligadas del intestino delgado de la rata, y se observa una rápida secreción de fluidos. El máximo se observa dentro de las dos horas, con aproximadamente 300 mg de aumento de peso por cm de intestino. Entre 50 y 200 mg/cm, la relación de respuesta a la dosis es casi lineal. La desviación promedio de la media es ± 9 mg/cm ($DE = \pm 4,9$). Los mejillones que producen menos de 100 mg/cm de aumento de peso por g de hepatopáncreas se consideran aptos para el consumo humano, cantidad que concuerda con la concentración de ácido ocadaico permitida. La cantidad mínima de ácido ocadaico que produce secreciones significativas en este ensayo es 0,5 μ g.

en general

Si bien los bioensayos con mamíferos para detectar la toxicidad de las DSP se utilizan mundialmente, existen grandes diferencias en los distintos países en la ejecución de, por ejemplo, el bioensayo en ratón (criterios de toxicidad: muerte del animal, no hay acuerdo en el tiempo de observación apropiado) situación que resulta en diferencias en cuanto a la especificidad y detectabilidad. Uno de los problemas principales es que el bioensayo en ratón detecta todos los componentes DSP y probablemente también otras toxinas. El bioensayo en ratas, por el contrario, solamente detecta el AO y las toxinas DTX, ya que los criterios utilizados incluyen la consistencia blanda de las materias fecales, diarrea y el rechazo al alimento, signos todos que se sabe son solo causados por el AO y las toxinas DTX. Además, el movimiento contrario a la realización de bioensayos en mamíferos presiona cada vez para que no se usen por motivos éticos y, por otra parte, se consideran poco adecuados para fines cuantitativos. En la UE, los representantes de las instituciones gubernamentales de Alemania, el Reino Unido y los Países Bajos presentaron recientemente ante los miembros del Comité Consultivo Científico (CCC) del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (CEVMA), una recomendación, con pruebas adecuadas y convincentes, destinada a fomentar el desarrollo de una

nueva metodología capaz de sustituir los bioensayos para detectar las toxinas DSP y PSP (Grune *et al.*, 2003).

La Comisión Europea reconoció que la comunidad analítica requiere de otros métodos distintos de los que emplean animales. Al respecto, se presentó una propuesta en el Sexto Programa Marco de la Comisión en el Área 5: “Calidad e Inocuidad de los Alimentos” (EC, 2003). Uno de sus objetivos es desarrollar herramientas de análisis y detección de los peligros asociados a mariscos de aguas costeras, eficaces en función del costo. Estos peligros incluyen las toxinas diarreicas, yesotoxinas, pectenotoxinas y azaspirácidas. De aceptarse la propuesta, caben esperar innovaciones en los próximos años.

ensayos in vitro

ensayos de citotoxicidad

Aune *et al.* (1991) desarrollaron un ensayo utilizando los cambios morfológicos observados en hepatocitos de rata frescos expuestos a toxinas DSP. Este método permite diferenciar las toxinas DSP diarreicas, es decir el AO y la DTX1, de las no diarreicas, la PTX1 e YTX. Las primeras inducen células de forma irregular con ampollas de aire en la superficie. La PTX1 provoca la formación de vacuolas en función de la dosis y la YTX no ocasiona cambios en la forma de la célula, pero sí la aparición de ampollas de aire en la superficie. Los primeros signos aparecen con 0,5 µg/ml de AO y DTX1, con 5 µg/ml de PTX y con 10 µg/ml de YTX. Este método demostró ser una herramienta de investigación útil para separar las toxinas DSP diarreicas de las no diarreicas. Sin embargo, tiene algunas desventajas, como insumir mucho tiempo y ofrecer resultados que pueden resultar confusos si se está ante la presencia de mezclas de toxinas de algas.

El AO resulta muy tóxico para las células KB (línea celular humana de carcinoma epidermoide), actividad que se observa tras un contacto de tan solo tres horas. Amzil *et al.* (1992) desarrollaron un método para determinar la mínima concentración activa, observando directamente en el microscopio los cambios en la morfología de la célula inducidos por la toxina. La mínima concentración activa de los extractos de hepatopáncreas de mejillón analizados guardó una buena correlación con las concentraciones de AO determinadas por CL (ver la Sección 3.2.3.).

Daiguji *et al.* (1998) observaron citotoxicidad en células KB con 0,05 µg/ml de PTX2, y ninguna toxicidad con dosis de 1,8 µg/ml de ácido pectenotoxina-2-secoico o de ácido 7-*epi*-pectenotoxina-2-secoico. Los autores concluyeron que la citotoxicidad es afectada por la estructura cíclica de las toxinas PTX.

Tubaro *et al.* (1996b) también desarrollaron un ensayo cuantitativo para determinar el AO usando células KB. El método es eficaz para detectar el AO en muestras de mejillón. El límite de detección es de 50 ng/g de glándula digestiva con un punto final de 24 horas. El ensayo de citotoxicidad dependiente de la dosis está basado en la conversión metabólica de una sal de tetrazolio (MTT), en formazan de color azul, cuya absorbancia se mide con un espectrofotómetro con lector de microplacas de barrido.

Pouchus *et al.* (1997) compararon la actividad de extractos de mejillón contaminados en células KB, interpretando directamente los cambios morfológicos y estimaron colorimétricamente la cantidad de células viables después de la tinción. Esta última técnica reveló interferencias con citotóxicas del mejillón no detectados por la primera. Los resultados de la técnica basada en la determinación de la mínima concentración activa de extractos tóxicos de DSP que inducen cambios morfológicos, muestran que es específica para el AO y preferible a la determinación de la concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) por el método de cultivo celular.

Croci *et al.* (1997, 2001) desarrollaron un método para detectar el AO y compuestos relacionados, basado en los cambios morfológicos que generan en cultivos de células de riñón de *Chloropithecus aethiops*, muy sensibles a la toxicidad de estos compuestos. En muestras contaminadas naturalmente

de *Mitylus galloprovincialis*, los resultados del bioensayo oficial en ratón (de Yasumoto, con un tiempo de observación de cinco horas) concuerdan con los de este ensayo de citotoxicidad.

Otros ensayos de citotoxicidad de las toxinas DSP son, por ejemplo, el de Diogene *et al.* (1995) con fibroblastos y los de Oteri *et al.* (1998), Fairy *et al.* (2001) y Flanagan *et al.* (2001) con líneas celulares humanas. En cuanto a los puntos finales utilizados para evaluar la citotoxicidad de las toxinas DSP, Draisci *et al.* (1998) utilizan la absorción del rojo neutro, Flanagan *et al.* (2001) la tinción vital y Fladmark *et al.* (1998) la inhibición de la agregación celular y la apoptosis.

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad (con hepatocitos o con células KB) parecen satisfactorios para el AO y la DTX1. En la práctica, su utilidad está sujeta a la finalización de los estudios de validación interlaboratorios que se están realizando en la UE. Según Marcaillou-Le Baut *et al.* (1994) los resultados obtenidos con los ensayos de citotoxicidad en células KB guardan una buena correlación con los obtenidos por CL o con el ensayo en ratón (por análisis de regresión lineal).

3.2.2 Ensayos bioquímicos

inmunoensayos

Los distintos métodos de inmunodiagnóstico disponibles para la detección de toxinas DSP están configurados como ensayos RIE o ELISA con anticuerpos preparados contra un único agente diarreico del AO (Hallegraeff *et al.*, 1995). Levine *et al.* (1988) desarrollaron un radioinmunoensayo (RIE) para el AO (Hallegraeff *et al.*, 1995). Los anticuerpos del AO se preparan inmunizando conejos con ácido ocadaico conjugado en la función carboxi para formar un enlace amida con un grupo amino de la albúmina bovina, el portador inmunogénico, (usando carbodiimida). En el sistema de ensayo, el AO compete para unirse al ^3H -AO y se detectan 0,2 pmoles de toxina (aproximadamente 0,2 pg/ml) por contador de centelleo. Las toxinas marinas estructuralmente relacionadas (como por ejemplo el A.O., la maitotoxina, la palitoxina y la brevetoxina) no inhiben la unión del AO marcado con tritio al anticuerpo.

Entre los distintos métodos de inmunodiagnóstico tipo ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) disponibles comercialmente, el DSP-Check®, fabricado por UBE Industries, Tokio, Japón, ha sido utilizado en todo el mundo. Según se afirma detecta la presencia de AO y DTX1 con un límite de detección de 20 ng/g. En la práctica, los resultados son variables, muchas veces se han obtenido resultados inconsistentes, incluyendo falsos positivos, con muestras tanto de fitoplancton como de mariscos. Vale y De M. Sampayo (1999) compararon la CL (método de Lee *et al.*, 1987) con el DSP-Check® y observaron que este último permite detectar cuantitativamente las toxinas DSP en todas las muestras contaminadas analizadas que contenían solamente ácido ocadaico, siempre y cuando la concentración de las toxinas progenitoras esté comprendida en el rango de detección y no se presenten como ésteres. En conclusión, el DSP-Check® es más sensible, más específico y más rápido que la CL. En el DSP-Check®, el grado de reacción cruzada del anticuerpo monoclonal con la DTX1 es comparable al del AO, pero las toxinas PTX y YTX no reaccionan (Hallegraeff *et al.*, 1995).

La prueba ELISA Rougier Bio-Tech® utiliza un anticuerpo monoclonal anti-AO y un anticuerpo antiidiotipo que compete con el AO por los sitios de unión en el anticuerpo anti-AO. Este anticuerpo es mucho más sensible (entre 10 y 20 veces más) al AO que a la DTX1 o la DTX2. Los derivados metil, diol y alcohol del AO también se unen al anticuerpo, mientras que no se observan reacciones cruzadas de ningún tipo para la DTX3 y para la brevetoxina-1. Varios estudios compararon exhaustivamente esta prueba con otros métodos analíticos de detección de toxinas DSP, como la HPLC y la CL acoplada a EM. Se concluyó que es un método bastante confiable para la cuantificación del AO en extractos de mejillón y de fitoplancton (Hallegraeff *et al.*, 1995).

Morton y Tindall (1996) compararon el **DSP Check**® y el **Rougier Bio-Tech**® con la CL (modificación del método de Lee *et al.*, 1987) y determinaron que ambas ELISA estiman de forma precisa las cantidades de ácido ocadaico en extractos sin ácido metilocadaico. Sin embargo, en extractos que contienen ambos análogos observaron que el **DSP Check**® subestima el ácido

ocadaico total. Considerando que los brotes de DSP se han asociado al ácido ocadaico, al ácido metilocadaico o a una mezcla de estos y otros compuestos relacionados, es necesario tener en cuenta que los ensayos ELISA pueden no ser la herramienta adecuada para evaluar con precisión la toxicidad total de las muestras de mariscos.

Biosense ® desarrolló un nuevo ensayo ELISA para detectar la yesotoxina (ver “Direct cELISA YTX assay”- ensayo para YTX Direct cELISA- en www.biosense.com). Según información interna de la empresa, este ensayo probablemente detecte muchísimos análogos y en 2003 están planificados estudio interlaboratoriales internacionales para evaluar su desempeño (Kleivdal, H. información personal, 2002).

Garthwaite *et al.* (2001) desarrollaron un sistema de análisis de las toxinas ASP, NSP, PSP y DSP (incluida la yesotoxina) con varios ensayos ELISA integrados. El sistema detecta las muestras de mariscos sospechosas que seguidamente se analizan utilizando métodos aprobados por las autoridades reglamentarias internacionales. La extracción con alcohol resultó en una buena recuperación para todos los grupos de toxinas.

La inmunotecnología también se aplicó a biosensores para las toxinas DSP. Según Botrè y Mazzei (2000) un biosensor es “un dispositivo bioanalítico autocompatible que incorpora material activo del punto de vista biológico, ya sea conectado o integrado con un transductor físico-químico adecuado, a los efectos de detectar, de forma reversible y selectiva, la concentración o la actividad de compuestos químicos en cualquier tipo de muestra”. Marquette *et al.* (1999) describen un método para detectar el ácido ocadaico en el mejillón con un inmunosensor quimiluminiscente semiautomático con membrana integrado en un sistema de análisis de inyección de flujo. En el ensayo competitivo, con anticuerpos anti-AO marcados con peroxidasa de rábano picante, el antígeno libre de la muestra compete con el AO, inmovilizado en membranas de polietersulfona disponibles comercialmente. Los autores investigaron la estabilidad del sensor en 38 ciclos de determinación del ácido ocadaico y obtuvieron respuestas uniformes en las primeras 34 medidas. Además, el desempeño de cinco inmunosensores (cinco membranas diferentes) demostró tener buena repetibilidad con muestras de mejillón homogeneizadas, con coeficientes de variación de 12,6 por ciento para las muy contaminadas y de 7 por ciento para las blancas. Cabe esperar que, tanto el desarrollo como la aplicación de biosensores para determinar toxinas del grupo DSP, avance rápidamente en los próximos años.

Las columnas de inmunoafinidad son otra técnica con anticuerpos utilizada en el análisis de las DSP para purificar los extractos de marisco antes de la determinación, generalmente por CL. Puech *et al.* (1999) describen el desarrollo reciente y la caracterización de las columnas de inmunoafinidad, elaboradas con anticuerpos monoclonales anti-AO, para la retención específica de las toxinas del grupo del AO. Los autores examinaron la velocidad de unión y la estabilidad de las columnas, así como su capacidad de eliminación de los compuestos que interferían. Observaron reacciones cruzadas entre los anticuerpos y la DTX1 y DTX2, lo que permitió la detección de varias toxinas en un único análisis. Se analizaron distintas matrices contaminadas naturalmente o enriquecidas (glándula digestiva del mejillón y algas) con recuperaciones entre el 55 y el 95 por ciento, según la matriz. Incluyeron, seguidamente, la purificación con columnas de inmunoafinidad, como un paso más en el método de detección espectrofluorométrica con CL y columnas de inmunoafinidad y evaluaron el desempeño del método. Según los criterios de validación, las estimaciones de la linealidad y de la precisión son satisfactorias (los porcentajes de la presunta respuesta del OA se ubicaron en el rango + 101 y 114 por ciento). Los autores concluyeron que las columnas de inmunoafinidad tienen gran potencial como técnica de limpieza en los métodos analíticos, pero es aún necesario probar su valor práctico con estudios de validación interlaboratoriales.

ensayos con fosfatasa ácida

La actividad de la fosfatasa ácida en el protozario *Tetrahymena pyriformis* es otra técnica de detección de las toxinas DSP. Consiste en extraer las toxinas del marisco con acetona y éter y limpiarlas por cromatografía con ácido salicílico. Luego se prepara un cultivo de *Tetrahymena* y se

añade el extracto. Al cabo de 24 horas, se determinan las concentraciones inhibitorias del 50 por ciento de la actividad de la fosfatasa y del crecimiento, expresadas en equivalentes de unidades ratón (Van Egmond *et al.*, 1993 y Hallegraef *et al.*, 1995).

La inhibición específica de la fosfatasa proteica Tipo 1 (PP1) y Tipo 2A (PP2A) causada por algunos análogos de las DSP (el AO y la DTX1) se utilizó para desarrollar un radioensayo con fosfatasa empleando la ^{32}P -fosforilasa. El ensayo se utiliza directamente en extractos de marisco y en las fracciones obtenidas después de la separación por HPLC de las toxinas de extractos de glándula digestiva. Si bien la técnica original, que está acoplada al fraccionamiento de la toxina por CL, no es una herramienta reglamentaria muy común, sí se ha utilizado a menudo para detectar la actividad inhibitoria de la fosfatasa en compuestos y en extractos parcialmente purificados de fitoplancton y de mariscos que se presumían fitotóxicos. El procedimiento de ensayo utilizado actualmente se basa en la inhibición que ejerce el AO sobre la PP1, con un límite de detección de 10 fg de AO/100 g de tejido. Honkanen *et al.* (1996a, b) desarrollaron un ensayo relativamente rápido para detectar el AO en extractos de ostras, *Crassostrea virginica*, utilizando la fosfatasa proteica. Los autores analizaron 320 muestras de ostras enriquecidas. Todas las muestras con $\geq 0,2 \mu\text{g}$ de AO/g dieron resultados positivos. El 16,7 por ciento de las muestras enriquecidas con $0,1 \mu\text{g}$ AO/g dio resultados positivos, mientras que las muestras control y las enriquecidas con $0,02 \mu\text{g}$ AO/g dieron resultados negativos. Los resultados de este ensayo concuerdan con los obtenidos por CL.

Quilliam (1998a) indica que, si bien el uso de radiomarcadores en el ensayo con PP permite obtener límites de detección bajos, los ensayos colorimétricos y fluorométricos desarrollados permiten adoptarlos de forma más generalizada.

Simon y Vernoux (1994) desarrollaron un bioensayo colorimétrico de inhibición de la fosfatasa para determinar cuantitativamente el AO. El ensayo utiliza un sustrato artificial de *p*-nitrofenilfosfato y una fosfatasa proteica PP2A semipurificada con extracto preparado a partir del músculo del conejo. La concentración detectable de AO más baja es de 4 ng/ml en solución acuosa y de 40 ng/ml (es decir, 100 ng de AO por g de tejido de mejillón) en extractos crudos de mejillón en metanol. El método es una manera rápida, precisa, reproducible (en el laboratorio), específica y simple de determinar el AO en soluciones tampones o complejas.

Tubaro *et al.* (1996a) desarrollaron un ensayo PP colorimétrico con *p*-nitrofenilfosfato y una preparación de PP2A disponible comercialmente para detectar el AO en mejillones. El ensayo, que se utiliza en formato de microplacas, es preciso, reproducible (en el laboratorio) y detecta concentraciones de AO de $0,063 \text{ ng/ml}$ en soluciones acuosas y de 2 ng/g en la glándula digestiva del mejillón. Los resultados del ensayo con 30 muestras de mejillón contaminadas naturalmente fueron similares a los obtenidos con los del ensayo de inhibición PP2A, con los de ELISA y con el ensayo de citotoxicidad con MTT. Según los autores, el ensayo es rápido, sensible y no requiere equipos costosos.

Los ensayos fluorométricos con PP permiten trabajar con límites de detección más bajos. Vieytes *et al.* (1997) desarrollaron un ensayo de inhibición enzimática fluorescente para el AO con 4-metilumbeliferil fosfato y difosfato de fluoresceína como sustrato de la enzima PP2A. En extractos de marisco, el límite de detección del AO es de $12,8 \text{ ng/g}$ de hepatopáncreas. Según los autores, este ensayo también puede emplearse con muestras muy diluidas, como por ejemplo las de fitoplancton.

Los ensayos fluorométricos de inhibición de la fosfatasa proteica no solo han tenido mejor desempeño que los colorimétricos, sino que además los resultados concuerdan con los del bioensayo en ratón y con las técnicas de CL (Quilliam, 1998a; Vieytes *et al.*, 1997; Mountfort *et al.*, 1999). Sin embargo, Mountfort *et al.* (2001) modificaron el ensayo fluorométrico para mejorar la falta de sensibilidad a los análogos y derivados éster del ácido ocadaico y para reducir considerablemente la incidencia de los falsos negativos. A la fecha de esta publicación se está realizando un estudio europeo conjunto del método fluorométrico de inhibición de la fosfatasa proteica para determinar los parámetros de desempeño para el ácido ocadaico y para la DTX1. Si los resultados son aceptables, el Comité

Europeo de Normalización hará una norma, y es probable que luego se lo apruebe con fines reglamentarios en la UE.

La YTX inhibe la hidrólisis del *p*-nitrofenil fosfato por la PP2A. La IC₅₀ es de 0,36 mg/ml y se observó que la potencia era cuatro órdenes de magnitud menor que la del AO. Por lo tanto en el ensayo de inhibición enzimática para el AO o para la DTX1 puede descartarse la interferencia de la YTX que coexista con el AO en los mariscos (Ogino *et al.*, 1997).

en general

Los métodos de detección inmunológicos (ELISA, RIE) aún no están ni completamente desarrollados ni validados formalmente para todas las toxinas. Según Nunez y Scoging (1997) la precisión de los ELISA para detectar concentraciones bajas de AO y/o DTX1 es menor que la de la CL, que la del ensayo colorimétrico de inhibición de la fosfatasa o que la del bioensayo en ratón. Gucci *et al.* (1994) tampoco encontraron una concordancia cuantitativa clara entre los distintos métodos de ensayo para DSP (bioensayo en ratón, bioensayo en ratas, ensayo ELISA y CL). Draisci *et al.* (1994) también informan que, en comparación con los resultados obtenidos con el bioensayo en ratón o con CL, los de los ensayos ELISA no siempre son cuantitativamente confiables.

Morton y Tindall (1996) compararon la detección del AO y de la DTX1 por CL con detector de fluorescencia con dos ensayos ELISA disponibles comercialmente para células de dinoflagelado (*Prorocentrum hoffmanium* y *P. lima*). Si bien con los ensayos ELISA no se obtuvieron ni falsos positivos ni falsos negativos, es probable que ambas pruebas subestimen el total de toxinas presentes. Los ensayos de inhibición de la fosfatasa ácida también parecen dar buenos resultados para el AO y la DTX1, pero solo se conocerá su valor práctico una vez concluidos los estudios de validación interlaboratoriales que se están realizando en la UE.

3.2.3 Análisis químicos

cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina detecta las toxinas DSP. El procedimiento consiste en limpiar los extractos (cromatografía en columna de gel de sílice o de permeación sobre gel), aplicar las fracciones directamente sobre una placa de gel de sílice y eluir con una mezcla de tolueno, acetona y metanol. Las toxinas DSP ácidas se presentan como manchas poco intensas bajo luz UV, con un R_f de 0,4. Los ésteres diólicos y las toxinas ácidas libres aparecen como una mancha de un color rojo rosado característico luego de rociar la placa con una solución de vanilina en etanol y ácido sulfúrico concentrado y de dejarla en reposo a temperatura ambiente durante varios minutos. Los ácidos libres son de color rojo rosado brillante y los ésteres diólicos del mismo color pero menos brillante. Con material limpio aplicado sobre una placa para cromatografía en capa fina el límite es de 1 µg de toxina, aunque es necesario contar con al menos 2 o 3 µg si se trabaja con fracciones menos limpias (Hallegraeff *et al.*, 1995). Los límites de detección algo altos constituyen una limitante a la utilización de la cromatografía en capa fina para la determinación de las toxinas DSP.

cromatografía de gases

Los métodos con cromatografía de gases detectan y separan también las toxinas del AO. El procedimiento consiste en aislar las toxinas de los extractos de éter dietílico de cultivos de dinoflagelados, posteriormente purificados con cromatografía de partición con fase invertida, cromatografía con permeación sobre gel y ácido salicílico. La cromatografía de gases de los derivados trimetilsilílicos de toxinas y de ésteres metílicos intactos se realiza con detector de ionización de llama (Hungerford y Wekell, 1992). En la práctica esta técnica se utiliza rara vez.

cromatografía líquida

El método original de cromatografía líquida (Lee *et al.*, 1987) es una de las técnicas analíticas más utilizadas en la determinación del AO y de la DTX1. El procedimiento consiste en la extracción secuencial del tejido de marisco con metanol, éter y cloroformo; la derivatización con 9-

antrildiazometano (ADAM), la limpieza con un cartucho de sílice Sep-pak y la determinación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detector de fluorescencia. El método ADAM es muy sensible a las toxinas DSP y permite detectar 10 pg de un derivado del AO inyectado en la columna. Sin embargo, la concentración mínima detectable en el tejido de marisco está limitada, no por la sensibilidad del detector, sino por la composición química de la muestra que puede presentar grandes variaciones. En la práctica, el límite de cuantificación es de aproximadamente 100 ng/g de tejido. Este límite, si solo se analizan glándulas digestivas, equivale a entre 10 y 20 ng/g de tejido entero de mejillones.

Aase y Rogstad (1997) optimizaron el procedimiento de limpieza de la muestra para la determinación del AO y de la DTX1 con el método de derivatización ADAM. Los autores proponen utilizar una columna de sílice de 100 mg para la extracción en fase sólida y utilizar solventes para el lavado con diclorometano en lugar de cloroformo para reducir al mínimo el efecto estabilizador del alcohol.

La naturaleza inestable del ADAM y las restricciones de disponibilidad impulsaron a varios investigadores a buscar otros reactivos de derivatización, incluyendo el 1-pirenildiazometano y el 1-bromoacetil-pireno, N-(9-acridinil)-bromoacetamida, 4-bromometil-7-metoxicumarina, 2,3-(antracendicarboximida) etilfluorometanosulfonato. Se observó que los mejores son los reactivos ADAM tipo hidrocarburo aromático, el 1-pirinildiazometano (PDAM) y el 1-bromoacetilpireno (BAP), ya que son los menos propensos a sufrir interferencias del reactivo y de los compuestos de reacción (James *et al.*, 1997). El Laboratorio Federal Alemán de Peces y Productos Pesqueros realizó un estudio conjunto de validación interlaboratorios del método por CL-ADAM (GFL, 2001) para determinar el AO y la DTX1 en mejillones. El Comité Europeo de Normalización está elaborando una norma que cabe esperar sea aprobada como Norma Europea en 2004. Si bien el método por CL-ADAM parece adecuado para el AO y la DTX1, no lo es para otras toxinas del complejo DSP.

El método no puede utilizarse directamente para analizar la DTX3; antes de analizarla es necesario convertirla por hidrólisis alcalina en AO, DTX1 o DTX2. El método por CL-ADAM tampoco puede utilizarse para analizar los ésteres diólicos de las toxinas DSP, ni las YTX ni algunas de las PTX. (Hallegraeff *et al.*, 1995 y Van Egmond *et al.*, 1993).

Otros procedimientos para determinar las yesotoxinas y la pectenotoxina-2 por CL para el marcado fluorescente utilizan DMEQ-TAD (4-[2-(6,7-dimetoxi-4-metil-3-oxo-3,4-dihidroquinoxalil)etil]-1,2,4-triazolin-3,5-diona), un reactivo dienófilo, (Yasumoto y Takizawa, 1997; Sasaki *et al.*, 1999). Si bien los autores sostienen que estos métodos son mejores que el bioensayo en ratón por su rapidez, sensibilidad y especificidad, no se han realizado aún las validaciones interlaboratorios para determinar sus características de desempeño.

Según Fernández *et al.* (1996), la capa de éter de petróleo, que habitualmente se descarta en todo procedimiento (CL con detector de fluorescencia, CL acoplada a EM) utilizado para caracterizar las toxinas DSP en mariscos, es en algunos casos muy rica en toxinas DSP poco polares.

cromatografía electrocinética micelar

Bouaïcha *et al.* (1997a) determinaron toxinas DSP no derivatizadas por cromatografía electrocinética micelar con detector UV. En muestras de mejillón enriquecidas con 10 ng/g de tejido entero detectaron AO, y en extracto crudo del dinoflagelado *Prorocentrum lima* detectaron AO y DTX2.

espectrometría de masas

Hallegraeff *et al.* (1995) analizaron los ésteres diólicos del AO y las toxinas DTX1 y DTX3. La CL acoplada a EM con ionización por electronebulización es un método sensible y rápido para analizar las toxinas DSP, con un límite de detección de 1 ng/g de tejido de marisco comestible entero. En la actualidad se continúa trabajando en el desarrollo de distintos procedimientos analíticos para la determinación de toxinas DSP y algunos artículos de divulgación recientes describen un amplio espectro de métodos (Quilliam, 2001). Suzuki *et al.* (2000) trabajaron especialmente con el AO, la

DTX1 y la PTX6 utilizando CL acoplada a EM para obtener el perfil de toxinas DSP en bivalvos (vieiras y mejillones). Se determinó que el modo de ionización por electronebulización negativa es mucho más eficiente que el positivo.

Varios autores estudiaron los efectos de la matriz en el análisis de toxinas DSP por CL acoplada a EM con ionización por electronebulización. Suzuki *et al.* (2000) obtuvieron buenos resultados limpiando la muestra con una columna B de alúmina. Hummert *et al.* (2000) utilizaron la cromatografía de exclusión por tamaño para limpiar extractos crudos de algas y de tejido de mejillón con microcistinas o con toxinas DSP. Si bien es probable que los autores hayan obtenido mejores resultados, la publicación no logra demostrar que los efectos de la matriz hayan sido eliminados completamente (no se presenta la información de recuperación y no se utilizó enriquecimiento). Por otra parte, Goto *et al.* (2001) se concentraron en las propiedades químicas de los distintos compuestos DSP, utilizando varios solventes de extracción y particiones del mismo.

Ito y Tsukada (2001) estudiaron específicamente los efectos de la matriz. Los autores obtuvieron mejores resultados con un método de adición de un estándar a cada muestra por separado, aunque implica realizar dos corridas de CL acoplada a EM por análisis. Por el contrario, obtuvieron resultados menos satisfactorios con un método con un factor de respuesta basado en una muestra modelo. El estudio subraya los efectos de la matriz de los extractos de marisco, demuestra en qué medida afectan los resultados y propone distintas formas de salvar el obstáculo para la cuantificación.

Holland y McNabb (2003) publicaron un informe de un estudio interlaboratorio del segundo semestre de 2002 con un nuevo método de CL acoplada a EM para determinar las toxinas ASP y DSP en mariscos. En líneas generales, los ocho laboratorios participantes obtuvieron datos uniformes para el grupo de toxinas analito, incluso en concentraciones bajas (< 5 ng/ml, equivalente a 0,05 mg/kg). También se determinó que la sensibilidad es adecuada para los límites de detección necesarios. La mayoría de los laboratorios detectaron las toxinas analito, aunque se observaron diferencias en cuanto a la cuantificación de algunas de ellas, especialmente en ausencia de estándares analíticos. Los participantes utilizaron distintos modos de detección de EM: algunos utilizaron solo la EM (con modos de control de iones específicos o de reacciones específicas), otros emplearon la detección EM en tándem y un tercer grupo ambas técnicas. Si bien la EM en tándem constituye una opción atractiva por su mayor especificidad, es necesario tomar precauciones adicionales para la cuantificación. En resumen, los resultados del estudio son alentadores para todo interesado en utilizar otro método distinto del bioensayo en ratón; método que no cuenta con validación estadística alguna, que da muchos falsos positivos, que es poco adecuado para detectar algunas toxinas y es inaceptable del punto de vista ético para el control rutinario de alimentos. Además, el método 40.105 (el método probado) detecta de manera confiable las toxinas ASP y varias otras toxinas y metabolitos, como las azaspirácidas y los ácidos pectenotoxina secoicos, no siempre se detectables con el bioensayo en ratón (Holland y McNabb, 2003).

en general

La CL constituye una herramienta útil para identificar y cuantificar ciertas toxinas diarreicas, como el AO o las toxinas DTX. En la actualidad, el Comité Europeo de Normalización está considerando hacer una norma con el primer método validado para el AO y la DTX1. Para las otras toxinas DSP existen algunos métodos de CL que aún no están validados. Las innovaciones en la metodología de la CL acoplada a EM son prometedoras pero es necesario mejorarlas y realizar los estudios interlaboratoriales correspondientes antes de incluirlas, de forma generalizada, como herramienta para los análisis reglamentarios. La escasez o la dificultad para obtener estándares analíticos y materiales de referencia es un problema grave que obstaculiza el desarrollo y la validación de la metodología analítica para las toxinas DSP.

3.3 Organismos fuente y hábitat

3.3.1 Organismos fuente

Los productores de toxinas DSP son dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* spp. y *Prorocentrum* spp. En condiciones ambientales favorables, estas algas pueden reproducirse rápidamente y causar floraciones.

Según Viviani (1992), siete especies de *Dinophysis* están confirmadas como productoras de toxinas DSP: *D. fortii* (en Japón), *D. acuminata* (en Europa), *D. acuta*, *D. norvegica* (en Escandinavia), *D. mitra*, *D. rotundata* y *D. tripos*, y los dinoflagelados bentónicos *Prorocentrum lima*, *Prorocentrum concavum* (o *P. maculosum*) y *Prorocentrum redfieldi*. Hallegraeff *et al.* (1995) indican que se sospecha de otras tres especies de *Dinophysis*, *D. caudata*, *D. hastata* y *D. sacculus*. Giacobbe *et al.* (2000) encontraron concentraciones de AO y DTX1 en *D. sacculus* entre 110 y 400 y entre 8 y 65 fg/célula, respectivamente. Las máximas concentraciones de toxinas DSP se encontraron en floraciones ocurridas a principios de primavera (OA+DTX1 455 fg/célula). Los autores indican que, si bien la toxicidad de *D. sacculus* es baja, la participación de la especie en los eventos nocivos en el Mediterráneo está lejos de ser despreciable.

Las toxinas DSP halladas en los dinoflagelados heterotróficos *Protoperdinium oceanicum* y *P. Pellucidum* parecen indicar que se alimentan de *Dinophysis*. La producción de toxinas varía considerablemente según la especie y según los morfotipos regionales y estacionales de una misma especie. En el norte de Japón, *D. fortii* contiene altas concentraciones de toxinas en marzo y junio, hecho asociado a una importante acumulación de toxinas en mariscos. Sin embargo, en el sur de Japón en mayo y julio, la toxicidad de la misma especie es mínima y los mariscos no están libres de toxinas (Hallegraeff *et al.*, 1995).

Pan *et al.* (1999) observaron que *Prorocentrum lima* produce AO, un éster diólico del AO, DTX1 y DTX4. Caroppo *et al.* (1999) comprobaron el potencial de producir AO, DTX1 y DTX2 de la especie no fotosintética *Phalacroma rotundatum* en el sur del Mar Adriático. También se determinó la capacidad productora de AO del dinoflagelado *Prorocentrum arenarium* aislado de un ecosistema de arrecife, en la Isla Europa, en el Canal de Mozambique (Ten Hage *et al.*, 2000) y de la especie *Prorocentrum belizeanum* de un ecosistema de arrecife coralino en Belice (Morton *et al.*, 1998). Según Tubaro *et al.* (1998), la especie *Gonyaulax polyhedra* fue la responsable de la contaminación con YTX en el mejillón mediterráneo. Satake *et al.* (1997) aislaron la YTX de un cultivo de células del dinoflagelado marino *Protoceratium reticulatum*.

3.3.2 Condiciones favorables para el crecimiento

Los mariscos acumulan toxinas en cantidades suficientes como para afectar al ser humano con tan solo 200 células de *Dinophysis* por litro (Botana *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha observado que en aguas holandesas del Mar de Wadden, solo se asociaron con DSP las floraciones de más de 20 000 células por litro. Un estudio de *Dinophysis* en aguas portuguesas mostró que el tiempo necesario para que el marisco se convierta en tóxico varía, no solo en función de la presencia de algas tóxicas, sino también de la abundancia relativa de las otras especies no tóxicas (Aune y Yndestad, 1993). Según Viviani (1992), no todos los brotes de DSP están acompañados de floraciones macroscópicas de *Dinophysis* spp. o de *Prorocentrum* spp. La toxicidad de cada especie de *Dinophysis* varía espacial y temporalmente y la cantidad de células por litro necesaria para contaminar los mariscos es muy variable. En Noruega, tan sólo 1 000 y 2 000 células de *Dinophysis* spp. por litro de agua de mar son suficientes para que el mejillón común acumule cantidades considerables de células (entre 20 000 y 30 000 células por glándula digestiva), que resultan en una toxicidad elevada (Aune y Yndestad, 1993).

En un fiordo aislado de Suecia se detectaron bajas concentraciones de AO en mejillones (*M. edulis*) con cantidades relativamente altas de fosfato y nitrógeno inorgánicos disueltos (FID y NID). En la misma zona se observó que las aguas profundas eran ricas en silicato disuelto (SiD). A fines de verano se observaron bajas concentraciones de AO en mejillones en las zonas con bajas relaciones FID/SiD y NID/SiD; y altas concentraciones de AO en zonas con agotamiento casi total de SiD en julio y cuya cantidad permaneció baja durante el resto de la estación productiva. La información obtenida muestra que la ausencia de silicatos favorece a los dinoflagelados, incluidas las especies de *Dinophysis* productoras de toxinas DSP (Haamer, 1995).

En marzo de 1993 y, entre abril y mayo de 1994, en el norte del Golfo de California, en México se observaron ciertas condiciones que fomentan la presencia de los dinoflagelados, como la desaparición de las diatomeas, poca presión de pastoreo, un entorno probablemente limitado en nitratos, temperaturas entre 20 y 23 °C y estratificación térmica. En estos períodos las densidades máximas de *D. caudata* estuvieron entre 75 y 90 x 10³ células por litro (Lechuga-Devéze y Morquecho-Escamilla, 1998).

McLachlan *et al.* (1994) realizaron un estudio con *P. lima*, una especie del bentos y del plancton, de aguas calientes y templadas o frías. Los autores observaron que el crecimiento de los cultivos de esta especie en Nueva Escocia, Canadá, está precedido de largas fases de latencia. En la fase de latencia inicial, con agregado de nitrógeno al medio, las concentraciones de toxina por célula permanecieron relativamente altas. En general, una vez comenzado el crecimiento celular, la concentración total de toxina por célula disminuyó y se mantuvo entre 5 y 10 pg. Las células de *P. lima* sobrevivieron cinco semanas con 0 °C, recuperándose con temperaturas más altas. Durante estas cinco semanas, probablemente hubo daño celular con pérdida concomitante de toxinas, liberadas al medio. La concentración de nitrógeno (NO₃⁻) en el medio se utilizó como factor limitante del crecimiento o para estresar fisiológicamente las células. Se observó que cuando se limita el crecimiento aumentan las toxinas asociadas a las células, registrándose la máxima acumulación de toxinas en la célula en la fase estacionaria. La relación AO/DTX1 fue de aproximadamente 5. Una relación AO/DTX1 baja, se asoció a las células en crecimiento y las altas se a la fase estacionaria.

Según Pan *et al.* (1999), la síntesis de toxinas DSP en *P. lima* está limitada al período luminoso y asociada a eventos en el ciclo de división celular. La síntesis de DTX4 comienza en la fase G1 del ciclo celular y continua durante la fase S (“la mañana” del fotoperíodo), mientras que la producción de AO y DTX1 ocurre posteriormente, en la fase S y en la fase G2 (“la tarde”). No se obtuvieron medidas de la producción de toxinas durante la citoquinésis al comienzo de la oscuridad.

3.3.3 Hábitat

La incidencia de DSP, o al menos la presencia de DSP, muestra una tendencia creciente, lo que puede atribuirse en parte, a un mejor conocimiento de la enfermedad y a programas de vigilancia más eficaces. Sin embargo, se informa con frecuencia de la presencia de algas productoras de toxinas y de moluscos tóxicos en zonas nuevas (Aune y Yndestad, 1993). El primer registro de DSP es de 1976, en Japón, donde ocasionó grandes problemas en el cultivo de vieiras. En ese mismo país se registraron aproximadamente 1 300 casos de DSP entre 1976 y 1982; más de 5 000 casos en España en 1981 y, en 1983 aproximadamente 3 300 en Francia. En 1984, la industria del mejillón permaneció cerrada prácticamente todo un año en Suecia por las toxinas DSP. La distribución conocida de las DSP incluye Japón, Europa, Chile, Tailandia, Canadá (Nueva Escocia) y probablemente Tasmania (Australia) y Nueva Zelanda (Hallegraeff *et al.*, 1995).

Van Egmond *et al.* (1993) y Viviani (1992) indican que el organismo productor de toxinas DSP en Japón es *Dinophysis fortii*. Sin embargo, se halló *Prorocentrum lima*, productora de AO, en Sanriku en la costa norte de Japón, en la superficie de las algas *Sargassum confusum* y *Carpopeltis flabellata*. En medio T1 a 15 °C, temperatura a la cual las cepas tropicales no presentan crecimiento, el

crecimiento de esta cepa de *P. lima* fue bueno, lo que indica que es una cepa local adaptada a entornos más fríos (Koike et al., 1998).

En aguas del Atlántico, en Europa, se observaron otras especies de dinoflagelados: *D. acuminata* y *D. acuta* en España, *D. acuminata*, *D. sacculus* y *P. lima* en Francia; *D. acuminata*, *P. redfieldii* y *P. micans* en los Países Bajos (Van Egmond et al., 1993 y Viviani, 1992); *D. acuta*, *D. sacculus*, *D. acuminata*, *D. caudata* y *P. lima* en Portugal (Van Egmond et al., 1993), *D. acuta*, *D. acuminata*, *P. lima* y *P. concavum* en Irlanda; *D. acuta*, *D. acuminata*, *D. norvegica*, *P. micans*, *P. minimum* y *P. lima* en Escandinavia; y *D. sacculus*, *D. acuminata*, *D. tripos*, *D. caudata* y *D. fortii* en el Mar Adriático (Van Apeldoorn et al., 1998; Ciminiello et al., 1997; Marasović et al., 1998; Giacobbe et al., 2000). El primer informe de PTX2 en Europa es de Draisci et al. (1996a), quienes detectaron la toxina en *Dinophysis fortii* del norte del Mar Adriático.

Van Apeldoorn et al. (1998) informan de la presencia de *D. caudata* en el Golfo de México, *D. fortii*, *D. acuminata* y *P. lima* en la región de Australia y *D. norvegica* y *P. lima* en la región este de Canadá. Entre marzo de 1997 y febrero de 1998 la especie *D. caudata* fue la más frecuente y la más abundante en el Estrecho de Johor, en Singapur. También se observó la presencia de los dinoflagelados *Prorocentrum micans* y *Prorocentrum* spp. (Holmes et al., 1999).

Caroppo et al. (1999) informan de la presencia de *Phalacroma rotundatum*, potencial productora de toxinas del grupo del ácido ocadaico, en aguas japonesas, en el noroeste de España, en la Ría Pontevedra y en la costa de Puglia en el Adriático sur, en Italia.

A lo largo de las costas chinas de los Mares de la China del Este y del Sur se detectó AO en algunas especies de mariscos, lo que implica que existen especies productoras de toxinas DSP en la zona. La frecuencia y la concentración de toxinas en mariscos de las costas del sur fueron superiores a las del norte (Zhou et al., 1999).

Orlova et al. (1998) indican que en 1995 y 1996 se observaron grandes cantidades de *D. acuminata* y *Prorocentrum minimum*, en la Bahía de Pedro el Grande, en el Mar de Japón, Federación Rusa.

También se determinó la capacidad productora de AO en el dinoflagelado bentónico, *Prorocentrum arenarium*, aislado de un ecosistema de arrecife en la Isla Europa en el Canal de Mozambique (Ten Hage et al., 2000) y en la especie *Prorocentrum belizeanum* de un ecosistema de arrecife coralino en Belice. (Morton et al., 1998).

3.4 Presencia y acumulación en frutos del mar

3.4.1 Incorporación y eliminación de las toxinas DSP en organismos acuáticos

Los mariscos acumulan fácilmente las toxinas diarreicas asociadas a especies de *Dinophysis* y *Prorocentrum*, pero poco se sabe del tiempo de retención (Hallegraeff et al., 1995). Algunos estudios describen la cinética de las toxinas DSP en bivalvos, tanto en condiciones naturales como controladas del laboratorio. Bauder y Grant (1996) estudiaron la cinética de las toxinas DSP en vieiras juveniles y adultas. En un microcosmos de laboratorio con condiciones controladas, alimentaron a las vieiras con células del dinoflagelado epibentónico *Prorocentrum lima*. Las toxinas DSP en las células de los dinoflagelados y en las vieiras se analizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con electronebulización asistida neumáticamente (CL acoplada a EM). Los autores observaron que la exposición a células de *P. lima* no inhibió las velocidades de eliminación, ni en adultos ni en juveniles, y tampoco causó mortalidad. Los autores observaron que en esta especie, la acumulación de toxinas por encima del límite reglamentario, de 0,2 µg toxinas DSP/g peso en húmedo, puede ocurrir en menos de una hora de exposición a densidades altas de *P. lima*. La saturación de toxinas (2 µg de toxina DSP/g de peso en húmedo) se alcanzó en dos días; sin embargo, la retención de toxinas fue muy baja (menos de 5 por ciento). Si bien la mayoría de las toxinas se acumularon en las vísceras, se observaron altas concentraciones de toxinas específicas según el peso en las gónadas de las vieiras adultas. La pérdida rápida de las toxinas alojadas en las gónadas registradas durante los dos primeros

días de depuración indica que la toxina es un derivado primario de un compuesto lábil (no unido) de la sección de las asas intestinales a través de las gónadas. Sin embargo, la eliminación de toxinas de los tejidos viscerales siguió un patrón bifásico de liberación rápida de toxinas durante los primeros dos días de depuración, seguida de una pérdida más gradual en las dos semanas subsiguientes. Esto sugiere que la deposición de heces puede constituir un mecanismo importante para la liberación rápida de toxinas no asimiladas y de células de dinoflagelado intactas.

Sedmak y Fanuko (1991) también observaron dos fases en la liberación de toxinas DSP durante la descontaminación en mejillones. En la primera fase, el contenido de toxinas disminuye rápidamente, en la segunda lentamente, y la toxicidad permanece por encima del límite de cuarentena de 0,5 UR/g de hepatopáncreas. Los patrones de contaminación y descontaminación son específicos de cada especie de marisco y no parecen guardar relación con el tipo de toxina del dinoflagelado.

En un estudio con vieiras tóxicas, *Patinopecten yessoensis*, cultivadas en cubetas con circulación de agua de mar filtrada y esterilizada y alimentadas con y sin diatomeas planctónicas, el contenido de toxinas DSP disminuyó gradualmente durante el cultivo (método de ensayo microbiano). En un grupo alimentado con cultivos de elevada densidad de *Chaetoceros septentrionelle* el contenido de DSP disminuyó en dos semanas al 30 por ciento del valor inicial. La toxicidad por DSP de los excrementos de las vieiras cultivadas fue relativamente alta. Los autores también observaron que en grupos alimentados con otras diatomeas, por ejemplo *Skeletonema costatum*, *Asterionella japonica*, *Rhabdonema* spp. y *Thalassiosira* spp., la toxicidad disminuyó, pero también disminuyeron las cantidades de glicógeno, de aminoácidos libres y de ácidos grasos libres, que deterioraron la calidad (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

Blanco *et al.* (1999) estudiaron la descontaminación del mejillón, *Mitylus galloprovincialis*, de Galicia, en el noroeste español, durante 70 días utilizando distintas variables ambientales (salinidad, temperatura, transmisión de la luz y fluorescencia). Entre las variables estudiadas, los autores observaron que la transmisión de la luz y la fluorescencia parecen ejercer el mayor efecto en la depuración. En la mayoría de los casos se observó una relación inversa entre la depuración y el peso corporal. Sin embargo, no pudieron determinar con certeza si la cinética de la depuración de las DSP es en uno o en dos compartimientos.

Sidari *et al.* (1998) estudiaron el comportamiento alimenticio del mejillón, *Mitylus galloprovincialis*, en un criadero de mejillones del Golfo de Trieste, en Italia, durante un brote de DSP. Los autores observaron que parece alimentarse de forma selectiva, escogiendo más bien los dinoflagelados y no las diatomeas. También observaron una selección en los distintos géneros de dinoflagelados y una marcada preferencia por el género *Dinophysis*. Aparentemente los mejillones son capaces de abrir las tecas de las células de *Dinophysis* y digerirlos más fácilmente que otros dinoflagelados.

3.4.2 Mariscos con toxinas DSP

En Japón, los mariscos que causan DSP son los mejillones, *Mitylus edulis* y *M. corseum*, las vieiras, *Patinopecten yessoensis* y *Chlamys nipponensis akazara*, y las almejas, *Tapes japonica* y *Gomphina melaegis*. En las costas atlánticas de Europa se encontró que estaban contaminadas con DSP especialmente *M. edulis*, y también ciertas especies del género *Ostrea*, (Viviani, 1992).

En Japón y en las costas españolas y francesas del Atlántico, la infestación ocurre desde abril hasta setiembre y entre mayo y agosto se registra la mayor toxicidad, con variaciones locales en algunos casos. En Escandinavia, por el contrario, las ostras han causado DSP en febrero y los mejillones en octubre. La información del primer episodio de DSP en el Mar Adriático, en 1989 indica que en algunas áreas costeras el período de infestación ocurre entre mayo y noviembre (Viviani, 1992).

El análisis comparativo de la toxicidad de distintos mariscos provenientes de una zona en Japón mostró que el más tóxico es el mejillón común (*Mitylus edulis*), seguido de las vieiras y por último las

ostras muy poco tóxicas. La toxicidad de los mejillones también varía según la profundidad del cultivo, con concentraciones que difieren en factores de dos o tres (Viviani, 1992). Botana *et al.* (1996) determinaron que los mejillones del nivel superior (entre 3 y 6 m) son los más tóxicos, mientras que entre 6 y 8 m y entre 8 y 12 m la toxicidad se reduce a la mitad. En mejillones adyacentes de la misma zona se detectaron concentraciones de 0,63 y 4,2 µg de AO/g de hepatopáncreas y en mejillones del mismo encordado ubicados a distintas profundidades 0,63 y 10 µg de AO/g de hepatopáncreas (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

Fernández *et al.* (1996) determinaron que en los mejillones españoles de las Rías de Galicia, la toxina principal es el AO, aunque también encontraron otras toxinas DSP de menor polaridad. La concentración de las toxinas DSP de menor polaridad no superó en ningún caso la de AO. Por otra parte, observaron que altas concentraciones de toxinas DSP menos polares se corresponden con altas concentraciones de AO. Los autores creen que las toxinas DSP menos polares que se encuentran en la capa de hexano, y que generalmente se descartan, pertenecen al grupo de los derivados acilo.

La acumulación y la concentración de enterotoxina en los tejidos de las distintas especies de moluscos bivalvos del Mar Adriático difieren según la especie, aunque estas compartan el mismo hábitat infestado con microalgas. EL control de toxinas DSP por bioensayo en ratón de *Mitylus galloprovincialis*, *Chamelea gallina*, *Tapes decussata* y *Venus verrucosa*, mostró que solo los mejillones contenían DSP, aunque todas ellas fueron recolectadas en el mismo hábitat, en el Mar Adriático. Esta falta de uniformidad en la distribución de las DSP incide en la elaboración de los planes de muestreo de mariscos para los programas de seguimiento (Viviani, 1992). Ciminiello *et al.* (1997) detectaron AO, DTX1 y YTX en *M. galloprovincialis* del norte del Mar Adriático. Viviani (1992) menciona que la cocción no alteró la toxicidad de los mariscos contaminados, pero la intoxicación sí se evitaba eliminando previamente las glándulas digestivas.

Suzuki y Mitsuya (2001) determinaron la presencia de homólogos del AO por cromatografía líquida con detector de fluorescencia en muestras del alga *D. fortii*, en vieiras *Patinopekten yessoensis* y en mejillones *Mitylus galloprovincialis* recolectados en la misma zona, en la Bahía de Mutso, Japón. Los autores encontraron que en mejillones y vieiras, las toxinas dominantes son respectivamente DTX3 y DTX1, mientras que en *D. fortii* solo detectaron DTX1. También observaron que los contenidos de toxinas en mejillones son bastante más altos que en las vieiras, lo que indica que los mejillones cuentan con más potencial de acumular homólogos del AO que las vieiras.

En el mejillón verde, *Perna viridis*, del Estrecho de Johor en Singapur, se observaron concentraciones bajas pero persistentes de toxinas DSP. Se detectaron seis isómeros del AO y cinco de la DTX1 y se observó que, en general, la concentración de los isómeros es más alta que la de AO y DTX1. La concentración máxima encontrada, de 97 ng/g de tejido digestivo del mejillón (peso en húmedo), correspondió a un isómero de la DTX1 (DTX1a), mientras que la concentración máxima de AO fue de 24 ng/g. Estos valores son inferiores al límite de consumo (Holmes *et al.*, 1999).

Las DSP están ampliamente distribuidas en distintas especies de mariscos a lo largo de la costa china. En 26 de las 89 muestras analizadas se detectó DTX1 o AO, pero solo seis tenían concentraciones superiores al límite reglamentario para consumo humano (20 µg/100 g de tejido). La concentración más alta se encontró en la especie *Perna viridis* de Shenzhen con 84 µg/100 g (Zhou *et al.*, 1999).

3.4.3 Otros organismos acuáticos con toxinas DSP

El mejillón se alimenta filtrando plancton y así acumula las toxinas DSP. Pero este proceso no selectivo, también es característico de algunos peces que acumulan toxinas. Por otro lado, los predadores pueden acumular fácilmente cantidades considerables de toxinas en una sola comida ya que muchos bivalvos concentran las toxinas en sus glándulas digestivas. Es así que en algunos peces predadores se detectó AO debido a que ingirieron mejillones o peces con la toxina.

Un estudio con bacalao en cautiverio, alimentados con mejillones tóxicos demostró que las concentraciones de AO más altas se registraron especialmente en el hígado (0,7 µg/g) y en las gónadas y las más bajas en el músculo. Los autores determinaron que, si bien la concentración de DTX1 en los mejillones que se utilizaron como alimento era más alta que la de AO, la DTX1 estaba prácticamente ausente en el tejido de los peces. También observaron que al alimentar a los peces con alimento no tóxico, el AO desaparecía en uno o dos meses, aunque en los testes el proceso fue menos rápido. No se detectó AO entre enero y febrero de 1992 en peces (bacalao, tiburón y arenque) de aguas escandinavas, cuando el contenido de AO y DTX1 de los mejillones en los alrededores era bajo. Tampoco se encontró AO en aceite de hígado de bacalao refinado (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

En los programas de seguimiento solo se incluye tradicionalmente a los moluscos que se alimentan por filtración. Sin embargo, Shumway (1995) recalcó la importancia de incluir en los programas de control rutinario a otros órdenes superiores que se alimentan de esta manera, como crustáceos y gastrópodos carnívoros, especialmente en regiones donde se recolectan especies no tradicionales. No existen registros de la presencia de toxinas DSP en gastrópodos o crustáceos falta que, sin lugar a dudas, se debe a que no se han obtenido. Según lo expuesto, no puede excluirse la acumulación de toxinas DSP en animales de órdenes superiores que se alimentan de esta manera.

3.5 Toxicidad de las toxinas DSP

3.5.1 Mecanismo de acción

La primera clave para elucidar el mecanismo de acción de las toxinas DSP fue descubrir que el AO provoca una contracción de larga duración del músculo liso de las arterias humanas. Una subunidad de la miosina activa la contracción del músculo liso, por lo que se asumió que el efecto del AO se debía a la inhibición de la fosfatasa de la miosina de cadena pequeña. Con posterioridad, se demostró que el AO es un potente inhibidor de las fosfatasas PP1 y PP2A serina/treonina y que la inhibición de la PP2A es aproximadamente 200 veces superior a la de la PP1. Las fosfatasas proteicas son un grupo de enzimas muy importantes y estrechamente relacionadas con muchos procesos metabólicos esenciales de la célula. La fosforilación y la desfosforilación de proteínas son uno de los principales procesos de regulación en células eucariotas. Estos procesos versátiles regulan entre otros el metabolismo, el transporte y la secreción en la membrana, la contractilidad y la división celular. Algunos autores indican que las fosfatasas, enzimas sensibles al AO, como por ejemplo la PP1 y PP2A, participan en el inicio de la mitosis. Según otros autores, la causa de la diarrea en el ser humano es la hiperfosforilación de las proteínas que controlan la secreción de sodio de las células intestinales o un aumento de la fosforilación de las proteínas citoesqueléticas o de unión, responsables de regular la permeabilidad a los solutos; lo que ocasiona una pérdida pasiva de fluidos (Van Egmond *et al.*, 1993; Hallegraef *et al.*, 1995). El estudio exhaustivo de la actividad y de la estructura midiendo la inhibición de la actividad de la fosfatasas proteicas indica que un grupo carboxilo libre de la molécula DSP es esencial para la actividad ya que los ésteres diólicos y metílicos no inhiben la fosfatasa. Sin embargo, la actividad de los derivados de la amida y del carboxil reducido (ocadaol) es la mitad que la del AO, al igual que la de los compuestos DTX3 naturales (Hallegraef *et al.*, 1995).

3.5.2 Farmacocinética

estudios con animales de laboratorio

estudios en ratones con ácido ocadaico (AO)

Matias y Creppy (1996a) estudiaron la circulación enterohepática del AO en ratones. El estudio consistió en administrar a ratones suizos una única dosis oral por cebado de 50 o 90 µg AO [³H]/kg de pc, disuelto en 0,2 ml de agua estéril y metanol (50:50 [v/v]). Recogieron las heces y la orina durante 24 horas y sacrificaron los animales. Con 50 µg/kg de pc no observaron signos clínicos de toxicidad, pero con 90 µg/kg de pc observaron diarrea pasadas ocho horas de la administración. No hubo mortalidad. Determinaron la radioactividad en el cerebro, pulmón, bazo, corazón, hígado, vesícula biliar, estómago, tejido intestinal, contenido intestinal, piel, sangre, músculo, orina y en las heces.

Derivatizaron el AO con 9-antrildiazometano (ADAM) y lo analizaron por CL (con detector de fluorescencia). Los resultados obtenidos por ambos métodos son similares, lo que indica que la velocidad de metabolización del AO es baja. Los autores determinaron que el AO se absorbe del tracto gastrointestinal ya que se encontró luego de 24 horas especialmente en los tejidos y contenidos intestinales (49,2 por ciento de la dosis) y en la orina (11,6 por ciento). Las altas concentraciones en los tejidos y en los contenidos intestinales luego de transcurridas 24 horas prueban que la eliminación del AO es lenta. Los autores determinaron que con una dosis de 50 µg/kg de pc, la cantidad de AO total en los órganos es baja, en comparación con la cantidad excretada por la orina y las heces (11,6 y 6,6 por ciento de la dosis, respectivamente); y es considerablemente menor que la cantidad en los tejidos y en los contenidos intestinales. El aumento de la dosis de 50 a 90 µg/kg de pc ocasionó un aumento proporcional de las concentraciones de AO en los tejidos, contenidos intestinales y en las heces. Con dosis más elevadas, la diarrea aumenta proporcionalmente al aumento de AO en el tejido intestinal. La circulación enterohepática quedó confirmada con el AO en el hígado, en la bilis y en todos los órganos, incluida la piel y los fluidos; y con el aumento entre dos y siete veces de las concentraciones en los contenidos intestinales, en comparación con los contenidos en las heces luego de 24 horas. El estudio también demuestra que en la intoxicación aguda con AO, el grado de concentraciones citotóxicas en el tejido intestinal concuerda con la diarrea observada (Matias *et al.*, 1999a). En estudios recientes con ratones usando el anticuerpo anti-AO, se detectó AO en el pulmón, hígado, corazón, riñón y en los intestinos delgado y grueso luego de transcurridos tan solo cinco minutos de la administración oral. También se detectó AO en los vasos sanguíneos y en el hígado durante las dos semanas posteriores a la administración de la dosis y en los intestinos durante las cuatro semanas siguientes (EU/SANCO, 2001).

Matias y Creppy (1996a) realizaron otro estudio con ratones suizos macho y hembra adultos a los que administraron una única inyección intramuscular de 25 µg AO[³H]/kg de pc, disueltos en 0,1 ml de una mezcla de agua estéril y metanol (50:50 [v/v]). Los autores detectaron AO en la bilis y en los contenidos intestinales una hora después de la inyección. El patrón de eliminación reveló la excreción biliar y la circulación enterohepática. También observaron que la administración de colestiramina, que impide la circulación enterohepática, causa cambios en el perfil de la eliminación cíclica del AO.

observaciones en seres humanos

No hay información.

3.5.3 Toxicidad en animales de laboratorio

toxicidad aguda

estudios con extracto de mejillón

La toxicidad de las DSP se mide generalmente en ratones con una inyección intraperitoneal de extracto de mejillón contaminado. Si bien es una comparación burda, es la base de los métodos de control de calidad y de análisis más utilizados.

Según Yasumoto *et al.* (1978), la letalidad de las toxinas DSP es 16 veces más alta por vía oral que por vía intraperitoneal, aunque los síntomas son los mismos.

Hamano *et al.* (1986) estudiaron la enteropatogenicidad de las DSP en modelos intestinales. Administraron a grupos de tres y cinco ratones (de 4 o 5 días de edad), por cebado, una única vez, 0,1 ml de extracto crudo de vieiras contaminadas con 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 o 0,8 UR de toxinas DSP y una gota de solución de Azul Evans al 1 por ciento por ml. Los ratones se observaron durante 4 horas a 25 °C y se sacrificaron. Retiraron el intestino íntegro y determinaron la acumulación de fluidos como la relación entre el peso del intestino y el peso del resto del cuerpo (relación AF). Las relaciones AF en el control y en los grupos 0,05; 0,1; 0,2; y 0,4 UR eran respectivamente 0,072; 0,073; 0,09; 0,108 y 0,112. Los autores observaron mortalidad con 0,8 UR. En cuanto a la diarreogenidad (expresada como la relación AF) de los componentes de la mezcla cruda (OA, DTX1, DTX3, PTX1) en ratones de cuatro o cinco días de edad observaron que el AO y la DTX1 tienen la misma potencia, se observó

diarrea con dosis $\geq 0,1$ UR; la DTX3 produce diarrea con dosis $\geq 0,05$ UR y no se observó diarreogenicidad (entre 0,025 y 0,4 UR), con las dosis de PTX1 utilizadas en el estudio.

estudios en ratones con administración oral de AO

En un estudio con ratones adultos con administración oral de 75 μg AO/kg de pc, se observó que en una hora el peso del intestino delgado apenas aumenta (por acumulación de fluidos), mientras que el del hígado disminuye ligeramente. Se dedujo que en ratones, el nivel mínimo con efecto adverso observable de una dosis aguda administrada por vía oral es de 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pc (EU/SANCO, 2001).

Luego de transcurrida una hora de la administración oral de AO a ratones, se observaron varias lesiones graves en las mucosas intestinales. El proceso por el que ocurren estas lesiones tiene tres etapas consecutivas (Matias *et al.*, 1999a):

- extravasación del suero a la lámina propia de las microvellosidades;
- degeneración del epitelio de absorción de las microvellosidades ilíacas;
- descamación del epitelio degenerado de la lamina propia.

El intestino delgado de la rata es el órgano más sensible y de mayor reproducibilidad para estudiar los efectos diarreicos de las toxinas marinas. A los 15 minutos de una inyección de AO en las asas ligadas del duodeno medio de ratas macho (de 200 g) se observaron los cambios siguientes: los enterocitos de la parte superior de las microvellosidades se hincharon y se desprendieron de la membrana basal. Con las dosis utilizadas (entre 1 y 5 μg de AO) no se observaron cambios en las células calciformes. Luego de transcurridos entre 60 y 90 minutos, la mayoría de los enterocitos de las microvellosidades se habían vertido al lumen y grandes partes de las microvellosidades aplanadas estaban cubiertas de células calciformes. El daño depende de la dosis: 3 μg de AO solo afectan la parte superior de las microvellosidades, mientras que con 5 μg se desintegra la estructura de las microvellosidades. Los cambios observados con una inyección intravenosa fueron similares pero menos extensos (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

estudios en ratones con administración oral de toxinas DTX

Ogino *et al.* (1997) estudiaron los efectos de la administración oral a ratones. Dosis orales de 100, 200, 300 o de 400 μg DTX1 causaron la muerte de 1/5, 0/5, 2/4 y 3/4 de los animales, respectivamente.

estudios en ratones con administración oral de toxinas PTX

Ogino *et al.* (1997) observaron que la administración de dosis orales de 25, 100, 200, 300 o de 400 μg PTX2 a ratones causó la muerte de 1/4, 0/4, 1/5, 2/5 y 1/4 de los animales, respectivamente. El estudio no demostró una relación de respuesta a la dosis, pero permitió determinar que la toxicidad oral de la PTX2 es comparable a la intraperitoneal (en ratones, la dosis intraperitoneal letal de PTX2 es 260 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pc).

En ratones, dosis orales de 1,0; 2,0 y 2,5 mg de PTX2/kg de pc causaron diarrea en 1/5, 2/5 y 2/5 de los animales, respectivamente. No se observó diarrea con una dosis de 0,25 mg/kg de pc, pero el intestino delgado se hinchó y se llenó de fluidos (EU/SANCO 2001). Las dosis orales entre 0,25 y 2,0 mg de PTX2/kg de pc ocasionaron cambios histopatológicos en el hígado, en el estómago y en todo el intestino. En ratones, una dosis oral de 0,25 mg de PTX2/kg de pc se considera el Nivel mínimo con efecto adverso observable (EU/SANCO, 2001).

estudios en ratones con administración oral de toxinas YTX

Ogino *et al.* (1997) no observaron letalidad en ratones con una dosis oral máxima de 1,0 mg de yesotoxina (YTX)/kg de pc. Yasumoto y Satake (1998) observaron los ratones durante tres días y registraron un aumento de peso con la administración de esta misma dosis. Aune *et al.* (2002) no registraron mortalidad en ratones hembra (sin ayuno) con dosis orales de hasta 10,0 mg de YTX/kg de pc. La observación con el microscopio óptico mostró que dosis entre 10 y 7,5 mg/kg de pc, solo

causaron cambios moderados en el corazón (edema intercelular leve). Las dosis de 5; 2,5 y 1 mg/kg de pc no causaron cambios. Por ultramicroscópica se observó hinchazón de las células del músculo cardíaco resultante en la separación de los organelos y que los efectos son más pronunciados en las proximidades de los capilares. Los efectos son proporcionales a la dosis y con 2,5 mg/kg de pc, la dosis más baja examinada por ultramicroscópica, son muy leves.

Ogino *et al.* (1997) estudiaron los resultados de una dosis oral de 0,1; 0,2 y 0,4 µg de YTX/ ratón, en suspensión al uno por ciento en solución de Tween 60, por cebado a ratones de la cepa ddY de cuatro días de edad. Luego de transcurridas cuatro horas no observaron acumulación de fluido intestinal, acumulación si observada con todas las dosis de AO o de DTX1.

estudios intraperitoneales

La inyección intraperitoneal de toxinas DSP en ratones causa inactivación y debilidad generalizada entre 30 minutos y pasadas varias horas de la administración. Concentraciones suficientemente altas causan la muerte de los ratones entre una hora y media y 47 horas luego de administradas. Considerando los efectos de la administración oral, es interesante comparar la toxicidad intraperitoneal de las distintas DSP (ver el Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1 Toxicidad aguda (dosis letal) de la administración intraperitoneal de las DSP en ratones

Toxina	toxicidad (µg/kg de pc)	efectos patológicos
Ácido ocaído (AO)	200	diarrea
Dinofisistoxina 1 (DTX1)	160-200 ^{##}	diarrea
Dinofisistoxina 3 (DTX3)	500	diarrea
Pectenotoxina 1 (PTX1)	250	hepatotóxica
Pectenotoxina 2 (PTX2)	230-260 ^{##}	hepatotóxica*
Pectenotoxina 3 (PTX3)	350	hepatotóxica*
Pectenotoxina 4 (PTX4)	770	hepatotóxica*
Pectenotoxina 6 (PTX6)	500	hepatotóxica*
Yesotoxina (YTX)	100 ^{**} 100-214 ^{***} 286 ^{***} (DL ₅₀)	cardiotóxica [#]
45-OH yesotoxina (OH-YTX)	100	hepatotóxica [@]

Fuente: Van Egmond *et al.*, 1993 y Ritchie, 1993 (salvo si se indica otra fuente).

* inferida de la toxicidad de la PTX1

** ratones macho de pocos días de edad en ayunas, con 80 µg/kg de pc muere 1/3 de los ratones, con 100 µg/kg de pc mueren los 3 ratones (Ogino *et al.*, 1997)

*** ratones macho en ayunas (Aune *et al.*, 2002)

la información obtenida indica daños en el corazón

Ogino *et al.* (1997)

@ la información obtenida indica daños en el hígado

Van Egmond *et al.* (1993) observaron diarrea ininterrumpida en ratones con una inyección intraperitoneal de 160 µg de DTX1/kg de pc y muerte en 24 horas.

En ratones de pocos días de edad (entre 7 y 10 g), la inyección intraperitoneal entre 50 y 500 µg de DTX1/kg de pc causa distensión del duodeno y de la porción superior del intestino delgado, observándose fluidos mucoides pero sin sangre. Con concentraciones más altas se observó congestión grave de los vasos submucosos y de las microvellosidades. Salvo en los intestinos, no se observaron cambios discernibles en órganos y tejidos. Al igual que con una administración oral, los cambios en la

ultraestructura de las microvellosidades intestinales ocurren en tres etapas secuenciales (ver el subtítulo estudios en ratones con administración oral de AO) (Van Apeldoorn *et al.*, 1998. Según Van Apeldoorn *et al.* (1998), la dilatación marcada o la destrucción del aparato de Golgi sugiere que la DTX1 ataca directamente el organelo.

El AO y la DTX1 inducen daños en el hígado de ratas y ratones tanto con administración oral como intraperitoneal. Los cambios en el hígado se expresan como una degeneración de las células de revestimiento endotelial en el sinusoides. Además, se observó la disociación de los ribosomas del retículo endoplasmático grueso; vacuolas autofágicas en los hepatocitos en la zona media de los lóbulos hepáticos y hemorragia en la región subcapsular del hígado. También se determinó que tanto la administración oral como la intraperitoneal de AO, DTX1 y DTX3 inducen daños en el epitelio del intestino delgado (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

El mismo estudio demostró que la administración intraperitoneal de PTX1 a ratones de pocos días de edad no causó cambios patológicos en los intestinos grueso y delgado, pero sí congestión marcada del hígado y superficies con granulación fina. Entre los 30 y 60 minutos siguientes a la administración de 1 000 µg/kg de pc intraperitoneal, se observaron múltiples vacuolas en la región periportal de los lóbulos hepáticos. Se observó un efecto similar en ratones, en las dos horas siguientes a la administración intraperitoneal de 500 o 700 µg/kg de pc. El microscopio electrónico confirmó lo observado con el microscopio óptico: varias porciones de las microvellosidades de los hepatocitos se aplanaron y se observó la invaginación de la membrana plasmática hacia el citoplasma. Luego de 30 minutos, las vacuolas aumentan de tamaño y la mayoría de los organelos se comprimen. Luego de 24 horas, casi todos los hepatocitos presentan gran cantidad de vacuolas y gránulos y se vuelven necróticos. En ratones, luego de transcurrida una hora de la administración intraperitoneal de dosis entre 150 y 200 µg/kg de pc solo se observaron lesiones hepáticas leves (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

Por otro lado, una dosis intraperitoneal de 100 µg YTX/kg de pc causa la muerte de ratones de pocos días de edad, pero, incluso con una dosis letal, no hay acumulación de fluidos intestinales. En ratones macho de cinco semanas de edad (entre 23 y 25 g de pc) se observó un comportamiento normal durante cinco horas luego de la administración intraperitoneal de dosis superiores a 300 µg YTX/kg de pc, pero padecieron disnea y murieron repentinamente. No se observaron cambios discernibles en el hígado, páncreas, pulmones, glándulas suprarrenales, riñones, bazo, ni timo. En ratones, una dosis intraperitoneal de 500 µg YTX/kg de pc provocó lesiones graves en el corazón, con hinchazón y degeneración de las células de revestimiento endotelial en los capilares del ventrículo izquierdo. No se observaron cambios en ratones con dosis orales de 500 µg YTX/kg de pc (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

Aune *et al.* (2002) estudiaron los efectos de dosis intraperitoneales entre 0,1 y 1,0 mg YTX/kg de pc en Tween 60 al 1 por ciento, en grupos de tres ratones blancos hembra. Con dosis de 1,0 mg/kg de pc, los tres ratones murieron y con 0,75 mg/kg de pc, dos de los tres ratones murieron. El microscopio óptico reveló que ambas dosis causaron efectos en el miocardio (edema intercelular leve) y por ultramicroscopía observaron que 1,0 mg/kg de pc provocó hinchazón de las células del músculo del miocardio y separación de los organelos, más pronunciada en las proximidades de los capilares (los efectos de las otras dosis no se estudiaron con ultramicroscopía). Los efectos letales que se observaron con dosis de 0,75 mg/kg de pc y superiores indican que la toxicidad intraperitoneal aguda es menor que la mencionada en el Cuadro 3.1. Una posible explicación es que en este estudio se utilizaron ratones hembra sin ayuno, mientras que en los otros se utilizaron ratones de una cepa diferente, machos y con ayuno.

En otro estudio, los ratones macho con una dosis de 300 µg de YTX desulfatada (preparada químicamente)/kg de pc sobrevivieron 48 horas. La YTX desulfatada solo causó deposición leve de gotitas de grasa en el músculo del corazón. Por otra parte, se observaron efectos en el hígado y páncreas. Dentro de las 12 horas de la administración, el hígado se vuelve pálido y se dilata. En todos los hepatocitos, en los lóbulos, se encontraron pequeñas gotitas de grasa. Casi todas las mitocondrias estaban ligeramente hinchadas y con menor densidad de electrones. Se observó degeneración de las

células pancreáticas acinosas. A las seis horas se observó un marcado desarreglo de la configuración del retículo endoplasmático grueso. En ratones, una dosis oral de 500 µg de YTX desulfatada/kg de pc provoca una degeneración grasa del hígado (Van Apeldoorn *et al.*, 1998).

administraciones repetidas

No hay información.

teratogenicidad/reproducción

Matias y Creppy (1996b) administraron una dosis oral de 50 µg de AO radiomarcado con [³H]/kg de pc (disuelto en agua y metanol 50:50), a ratones hembra en el día 11 de la gestación. Midiéron el compuesto radiomarcado 24 horas luego de la administración y probaron que el AO atraviesa la placenta. El tejido fetal contiene más AO que el hígado o el riñón materno: 5,60 por ciento del compuesto radiomarcado en comparación con 1,90 y 2,55 por ciento, respectivamente, determinados por contador de centelleo y CL con detector de fluorescencia luego de la derivatización con ADAM.

actividad mutagénica del ácido ocadaico

Los estudios con *Salmonella typhimurium* TA 98 o TA 100 demostraron que el AO no induce mutaciones, ni en ausencia ni en presencia de un sistema de activación metabólica. Sin embargo, se determinó que es un mutágeno potente en células de pulmón del hamster chino sin activación metabólica (la actividad mutagénica es comparable a la de 2-amino-N⁶-hidroxiadenina, uno de los más potentes mutágenos conocidos). La resistencia a la toxina diftérica (DT^r) se utilizó como marcador de la mutagénesis. Los resultados obtenidos indican que el AO aumentó el número de células DT^r induciendo una mutación del fenotipo de la DT^r y no por selección de células DT^r inducida espontáneamente. Los autores del estudio sugieren que la inducción de la mutación de la DT^r no se debe a la formación de un aducto del ADN-AO, sino que opera probablemente modificando el estado de fosforilación de las proteínas que participan en la reparación o replicación del ADN (Aune y Yndestad, 1993).

La formación de un aducto del ADN-AO se estudió utilizando el método de postmarcado con ³²P en dos líneas celulares (fibroblastos BHK21 C13 y queratinocitos HESV) tratados con AO durante 24 horas (con dosis entre 0,01 y 5 nM). Los autores del estudio determinaron que con dosis bajas no hay formación de aducto. Con dosis intermedias encontraron la mayor cantidad de aductos y con las dosis elevadas observaron que el número de aductos disminuyó en función de la dosis. En células BHK21 C13 se observaron 19 aductos y 15 en células HESV. Diez aductos son similares en las dos cepas, nueve específicos de la línea BHK21 C13 y cinco de la HESV (Fessard *et al.*, 1996).

actividad promotora de tumores del ácido ocadaico y de la dinofisistoxina 1

Los experimentos en dos etapas realizados con piel de ratón probaron que tanto el AO como la DTX promueven los tumores. A diferencia de los ésteres de forbol, estas dos sustancias no activan la proteína quinasa C, sino que inhiben la actividad de la fosfatasa proteica 1 y 2A, causando una rápida acumulación de proteínas fosforiladas. Los efectos del AO en la fosforilación de proteínas en los sistemas celulares resaltan el potente efecto supresor de tumores de las PP1 y PP2 en células normales. La diferencia entre los promotores ésteres de forbol y el AO y la DTX radica en que no se unen a los mismos receptores. Tanto el AO como la DTX1 se unen a fracciones específicas de la piel de ratón. Los sitios de unión del AO también se encuentran en el estómago, en el intestino delgado y en el colon, así como en otros tejidos (Fujiki *et al.*, 1988). Fujiki *et al.* (1989) determinaron que el AO, la DTX1 y la PTX2 inducen la ornitina decarboxilasa (ODC) en la piel de ratón. Además, Suganuma *et al.* (1992) determinaron que en el estómago de la rata, el AO induce la ODC y realza los cambios neoplásicos (adenocarcinomas e hiperplasia adenomatosa) en la región glandular del estómago de la rata luego de la iniciación con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

Por otra parte, el AO promueve la transformación morfológica de células BALB/3T3 iniciadas con (3-metil-colantreno) carcinogénicas. Además, Sheu *et al.* (1995) demostraron que el AO induce la transformación morfológica de células BALB/3T3, incluso en ausencia de un iniciador.

El ácido ocadaico induce los aductos del ADN en células de Riñón de Hamster Bebé (BHK, por sus siglas en inglés), en queratinocitos (HESV) Humanos, en células del epitelio bronquial humano y en embriones de peces cebra. También se observó que en concentraciones bajas e intermedias (no citotóxicas) la formación de aductos del ADN aumenta en función de la dosis, mientras que las concentraciones altas causan estrés tóxico (Huynh *et al.*, 1998).

inmunotoxicidad del ácido ocadaico

EL efecto del AO en monocitos de sangre periférica humana se estudió *in vitro*, mediante el efecto en la síntesis de la interleuquina-1 (IL-1). Las concentraciones entre 0,1 y 1,0 µg de AO/ml indujeron una reducción notoria de la producción de IL-1 en los monocitos. Las concentraciones de AO más elevadas ocasionaron la muerte de las células. El efecto supresor del AO en la IL-1 se revierte fácilmente con un anti-AO monoclonal específico, pero se desconoce el modo de acción de este efecto del AO (Aune y Yndestad, 1993).

toxicidad in vitro

La toxicidad del AO de las DTX1, PTX1 e YTX se estudió en hepatocitos de rata frescos con microscopía óptica y electrónica (Van Apeldoorn, *et al.*, 1998). El AO es el más tóxico. Con 1 µg/ml se observaron burbujas de aire en la superficie de la célula y el aumento de la concentración ocasionó un aumento en el número y tamaño de las burbujas. También se observó que con concentraciones elevadas las células perdieron su aspecto circular, volviéndose irregulares. Con 2,5 µg DTX1/ml se observaron efectos similares a los del AO, aunque en menor grado. Por otra parte, los resultados de la PTX1 fueron bien distintos: del punto de vista morfológico se observaron pequeños surcos en la superficie de la célula y aparición de vacuolas en el citoplasma en función de la dosis, a partir de 7,5 µg/ml. Con el microscopio electrónico se observó invaginación de la membrana celular y la aparición de vacuolas. Según el estudio, la YTX es bastante menos tóxica ya que con concentraciones entre 25 y 50 µg/ml se observaron burbujas de aire muy pequeñas en la superficie celular y ningún cambio en el aspecto esférico. Ninguna de las toxinas DSP purificadas que se examinaron en el estudio causó la pérdida de enzimas (lactato deshidrogenasa) de la célula.

Matias *et al.* (1996) constataron que según la concentración (CI_{50} $3,3 \times 10^{-8}$ y $5,3 \times 10^{-8}$ M, respectivamente) el AO inhibe la síntesis de ADN y de proteínas en células Vero (de riñón de mono). La síntesis del ARN se inhibe con una CI_{50} de $8,2 \times 10^{-8}$ M. El tiempo transcurrido hasta la inhibición de la síntesis de ADN y ARN fue más prolongado (ocho horas) que el tiempo hasta la inhibición de la síntesis de proteínas (de cuatro horas). Esto indica que probablemente la síntesis de proteínas constituye el objetivo primordial y el primer efecto citotóxico del AO.

Matias *et al.* (1999b) estudiaron el efecto del AO en la producción de radicales que reaccionan con oxígeno como posibles inductores del deterioro de la síntesis proteica, con y sin predadores de los radicales de oxígeno (SOD+catalasa, vitamina E y/o vitamina C). Los autores observaron que la peroxidación de los lípidos parece ser un marcador precoz de la exposición al AO. Los predadores de radicales impidieron (parcialmente) la peroxidación de los lípidos, pero la inhibición de la síntesis proteica inducida por el AO no se redujo al mismo grado. Esto apunta a la posible existencia de un mecanismo más específico responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas.

En el lisado de reticulocitos de conejo sin células, el ARNm específico se convierte en globina, utilizado para garantizar que la síntesis proteica constituya un objetivo directo del ácido ocadaico. Efectivamente, el AO inhibe la síntesis de proteínas del sistema según la concentración (Matias *et al.*, 1996).

Matias y Creppy (1998) estudiaron el efecto del AO en los cinco nucleósidos (deoxicitosina, 5-metildeoxicitosina, desoxitimidina, deoxiguanidina y deoxiadenina) en el ADN de células Vero. Los autores observaron que con 7,5 ng de AO/ml, la síntesis del ADN no se inhibe significativamente, pero se induce la hipermetilación del ADN. La cantidad de 5-metildeoxicitosina aumentó de 3,8 a 7,9 por ciento, indicando una posible interferencia en la expresión, replica y regulación del ADN.

También se observó que concentraciones más altas de AO inhiben la síntesis de ADN, pero no provocan un aumento de la tasa de metilación del ADN. El AO participa en la producción de tumores, por lo que los efectos más amenazadores son aquellos que están posiblemente conectados a la modificación del ADN y/o regulación de la expresión génica, como por ejemplo la tasa de metilación. En otras palabras, se cree que los riesgos para el ser humano y para los animales están más asociados a la exposición repetida a concentraciones bajas de AO en mariscos, que afectan el ADN de un individuo repetidamente en el transcurso de su vida.

Zhou *et al.* (1994) estudiaron por microscopía fluorescente los efectos de la exposición a PTX1 de cultivos primarios de células del hígado de embriones de pollo de 11 días. La PTX1 reduce el tamaño de las células y el número de microtúbulos, los que pierden su disposición radial. Los haces de filamentos de actina, conocidos como fibras de estrés, desaparecen y la actina se acumula en la periferia celular. Los efectos causados por una exposición inferior a cuatro horas a concentraciones $\leq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ son reversibles dentro de las 24 horas.

Tripuraneni *et al.* (1997) estudiaron los efectos del AO en cultivos monocapa de células T₈₄ del epitelio intestinal humano, midiendo los parámetros electrofisiológicos, la liberación de lactato deshidrogenasa y las tasas de flujo de manitol [³H] y ²²Na⁺. También estudiaron la fosforilación de las proteínas para identificar cuáles son las proteínas participantes. Los autores observaron que el AO no estimula directamente la secreción de Cl⁻, pero aumenta la permeabilidad paracelular de los epitelios intestinales. Se cree que esta alteración contribuye a la diarrea en la intoxicación con DSP.

De la Rosa *et al.* (2001) concluyeron que la YTX afecta las cantidades cistólicas de Ca²⁺ en linfocitos humanos recién aislados. Los autores observaron que en los linfocitos humanos, la YTX modula el Ca²⁺ intracelular, produciendo una ligera entrada de calcio no capacitativa e inhibiendo la entrada de Ca²⁺ mediante el vaciado del calcio interno. El AO no produce estos efectos. Los autores sugieren la existencia de una interacción entre la YTX y los canales de calcio de la membrana plasmática.

3.5.4 Toxicidad en seres humanos

Los mariscos que contienen más de 2 μg de AO/g de hepatopáncreas o más de 1,8 μg de DTX1/g de hepatopáncreas no se consideran aptos para el consumo humano (Hallegraeff, 1995). Los síntomas principales en el ser humano incluyen diarrea, náuseas, vómitos y dolores abdominales. Los síntomas, que nunca son letales, comienzan a aparecer entre 30 minutos y un par de horas luego de la ingestión de los mariscos contaminados, y se observa una recuperación completa en un lapso de tres días. La intensidad de los síntomas varía según la cantidad de toxinas ingerida y generalmente no es necesario hospitalizar al paciente. El AO, la DTX1 y la DTX3 son las toxinas más importantes del grupo DSP del punto de vista de la diarrea en el ser humano (Aune y Yndestad, 1993). Por otra parte, Carmody *et al.* (1996) mencionan que en un episodio de DSP prolongado, en Irlanda, se constató que la DTX2 fue la toxina DSP diarreica predominante. La información epidemiológica de Japón (1976 – 1977) muestra que tan solo 12 UR alcanzan para inducir síntomas de intoxicación leve en el ser humano (EU/SANCO, 2001). Una UR es la cantidad de toxina (más adelante definida como DTX1 en el estudio japonés) inyectada intraperitonealmente, que causa la muerte de un ratón en 24 horas. Doce UR equivalen a 43,2 μg , el nivel mínimo con efecto adverso observable para la DTX1 (EU/SANCO, 2001). Según Yasumoto *et al.* (1998), sin embargo, la dosis mínima de DTX1 que induce síntomas tóxicos en adultos es de 32 μg . Según Fernandez y Cembella (1995), una UR corresponde a aproximadamente 3,2 μg de DTX1 y a 4 μg de AO. Es decir, la dosis mínima que produce efectos tóxicos en el ser humano es 38,4 y 48 μg de DTX1 y de AO, respectivamente. Aún no hay estudios sobre los efectos mutagénicos e inmunosupresores del AO y de la DTX1 constatados en animales y en sistemas experimentales.

La situación no es satisfactoria para el caso de las toxinas PTX e YTX, los otros dos grupos químicos del complejo DSP. El potencial diarreico de las PTX es bajo y las YTX no inducen diarrea en roedores, pero la inyección intraperitoneal de cualquiera de ellas es letal para ratones. En roedores son tóxicas para el hígado y el corazón, respectivamente. No está claro si las PTX e YTX constituyen una

amenaza para la salud de los consumidores de mejillones contaminados (Aune y Yndestad, 1993). Se cree que en un evento de DSP con cholgas (con 56 casos de hospitalización) en Nueva Gales del Sur, Australia, ocurrido en diciembre de 1997 (ANZFA, 2001); los ácidos PTX-2 secoicos contribuyeron a los síntomas gastrointestinales, vómitos o diarrea observados en seres humanos (Quilliam *et al.*, 2000 en Aune, 2001). Según Burgess y Shaw (2001), los pacientes consumieron aproximadamente 500 g de cholgas con 300 µg de PTX-2SA/kg (~150 µg de PTX-2SA/persona~2,5 µg/kg de pc para una persona de 60 kg).

En Noruega durante un episodio de DSP en 1984, algunas personas fueron hospitalizadas con los síntomas habituales de DSP, además de calambres y agotamiento grave. Estos pacientes se recuperaron en unos días, luego de una inyección intravenosa de una mezcla de electrolitos (Aune y Yndestad, 1993). Recientemente, durante la inauguración de un criadero de mejillones en Noruega, 70 personas ingirieron mejillones comunes. El 54 por ciento de los invitados se intoxicaron y presentaron los síntomas típicos de DSP. La concentración en los mejillones restantes fue entre 55 y 56 µg eq de OA/100 g de carne de mejillón (Aune, 2001).

3.5.5 Toxicidad en organismos acuáticos

Windust *et al.* (1996) determinaron que concentraciones micromolares de AO inhiben el crecimiento de varias microalgas no productoras de DSP. La DTX1 afecta el crecimiento de las microalgas de forma equivalente al AO. Los efectos de una mezcla de ambos son una simple suma. Sin embargo, no afectan el crecimiento de *P. Lima*, un dinoflagelado productor de toxinas DSP.

Las concentraciones mayores o iguales a 3 µM de AO y del éster AO-diol inhiben casi completamente el crecimiento de la diatomea *Thalassiosira weissflogii*, (CE₅₀ 2,2 y 1,0 µM para AO-diol y AO, respectivamente). Este resultado contradice la creencia que solo las toxinas ácidas libres, como por ejemplo el AO y la DTX1, son inhibidores potentes de la fosfatasa. En cuanto a la DTX4, solo afecta el crecimiento en concentraciones bastante más altas. El éster AO-diol se hidroliza parcialmente a AO (7 por ciento hidrolizado, 20 por ciento de éster AO-diol incambiado y 73 por ciento sin identificar). Este fenómeno sugiere que las células expuestas a los ésteres de toxinas DSP inactivos, pueden activarlos metabólicamente. En otro experimento se observó que tanto la DTX4 como el éster AO-diol se hidrolizan (2,0 y 2,7 por ciento, respectivamente, en un plazo de cinco días) a AO de forma espontánea y no por intermedio de la presencia de *T. weissflogii*.

Windust *et al.* (1997) observaron que la DTX4 inactiva se hidroliza, por intermediarios lipófilos sin carga, a AO, es decir la toxina ácida libre activa.

Ogino *et al.* (1997) estudiaron la ictiotoxicidad de la yesotoxina (YTX) y de la YTX bisdesulfatada (dsYTX) en *Oryzias latipes*. La YTX se diluyó en 0,1 ml de metanol y la solución obtenida se diluyó con agua hasta 50 ml para preparar 1,0 o 0,5 mg/l de una solución de prueba. Se colocó un ejemplar de *Oryzias latipes* en un vaso de precipitación con solución de prueba y se observó durante 24 horas. El ensayo se realizó por triplicado. La dsYTX se analizó de forma similar con solo 0,5 mg/l. En 24 horas no murió ninguno de los peces expuestos a 1 y a 0,5 mg/l de YTX, mientras que tres de los peces expuestos a 0,5 mg/l de dsYTX lo hicieron en seis horas.

3.6 Prevención de la intoxicación por DSP

3.6.1 Depuración

La velocidad de eliminación de las toxinas DSP varía con la estación. Se observó que la baja temperatura del agua retarda la eliminación de toxinas, aunque se desconoce en qué medida este factor afecta su absorción o eliminación. La tasa de eliminación está estrechamente relacionada al lugar donde se acumulan las toxinas, es decir que la eliminación de las toxinas del tracto gastrointestinal (por ejemplo en *Mitylus*) es más rápida que la de las alojadas en los tejidos. Los datos obtenidos de moluscos bivalvos de cultivo revelan que en *Mitylus edulis*, el tiempo de retención de las toxinas varía

entre una semana y seis meses. Otros estudios con mejillones de cultivo en estanques de acuicultura y con mejillones en el laboratorio, mostraron que la reducción de contenidos elevados de toxinas DSP (3 UR) a concentraciones aceptables es más rápida en los primeros que en los segundos. Se cree que la calidad del alimento disponible para los mejillones durante la eliminación afecta la velocidad de eliminación de toxinas (Hallegraeff *et al.*, 1995).

Probablemente la tasa de depuración (de eliminación de las toxinas DSP del marisco) varía según la especie y es afectada por factores interrelacionados, como la alimentación o bombeo del marisco, la temperatura, salinidad y la concentración de partículas y de algas no tóxicas. En Japón se observó una disminución en una semana de las toxinas DSP de 4,4 a 2,5 UR/g (por bioensayo en ratón), y luego a 0,5 UR/g la semana siguiente. En los Países Bajos, luego de cuatro semanas con temperaturas del agua entre 14 y 15 °C, no se detectó toxicidad en mejillones por bioensayo en ratas (Hungerford y Wekell, 1992). Los mejillones de la costa de Suecia (con temperaturas del agua entre 1,4 y 3 °C) se analizaron por CL con detector de fluorescencia. Se observó que luego de una floración, las concentraciones de AO disminuyen en una semana de 7,2 a 1,8 µg/g hepatopáncreas (Edebo *et al.*, 1988b). Salvo el método utilizado para reducir las concentraciones de PSP en berberechos del Mediterráneo, no existen métodos útiles para reducir eficazmente las concentraciones de ficotoxinas en mariscos contaminados. Hasta la fecha, los métodos probados (en general para reducir el contenido de toxinas PSP, como por ejemplo transferir los mariscos a aguas sin organismos tóxicos para autodepurarse, desplazar verticalmente los mejillones en la columna de agua para reducir al mínimo la acumulación de toxinas, tratar el agua con ozono, estrés de sal o temperatura, tratamientos de choque eléctrico, disminución del pH o cloración, cocción) no parecen seguros. Algunos son demasiado lentos, otros no son viables económicamente o resultan en productos de aspecto o sabor inaceptables (Hallegraeff *et al.*, 1995). Según Scoging (1991), la toxina se desnaturaliza solamente por ebullición estricta (163 minutos a 100 °C).

Blanco *et al.* (1999) estudiaron la depuración en mejillones, *Mitylus galloprovincialis*, de Galicia, en el noroeste español, contaminados con toxinas DSP. Trasladaron los distintos grupos de mejillones a ambientes con distintas condiciones (salinidad, temperatura, transmisión de la luz y fluorescencia) y observaron la cinética de la depuración del AO en cada grupo, durante 70 días. La transmisión de la luz y la fluorescencia parecen ejercer el mayor efecto en la depuración. En la mayoría de los casos observaron una relación inversa entre la depuración y el peso corporal. Sin embargo, no pudieron determinar con certeza si la depuración de las DSP ocurre con una cinética de uno o dos compartimientos.

González *et al.* (2002) realizaron un estudio cuyos resultados preliminares indican la inestabilidad del ácido ocadaico libre en una atmósfera supercrítica de dióxido de carbono con ácido acético. El 90 por ciento de la toxina se eliminó y la actividad biológica contra la fosfatasa se vio afectada gravemente (una reducción de hasta 70 por ciento). La eliminación de las toxinas de los mariscos contaminados se obtuvo por deshidratación parcial y el rendimiento de la eliminación fue más bajo que el obtenido con la toxina libre. También determinaron una reducción entre 51 y 57 por ciento del contenido de toxina del hepatopáncreas de mejillón parcialmente liofilizado con 1 µg de AO/g tras una exposición de 190 minutos a la mezcla supercrítica.

3.6.2 Medidas preventivas

La prevención de las enfermedades transmitidas por los mariscos se efectúa controlando el ambiente marino y la carne de los mariscos. Según Wright (1995), cada día más países inspeccionan más frecuentemente el agua de mar en los alrededores de los emprendimientos acuícolas o de los criaderos de mariscos para detectar cepas de fitoplancton productoras de toxinas. Menciona además, que desde el descubrimiento que las algas productoras de toxinas se trasladan en el agua de lastre de los buques a nuevos puntos geográficos en todo el mundo, este tipo de control gana popularidad.

Los datos sobre la presencia de especies de algas tóxicas, el tipo de alga y las concentraciones se pueden utilizar para predecir qué toxinas pueden aparecer en épocas de floración y qué productos

marinos controlar analíticamente. Si bien algunas especies de algas nunca observadas en una zona en particular aparecen repentinamente y causan problemas rápidamente, muchos países cuentan con programas de control para verificar las especies de fitoplancton (tóxicas) en los lugares donde se cultivan mariscos. Algunos países solo controlan la presencia de una o dos especies de algas, mientras que otros cuentan con una larga lista de especies. En algunos países, las zonas de cultivo de mariscos se cierran cuando el número de células de una especie de algas en particular supera las concentraciones estipuladas para esa especie, mientras que otros solo cierran las zonas de recolección cuando detectan toxinas en los mariscos. En Italia, por ejemplo, las zonas de recolección se cierran cuando se observa la presencia simultánea de algas tóxicas y de toxinas en los mariscos (Hallegraeff *et al.*, 1995).

La principal estrategia para prevenir la intoxicación con DSP es impedir que los mariscos contaminados ingresen al mercado controlando sus contenidos de toxinas DSP. Sin embargo, según lo expuesto, en áreas endémicas el muestreo semanal es insuficiente para asegurar la máxima protección de la salud humana. No solo es necesario contar con un plan de muestreo confiable, sino que se necesitan medios de detección eficaces. Sin embargo, existen varios factores que dificultan el control (Aune y Yndestad, 1993):

- la variabilidad del número de células de algas productoras de toxinas resultantes en mejillones tóxicos;
- el período de toxicidad que varía según la región y el episodio;
- las algas y las toxinas en cuestión que varían según la región;
- la presencia simultánea de toxinas DSP y PSP dificulta el control;
- incluso en el mismo lugar de muestreo, la toxicidad de los mejillones contaminados puede variar en varios órdenes de magnitud según la profundidad; y
- aunque con concentraciones menores, otros productos marinos, como por ejemplo las ostras, también pueden estar contaminados.

3.7 Casos y brotes de DSP

3.7.1 Europa

La Figura 3.3 ilustra la presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM entre 1991 y 2000.

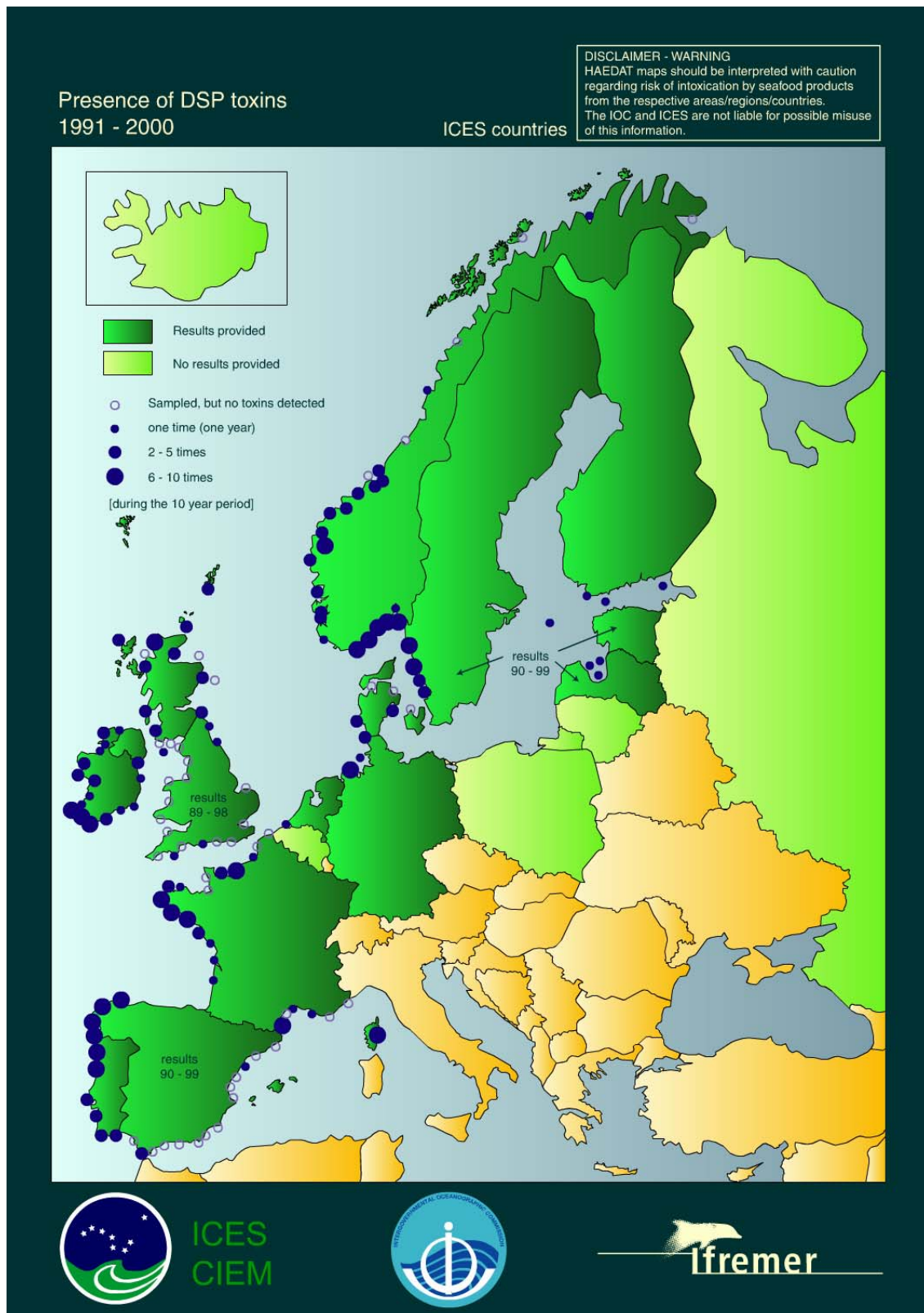
Bélgica

En 1999, una de las 350 muestras analizadas por bioensayo en ratón dio resultados positivos para DSP (EU-NRL, 2000). De Schrijver *et al.* (2002) describen 403 casos de DSP ocurridos en febrero de 2002, en Amberes, por consumo de mejillones comunes importados de Dinamarca. El bioensayo en ratones para determinar la presencia de ácido ocaidaico, toxinas dinofisis, yesotoxina, pectenotoxinas y azaspiracida dio resultados positivos. Estos resultados se confirmaron por CL acoplada a EM con resultados de 5,9 µg AZA/kg de carne (inferior al límite reglamentario), 229 µg AO libre/kg de carne y 300 µg eq de AO (diol éster o AO conjugado)/kg de carne. Por espectrometría se observó un pico importante correspondiente al ácido pectenotoxina-2-secoico (PTX2SA) que no pudo cuantificarse. El resto de los mejillones importados fueron retirados del mercado.

Croacia

En el verano de 1994 se detectó por bioensayo en ratón y CL, la presencia de AO y de DTX1 en muestras de *Mytilus galloprovincialis* provenientes de la Bahía de Kastela, en el Adriático central, aunque no se registraron problemas de salud por consumo de mariscos contaminados (Orhanovic *et al.* 1996). El bioensayo en ratones de especímenes de *M. galloprovincialis* recogidos en la Bahía de Kastela durante una floración masiva en el verano de 1995 dio resultados positivos para toxinas DSP. El análisis de las muestras por CL reveló la presencia de AO, la ausencia de DTX1 y DTX2, y sugirió la presencia de un compuesto derivado desconocido en concentraciones muy altas. La toxicidad de los mejillones se atribuyó a *D. sacculus*. (Marasović *et al.*, 1998).

Figura 3.3 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de los países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Dinamarca

En 1990 se detectaron concentraciones de 170 µg AO/100 g en mejillones de la costa norte del país. Estos mejillones se exportaron también a Francia donde se registraron 415 casos de intoxicación (Van Egmond *et al.*, 1993). En 1999 ocurrieron tres eventos tóxicos. En los dos primeros, la presencia de toxinas DSP en el mejillón común resultó en el cierre de las zonas de producción locales durante algunas semanas. El tercer evento ocurrió con mejillones provenientes del Mar del Norte. Dos empleados del personal de una empresa productora enfermaron por ingerir los mejillones antes de que se realizara el bioensayo en ratón (EU-NRL, 2000). En 2000 se detectaron concentraciones de AO inferiores al límite de 160 µg/kg de mejillón entero en muestras tomadas en la costa este de Jutlandia. En esa misma época, se detectaron densidades altas de *Dinophysis acuminata*, que restringieron la cosecha o provocaron el cierre de las áreas de producción (EU-NRL, 2001). En 2001 se detectaron concentraciones de toxinas DSP superiores al límite reglamentario en mejillones comunes destinados a la venta, provenientes de tres zonas de cultivo. En 2002, las toxinas DSP se presentaron con más frecuencia que lo habitual y varias zonas de producción permanecieron cerradas durante semanas o meses. En Limfjord, en la costa este de Jutlandia; en el fiordo Roskilde, en Isefjorden y en el Mar de Wadden, en el Mar del Norte se detectaron concentraciones de DSP superiores al límite reglamentario. En noviembre y diciembre de 2002 se registraron varios casos en Alemania por ingerir mejillones con AO provenientes del área de producción de Isefjorden, al igual que en Bélgica (ver *Bélgica*) donde también se registraron casos por ingerir mejillones importados de Dinamarca (EU-NRL, 2002).

Francia

Desde 1978 se han registrado varios casos de intoxicación por DSP en consumidores de mariscos de distintas regiones (como por ejemplo Normandía, Loira Atlántico, el sur y oeste de Bretaña y en las costas mediterráneas). En 1984 y 1985 se registraron 10 000 y 2 000 casos, respectivamente con síntomas de DSP por ingerir mejillones cultivados en el país (Durborow, 1999). En las costas atlánticas y mediterráneas las densidades máximas de algas ascienden a varios miles de células por litro, mientras que en el este del Canal de la Mancha (al norte del estuario del Sena) se han registrado densidades de hasta 100 000 células por litro. Generalmente la toxina en cuestión es el AO (Van Egmond *et al.*, 1993). Tanto en las costas del Mediterráneo como en las del Atlántico se ha observado la presencia de especies *Dinophysis* (EU-NRL, 1998) y dos y 27 áreas de producción, respectivamente, permanecieron cerradas debido a la presencia de DSP (EU-NRL, 2000). A fines de 1998 se detectaron concentraciones de *A. tamarensis* de hasta 350 000 células por litro y algunas áreas de producción de almejas, ostras y mejillones permanecieron cerradas durante dos meses. En 1999 se detectó la presencia de DSP en mariscos de Irlanda y Túnez (EU-NRL, 2000). En 2000 se cerraron varias zonas de producción de la costa del Atlántico y una en la costa del Mediterráneo debido a la presencia de toxinas DSP (EU-NRL, 2001). En 2002 se observaron varios eventos tóxicos con DSP: hacia fines de otoño se detectaron toxinas DSP en mariscos a lo largo de la costa sur de Bretaña y de la costa cercana al río Loira y algunas zonas permanecieron cerradas hasta diciembre. Fue la primera vez que se registraron tantos eventos de DSP a lo largo de las costas francesas del Atlántico (EU-NRL, 2002).

Alemania

En 1987 se detectó la presencia de AO en mejillones del Mar de Wadden. En la costa de la Bahía Alemana se detectó regularmente la presencia de *Dinophysis acuminata*. Entre 1986 y 1989, los mejillones que causaron DSP provenían generalmente de Frisia Oriental y Septentrional. En estas mismas zonas se detectaron densidades superiores a 1 000 células de *Dinophysis* por litro (con un máximo de 25 000 células por litro) en 1990. Los bancos de mejillones permanecieron cerrados y no se registraron casos de intoxicación por DSP en seres humanos (Van Egmond *et al.*, 1993). En setiembre de 1998 se detectó la presencia de AO (EU-NRL, 1998). En 1999 se detectaron toxinas DSP en dos muestras aunque con concentraciones inferiores al límite reglamentario (EU-NRL, 2000). En 2000 se registró un caso de intoxicación por DSP en dos mujeres de edad avanzada (EU-NRL, 2001). En octubre de 2001 se observó un aumento de la densidad celular de *D. acuminata* ($5,9 \times 10^3$ células por litro) en la costa de Frisia Oriental. La concentración de toxinas DSP en los mejillones aumentó y se decretó una veda para la recolección del marisco en la zona contaminada (Anonymous, 2001b).

Grecia

Diez muestras dieron resultados positivos para DSP en 1999 y se detectó una concentración de *D. acuminata* de 1 500 células por litro (EU-NRL, 2000). Desde abril hasta junio de 2000, una zona de producción permaneció cerrada debido a la presencia de toxinas DSP (EU-NRL, 2001).

Irlanda

Los primeros eventos de intoxicación con DSP ocurrieron en la década de 1980. En 1984 y desde 1987 hasta 1991 se detectó una toxicidad variable en mejillones. En 1988 se detectó la presencia de *D. acuminata* (1 500 células por litro) y de *D. acuta* (240 células por litro) en la costa sudoeste de las bahías de Dingle, Kenmare, Bantry, Dunmanus y Roaring Water, y concentraciones de hasta 200 µg AO/100 g y 25 µg DTX1/100 g de carne de mejillón. En 1990, en Glengariff, se determinó que un isómero del AO contribuyó a la toxicidad residual detectada en mejillones luego de la completa desaparición del AO y, por primera vez, se detectó toxicidad en invierno (Van Egmond *et al.*, 1993). En un episodio de DSP ocurrido en 1991 se observó la presencia de AO y de DTX2 en mejillones. En 1994, la observación de zonas de cultivo de mejillones similares reveló que las cantidades de DTX2 superaban ampliamente las de las otras toxinas (las concentraciones de AO fueron inferiores a 0,7 µg/g y la concentración máxima de DTX2 de 6,3 µg/g de hepatopáncreas). La toxicidad en los mariscos se observó poco tiempo después de obtenerse recuentos elevados de células de *Dinophysis acuta* (Carmody *et al.*, 1996). Por otro lado, en extractos de mejillones irlandeses se aisló e identificó un nuevo isómero de la DTX2, conocido como DTX2B, (James *et al.*, 1997). En mariscos recolectados en aguas irlandesas también se detectó la presencia de derivados acilo del AO y de la DTX2 (EU-NRL, 1996). La ingestión de mejillones de Killary, en Irlanda provocó la inexplicable intoxicación de seres humanos con síntomas de DSP. Como resultado de este episodio, se aisló una toxina nueva (C₄₇H₇₁NO₁₂), denominada provisoriamente KT3, que constituye una nueva clase de toxinas de mariscos tipo poliéter, conocida hoy en día como azaspirácidas (Satake *et al.*, 1997) (ver también el Capítulo 6).

El cinco por ciento de las 1 800 muestras analizadas por bioensayo en ratón en 1999 dieron resultados positivos para DSP y/o AZP (EU-NRL, 2000). En agosto de 2000 se cerraron 30 zonas de recolección de mariscos bivalvos y se observaron síntomas de DSP en humanos (Anonymous, 2000a). El 17 por ciento de las muestras analizadas por bioensayo en ratones en 2001 dio resultados positivos, en comparación con tan solo un 3,4 por ciento en 2002. La concentración más alta de toxinas DSP (AO y DTX2), en 2002 se detectó en ostras, con 30 µg/kg. El 7 por ciento de los mejillones muestreados contenían concentraciones de AO o de DTX2 superiores al límite reglamentario (EU-NRL, 2002).

Italia

Desde 1989 se observa la presencia de *Dinophysis* spp. en las costas del norte y centro del Mar Adriático y se han registrado casos de DSP. Ese mismo año comenzó un programa de control de los bancos de mariscos italianos. Las especies encontradas fueron *D. sacculus*, *D. fortii* y *Dinophysis* spp., en concentraciones máximas de 4 000 células por litro (Tubaro *et al.*, 1992). Las muestras de mejillones tóxicos y de algas del género *Dinophysis* tomadas durante floraciones en la costa de Cesenato se analizaron por CL acoplada a EM con nebulización iónica (CL acoplada a EM-ISP) para detectar la presencia de toxinas DSP. Todas las muestras de mejillones dieron resultados positivos para el AO con concentraciones entre 0,178 y 0,286 µg por g de tejido comestible, superiores al límite reglamentario de 0,16 µg por g de tejido comestible. Si bien nunca se detectó la presencia de DTX1 en fitoplancton tóxico, algunas muestras dieron resultados positivos con concentraciones iguales o inferiores a 0,076 µg por g de tejido comestible, inferiores a la que se suponía causaba efectos tóxicos en ratones (0,13 µg por g de tejido comestible). Por primera vez, el análisis por CL acoplada a EM-ISP de las células de algas permitió determinar, sin ambigüedad alguna, que *Dinophysis fortii* produce o transmite el AO a los mariscos (Draisci *et al.*, 1996b). *Dinophysis* spp., y especialmente *D. sacculus*, son especies comunes en las costas italianas. Las grandes floraciones del verano de 1988 (de 40 000 células por litro) en las lagunas salinas del noreste de Sicilia pueden constituir una restricción potencial a la expansión de la acuicultura en la zona (Van Egmond *et al.*, 1993). Según Salati y Meloni (1994), *Dinophysis* spp. y *Prorocentrum* spp. son especies comunes en los mares

italianos, tal es así que en 1989, 1990 y 1991 se registraron casos de DSP en Italia. En el Mar Adriático se ha registrado la presencia de toxinas PTX (EU-NRL, 1996). En mares italianos también se registró la presencia de especies productoras de DSP, como por ejemplo *Dinophysis* spp., *Lingulodinium polyedra* y *Protoceratium reticulatum*. En mariscos y en el fitoplancton se encontró una mezcla de AO y de pequeñas cantidades de DTX1, YTX y de PTX (EU-NRL, 1998).

Ciminiello *et al.* (1997) informan que en la glándula digestiva de los mejillones del mar Adriático, además de YTX, se identificaron dos análogos nuevos, la homoyesotoxina y la 45-hidroxi homoyesotoxina. Según Tubaro *et al.* (1998), la *Gonyaulax polyhedra* se identificó como la especie responsable de la contaminación con YTX.

En 1999 se detectó la presencia de toxinas DSP en 350 de las 900 muestras de *Mitylus galloprovincialis* provenientes del norte del Adriático. La zona de Emilia Romagna fue la más problemática y se observó que las cantidades de YTX fueron siempre superiores a las de AO (EU-NRL, 2000). En 2000, el 13 por ciento de las muestras de *M. galloprovincialis* analizadas por bioensayo en ratón dieron resultados positivos para DSP. Varias zonas de producción permanecieron cerradas: en la región de Emilia Romagna desde fines de agosto hasta fines de diciembre, en la región del Veneto desde fines de octubre hasta fines de diciembre y en Friuli Venecia Giulia a fines de diciembre. En la mayoría de los casos, las toxinas YTX ocasionaron los cierres. En 2001, el 18 por ciento de las muestras de *M. galloprovincialis* analizadas por bioensayo en ratón dieron resultados positivos para DSP. En la región de Emilia Romagna se cerraron varias zonas de producción durante enero, febrero y principios de marzo, una extensión de los cierres de 2000, y también en el período comprendido entre mediados de junio y fines de octubre. En Veneto, las áreas de producción se cerraron en julio, en Friuli Venecia Giulia desde enero hasta mediados de febrero y luego desde principios de julio hasta principios de agosto (EU-NRL, 2001). En 2002 se detectó la presencia de DSP en el norte del Adriático (en la costa de Emilia Romagna, Veneto y Friuli Venecia Giulia) y se estableció una veda para la recolección. En julio se detectó la presencia de DSP en muestras de *Pecten maximus*, de Escocia (EU-NRL, 2002).

Países Bajos

Los primeros casos de DSP en los Países Bajos datan de la década de los años 1960 (Fleming, 2003). Las DSP se observan desde 1961 en las costas del Mar de Wadden. La concentración máxima de *D. acuminata*, de 10 000 células por litro se registró en 1981 y disminuyó a tan solo 80 células por litro en 1986 y 1987 pero con los mismos efectos tóxicos. Parecería que la toxicidad en mejillones y la temperatura están estrechamente relacionadas, ya que con apenas 30 células por litro a 10 °C los mejillones mantienen una toxicidad elevada. En las costas del Mar de Wadden, las densidades máximas de *D. acuminata* se registran todos los años en agosto y setiembre, con una salinidad de 30 ‰ y cierta correlación con la velocidad del viento. Solo se observan densidades de más de 10 000 células por litro cuando la velocidad del viento es igual o menor a dos en la escala de Beaufort (Van Egmond *et al.*, 1993). En 1998 se registró la presencia de especies productoras de toxinas DSP en aguas holandesas, pero no se detectó la presencia de toxinas DSP en bivalvos (EU-NRL, 1998). En el verano de 2001 se observaron mejillones contaminados y proliferaciones de *D. acuminata* en aguas holandesas del Mar de Wadden, causadas por la estratificación de la sal y el clima cálido (Peperzak *et al.*, 2002). En Grevelingen ocurrió un evento tóxico en la primavera de 2002, con toxinas DSP determinadas por bioensayo en ratas. Durante el otoño de 2002 se detectaron toxinas DSP en mejillones del Mar de Wadden (entre 160 y 320 µg AO/kg determinadas por ensayo en ratas) (EU-NRL, 2002).

Noruega

La *D. acuminata* se observa a menudo en las costas del país. En 1979, durante un brote de DSP, la densidad en una floración de *Prorocentrum minimum* en el Fiordo de Oslo fue de 1 900 células por litro. En ese mismo fiordo, ocasionalmente, se observan floraciones de *P. lima* (Van Egmond *et al.*, 1993). Todos los años desde 1984, se detectan toxinas DSP en mejillones del sudeste y de algunas zonas de la costa oeste de Noruega. En ostras no se han detectado toxinas DSP. Regularmente se

detectan densidades altas de *Dinophysis* spp. durante períodos prolongados. En 1984 y 1985, las intoxicaciones por DSP ocurrieron en una extensa área geográfica (Underdal, 1989).

En el período comprendido entre octubre de 1984 y abril de 1985 se registraron densidades de 30 000 células por litro de *D. acuta* y *D. norvegica*, con una toxicidad de aproximadamente 7 µg eq de AO/100 g de hepatopáncreas que causaron entre 300 y 400 casos de DSP en 1984, en el sudeste de Noruega. En Skagerrak se observaron floraciones de *D. acuminata* y *D. acuta* en 1985 y 1986. En 1989 y 1990 la concentración de DSP en mejillones superó el umbral tóxico. La composición del perfil de toxinas en 1985 y 1986 no fue la misma: se detectó AO en los mejillones de Arendal y DTX1 e YTX en los de Sognefjord (Van Egmond *et al.*, 1993). También se detectaron toxinas YTX en mariscos noruegos (EU-NRL, 1996). En Sognefjord, la DTX1 es la principal toxina DSP, mientras que en el resto de la costa es el AO (EU-NRL, 1998). En 1994 se cerraron varias zonas de producción por DSP, en los años subsiguientes se observó el mismo patrón (EU-NRL, 1998).

Los resultados del análisis por bioensayo en ratón de las muestras de mejillones tomadas en cuatro sitios a lo largo de la costa noruega revelaron concentraciones de toxinas muy elevadas, con síntomas que indicaban la presencia de toxinas no diarreicas (calambres). El análisis químico determinó la ausencia de AO y DTX1 en dos sitios de muestreo y detectó la presencia de estas toxinas en otro, aunque solo se les atribuyó una parte pequeña de la toxicidad total. Los extractos de las muestras de los cuatro sitios se incubaron con una preparación fresca de hepatocitos de rata y se determinó la presencia de una o más toxinas no identificadas. La administración intraperitoneal y oral de muestras de mejillón purificadas a ratones de corta edad demostró que la toxicidad oral era entre 25 y 50 veces menor que la intraperitoneal. Los resultados preliminares indican que existe un amplio margen de seguridad entre la cantidad de mejillones que ingiere un ser humano y las grandes cantidades de extracto de mejillón necesarias para causar efectos tóxicos en el intestino y en el hígado de los ratones por exposición oral (Aune *et al.*, 1998). De las 473 muestras analizadas en 1999, 135 dieron resultados positivos para DSP. En muchos casos se observó que la toxina dominante era la YTX, causante de aproximadamente el 33 por ciento de los cierres (EU-NRL, 2000). El 45 por ciento de las 414 muestras analizadas por bioensayo en ratón en 2000 dio resultados positivos para DSP. A fines de julio, la presencia de DSP causó el cierre de varias zonas de producción en el sur de Noruega, cierres que se prolongaron hasta la Pascua de 2001. Hasta octubre de 2001, de 915 muestras analizadas por bioensayo en ratón, el 26 por ciento dio resultados positivos para DSP (EU-NRL, 2001). Las altas concentraciones de yesotoxina observadas en mejillones de cultivo indican que probablemente la *Gonyaulax grindleyi* es otra de las especies responsables del problema ocurrido en el sur de Noruega (en Lysen fjorden) en 2000 y 2001. Sin embargo, a la fecha, no se ha podido determinar a ciencia cierta si esta fue la especie responsable (Hufnagl, 2001).

Portugal

Las toxinas DSP se detectan desde 1987, aunque sin intoxicar a los seres humanos. Se han observado mariscos contaminados luego de un período de latencia corto, con densidades de *D. sacculus* y *D. acuta* de 200 células por litro. En 1988 se detectaron moluscos contaminados con toxinas DSP en la costa norte de Portugal y se determinó que la especie responsable fue la *D. acuta*. En 1988 también se detectaron toxinas DSP en la Laguna de Ría Formosa, después de una floración de *Prorocentrum lima*. En 1989, en la costa del Algarve, se observó la presencia de *D. acuminata*, *D. sacculus* y *D. caudata* (con una densidad de aproximadamente 1 600 células por litro) que causaron contaminación por DSP (Van Egmond *et al.*, 1993). Según Gago-Martínez *et al.* (1993), el AO es la principal toxina responsable de los casos de DSP en el país; aunque también se detectó la presencia de DTX2 en mariscos y fitoplancton, y de derivados acilo del AO y DTX2 en mariscos (EU-NRL, 1996).

En el sur de Portugal se registró un aumento de la frecuencia de los episodios de DSP. La especie *D. acuta* se asoció a la presencia de DTX2 y los cierres cautelares fueron por DSP (EU-NRL, 1998). En 2000, en la Laguna Aveiro se detectaron concentraciones elevadas de AO y DTX2 y también se observó la acumulación de toxinas en el cangrejo verde, un predador de mariscos. Se registraron varios casos en seres humanos (EU-NRL, 2001). En el verano de 2001 ocurrió un brote de DSP por ingerir navajas, *Solen marginatus*, con 50 µg eq de AO/100 g, recolectadas en la laguna Aveiro.

Todas las muestras de especies analizadas en la región (salvo las ostras) contenían AO y sus ésteres en concentraciones superiores al límite reglamentario (entre 57 y 170 µg/100 g). Se cree que un paciente se intoxicó con DSP por ingerir una gran cantidad de cangrejos verdes, *Carcinus maenas*, un predador de mariscos, con al menos 32 µg eq de AO/100 g (Vale y De Sampayo, 2002). En 2002, una proliferación de *D. acuminata* ocasionó cierres prolongados de zonas de recolección intermareales naturales de bivalvos bentónicos y de mejillones no cultivados, ubicadas a lo largo de toda la costa noroeste. La recolección de mejillones de roca y de berberechos por aficionados ocasionó varios eventos de intoxicación en seres humanos. En setiembre se detectó una concentración máxima de 1 860 µg AO total/100 g de carne entera en mejillones no cultivados de Pava de Varzim, asociada a una docena de casos de gastroenteritis grave. El 18 por ciento de las 738 muestras analizadas por bioensayo en ratón dio resultados positivos y por primera vez se detectó la presencia de toxinas PTX. Hasta la fecha, las concentraciones de PTX1 y PTX2 no han superado los 160 µg/kg determinadas por CL acoplada a EM y la contaminación se atribuye principalmente a la PTX2SA (EU-NRL, 2002).

España

En las rías españolas, la mayoría de los brotes de DSP se asociaron a *D. acuminata*, salvo en algunos años (1989 y 1990) en que la especie causante fue la *D. acuta*. El primer evento de DSP confirmado ocurrió en 1978. En los estuarios se ha observado ocasionalmente la presencia simultánea de *Gymnodinium catenatum* y *Dinophysis acuta*, causantes de contaminaciones mixtas con PSP y DSP. En 1981, la presencia de *D. acuminata* y *D. acuta* se asoció a eventos de DSP que causaron 5 000 casos de gastroenteritis en toda España. En 1982 y 1984 se registraron otros casos de contaminación con DSP. Se observó que el fenómeno de 1989 se prolongó hasta 1990 cuando se detectó *D. acuta* desde julio hasta diciembre, en lugar de en setiembre y en octubre, con densidades máximas entre 7 000 y 22 000 células por litro. Se cree que la *Prorocentrum lima* podría estar asociada a la contaminación con DSP observada en los mejillones cultivados en sistemas de encordado ya que esta especie produce AO, además de DTX1 y otros compuestos, como por ejemplo la palitoxina (Van Egmond *et al.*, 1993).

En 1993 ocurrió otro episodio muy grave en Galicia, que se prolongó durante un período más extenso que lo habitual. El perfil de toxinas de las muestras de mejillones fue muy complejo y reveló la presencia de toxinas PSP y DSP (el AO y la DTX2) (Gago-Martínez *et al.*, 1996). La gravedad de los episodios de DSP resultó en cierres prolongados en Galicia, que se extendieron de abril hasta diciembre de 1995. En 1996, los cierres solo ocurrieron en enero, una extensión de los de 1995. En 1997 se decretaron cierres por DSP en primavera, en verano y/o en otoño según la ubicación (EU-NRL, 1998). Fernández *et al.* (1996) informan que en fitoplancton o en los mariscos españoles, además del AO y de la DTX2 se registró la presencia de dos derivados polares del AO y de las DTX: 7-O-acilésteres que contienen un grupo acilo graso unido al grupo 7-OH y diol ésteres en los que el grupo carboxílico de las toxinas está esterificado. En 1999 y 2000, varios eventos tóxicos con DSP resultaron en la imposición de una veda para la recolección de bivalvos en ciertas zonas de producción (EU-NRL, 2000; EU-NRL, 2001). En 2002 se observaron eventos tóxicos en Galicia (*D. acuminata* y *D. acuta*) y en Andalucía (*D. acuminata*), que causaron cierres prolongados. En Cataluña se decretó un cierre de corta duración (EU-NRL, 2002).

Suecia

El cultivo experimental de mejillones data de 1971. Desde 1971 hasta 1980, la etapa experimental, la recolección de mejillones se realizaba durante de todo el año. En 1983 se observaron síntomas de DSP en los consumidores de mejillones, motivo por el cual en 1986 se puso en práctica un sistema de vigilancia para detectar la presencia de estas toxinas en mejillones. Se determinó que en mejillones suecos la toxina DSP es el AO producido por la *Dinophysis* spp. y que las concentraciones en mejillones provenientes del archipiélago exterior son superiores a las de los mejillones de aguas más protegidas. Las altas concentraciones de AO observadas en el invierno de 1989 y 1990, atribuidas a la afluencia de aguas de alta mar con plancton tóxico, provocaron la suspensión prolongada de la recolección de mejillones de cultivo. En mar abierto frente al Skagerrak se detectaron concentraciones significativas de dinoflagelados tóxicos. Las pocas veces que se detectó un aumento de las

concentraciones de AO en mejillones de los fiordos protegidos al norte de Orust coincidieron con el aumento de la afluencia de aguas de mar abierto (Haamer, 1995). En 1997 se detectó la presencia de AO y de DTX2, aunque limitada a casos de menor importancia (EU-NRL, 1998). En junio y julio de 1999 se observó un pico de toxicidad por DSP. Los cierres de las zonas de producción suecas ocurren habitualmente entre setiembre y marzo (EU-NRL, 2000).

Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

En 1997 se registró por primera vez la presencia de DSP en el Reino Unido, cuando 49 pacientes presentaron síntomas, 30 minutos luego de haber ingerido mejillones en dos restaurantes londinenses (Durborow, 1999). En 1999, los eventos de DSP parecían ser más frecuentes y de mayor duración (EU-NRL, 2000). A comienzos de 2000, aún se detectaba la presencia de toxinas DSP en mejillones de Cornwall y más tarde ese mismo año, en berberechos del sudeste de Inglaterra y del sur de Gales. Se impusieron restricciones a la recolección (EU-NRL, 2001). Desde julio de 2001 hasta agosto de 2002, la presencia de toxinas DSP ocasionó la imposición de una veda recurrente para la recolección de berberechos en el sur de Gales (Anonymous, 2002d).

En marzo de 2002 se estableció una veda para la recolección de mariscos en varias regiones de Inglaterra (Hatchett, 2002). En setiembre la presencia de toxinas DSP obligó a establecer una veda para los berberechos provenientes de un área de la costa oeste de la Isla de Man (Anonymous, 2002c). En 2000 y 2001, en Escocia se detectó la presencia de toxinas DSP, primero en la costa oeste y luego, a fines de marzo, en mejillones de las Shetland. El brote fue de corta duración, aunque las toxinas volvieron a aparecer a fines de mayo, detectándose en el hepatopáncreas de vieiras y mejillones provenientes de varias zonas de la costa oeste. Hacia mediados de junio se detectaron toxinas DSP en mejillones de varias zonas, aún presentes a mediados de octubre. Se impusieron restricciones a la cosecha en todas las zonas afectadas (EU-NRL, 2001).

En el período comprendido entre el 1 de abril de 2002 y el 31 de marzo de 2003, en Escocia se recolectaron y analizaron 5 409 muestras de moluscos de 76 zonas costeras de producción primaria y de 36 zonas secundarias en mar abierto. De las muestras recolectadas, 931 se analizaron para detectar la presencia de DSP y 66 dieron resultados positivos (Anonymous, 2003c). En 2001, en Irlanda del Norte, 25 muestras de ostras, 10 de mejillones, una de berberechos y 23 de vieiras dieron resultados positivos para DSP (EU-NRL, 2001). En consecuencia, el Organismo de Normas Alimentarias del Reino Unido decretó una veda para la recolección de vieiras en los mares de Irlanda del Norte (Anonymous, 2001a).

3.7.2 África

Sur África

En el otoño de 1991 se identificó DSP en la costa oeste y en el otoño de 1992 tanto en la costa oeste como en la costa sur de Sudáfrica. El organismo causante fue *Dinophysis acuminata* (Pitcher *et al.*, 1993).

3.7.3 América del Norte

La Figura 3.4 ilustra la presencia de toxinas DSP en América del Norte entre 1991 y 2000.

Canadá

En 1989 se aisló la DTX1 en mejillones de la Isla Príncipe Eduardo, con una concentración de 0,15 µg/100 g de glándula digestiva (Todd, 1997). En agosto de 1990, en la región este de Nueva Escocia, 13 de 17 personas presentaron síntomas de gastroenteritis, entre una y ocho horas después de ingerir mejillones de cultivo locales cocidos al vapor o por ebullición. La *Dinophysis norvegica* se encontró en la glándula digestiva de algunas de las muestras de mejillones, así como en la columna de agua de la zona de cosecha, aunque en menor cantidad. Se cree que la toxina causante fue la DTX1 (Todd *et*

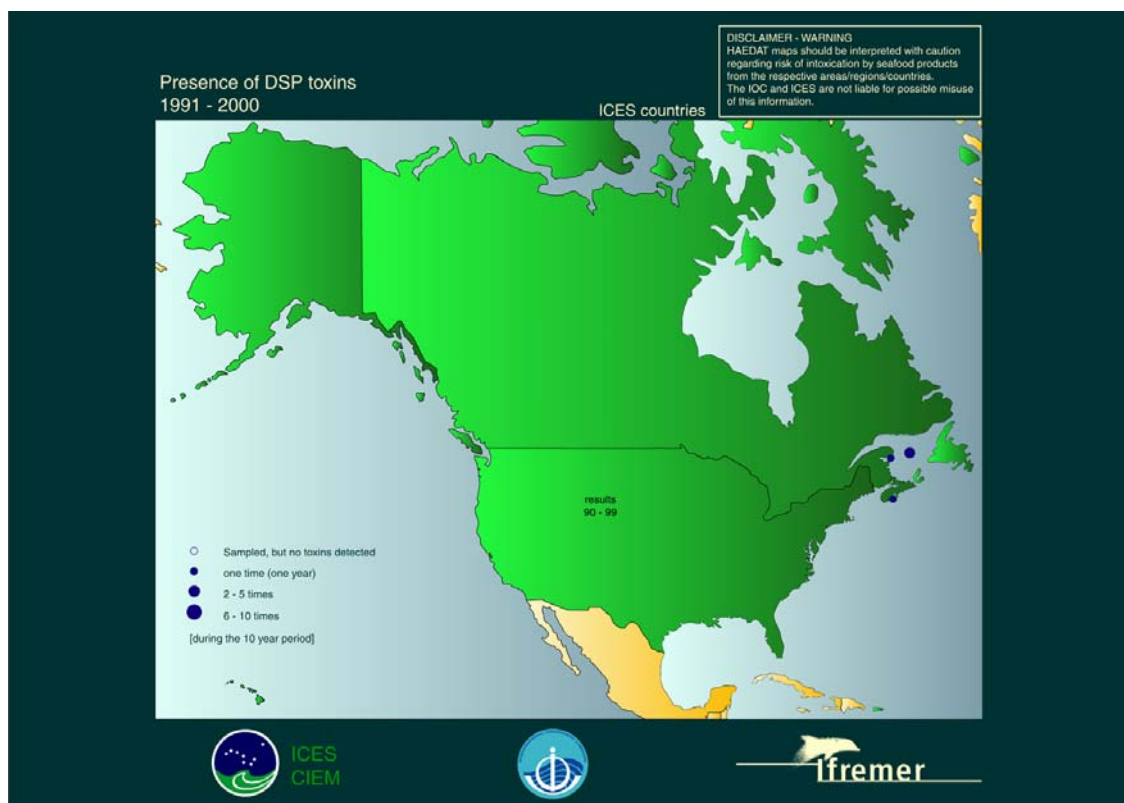
al., 1993). Sin embargo, en la misma zona tóxica se aisló otro dinoflagelado, *Prorocentrum lima*, que también se identificó como productor de toxinas DSP en un cultivo unialgal (Marr *et al.*, 1992).

Partiendo de la base que los mejillones contenían 100 µg DTX1/100 g de tejido, las víctimas ingirieron entre 1,4 y 6,0 µg DTX1/kg de pc (Todd, 1997).

En octubre de 1993 varias personas en la Bahía de Bonavista, en Terranova presentaron síntomas de intoxicación diarreica por mariscos luego de ingerir mejillones con DTX1. En las muestras de agua, la densidad de *Dinophysis norvegica* ascendió a 2 000 células por litro y en el tejido digestivo se encontraron hasta 40 000 células por mejillón (McKenzie *et al.*, 1994). En mejillones se encontraron hasta 4 µg DTX1/100 g de glándula digestiva (Todd, 1997).

Lawrence *et al.* (1998) estudiaron las poblaciones de microalgas en un área de cultivo de mejillones cercano a Indian Point, en Nueva Escocia, para determinar cuál era la fuente local de las toxinas DSP acumuladas en los mariscos. No se detectó la presencia de toxinas DSP en muestras ricas en *Dinophysis*, ni por CL acoplada a EM, ni por ensayos con anticuerpos de las toxinas DSP. Sin embargo, se encontraron células de *Prorocentrum lima*, productora de toxinas, como epifitas de *Pilayella littoralis*, una macroalga que daña las mallas de los sistemas de cultivo.

Figura 3.4 Presencia de toxinas DSP en aguas costeras de países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



Fuente: <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/dossiers/ciem/aindex.htm>

Estados Unidos de América

Hasta 1980 solo se informó de casos esporádicos de DSP en la región de Nueva York y Nueva Jersey. La incidencia aumentó a 31 casos en 1980, 210 casos en 1981, 1 332 casos en 1982 y 1 951 casos en 1983 (Stamman *et al.*, 1987). Entre 1983 y 1985 se registraron cuatro episodios tipo DSP en Filadelfia

y en Long Island, Nueva York, por ingerir mejillones y almejas. Los episodios se asociaron a especies de *Dinophysis* o *Prorocentrum*, aunque no se realizaron análisis químicos (Todd *et al.*, 1993).

En 1989 se observaron altas densidades de *D. acuta* en aguas decoloradas de Long Island. Los análisis efectuados para determinar la presencia de AO mostraron que los mejillones de dos estaciones contenían concentraciones superiores a 0,5 UR por 100 g, pero no se informó de casos de intoxicación en seres humanos (Aune y Yndestad, 1993).

Entre junio y setiembre, a menudo se observan altas densidades de *Dinophysis acuminata* y *Dinophysis norvegica*, en la costa de Maine. La especie *Prorocentrum lima* solo se encontró en la región de las bahías Frenchman y Eastern. La actividad tipo AO detectada en los mejillones no alcanzó la magnitud necesaria para causar problemas de salud en seres humanos (Van Dolah *et al.*, undated). En 1998 se registró la presencia de *P. lima* a lo largo de las costas de Maine (Stancioff, 2000).

El análisis de los extractos de mariscos y fitoplancton provenientes del Golfo de México reveló la presencia de AO (0,162 µg/g de marisco) y de ácido domoico (2,1 pg por célula de fitoplancton). El ácido domoico es el agente causante de la intoxicación amnésica por mariscos (ASP). En esta zona no se ha registrado intoxicación en seres humanos (Dickey *et al.*, 1992a).

3.7.4 América Central y del Sur

Argentina

Hasta 1999 no se había detectado toxicidad a pesar de la presencia de *D. acuminata* y *D. fortii*. En 1999, 40 personas se intoxicaron en la Patagonia. En el plancton se confirmó la presencia de *P. lima* y de toxinas DSP en mejillones (Ferrari, 2001).

Brasil

En 1990, varias personas en Florianópolis presentaron trastornos gastrointestinales y diarrea por ingerir mejillones. Los resultados obtenidos del análisis del plancton y por bioensayo en ratones indicaron la presencia de toxinas DSP y de *D. acuminata* (Ferrari, 2001).

Chile

En 1970 y 1971 se observaron casos de trastornos gastrointestinales, que se cree que estuvieron asociados a floraciones de *Dinophysis* spp. (IPCS, 1984). En enero de 1991, aproximadamente 120 personas se intoxicaron con DSP luego de ingerir mejillones frescos. Se identificó la presencia de *D. acuminata* en bivalvos frescos y en mejillones enlatados. También se detectó la presencia de AO y DTX1 en las muestras tóxicas (Aune y Yndestad, 1993). Zhao *et al.* (1993) determinaron que la toxina más significativa en los mejillones chilenos es la DTX1 y la menos significativa es el AO. Quilliam (1998a) informa que recientemente se detectó en Chile la presencia de toxinas YTX y de compuestos relacionados en mariscos y fitoplancton.

Lagos (1998) también informa de la presencia, muy documentada, de la DSP en Chile. Hasta 2001, las toxinas PSP y DSP tuvieron graves consecuencias para la salud pública y economía chilenas. Todos los bancos naturales de peces situados al sur de los 44° S se cerraron por la presencia de toxinas. A causa de estos cierres, las autoridades resolvieron poner en práctica un programa nacional de control (Suárez-Isla, 2001). En marzo de 1998, Uribe *et al.* (2001) también detectaron toxinas DSP en los fiordos del estrecho de Magallanes (53°19'S, 72°30'W), en el sur de Chile. En *Mitylus chilensis* se detectó una concentración de DTX1 entre 6,5 y 58 µg/100 g de glándula digestiva. No se detectó AO y el alga causante se identificó como *D. acuminata*.

México

En las primaveras de 1992, 1993 y 1994 el análisis por bioensayo en ratón de extractos de mariscos de muestras tomadas en la Bahía Concepción, en el Golfo de California dio resultados positivos para las toxinas DSP. Las muestras tomadas en abril de 1994, analizadas por CL contenían AO y DTX1,

aunque no se informó de intoxicación en seres humanos. A menudo, las muestras de agua de esta zona contienen especies de dinoflagelados productoras de DSP (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998).

En marzo de 1993 y abril de 1994, las densidades del dinoflagelado *D. caudata* en el Golfo de California (Punta Arena, Playa Escondia, Amolares y San Ignacio) alcanzaron máximos entre 74 y 90 x 10³ células por litro. Sin embargo, no se informó de contaminación en mariscos, ni de intoxicación en seres humanos (Lechuga-Devéze y Morquecho-Escamilla, 1998).

Uruguay

En 1990 varias personas presentaron trastornos gastrointestinales y diarrea luego de ingerir mejillones. Los resultados obtenidos del análisis del plancton y por bioensayo en ratones indican la presencia de DSP y de *Dinophysis acuminata* (Ferrari, 2001). En enero de 1992 se detectó la presencia de DSP en mariscos recogidos en las costas uruguayas. En la misma época se observó una concentración de *D. acuminata* de 6 000 células por litro en La Paloma, lo que resultó en el establecimiento de una veda parcial para la recolección de mariscos (Aune y Yndestad, 1993).

3.7.5 Asia

China

Las DSP se encuentran en distintas especies de mariscos y están ampliamente distribuidas a lo largo de la costa china. En 1996 y 1997, 26 de las 89 muestras analizadas contenían DTX1 o AO, pero solo seis contenían concentraciones superiores al límite reglamentario para consumo humano (20 µg/100 g de tejido). La concentración máxima, de 84 µg/100 g, se encontró en la especie *Perna viridis* de Shenzhen, aunque en ese período no se informó de intoxicaciones por DSP en seres humanos (Zhou *et al.*, 1999).

Japón

A fines de junio de 1976 y en 1977 se registró por primera vez la presencia de DSP, cuando 164 personas presentaron síntomas de diarrea y vómitos graves. La información epidemiológica indica que tan solo 12 unidades ratón (UR) alcanzaron para provocar intoxicación leve en el ser humano (Yasumoto *et al.*, 1978). Una UR se definió como la cantidad de toxina (que más adelante se definió como DTX1), administrada por vía intraperitoneal, necesaria para causar la muerte de un ratón en 24 horas (EU/SANCO, 2001). El *D. fortii* fue el primer dinoflagelado asociado. Entre 1976 y 1982 ocurrieron en el país aproximadamente 1 300 casos de DSP (Hallegraeff, 1993).

India

Un estudio de dos años de duración (desde 1984 hasta 1986) reveló la presencia de toxinas diarreicas en varios de los mariscos analizados, con cantidades que oscilaron entre 0,37 y 1,5 UR/g hepatopáncreas. Sin embargo, no se conocen episodios de DSP que hayan afectado a la población en general (Aune y Yndestad, 1993).

Las Filipinas

Recientemente se detectó la presencia de cinco especies de *Dinophysis* aunque no se ha informado de casos de intoxicación en seres humanos (Corrales y Maclean, 1995).

Federación Rusa

En aguas costeras del este de la Federación Rusa se identificó la presencia de *D. acuminata*, *D. acuta*, *D. fortii* y de *D. norvegica* aunque no se ha informado de intoxicaciones en seres humanos (Aune y Yndestad, 1993).

3.7.6 Oceanía

Australia y Nueva Zelanda

El dinoflagelado *P. Lima*, productor de AO y de AO metílico, se aisló en tres zonas de la Isla Heron, Australia, aunque no se informó de ningún caso de DSP (Morton y Tindall, 1995). Rhodes y Syhre (1995) mencionan la presencia de *P. lima* en aguas neocelandesas (en los canales Northland y Marlborough), que aparentemente producía AO. Recientemente se detectaron toxinas YTX y compuestos relacionados en mariscos y fitoplancton en Nueva Zelanda (Quilliam, 1998a).

En diciembre de 1997 se registraron 56 casos de hospitalización por intoxicación luego de ingerir pipi australes, *Donax delatoides*, en Nueva Gales del Sur, Australia (ANZFA, 2001). Según Quilliam *et al.* (2000), es probable que los ácidos PTX 2-secoicos hayan contribuido a los síntomas gastrointestinales, vómitos o diarrea en seres humanos (Aune, 2001). Según Burgess y Shaw (2001), los pacientes ingirieron aproximadamente 500 g de pipi australes con 300 µg de PTX2SA/kg (~150 µg PTX2SA/persona ~2,5 µg/kg de pc para una persona de 60 kg).

En marzo de 2000, en la Isla North Stradbroke (Queensland), una señora de edad avanzada enfermó gravemente luego de ingerir pipi de las playas locales. Se determinó que el marisco contenía altas concentraciones de PTX2SA (Burgess y Shaw, 2001).

En mejillones de Tasmania se detectaron toxinas DSP (AO y DTX1) producidas por los dinoflagelados *Dinophysis fortii* y *D. acuminata*. Sin embargo, hasta la fecha no se ha detectado la presencia de toxinas DSP en mariscos comercializados de Tasmania y no se conocen casos de intoxicación en seres humanos (Hallegraeff, 1992).

En el 0,7 por ciento de las muestras de mariscos recogidas semanalmente a lo largo de las costas neocelandesas desde setiembre de 1994 hasta julio de 1996 se detectaron concentraciones de toxinas DSP superiores al límite reglamentario (concentración máxima de 96 µg/100 g de mejillón), en nueve eventos de DSP. Durante el período de muestreo ocurrieron tres brotes de intoxicación con DSP en seres humanos con 13 casos (Sim y Wilson, 1997).

3.8 Reglamentación y seguimiento

3.8.1 Europa

En 1996, durante el transcurso de la primera Reunión de Laboratorios Nacionales de Referencia para Biotoxinas Marinas y Métodos de Análisis y Criterios de Toxicidad de la UE, el grupo UE-LNR (EU-NRL por sus siglas en inglés) acordó que el método recomendado para la detección de toxicidad grave causada por toxinas DSP solubles en acetona es el bioensayo en ratón según la técnica de Yasumoto *et al.* (1978), con un período de observación de 24 horas. En función de los efectos tóxicos, el grupo acordó fijar el límite de tolerancia para las toxinas DSP, incluidas las toxinas no diarreicas solubles en acetona, entre 80 y 160 µg de eq de AO/kg de carne de marisco entera o entre 20 y 40 UR/kg de carne de marisco entera para los países miembro de la UE (EU-NRL, 1996).

En marzo de 2002 la Comisión Europea dispuso (EC, 2002a):

- La concentración máxima de la suma de AO más las toxinas DTX y PTX, en tejidos comestibles (cuerpo entero o cualquier parte comestible aislada) de moluscos, equinodermos, tunicados y gastrópodos marinos es de 160 µg eq de AO/kg.
- La concentración máxima de toxinas YTX en tejidos comestibles (cuerpo entero o cualquier parte comestible aislada) de moluscos, equinodermos, tunicados y gastrópodos marinos es de 1 mg eq de YTX/kg.
- Los métodos recomendados, excepto para la yesotoxina, para el análisis de las toxinas mencionadas son el bioensayo en ratón o en ratas. Los métodos analíticos, como por ejemplo CL con detección fluorométrica, CL acoplada a EM, inmunoensayos y ensayos funcionales

como el ensayo de inhibición de la fosfatasa, se pueden utilizar como métodos alternativos o complementarios del ensayo biológico, siempre y cuando cada uno de ellos, de forma independiente o combinada, resulte igual o más eficiente que los métodos biológicos, que su utilización garantice un grado equivalente de protección a la salud pública y que detecten como mínimo los análogos siguientes:

AO y toxinas DTX: puede ser necesario agregar un paso de hidrólisis para detectar la presencia de la DTX3

Toxinas PTX: PTX1 y PTX2

Toxinas YTX: YTX, 45 OH YTX, homo YTX y 45 OH homo YTX.

- Si hubiera discrepancias entre los resultados obtenidos con los distintos métodos, prevalecerán y se consideraran como referencia los obtenidos con el bioensayo en ratón.

Irlanda

El Programa de Control de Biotoxinas comenzó a funcionar en 1984 analizando las muestras por bioensayo para detectar la presencia de toxinas DSP. El control se intensificó en los últimos años, en la medida en que se detectaron otras toxinas como el AD y especialmente las azaspirácidas. Actualmente, el programa prevé la realización de análisis semanales, tanto de fitoplancton como de mariscos, por bioensayo en ratón para detectar toxinas DSP, por CL acoplada a EM para detectar el ácido ocaídoico, la DTX2 y las azaspirácidas; y por CL para detectar el AD. Las autoridades reglamentarias, el personal de la salud y los productores y procesadores de mariscos reciben regularmente los informes elaborados con los resultados del análisis de las muestras y se está trabajando en un sistema de información por internet para facilitar el acceso a la información (McMahon *et al.*, 2001).

Turquía

La reglamentación está basada en el bioensayo en ratón. No se dispone de más información (Fernández, 2000).

3.8.2 América del Norte

Canadá

Hallegraeff *et al.* (1995) informan que en Canadá se controlan las especies *Dinophysis* y *Prorocentrum*. Las zonas de recolección de productos pesqueros se cierran cuando las concentraciones de toxinas DSP en mariscos, determinadas por bioensayo en ratón (no oficial) superan los límites tolerables (es decir superiores a 0,2 µg/g de carne = 5 UR/100 g de carne).

Estados Unidos de América

No se realiza el control de DSP porque aún no se ha confirmado su presencia. La Administración para el Control de Alimentos y Medicamentos (FDA) es el organismo competente en temas de inocuidad de los productos y de las biotoxinas marinos. En lo que atañe a la inocuidad de los alimentos en el país, la entidad participa en varios programas de cooperación con los estados individualmente, mediante acuerdos enmarcados según lo dispuesto por el Programa Nacional de Higiene de los Mariscos. En la esfera internacional, la FDA es la entidad encargada de firmar memorandos de entendimiento con distintos países para reglamentar la importación de productos marinos. Por otro lado, el Servicio Nacional de Pesquerías Marinas (NMFS) de la Agencia Nacional de la Atmósfera y el Océano (NOAA) cuenta con varios programas de biotoxinas marinas, especialmente en peces y fauna silvestre.

3.8.3 América Central y del Sur

Argentina

Argentina cuenta con un programa nacional de seguimiento de la toxicidad en mejillones en cada una de las provincias costeras, en el que participan los laboratorios regionales y una estación en Mar del Plata (Ferrari, 2001).

Brasil

Brasil puso en práctica un programa de control piloto de un año de duración, pero no cuenta con un programa nacional de control (Ferrari, 2001).

Chile

En el país se realizan dos tipos de control. El Servicio Nacional de Salud analiza por bioensayo la toxicidad de muestras recolectadas mensualmente en 40 estaciones. Además, el Instituto de Investigación Pesquera, en colaboración con las universidades, cuenta con programas de control de la toxicidad. Estos programas incluyen también el análisis del fitoplancton, de manera de seguir el fenómeno en su totalidad y no solo la toxicidad. Sin embargo, los métodos utilizados presentan problemas, ya que a menudo las PSP y DSP ocurren simultáneamente. El Ministerio de Salud, a través del Servicio Regional de Salud, está a cargo del cierre de las zonas de recolección contaminadas, y de la cuarentena de los mariscos cuando los resultados del bioensayo son positivos para DSP. El Servicio Nacional de Pesca supervisa los mariscos para exportación y actualmente cuenta con un memorando de entendimiento con EEUU y la UE que permite la exportación de mariscos. No existe reglamentación para los mariscos importados que hasta ahora no tienen un gran mercado (APEC, 1997). Hasta 2001, las toxinas PSP y DSP tuvieron graves consecuencias para la salud pública y la economía chilenas. Todos los bancos naturales de peces situados al sur de los 44° S se cerraron por la presencia de toxinas. A causa de estos cierres, las autoridades resolvieron poner en práctica un programa nacional de control (Suárez-Isla, 2001). La reglamentación está basada en el bioensayo en ratón (no se dispone de más información) (Fernández, 2000).

Uruguay

Uruguay cuenta con un programa nacional de control de la toxicidad en mejillones y en el fitoplancton tóxico (Ferrari, 2001). La reglamentación está basada en el bioensayo en ratones (no se dispone de más información) (Fernández, 2000).

Venezuela

La reglamentación está basada en el bioensayo en ratón (no se dispone de más información) (Fernández, 2000).

3.8.4 Asia

China

El país no cuenta con un programa de seguimiento reglamentario de toxinas en mariscos, ni tampoco con reglamentación referente al contenido de biotoxinas de algas en productos marinos. Sin embargo, existe un proyecto sobre mareas rojas que dispone el seguimiento regular en dos zonas, una en el sur y otra en el norte del país, mediante el análisis de muestras bisemanales de plancton y de mariscos (APEC, 1997).

Japón

El control se realiza tanto en el fitoplancton, como en los mariscos. En las principales zonas productoras de mariscos, los investigadores de las Estaciones Pesqueras Experimentales de las Prefecturas realizan el muestreo periódico de plancton y los conteos celulares de las especies clave de *Dinophysis*. Las muestras de mariscos se toman al menos una vez al mes durante las estaciones críticas. En cuanto se detectan toxinas, aumenta la frecuencia del control y se muestrea en más estaciones. El límite de tolerancia para las toxinas DSP en bivalvos es de 5 UR/100 g de carne entera

determinado por bioensayo en ratón ($\sim 0,2 \mu\text{g/g}$). La información sobre la toxicidad de los mariscos se distribuye por medio de una red bien definida que conecta a los organismos gubernamentales, pesquerías, cooperativas, pescadores, a los medios y al público en general. La veda para la recolección de mariscos se levanta luego de transcurridas tres semanas con toxicidades inferiores a los límites de cuarentena (APEC, 1997 y Hallegraef *et al.*, 1995).

República de Corea

El Instituto Nacional de Desarrollo e Investigación Pesquera toma y analiza bisemanalmente muestras de fitoplancton de zonas clave, en más de 200 estaciones, durante el período comprendido entre febrero y octubre. Las muestras se analizan para detectar ASP así como también PSP y DSP, aunque estas dos últimas no constituyen un problema grave. La determinación de las toxinas DSP se realiza por CL (APEC, 1997). También se controla la presencia de especies de *Prorocentrum* y las zonas de recolección de productos pesqueros se cierran cuando la densidad supera las 10^5 células por litro. El límite de tolerancia para toxinas DSP en mariscos es de 5 UR/100 g determinado por bioensayo en ratón (Hallegraef *et al.*, 1995).

Tailandia

La reglamentación está basada en el bioensayo en ratón (no se dispone de más información) (Fernández, 2000).

3.8.5 Oceanía

Australia

La reglamentación para toxinas DSP recomienda entre 16 y 20 $\mu\text{g eq}$ de AO/100 g de carne de marisco, salvo en 1995 cuando las concentraciones máximas permitidas de DSP fueron entre 20 y 60 $\mu\text{g AO/100 g}$ de carne de marisco o 2 $\mu\text{g AO/100 g}$ de hepatopáncreas. No se especifica si estos límites son valores obligatorios o recomendaciones, ni tampoco de donde se obtuvieron estos valores (Burgess y Shaw, 2001).

Nueva Zelanda

El Programa de Control de Biotoxinas Neocelandés combina los análisis de mariscos comunes y el control del fitoplancton. El límite reglamentario en mariscos es de 20 $\mu\text{g AO eq/100 g}$ de carne de marisco (Sim y Wilson, 1997). En la actualidad, el análisis de mariscos se realiza mediante bioensayo selectivo en ratones con pruebas de confirmación aprobadas para AO y DTX1 (DSP ELISA Check Kit, PP2A, CL acoplada a EM), y para las toxinas PTX e YTX (CL acoplada a EM) (Busby y Seamer, 2001).

El proyecto de Programa de Control de Biotoxinas está diseñado para suministrar información sumamente precisa, en tiempos más cortos y mediante técnicas de CL acoplada a EM que sustituyan al bioensayo en ratón y provean información analítica y química, en lugar de resultados de análisis por bioensayo. En la actualidad se está trabajando en el desarrollo y la puesta en práctica de nuevos métodos de ensayo, se estudian las distintas alternativas de financiamiento, la validación de los métodos, la reglamentación de los análisis y la disponibilidad de estándares analíticos. Además se realiza la comparación con las pruebas existentes, se evalúan las distintas estrategias para ponerlo en práctica y se exploran las posibilidades de cooperación internacional (McNabb y Holland, 2001).

