

4. Intoxicación amnésica por mariscos (ASP)

La intoxicación amnésica por mariscos (ASP), conocida también como intoxicación por ácido domoico (DAP), ya que la amnesia no siempre se manifiesta, fue reconocida por primera vez en 1987 en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá. La ASP, entonces, como consecuencia de ingerir cholgas, causó tres muertes y 105 casos de intoxicación aguda en seres humanos. Los síntomas eran calambres abdominales, vómitos, desorientación y pérdida de memoria (amnesia). La toxina causante (el amino ácido domoico o DA, un estimulante) fue producida por la especie de diatomea *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* (= *Nitzschia pungens* f. *multiseries*) (Hallegraeff, 1995).

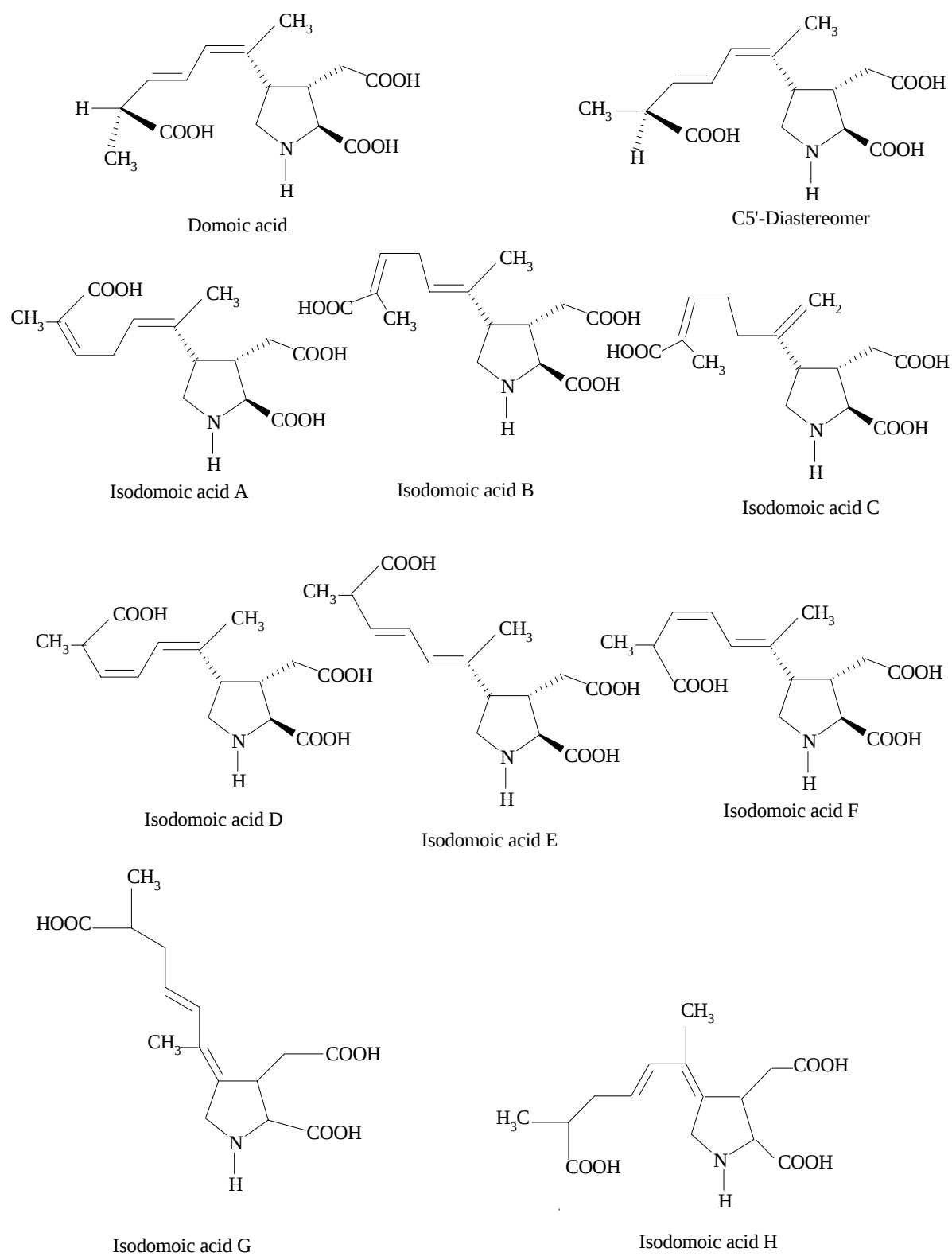
En setiembre de 1991, se atribuyeron las muertes inexplicables de pelícanos y cormoranes en la Bahía Monterrey, en California, a un brote de intoxicación por DA producido por *Pseudo-nitzschia australis*, una diatomea de la misma familia; ingerida por anchoas y a su vez ingeridas por aves. En octubre de 1991, se encontró que las navajuelas de la costa de Oregon, inducían síntomas semejantes a los del DA en ratones. Estos incidentes hicieron que las autoridades reglamentadoras de los Estados Unidos realizaran relevamientos masivos de muchas especies marinas en busca del DA. La toxina se encontró en extensas zonas desde California a Washington, e inesperadamente en cangrejos, en crustáceos por primera vez. Desde estos incidentes, hay una conciencia global del DA y sus fuentes (Wright y Quilliam, 1995).

4.1 Estructuras químicas y propiedades

La intoxicación amnésica por mariscos es causada por el ácido domoico (DA), ver la Figura 4.1, un compuesto natural perteneciente a la categoría de los cainoides aislados de diversas fuentes marinas, incluidas las macro y microalgas (Wright y Quilliam, 1995). El DA es un amino ácido cristalino, soluble en agua. Puede purificarse por diversos métodos cromatográficos y su detección se facilita por espectroscopia UV por poseer un cromóforo fuerte. Originalmente, el DA fue descubierto como un producto de una macroalga roja, *Chondria armata*, y aislado posteriormente de otras varias microalgas rojas. Sin embargo, estas no eran la fuente del DA en el primer incidente informado en 1987, de ASP, en la Isla Príncipe Eduardo, Canadá. El origen del DA en este brote de ASP era la diatomea *Pseudo-nitzschia* (antes *Nitzschia*) *pungens* forma *multiseries*. El DA es una potente neurotoxina de la clase de los compuestos cainoides, neurotransmisores estimulantes, que se unen a proteínas receptoras específicas en las neuronas, causando su despolarización continuada hasta la ruptura celular (Wright, 1995).

La investigación de los cainoides presentes en *Chondria armata* resultó en el descubrimiento, en cantidades pequeñas, de los isómeros geométricos del ácido isodomoico A, B y C (ver Figura 4.1), así como de domoilactonas. Ninguno de estos isómeros, encontrados en algas, se detectó en extractos de plancton o de tejido de mariscos. Sin embargo, se aislaron otros tres isómeros geométricos (ácidos isodomoico D, E y F) y el diastereómero C5' (ver Figura 4.1) tanto de células de plancton como de tejido de mariscos (Wright y Quilliam, 1995; Ravn, 1995). Los isómeros geométricos pueden prepararse en el laboratorio exponiendo brevemente soluciones diluidas a la luz UV, siendo por tanto considerados como productos *de novo* del plancton. Los estudios farmacológicos indican que estos fotoisómeros se unen menos fuertemente con las proteínas receptoras del cainato que el propio DA, sugiriendo que no son tan tóxicas como el amino ácido padre. El calentamiento acelera la formación del diastoisómero C5', que posee casi la misma capacidad de unión con el receptor cainato que el propio DA (Wright y Quilliam, 1995). Zaman *et al.* (1997b) informaron de la separación de dos nuevos isómeros de DA del alga roja *Chondria armata*, el ácido isodomoico G y H, (ver Figura 4.1).

Figura 4.1 Estructuras químicas del ácido domoico y sus isómeros



4.2 Métodos de análisis

4.2.1 Bioensayos

ensayos in vivo

bioensayo en ratón

El bioensayo en ratón para las toxinas PSP de la AOAC, también permite detectar DA en concentraciones de aproximadamente 40 µg/g tejido (AOAC, 1990). El ensayo en ratón para las PSP impone la extracción con agua en medio ácido del tejido (animal entero u órganos seleccionados), seguido de inyección intraperitoneal de 1 ml del extracto en ratones. Se registra el tiempo transcurrido (en general menos de 15 minutos) desde la inyección inicial a la muerte del ratón. Este fue el procedimiento empleado al detectarse por primera vez intoxicaciones con ASP en extractos de mariscos en Canadá. Los primeros indicios de toxicidad asociada con el síndrome ASP se evidenciaron en el transcurso de bioensayos AOAC de evaluación rutinaria de PSP en ratones. Laboratoristas expertos en bioensayos percibieron que podían distinguirse los síntomas aberrantes de la ASP, de los clásicos de intoxicación por PSP y muerte subsiguiente. El éxito de la aproximación durante el primer incidente de ASP se debió en parte a los altos niveles de toxinas en los mariscos contaminados de la Isla Príncipe Eduardo. La señal típica de la presencia de DA es un síndrome característico en el que los hombros se rascan con la pata trasera, seguido de convulsiones. El periodo de observación debió prolongarse de 15 minutos a cuatro horas. Aunque el procedimiento de extracción de la AOAC da recuperaciones elevadas de DA, su límite de detección no es lo suficientemente bajo como para emplearse con confianza en la cuantificación de esta toxina con fines reglamentarios. El valor guía para almejas fijado en Canadá, y adoptado posteriormente por la mayoría de los países con límites para la ASP es de 20 µg DA/g de tejido de almeja. Para la detección de rutina de las toxinas ASP, el método de ensayo en ratón de la AOAC ha sido sustituido por métodos de CL con detector fluorométrico o diodo/UV, que resultan herramientas mas sensibles y confiables (Fernandez y Cembella, 1995).

Tasker *et al.* (1991) pretendieron haber desarrollado una escala de comportamiento comparativa desde cero (normal) a siete (muerte), que sostenían era consistentemente reproducible en ratones inyectados intraperitonealmente. Según lo autores, la escala comparativa podía utilizarse, además, para cuantificar de manera confiable concentraciones de DA del orden de 20 µg/ratón (~0.8 mg/kg pc).

ensayos in vitro

ensayos de enlace con receptores

Se desarrolló, para el DA, un ensayo de enlace competitivo con receptores de micro placa que emplea sinaptosomas de cerebro de rana (*Rana pipiens*). El análisis del DA estaba basado en la competencia con el ácido cainico radiomarcado-[³H] por el enlace con el receptor de cainato/quisqualato glutamato. El método parecía ser sensible (IC₅₀ 0.89 nM ~ 0.3 µg) y muy prometedor como ensayo automatizado y rápido para determinar DA en muestras de mariscos contaminados y de fitoplancton. Los resultados preliminares indicaron una buena correlación cuantitativa con el método del fluorenilmetoxycarbonilo-HPLC, con extractos de *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* (Van Dolah *et al.*, 1994). En 1995, se informó que el método se encontraba aun en las últimas etapas de las pruebas farmacológicas (Wright y Quilliam, 1995). En 1997, Van Dolah *et al.* informaron un desarrollo posterior con sustitución del cerebro de rana con un receptor de glutamato de rata clonada GLUR6 de manera de prescindir de animales vivos en los ensayos. Se optimizaron el límite de detección y la selectividad del ensayo incluyendo un tratamiento previo con glutamato decarboxilasa para eliminar interferencias potenciales resultantes de las altas concentraciones de glutamato endógeno en mariscos. El ensayo de Van Dolah *et al.* (1997) es adecuado para determinar DA en extractos de algas en agua de mar y en mariscos.

ensayo con cortes hipocampales

Se estudio la eficacia de las preparaciones de cortes hipocampales *in vitro*, como una manera de detectar, rápida y específicamente el DA. Se registraron las respuestas neuronales extracelulares de la región CA1 de cortes de rata adulta Sprague-Dawley completamente sumergidos y perfusados, con patrones de referencia en el rango 50 a 1000 nM. El DA produjo un aumento rápido y reversible en la amplitud del pico de la población ortodrómica y una disminución en el EPSP (potencial extra-celular desde *stratum radiatum*). Los resultados de este experimento indicaron que los preparados de cortes hipocampales son una herramienta viable para detectar DA (Kerr *et al.*, 1999; Saba *et al.*, 1997).

4.2.2 Ensayos bioquímicos

inmunoensayos

Se desarrolló un ELISA para detectar la presencia de DA en suero y orina de mamíferos, empleando anticuerpos policlonales producidos en conejos. El método fue eficaz para determinar concentraciones de DA en orina de rata, con un límite inferior informado de cuantificación de 40 ng/ml. Los niveles de DA en plasma de rata y mono no se pudieron determinar con precisión con este anti suero en el ELISA. Este sistema de detección no ha sido sometido a ensayos colaborativos extensos para su uso como técnica de rutina (Cembella *et al.*, 1995 y Smith y Kitts, 1994). El método anterior comprendía varias etapas y carecía del límite de detección deseado. Además, dependía de la inmovilización física del DA en la micro placa mediante el portador proteico. Actualmente, se han desarrollado micro placas CovaLink NH[®] en las que un grupo amino secundario se ha proyectado en los ELISAs para enlazar péptidos, esteroides, oligonucleótidos, y DNA a la superficie del pozo de la micro placa, directa y químicamente. El uso de estas micro placas CovaLink para simplificar y mejorar el anterior método ELISA, ha resultado en dos versiones diferentes, basadas respectivamente en un inmovilización física y otra química del DA (Osada *et al.*, 1995).

Smith y Kitts (1994) y Smith y Kitts (1995), desarrollaron respectivamente, ELISAs para determinar DA en fluidos del cuerpo humano y en extractos de mejillón. Los ensayos empleaban un anti suero policlonal producido en ratones frente a un conjugado de ovalbumina-DA. El ensayo se utilizó para cuantificar el DA presente en fluidos humanos inoculados con domoato puro. Los límites de cuantificación inferiores fueron de 0,2 µg/ml en orina, 0,25 µg/ml en plasma y 10 µg/ml en leche. El límite relativamente alto en leche era debido posiblemente al elevado contenido graso de ésta. Los autores sugirieron que las muestras de leche humana pueden requerir una extracción previa al análisis (Smith y Kitts, 1994). Las experiencias de recuperación, demostraron, tanto para extractos acuosos como ácidos de tejidos de mejillón, que la concentración de DA podía medirse con precisión al 8 por ciento del valor real. El límite de detección era de 0,25 µg/ml de extracto. Este valor representa, cuando se analizan extractos ácidos (AOAC), 0,5 µg DA/g de tejido de mejillón (Smith y Kitts, 1995). Las determinaciones de DA mediante CL y ELISA correlacionaron bien ($r = 0,96$) al compararse directamente, aunque el ELISA resultó en valores superiores para la mayoría de las muestras. Se ha indicado que esto era debido posiblemente a una pérdida de DA durante la extracción en fase sólida previa al HPLC o a la posible presencia de isómeros de DA. La CL rutinariamente no determina los isómeros de DA que no co-eluden con éste. Sin embargo, el método ELISA mide el contenido total de DA incluyendo un diastereoisómero y al menos dos isómeros *cis-trans* (Smith y Kitts, 1995)

Para desarrollar un ELISA competitivo indirecto en mariscos y agua de mar, Garthwaite *et al.* (1998) emplearon anticuerpos ovinos producidos contra conjugados enlazados a través del grupo amino secundario del DA, junto con conjugados activados derivados de ésteres de DA como cobertura de la placa. El ELISA tiene un límite de detección inferior a 0,1 ng/ml, un límite de cuantificación (LDC) de 0,15 ng/ml y un rango de trabajo de 0,15-15 ng DA/ml. El límite de cuantificación equivale a 38 µg DA/kg de carne de marisco, 500 veces menos que el límite reglamentario de 20 mg/kg carne. Se demostró también que este ELISA resultaba adecuado para analizar DA en cultivos de algas y en agua de mar recogida del campo en Nueva Zelanda, teniendo en consecuencia el potencial de ser un alerta temprano del desarrollo de floraciones de algas. Los compuestos análogos en agua de mar, como el ácido canaico, no interfieren con este ensayo.

El ELISA como lo desarrolló Garthwaite *et al.* (1998) ha sido comercializado bajo forma de kit, por Biosense®, destinado al seguimiento rutinario de los niveles de DA en moluscos bivalvos de cultivo para verificar su concordancia con los límites reglamentarios. Según el fabricante también puede usarse para cuantificar DA en otras matrices (ver www.biosense.com “Direct cELISA ASP assay”, 2003). Comparado con el procedimiento original de 1998, se ha reducido el LDC del kit a 10 µg/kg marisco. Al momento de escribir esta monografía se estaba validando el método Biosense® ELISA, aunque trabajos preliminares en esa dirección entre laboratorios de Escocia, Chile y Nueva Zelanda indicaron un comportamiento excelente (Kleivdal, 2002).

En tanto que los anticuerpos desarrollados por Garthwaite eran policlonales, Kawatsu *et al.* (1999) produjeron anticuerpos monoclonales contra el DA y los aplicaron en un inmunoensayo competitivo indirecto. Se estimaron respectivamente los rangos para la determinación cuantitativa de ácido domoico y LDC en mariscos, en 0,15-10 ng DA/ml y < 40 ng DA/g, muy comparable con el comportamiento del ELISA de Garthwaite *et al.* (1998). Los informes de los autores indican una recuperación del DA al 103 por ciento (C.V. 4,5 por ciento) para DA agregado a extractos de mariscos con niveles de toxinas de 0,02–0,2 ng/ml. El mismo grupo de investigadores empleó también los monoclonales como ligandos en cromatografía de inmunoafinidad, que combinada con CL, fue usada exitosamente para confirmar la presencia de DA en muestras comerciales de cholgas (*Mytilus edulis*) (Kawatsu *et al.*, 2000).

Garthwaite *et al.* (2001) desarrollaron un ELISA grupal para toxinas ASP, NSP, PSP, DSP y yesotoxina como un sistema de selección para muestras de mariscos contaminados. El sistema detectó muestras de mariscos sospechosas, las que desde entonces deben analizarse con métodos aprobados por autoridades reglamentadoras internacionales. La extracción con alcohol permitió una buena recuperación para todos los grupos de toxinas.

Los biosensores ofrecen un nuevo enfoque basado en anticuerpos. Traynor *et al.* (2002) han descrito la detección de residuos de DA en moluscos bivalvos con un inmunobiosensor. En esta aplicación el DA se une a la superficie del sensor y se emplea el anticuerpo policlonal producido a un conjugado DA HAS. Los autores indicaron que el ensayo era adecuado para análisis rápidos en berberechos, mejillones, ostras y vieiras. Se encontró un límite de detección a 0,8 µg/g, y un C.V. entre ensayos de 8 por ciento a un nivel de 20 µg/g, el actual límite legal para el cuerpo entero. Al momento de escribirse este trabajo estaba en marcha una comparación en gran escala con CL. Es de esperar que la tecnología de los biosensores se aplique en el futuro más extensamente para analizar ASP.

4.2.3 Ensayos químicos

cromatografía de capa fina

El DA puede determinarse por cromatografía de capa fina con un punto de absorción UV débil que se vuelve amarillo luego de nebulizarlo con ninhidrina al 1 por ciento (Quilliam *et al.*, 1998). Interfieren los amino-ácidos normales presentes en los extractos crudos, que deben separarse. Esto se logra para las muestras de plancton con dos cromatografías en capa fina bidimensionales. No pueden analizarse directamente, por ser muy complejos, los extractos crudos de tejidos de mariscos. Un procedimiento de limpieza (una extracción fuerte, ligeramente modificada, de intercambio aniónico en fase sólida [SAX-SPE]) permite obtener fracciones directamente utilizables o concentrarlas al vacío antes de aplicarlas sobre una placa de sílica-gel. La cromatografía de capa fina unidimensional, con esta forma de limpieza es suficiente, al ser retirados casi todos los amino-ácidos que interfieren. El límite de detección por este método, para el DA, es de alrededor de 0,5 µg, lo que permite la detección en tejidos de marisco a alrededor de 10 µg/g. Es también posible detectar el DA sobre la placa utilizando otros reactivos para la nebulización. Por ejemplo, luego de nebulizar con vainillina, primero se colorea de amarillo con el ácido domoico (o cainico) para luego pasar, con el tiempo, a rosado (Wright y Quilliam, 1995).

Quilliam *et al* (1998) estudiaron, además, la cromatografía en capa fina como una técnica de separación para detectar el DA, luego de extracción con metanol en agua seguida por una limpieza SAX-SPE. El método fue exitosamente aplicado a muestras de vieiras, navajuelas y anchoas contaminadas con DA, concluyéndose que resultaría exitoso para los análisis de rutina de tejidos de mariscos en los laboratorios que no cuentan con sistemas de CL. Debiera también ser útil como un método para confirmar químicamente la presencia de DA en muestras positivas con, por ejemplo, inmunoensayos.

análisis de amino ácidos

Los extractos acuosos crudos de plancton, pueden analizarse directamente mediante un sistema de análisis de amino ácidos empleando las soluciones tampón y columnas de intercambio iónico habitualmente usadas para analizar hidrolizados proteicos, elutos de DA similares a la metionina. Las medidas de absorbancia a 440 nm permiten detectar amino ácidos con grupos amina primarios, en tanto que a 570 nm se detectan selectivamente imino ácidos como la prolina y el DA. El límite de detección del DA por este método es de alrededor de 1 µg/ml, con unos 50 µl de extracto inyectados por la columna. Aunque el límite de detección del método de análisis de amino ácidos es próximo al de los métodos CL-UV, no resulta tan efectivo para muestras con una concentración alta de amino ácidos libres y el análisis es en si más prolongado. Los extractos de mariscos pueden analizarse de esta manera luego de las necesarias limpiezas y concentración de material (Wright y Quilliam, 1995).

cromatografía líquida (CL)

El DA puede analizarse y aislarse, por CL o por cromatografía de intercambio iónico con detector UV. Las separaciones más rápidas y eficientes se logran con CL-UV de fase revertida. Se recomienda emplear una fase móvil ácida para suprimir la ionización de las funciones carboxilo, en tanto que se logra de la mejor manera la separación selectiva del DA y sus isómeros con fases octadecilsilica “tipo polímero”. La CL-UV es actualmente la técnica analítica preferida para analizar DA en mariscos disponiéndose de un método, validado formalmente para mejillones por un estudio colaborativo de la AOAC (Lawrence *et al.*, 1991b). La detección del DA se facilita por su fuerte absorbancia a 242 nm. El límite de detección CL-UV para el DA es de unos 10-80 ng/ml, dependiendo de la sensibilidad del detector UV empleado. El límite de detección en los tejidos depende del método de extracción y limpieza. El DA se extrae, en el método de Lawrence *et al.* (1989a), de tejido homogeneizado de mejillones hirviendo durante cinco minutos con HCl 0,1 M, de forma similar al procedimiento de extracción del ensayo en ratón de la AOAC para PSP. La mezcla se enfría y centrifuga, diluyéndose, filtrándose y analizándose una alícuota del sobrenadante por CL isocrática con detector UV a 242 nm.

Si se analizan extractos crudos sin limpiar (sea ácidos o en metanol acuoso), el límite práctico para la cuantificación es de unos 1 µg/g (Lawrence *et al.*, 1989a). Esto es adecuado para la mayoría de los laboratorios de control que trabajan con niveles de contaminación superiores a 20 µg/g. Sin embargo, habitualmente se encuentran interferencias capaces de dar falsos positivos con extractos crudos. Se ha demostrado, por ejemplo, que el triptofano y algunos de sus derivados se encuentran a menudo presentes en concentraciones importantes en tejidos de mariscos y de peces con escamas y que estos compuestos aparecen como elutos próximos al DA. Puede usarse un detector foto-con dispositivo de diodo para examinar espectros UV y para poder confirmar el DA. Un enfoque alternativo es preparar un derivado químico y analizar la muestra comparándola con un estándar conocido que experimentó el mismo proceso. Con estos fines se han desarrollado técnicas de derivatización por reacción con fenil- o butil-isotiocianato o por esterificación con isopropanol (Lawrence *et al.*, 1989b; Lawrence y Ménard, 1991). Una técnica confirmatoria más sofisticada resulta de sustituir el detector UV por espectroscopía de masas con electronebulización y control selectivo de iones (Lawrence *et al.*, 1994). Esta técnica ofrece la posibilidad de confirmar la presencia de DA a niveles bajos, del orden de 0,1 µg/g, sin tratamiento adicional de las muestras.

Quilliam *et al.* (1995) desarrollaron un procedimiento analítico mejorado por CL-UV. Se hace una extracción con metanol acuoso combinado con limpieza por SAX (intercambio aniónico fuerte)-SPE (extracción en fase sólida), resultante en cromatogramas libres de interferencias. Otras ventajas del método de Quilliam *et al.* (1995) sobre el de Lawrence *et al.* (1989a) parecen ser los extractos más

estables, las recuperaciones mayores y un nivel de detección menor (20-30 ng/g). Hatfield *et al.* (1994) modifican ligeramente la etapa de limpieza SPE (extracción en fase sólida) en el método de Quilliam *et al.* (1995). Sustituyen el lavado normal con acetonitrilo al 10 por ciento y solución tampón de citrato de amonio 0,5 M en la solución de elusión de acetonitrilo al 10 por ciento con cloruro de sodio 0,1 M en un lavado con acetonitrilo al 10 por ciento y una solución de elusión de cloruro de sodio 0,5 M en acetonitrilo al 10 por ciento. Este método modificado permite el análisis de muestras de matrices complejas, como las vísceras de cangrejos. Además, el DA es mas estable en elutos de cartuchos SAX SPE, que permiten almacenar las muestras en caso que los análisis no puedan realizarse inmediatamente

Son hasta ahora pocos los métodos de análisis de ASP por CL validados por estudios colaborativos. Solamente el de Lawrence *et al.* (1989a) ha sido así considerado por la AOAC.

Si bien el método de Quilliam *et al.* (1995) fue planeado para un estudio colaborativo de la AOAC, limitantes de tiempo no han hasta ahora permitido hacerlo. En cambio, el Laboratorio Comunitario de Referencia para Biotoxinas Marinas de la UE realizó en 2002/2003 un estudio interlaboratorio de validación, en dos fases, para diversas muestras de mariscos y pescados en Europa. Se ha completado exitosamente la primera fase de familiarización. La segunda fase debiera estar redondeada en 2003. En este estudio de validación participan los Laboratorios Nacionales de Referencia para Biotoxinas Marinas de UE. Si del estudio surgen resultados aceptables, el Comité Europeo de Normalización (CEN) hará del método una norma.

Un grupo de trabajo del CEN en biotoxinas ha normalizado el método de Lawrence *et al.* (1989a) que se encuentra actualmente en la etapa de aprobación como Norma Provisional Europea prEN 14176 (CEN, 2002c).

Se ha informado de un método automático rápido y sensible para determinar DA con CL empleando, un sistema de sustitución de columna con detector UV. Los picos de interferencia resultantes de componentes de la matriz proteica se separan mediante una columna con CL de fase inversa expresamente diseñada para una separación previa. El método es adecuado para extractos de almejas y algas. La muestra se extrae con agua pura y el extracto crudo se inyecta directamente. El sistema de sustitución de columnas eliminó la necesidad de cualquier otra limpieza de la muestra luego de la extracción (Hummert *et al.*, 1997).

Se ha desarrollado un procedimiento muy sensible, basado en la reacción con 9-fluorenilmetilcloroformato para formar un derivado de fluorenilmetoxycarbonilo (FMOC) y análisis CL con detector de fluorescencia, para seguir el DA en matrices marinas como agua de mar y fitoplancton. El límite de detección es bajo, del orden de 15 pg/ml para DA en agua de mar (Pocklington *et al.*, 1990). Se ha adaptado también este procedimiento para extractos de mariscos (Wright y Quilliam, 1995).

Otras técnicas que producen derivados fluorescentes analizados luego de una separación con CL, incluyen el método de Sun y Wong (1999), que utiliza 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato y el de James *et al.* (2000a), que produce un derivado del DA con 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-F). Estos métodos, basados en detección de fluorescencia con CL, no son aun de uso difundido.

electroforesis capilar (EC)

Este método relativamente simple permite separaciones rápidas y de alta resolución de compuestos polares complejos. Se conecta un tubo capilar delgado de sílice fundido conteniendo una solución tampón entre dos contenedores de líquido. Luego de inyectar en el capilar un volumen pequeño de extracto de muestra (usualmente 1-10 nL), se aplica una diferencia de voltaje de 20-30 kV a los extremos del capilar. Las sustancias iónicas migran hacia abajo como bandas delgadas, pasando por un detector (absorbancia UV, fluorescencia) (Wright y Quilliam, 1995). Nguyen *et al.* (1990) informaron un límite de detección de 2 µg/g (relación señal-ruido 5:1) para un extracto tratado de tejido de almeja. De tenerse la precaución de limitar el ingreso de líquido, durante el procedimiento de extracción y de tratamiento del extracto, el extracto tratado resultaba cinco veces menos concentrado que los tejidos. El límite de detección en los tejidos húmedos fue de 10 µg/g. En 10 minutos se separaba fácilmente el DA de los componentes de la matriz de muestra de almejas. Con excelentes límites de detección de masa, el método EC requiere solamente muestras de 3 a 15 nl pudiendo emplearse cuando el tamaño de las muestras está severamente limitado. Zhao *et al.* (1997) estudiaron métodos basados en electroforesis capilar combinada con detector UV. El DA podía analizarse mediante capilares de sílice, en modo catiónico o aniónico, respectivamente con sistemas tampón ácidos o básicos. El mejor comportamiento, por la eficiencia de la separación y duración del análisis, se obtuvo con tampones de fosfato o borato a un pH 9 aproximadamente. El agregado de β-ciclodextrina al buffer de borato permitió una separación del DA y de varios de sus isómeros (ácidos isodomoicos) superior a la obtenida por cromatografía líquida. Además, se desarrolló un procedimiento de extracción y lavado, probado con mejillones, almejas y anchoas. Podía obtenerse un límite de detección de masa de 3 pg de DA inyectado y un límite de detección del método en tejidos de 150 ng/g. La comparación con CL indicó que las dos técnicas ofrecían precisión y exactitud comparables. Las condiciones para la EC desarrolladas por Zhao *et al.* (1997) las aplicaron Piñeiro *et al.* (1999) con algunas pequeñas modificaciones. En sus estudios para optimizar la EC combinada con detector UV/dispositivo de diodo, los autores podían identificar claramente la presencia de DA en algunas muestras contaminadas de navajuelas y en material de referencia: tejido de almeja (NRC CRM-ASP-MUS-b) (ver Capítulo 4.2.4.).

espectrometría de masas

La electronebulización se ha convertido en la técnica predominante para las interfases entre CL y EM, volviendo obsoletos métodos mencionados anteriormente, como (flujo continuo) Bombardeo Atómico Rápido (FAB por sus siglas en inglés) y termospray. Quizás sea, el retiro del contenido de lípidos en los homogenatos, el punto más importante para resolver el problema de la supresión de la señal tan a menudo encontrada en los análisis de extractos de mariscos empleando CL-ESI-EM (ESI= ionización electronebulización).

Hess *et al.* (2001), informaron de experiencias de limpieza y de determinación con CL-EM tanto en el ácido domoico (DA) como en muestras reales. Concluyeron que el lavado de tejidos de mejillón y de vieira mediante cartucho SAX, permitía un seguimiento validado de rutina del DA en mariscos, tanto con CL-UV como con CL-EM, evitando falsos positivos. Afirman “..parece prudente emplear la limpieza SAX para evitar falsos negativos.” (SAX = Intercambio Aniónico Intenso). Por otra parte, Powel *et al.* (2002) concluyeron que un paso adicional con un cartucho SAX SPE no mejoraba significativamente la recuperación del ácido domoico de muestras de cangrejo de arena, y Furey *et al.* (2001) hicieron una limpieza mínima de muestras sin mencionar, para nada, efectos de la matriz.

Furey *et al.* (2001) informaron de un ejemplo de uso extenso de CL-EM múltiple al usar para análisis cuali- y cuantitativo de DA un espectrómetro de masa de captura iónica. En una figura, se indica un camino de fragmentación para el ácido domoico. Se ha demostrado una buena linealidad para CL-EM¹⁻³ para curvas de calibración durante 2-3 décadas obtenidas usando extractos inoculados de tejido de vieira; sin embargo EM⁴ y EM⁵ ofrecieron una linealidad pobre.

En el segundo semestre de 2002, se realizó un estudio interlaboratorio con el nuevo método CL-EM para determinar toxinas ASP y DSP en mariscos (Holland y McNabb, 2003). Los ocho laboratorios participantes en general obtuvieron conjuntos de datos consistentes para el amplio grupo de toxinas analitos, hasta niveles bajos ($< 5\text{ ng/ml}$, equivalente a $0,05\text{ mg/kg}$). Generalmente, la sensibilidad es la adecuada para los LODs requeridos. La mayoría de los participantes pudieron detectar las toxinas analitos; se observaron mayores diferencias para cuantificar algunas toxinas, especialmente en ausencia de normas analíticas. Los participantes han empleado diferentes modos de detección por EM: detección EM simple (SIM/SIR), detección en tandem (MRM), o ambas. Aunque resulte atractivo usar el modo MRM para mejorar la especificidad, requiere cuidados adicionales en la cuantificación. Resumiendo, el estudio resultó muy estimulante para los interesados en métodos alternativos a los bioensayos en ratón, no apoyados por datos de validación estadísticos, que es bien sabido dan un número relativamente alto de falsos positivos, con una capacidad de detección inadecuada para algunas toxinas y que resultan éticamente inaceptables para el seguimiento rutinario de los alimentos. Además, el método 40.105 (el ensayado) detecta confiablemente toxinas ASP y una gama de otras toxinas y metabolitos, por. ej. azaspirácidas y ácidos seco pectenotoxina que pueden no responder a los ensayos en ratón (Holland y McNabb, 2003).

4.2.4 Materiales de referencia

Los materiales certificados son instrumentos útiles para el aseguramiento analítico de la calidad, desarrollados para las ASP y disponibles mediante el Programa de Materiales de Referencia Certificados del Consejo Nacional de Investigación (NRC por sus siglas en inglés) del Canadá (NRC, 2003). El NRC suministra soluciones certificadas de DA para calibración (NRC CRM-DA-d) y material de referencia de tejido de almejas para el DA (NRC CRM-ASP-MUS-b). La NRC CRM-DA-d, es una solución certificada para calibrar instrumentos, que apoya al analista en las determinaciones del DA. Está disponible como un juego de cuatro ampollas, cada una con una solución $0,5\text{ mL}$ de DA disuelta en acetonitrilo/agua ($1:9\text{ v/v}$), con una concentración de $100\text{ }\mu\text{g/mL}$. Es adecuada para calibrar experiencias de cromatografía líquida y para inocular muestras de marisco de control para pruebas de recuperación. La NRC CRM-ASP-MUS-b es una pasta homogeneizada de tejido de mejillón (*Mytilus edulis*) con $36 \pm 1\text{ }\mu\text{g/g}$ de DA, así como varios compuestos relacionados. La NRC CRM-ASP-MUS-b se distribuye también en ampollas, cada una con $8,1 \pm 0,1\text{ g}$ de homogenato de mejillón.

4.3 Organismos fuente y habitat

4.3.1 Organismos fuente

En 1997, la ASP fue sindicada por primera vez en la Isla Príncipe Eduardo en Canadá, siendo el DA la toxina responsable del síndrome (Bates *et al.*, 1989). El DA fue aislado originalmente en la década de los años 1950 de la macroalga roja *Chondria armata* (Ravn, 1995). Dos décadas más tarde, fue detectado en la macroalga roja del Mediterraneo *Alsidium corallinum* (Todd, 1993). Otra diatomea, *Amphora coffaeiformis*, produce también DA (Lundholm *et al.*, 1994).

Se ha supuesto que el origen del DA, en el primer incidente con ASP de 1987, fue el alga roja *Chondria baileyana*, una especie encontrada en aguas de la Isla Príncipe Eduardo. No obstante, la diatomea *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* era señalada como productora del DA y el brote de intoxicación en seres humanos se rastreó hasta cholgas de cultivo (*Mytilus edulis*) contaminados con fragmentos identificables de *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* (Bates *et al.*, 1989).

El DA es producido por *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries* tanto en condiciones de cultivo como de campo (Hasle y Fryxell, 1995). En la Bahía de Fundy en el sudoeste de Canadá, *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* pareció ser el organismo productor del DA responsable de niveles inaceptables en mariscos para consumo humano (Martin *et al.*, 1993).

Extrañamente, no produjeron DA los aislados de *P. pseudodelicatissima* de la Bahía de Galveston (Texas), de la Bahía de Massachusetts (Massachusetts), de la Bahía de Monterey (California) y también de Dinamarca y Australia (Bates, 2000).

El ASP apareció también en la Costa Oeste de los Estados Unidos causando muerte de pelícanos y cormoranes, luego de alimentarse con anchoas contaminadas con DA. En esa zona, la diatomea *Pseudo-nitzschia australis* pareció ser el organismo fuente (Wright y Quilliam, 1995). También *Pseudo-nitzschia australis* produjo DA tanto en condiciones de cultivo como de campo (Hasle y Fryxell, 1995).

Se encontró que *Pseudo-nitzschia delicatissima* (syn. *Nitzschia actydropbila*) y *Pseudo-nitzschia seriata* producían DA bajo condiciones de cultivo (Hasle y Fryxell, 1995). *Pseudo-nitzschia pungens* y *Pseudo-nitzschia multiseriata* (syn. *P. pungens* f. *multiseriata*) son ahora considerados especies separadas en razón de diferencias morfológicas y genéticas (Wright y Quilliam, 1995).

Rhodes *et al.* (1998) informaron la presencia de DA en cultivos de *Pseudo-nitzschia fraudulenta* y *Pseudo-nitzschia turgidula* originarios de Nueva Zelanda. Originalmente se encontró *P. multistriata* en aguas japonesas (Bates, 2000), aunque se demostró recientemente que aislados del Golfo de Nápoles producen DA (Sarno y Dahlmann, 2000). Se informó haber aislado una diatomea productora de DA (Kotaki *et al.* (2000)), de un estanque de langostinos de cultivo en VietNam, posteriormente identificado como *Nitzschia navis-varingica* (Lundholm y Moestrup, 2000). Kotaki *et al.* (2000) compararon los niveles celulares de DA de *Nitzschia navis-varingica* con los de otra especie productora, *Pseudo-nitzschia*. Los niveles celulares de DA en *Nitzschia navis-varingica* eran comparables a los presentes en *P. multiseriata* y *P. seriata*, menores que en *P. australis*, pero mayores que en *P. turgidula* y *P. pungens*.

4.3.2 Condiciones favorables para el crecimiento

Las floraciones tóxicas de *Pseudo-nitzschia* pueden convertirse en un fenómeno recurrente, y resulta importante determinar si existe alguna predictabilidad estacional o espacial. Desde el primer incidente con ASP en Canadá en 1987, se ha estudiado intensamente la auto ecología de *P. pungens* f. *multiseriata*. Aunque se ha informado porque domina con temperaturas más frías, es capaz de sobrevivir hasta 30 °C (Villac *et al.*, 1993a). Se concluyó que el crecimiento y la fotosíntesis óptimos de *P. pungens* f. *multiseriata* se daban en rangos de temperatura entre 15-20 °C. Sin embargo, se han observado floraciones mono-específicas de *P. pungens* f. *multiseriata* a fines de otoño o en invierno, con bajas temperaturas prevalentes del agua (-1 a 3 °C). Como la temperatura óptima de crecimiento es muy superior a ésta, es evidente que otros factores han de haber iniciado el desarrollo de las floraciones (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Se observaron las velocidades de crecimiento más altas para *P. pungens* f. *multiseriata* a 20° y 25°C (Lewis *et al.* (1993)). Las concentraciones más altas de células estacionarias tuvieron lugar entre 5° y 15°C, disminuyendo entre 20° a 25°C.

Los movimientos verticales de agua fría con concentraciones de nitrógeno elevadas (como las encontradas en la Bahía de Monterey, California) pueden haber estimulado el crecimiento de las poblaciones de *P. pungens* f. *multiseriata* (Villac *et al.*, 1993b). Se ha informado de aumentos de la cantidad de células, aun con pequeños movimientos verticales de agua. Desde 1991 a 1994 en la Costa Oeste de los Estados Unidos las floraciones de *P. australis* eran muy comunes, persistiendo por más tiempo durante fines del verano y otoño, cuando las condiciones hidrográficas se asocian con el final de la estación de los movimientos verticales de aguas, usualmente caracterizadas por temperaturas superficiales mayores, estratificación térmica y menores concentraciones de nutrientes. Los nutrientes pueden resultar aun más importantes para el crecimiento del fitoplancton que los efectos directos de los cambios estacionales de temperatura. *P. seriata*, otra productora de DA de la especie *Pseudo-nitzschia*, se encontró desde el Mar de Barents cerca de Spitsbergen al norte, a

Alemania en el sur (Bahía de Kiel en el Báltico) y en el Atlántico occidental desde las costas oeste y este de Groenlandia a los 45°N en Canadá. Sólo durante el invierno alcanzaba latitudes bajas la *P. seriata*, limitada a aguas frías. Es conocida en el Pacífico desde Alaska a la Columbia Británica/Washington y también puede presentarse en el norte de Japón.

La producción de DA varía ampliamente de una especie a otra dentro del género *Pseudo-nitzschia*, y es vital poder distinguir las especies. No está aun clara la relación entre la producción de DA por *Pseudo-nitzschia* spp. y las condiciones ambientales.

Las condiciones en zonas poco profundas con circulación restringida pueden favorecer el estrés requerido para iniciar la producción de DA, junto con el necesario exceso de nitrógeno inorgánico (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Aun la producción de toxina de la misma especie puede variar con la zona. Por ejemplo, *P. pseudodelicatissima* de la Bahía de Fundy, New Brunswick, Canadá, causó niveles altos de DA en mariscos tipo molusco, en tanto que no lo produjeron aislados de la especie de la Bahía de Galveston (Texas), Bahía de Massachusetts (Massachusetts), Bahía de Monterey (California), Dinamarca y Australia (Bates, 2000).

El pico de la floración de *P. pungens* f. *multiseries* en Canadá en 1987 sucedió luego de un periodo inusualmente seco a fines del verano, seguido de una intensa tormenta con lluvias a comienzos de setiembre. Se encontró una relación entre pulsos de disponibilidad de nitratos y picos de *P. pungens* f. *multiseries*, atribuida fundamentalmente a desbordes de agua dulce luego de las lluvias (Villac *et al.*, 1993a; Villac *et al.*, 1993b). Los estudios de densidad poblacional en el estuario del río Cardigan (Isla Príncipe Eduardo, Canadá) indicaron que podrían requerirse densidades celulares de aproximadamente 3×10^5 por litro antes que los mariscos superasen el nivel de tolerancia de DA para consumo por seres humanos de 20 mg/kg (Dickey *et al.*, 1992a). El incidente con DA en el otoño de 1991 en aguas del estado de Washington en la costa oeste de los Estados Unidos, ocurrió también luego de un periodo muy caluroso y seco de 45 días de duración, seguido de lluvias a mediados de octubre (Horner y Postel, 1993).

En estudios en cubeta de cultivos *P. multiseries*, la producción de DA tuvo sólo lugar en la fase estacionaria, no resultando evidente durante la fase de crecimiento exponencial (Bates *et al.*, 1991). Sin embargo, en estudios posteriores con cultivos (Bates, 2000), se encontró que la producción de DA por *P. multiseries* y *P. seriata* comenzaba a fines de la etapa exponencial para continuar con mayor rapidez durante la fase estacionaria. En cambio, *P. australis* y *P. pseudodelicatissima* produjeron DA durante la mayor parte de la fase exponencial y no durante la estacionaria. Para la *P. pseudodelicatissima* la información no es del todo consistente, pues un aislado de aguas de Washington produjo DA tanto durante el final de la fase experimental como en la estacionaria (Bates, 2000). La dinámica de la producción de DA por *Nitzschia navis-varingica* fue estudiada por Kotaki *et al.* (2000), encontrando la misma dinámica que para *P. multiseries* y *P. seriata*, es decir, comienzo de la producción de DA durante el final de la fase exponencial, acelerándose en la estacionaria.

La producción de DA por *P. seriata* parecía también depender de la temperatura, produciéndose cantidades mayores a 4°C que a 15°C (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Lewis *et al.* (1993) demostraron que la velocidad de producción de DA por *P. pungens* f. *multiseries* durante la fase estacionaria de crecimiento podía reducirse de manera importante disminuyendo ligeramente la temperatura. Sin embargo, aunque las concentraciones y velocidades de producción de DA eran bajas a temperaturas bajas, altos rendimientos celulares podían permitir una producción de DA suficiente como para volver tóxicos a los mariscos tipo molusco. Los estudios de Lewis *et al.* (1993) además demostraron que las densidades experimentales de flujo de fotones no tenían efecto evidente sobre la velocidad inicial de producción de DA o sobre la de crecimiento de *P. pungens* f. *multiseries*.

Bates *et al.* (1991) afirmaron que se requería disponer de nitrato extra-celular o de otra fuente de nitrógeno y de luz para producir DA durante la fase estacionaria. También se ha señalado como favoreciendo la producción de DA el estrés de en *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries*.

La producción de DA se vio muy favorecida al aplicarse a la población de algas un estrés severo luego de un periodo de crecimiento activo. La producción se aceleró unas tres veces durante el periodo de transición desde el estado estacionario al de cultivo en cubeta, donde se enlenteció, disminuyendo la absorción de silicato o fosfato (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Pseudo-nitzschia especie *P. australis*, fue identificada en el incidente con DA de 1991 en la Bahía de Monterey (California) en la costa oeste de los Estados Unidos, siendo un habitante frecuente de estas aguas. Al momento de la floración de *P. australis* en 1991, en la zona de la Bahía de Monterey culminaba la estación seca anual; las aguas estaban con estratificación moderada, la temperatura superficial del agua era de 13-14 °C, la salinidad 30-33 ‰ y relativamente agotados los nutrientes. Este agotamiento era común hacia fines del verano y en otoño, luego del periodo estacional de movimiento vertical de las aguas (Villac *et al.*, 1993a). La relativamente confinada Bahía de Monterey ha sido caracterizada como una zona bajo “la sombra de persistentes movimientos verticales de agua”; una región en que el agua está atrapada por un frente a lo largo de la costa que limita el flujo desde las zonas próximas a la costa. Se ha sugerido que los niveles celulares de DA en *P. australis* correlacionan con las concentraciones de silicatos (Bates *et al.*, 1991). Se examinaron, en estudios sobre cultivos en cubeta y continuos, los efectos limitantes sobre la producción de DA de silicatos y fosfatos por *P. multiseries*. Se probó que una mayor producción de DA tenía lugar con poco silicato, aun con la misma velocidad de crecimiento. Es muy posible que las floraciones naturales de *P. multiseries*, causantes de importantes cantidades de DA, estuvieran con un severo estrés de silicatos. Una fluoración anterior de otra diatomea o una fluoración prolongada de *P. multiseries* pueden agotar el silicato en el agua de mar. En el pico de la fluoración de *P. Multiseries*, tóxica, en la Bahía de Cardigan, Canadá en diciembre de 1987, la concentración de silicato era baja, del orden de 0,62 µM. el pico del DA ocurrió 10 días después. Se demostró que era favorecida también la producción del DA por limitantes en la cantidad de fosfatos en el medio de cultivo. La competencia entre velocidades de producción del DA altas en estado estacionario, con velocidades bajas de absorción de nutrientes y con niveles elevados de trifosfato de adenosina (ATP) indica además, que la síntesis del DA requería cantidades importantes de ATP como fuente de energía biogénica (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

La producción de DA por *P. multiseries*, según un estudio de Pan *et al.* (1998), parecía verse favorecida al estresarse el metabolismo primario limitando el Si, P y quizás otros nutrientes esenciales como vitaminas y metales traza. Al limitárselos, estos nutrientes esenciales pueden:

- disminuir el metabolismo primario, haciendo disponibles los precursores necesarios, compuestos de elevada energía y cofactores, y
- favorecer la expresión de genes involucrados en la biosíntesis del DA. La síntesis del DNA y la progresión a lo largo del ciclo de división celular, que limitaciones de Si y P, endentecen, quizás prolongando o deteniendo las células en la etapa del ciclo de división mas propicio para producir DA.

Sin embargo, la limitación de nitrógeno resulta en una cantidad insuficiente de N celular libre, que restringe la síntesis de esta toxina nitrogenada. Se necesita para la síntesis del DA una provisión continuada de intermediarios fotofosforilados de alta energía (por ej. ATP y NADPH).

Subba Rao *et al.* (1998) informaron que cultivos de *P. multiseries* producían niveles sustancialmente más elevados de DA (230 fg/célula) al ser enriquecidos con litio (385,6 µM) que los cultivos de control (135 fg/célula). El nitrógeno, fosfato o silicato no eran limitantes en los cultivos.

Se ha especulado que los eventos con DA podrían limitarse a estaciones en las que la estratificación y agotamiento de los nutrientes ocurrían o estaban limitados a zonas costeras en las que el desarrollo de floraciones agotaba los nutrientes disueltos. Sin embargo, las observaciones de campo en la Bahía de

Monterey demostraron que el DA era producido por *P. australis*, de células grandes, a bajas densidades celulares y concentraciones de nutrientes moderadas (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Se ha informado que los cultivos axénicos de *Pseudo-nitzschia multiseries* producen menos DA que los cultivos bacterianos originales. Se volvieron a introducir individualmente las cepas bacterianas aisladas de dos clones no axénicos de *P. multiseries*, en cultivos de tres cepas axénicas de *P. multiseries*. La bacteria no afectó sustancialmente las velocidades de división o los rendimientos celulares. Sin embargo, mejoraron de 2 a 95 veces la producción de DA (por célula) en relación al cultivo axénico, dependiendo de la *P. multiseries* y de la cepa bacteriana empleadas (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Para comprender mejor los mecanismos de producción de DA por *P. multiseries*, se requieren más estudios que aclaren:

- los detalles del camino biosintético
- la regulación de las enzimas involucradas en el camino
- la relación entre síntesis de DA y el ciclo de división celular
- la compartimentalización celular de la biosíntesis del DA
- otros factores ambientales que pueden desencadenar la producción de DA

Además, estos estudios debieran ampliarse a otras especies *Pseudo-nitzschia* productoras de DA diferentes de *P. multiseries*, para confirmar estos mecanismos comunes (Pan *et al.*, 1998).

4.3.3 Hábitat

Pseudo-nitzschia son diatomeas ampliamente distribuidas y según Hasle y Fryxell (1995; a menos que se indique otra cosa) las diferentes especies mencionadas en el Capítulo 4.3.1 se encuentran en las aguas siguientes:

P. multiseries:

Atlántico: aguas de Norte América, Europa, y Sur América.

Pacífico: aguas de Norte América y nordeste del Asia, Japón (Kotaki *et al.* 1999).

P. pseudodelicatissima:

Atlántico: aguas de Europa y África (Estrecho de Dinamarca a África del noroeste, incluyendo las aguas costeras noruegas y danesas, Skagerrak, Bahía de Kiel), Canadá y EEUU (Ártico al Golfo de México) y América del Sur (Argentina) (Ferrario *et al.*, 1999).

Pacífico: aguas de California y Columbia Británica, aguas costeras de Penn Cove, Washington (Trainer *et al.*, 1998a).

P. australis

Atlántico: aguas costeras de España, Portugal, África del suroeste y Argentina.

Pacífico: aguas costeras de Perú, Chile, Nueva Zelanda, México (Golfo de California) (Hernández-Becerril, 1998), costa oeste de América del Norte desde San Diego (California) a Puget Sound, Washington, Columbia Británica.

P. delicatissima

Atlántico: aguas costeras noruegas, aguas danesas, Skagerrak, África del noroeste, Rhode Island y Argentina (Negri y Inza, 1998) y aguas costeras de los Estados Unidos (Louisiana) (Parsons *et al.*, 1998).

Pacífico: California.

P. pungens

Atlántico: aguas costeras de Argentina (Ferrario *et al.*, 1999) y aguas costeras de EEUU (Louisiana) (Parsons *et al.*, 1998).

Pacífico: aguas costeras de los Estados Unidos (Penn Cove, Washington) (Trainer *et al.*, 1998a) y México (Golfo de California) (Hernández-Becerril, 1998)

Aguas costeras de Nueva Zelanda (Rhodes *et al.*, 1998)

Mar del Japón, Bahía de Pedro el Grande, la Federación Rusa (Orlova *et al.*, 1998).

P. seriata

Mar de Barents (ca. 80°N), Mar Noruego, Mar del Norte, aguas costeras noruegas, Skagerrak, Bahía de Kiel, Canal de la Mancha, Groenlandia hasta Terranova (45°N), Alaska, Columbia Británica.

Aguas costeras de Argentina (Negri y Inza, 1998).

P. multistriata

Aguas costeras japonesas y en el Golfo de Nápoles, Italia (Bates, 2000).

P. turgidula

Aguas costeras de Nueva Zelanda (Rhodes *et al.*, 1998).

P. fraudulenta

Aguas costeras de Nueva Zelanda (Rhodes *et al.*, 1998).

Aguas costeras de Argentina (Negri e Inza, 1998)

Nitzschia navis-varingica

Aislado de un estanque de cultivo de mariscos en VietNam (Kotaki *et al.*, 2000; Lundholm y Moestrup, 2000).

4.4 Presencia y acumulación en frutos del mar

4.4.1 Absorción y eliminación de toxinas ASP en organismos acuáticos

Los mariscos (moluscos bivalvos, gastrópodos, cangrejos, langostas y otros) acumulan ficotoxinas por filtración directa de las células del plancton o al alimentarse directamente con organismos contaminados (por ej. carnívoros y necrófagos). Deben evitarse las generalizaciones relativas a la absorción y retención de ficotoxinas por mariscos. La velocidad de acumulación de algas tóxicas (o toxina) por mariscos que se alimentan por filtración es específica para cada especie y en la mayoría de los casos esta relacionada directamente con la cantidad de células disponibles a los animales. La velocidad de acumulación de algas tóxicas es muy variable para una zona dada. La velocidad de eliminación de la toxina depende de la estación, retardando las bajas temperaturas la pérdida de toxina; sin embargo, no está bien entendido el grado en que la temperatura afecta la absorción y liberación de toxinas. Además, la velocidad de eliminación depende mucho del lugar donde esté almacenada la toxina en el animal, por ej. las toxinas del tracto gastrointestinal son eliminadas mucho más fácilmente que las toxinas unidas a tejidos. En la cholga (*Mytilus edulis*) y la ostra (*Crassostrea virginica*) el grueso del DA reside en los intestinos.

La mayor parte de la información disponible es relativa a moluscos bivalvos. Se ha demostrado que el DA depura de los mejillones bastante rápido (Villac *et al.*, 1993a).

El nivel de DA en mejillones en ausencia de *Pseudo-nitzschia* es menor a 1 µg/g. Se necesitó una concentración mínima de $2-4 \times 10^5$ *Pseudo-nitzschia* células por litro durante por lo menos tres a cuatro semanas para producir 20 µg DA por g mejillones en la Isla Principe Eduardo, al este de Canadá (Todd, 1993). Cuando a los cholgas (*Mytilus edulis*) se les ofreció DA disuelto, durante 24 horas, (125 nM; a 5°C; salinidad 28 •) o como alimento encapsulado en liposomas, <1% de DA disuelto y hasta un 6 por ciento del DA contenido en el alimento se incorporó a los tejidos de mejillón. El DA absorbido de la solución estaba más concentrado en agallas y riñones, en tanto que el DA

ingerido como alimento lo estaba en glándulas digestivas y riñones. Las concentraciones más bajas de toxina eran retenidas en gónadas, músculo, pie y tejido conectivo. Los niveles de DA en los tejidos de mejillón no disminuyeron de manera consistente en un periodo de depuración de 48 horas, ni pareció que el DA se transfiriese a tejido alguno para su almacenamiento. Se eliminaron cantidades pequeñas de DA en las heces y disueltas otras más grandes (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Estudios preliminares de alimentación con el mejillón Greenshell (*Perna canaliculus*) de Nueva Zelanda, al que se proporcionó *P. pungens* f. *multiseries* mostraron contaminación de los mejillones con DA aunque la toxina fue eliminada rápidamente al cesar la alimentación. Bajo algunas condiciones las velocidades de excreción e ingestión eran equivalentes, no acumulándose en los tejidos (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Al exponerse continuamente durante 40 horas a la diatomea productora de DA *P. pungens* f. *Multiseries*, seguidas de un periodo de liberación de 120 horas, ostras del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y mejillones californianos (*Mytilus californianus*), la carga tóxica era superior en la ostra del Pacífico luego de cuatro horas de exposición (36,3 µg/g; con los niveles más altos en tejido blando 32,9 µg/g). Sin embargo, con una exposición de cuatro horas la ostra del Pacífico cerró su caparazón disminuyendo la carga tóxica del cuerpo. Las agallas, músculo y tejido blando aun presentaban niveles detectables de DA pasadas las 120 horas del periodo de liberación. La carga de DA en el mejillón californiano alcanzó también un máximo pasadas las cuatro horas de exposición (3,6 µg/g; nivel más alto en el tejido de las agallas 2,5 µg/g). Pasadas las 24 horas del periodo de liberación, no se observaron niveles detectables en el manto, agallas o tejido blando. Sólo de encontraron trazas en el tejido muscular luego de 24 horas de depuración (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

La depuración de navajuelas no es muy rápida. En éstas, se encontraron niveles superiores de DA concentrados en los tejidos musculares comestibles y otros menores en partes de tejidos no edibles. Cuando las velocidades de depuración son lentas, valores bajos de DA pueden resultar en intoxicaciones, como con navajuelas. En consecuencia, la presencia continua de diatomeas productoras de DA con densidades bajas, puede resultar en concentraciones elevadas a largo plazo en la almeja.

En anchoas, se encontró el DA en las vísceras y en el músculo del pescado (Villac *et al.*, 1993a). Se informó que la vieira (*Argopecten irradians*) absorbe hasta 60 µg/g del DA en la glándula digestiva pasadas unas 84 horas de exposición a *P. multiseries* tóxica. Los niveles de DA disminuyeron a 5 µg/g luego de una depuración de 48 horas (Douglas *et al.*, 1997).

Al alimentar vieiras (*Placopecten magellanicus*) con células de *P. multiseries* con alto contenido de DA (4-6,6 pg/célula) durante 22 días, seguidos de 14 días de alimentación con microalgas no tóxicas, el DA fue incorporado dentro de las 24 horas con absorciones incrementadas pasados seis días. El orden de concentración del DA concentrado en tejidos era: glándula digestiva >> restante tejido blando >> músculo aductor. En la glándula digestiva se registró un máximo de 3 108 µg/g; sin embargo, sólo se encontraron cantidades traza (0,7-1,5 µg/g) en el músculo aductor. Al final de la exposición, se había incorporado a los tejidos el 50,9 por ciento del DA proporcionado. El nivel de DA en la glándula digestiva, 14 días después de finalizada la dieta tóxica permaneció elevado, 752 µg/g durante la experiencia; no hubieron de enfermedad o mortalidad de las vieiras marinas señales atribuibles a una carga elevada de DA. Sin embargo, el muestreo destructivo de las vieiras no permitió evaluar los efectos de largo plazo (Douglas *et al.*, 1997). El mejillón (*Modiolus modiolus*) retuvo también DA por periodos prolongados (Stewart *et al.*, 1998).

Se estudió la distribución anatómica del DA en vieiras (*Pecten maximus*). En un estudio, solamente se analizaron hepatopáncreas, músculo y gónadas. En un segundo, se analizaron combinados hepatopáncreas, músculo y gónadas y los restantes tejidos blandos. En el primer estudio el 98,8 por ciento del contenido de DA total (en hepatopáncreas, gónada y músculo) estaba localizado en el hepatopáncreas y, en el segundo (que incluía el total de tejido), el 79,3 por ciento del contenido total

de DA se localizaba en el hepatopáncreas; cantidades despreciables se encontraron en las gónadas y músculo y alrededor del 14,5 por ciento en los restantes tejidos blandos (Arévalo *et al.*, 1998).

Stewart *et al.* (1998) apuntaron a la alta posibilidad de que las bacterias autóctonas podrían resultar un factor significativo en la eliminación de DA en especies de moluscos que lo depuran fácilmente. Esto se demostró con cholgas *Mytilus edulis* y almejas *Mya arenaria*. Stewart *et al.* (1998) sugirieron diferentes mecanismos utilizados por diferentes mariscos con el DA, fácilmente disponible en cholgas y algunos tipos de almejas, pero retenido probablemente en las glándulas digestivas de sea vieiras y mejillones rojos y en consecuencia, no disponible en gran medida para uso bacteriano.

Se dispone de pocos datos sobre tiempos de retención de toxinas en cangrejos y gastrópodos carnívoros; la tendencia general en estos organismos apunta a retenciones prolongadas. Se informó un periodo de retención superior a los dos años para *Siliqua patula*, con una especie no identificada de *Pseudo-nitzschia* como fuente de la toxina (Shumway *et al.*, 1995).

Se observó una disminución del contenido de DA de 50 µg/g a 5 µg/g en 72 horas en cholgas del incidente de 1987 en Canadá (fuente de toxina *P. pungens* f. *multiseries*), en tanto que en navajuelas del incidente de 1991 en la Bahía de Monterey (California) 1991 (fuente de toxina *P. australis*) la disminución de 47,9 µg/g a 44,3 µg/g se procesó en tres meses (Villac *et al.*, 1993a). Cangrejos Dungeness (*Cancer magister*) acumularon la toxina principalmente en las vísceras, aunque durante la cocción pueden penetrar la carne de no haber sido los cangrejos eviscerados previamente (Villac *et al.*, 1993a). Cuando cangrejos Dungeness se alimentaron con DA por medio de carnes contaminadas de navajuela, durante seis o nueve días, los análisis de los cangrejos crudos indicaron que el DA se acumulaba rápidamente, confinándose a las vísceras, principalmente en el hepatopáncreas (22 µg/g). No se detectó DA ni en carnes del cuerpo o patas del cangrejo crudo (Hatfield *et al.*, 1995). Los estudios de Lund *et al.* (1997) muestran también que los cangrejos Dungeness absorbieron DA rápidamente (por carne contaminada de almeja) y acumularon el DA sólo en el hepatopáncreas. El DA fue eficazmente depurado del hepatopáncreas (por las heces) en un periodo de tres semanas, finalizada la alimentación toxica. La depuración se aceleró más cuando los cangrejos se alimentaron con raciones libres de toxinas que cuando se los privó de alimento.

Arévalo *et al.* (1998) informaron que la disminución media de la toxicidad de las muestras de tejido total estándar de vieira (*Pecten maximus*), homogeneizadas de 100 g de tejido total) sin incluir el hepatopáncreas fue del 94 por ciento (variando entre 82,3 a 100 por ciento).

4.4.2 Mariscos con toxinas ASP

Mejillones de cultivo (*Mytilus edulis*) muestreados durante el primer brote de intoxicación por ASP en el este del Canadá (Isla Príncipe Eduardo) en el otoño de 1987, contenían hasta 790 µg DA/g tejido húmedo (mejillón entero) (hasta 1 280 y 1 500 µg/g en tejido blando y glándula digestiva, respectivamente) (Bates *et al.*, 1989; Todd, 1997). En agosto-octubre de 1988, se detectó también DA en cholgas y en *Mya arenaria* del sudoeste de la Bahía de Fundy, Canadá (Martin *et al.*, 1993).

Se detectó DA en octubre de 1991 en navajuelas (*Siliqua patula*) de los estados de Oregon y Washington en los Estados Unidos. Los valores más elevados ocurrieron en la primera semana de diciembre de 1991 (el nivel máximo en la parte edible era de 147 µg/g y el nivel promedio de 106 µg/g para todas las playas del estado de Washington). Los tenores de DA en las almejas permanecieron por encima de los niveles de cierre reglamentarios de 20 µg/g por al menos seis meses. Los niveles de DA disminuyeron a menos de 10 µg/g a fines de la primavera de 1992. Desde la primavera de 1992 hasta la de 1993, los niveles de DA eran menores a 5 µg/g en la mayor parte de las zonas de muestreo costeras. El DA parecía distribuirse en las diversas partes del cuerpo de la navajuelas. El nivel superior se encontró en el pie, seguido del cuerpo, vísceras y sifón (o cuello). El nivel de DA en el pie de la navajuela alcanzó 230 µg/g (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Se informó que las vieiras (*Argopecten irradians*) absorben DA hasta niveles de 60 µg/g en la glándula digestiva luego de una exposición de 84 horas al *P. multiseriatus* tóxico. Los niveles de DA disminuyeron a 5 µg/g luego de una depuración de 48 horas (Douglas *et al.*, 1997). Una mortalidad inexplicada de vieiras marinas (*Placopecten magellanicus*), en el otoño de 1993, ocurrió en la Bahía de Fundy, Canadá. La glándula digestiva de las vieiras parecía contener 93,4 µg DA/g. Aunque se ha informado que algunos moluscos bivalvos contienen niveles elevados de DA, sin síntomas, *Chlamys hastata* murió rápidamente, dentro de las 12 horas, luego de una exposición a cultivos tóxicos de *P. multiseriatus*, (Douglas *et al.*, 1997). Rutinariamente se encuentran cantidades importantes de DA en las glándulas digestivas, pero no en los músculos aductores de vieiras, en zonas próximas a la costa en Canadá en Georges Bank, Browns Bank y la Bahía de Fundy (Stewart *et al.*, 1998).

4.4.3 Otros organismos marinos con toxinas ASP

Se detectó DA sólo en las vísceras de cangrejos Dungeness (*Cancer magister*) de los estados de Washington y Oregon en los Estados Unidos. Los niveles de DA en las vísceras crudas de cangrejos individuales del estado de Washington en diciembre de 1991 promediaron 13 µg/g con una variación de 0,8 a 90 µg/g. Los niveles promedio más elevados de DA en cangrejos del estado de Washington se encontraron en muestras de Grays Harbor y de la Bahía de Willapa, respectivamente 32 y 31 µg/g. En 1992, los niveles promedio de DA eran menores a 5 µg/g en muestras pre-estacionales de cangrejos Dungeness retirados a lo largo de las costas de Oregon y Washington, con variaciones de 0 a 71 µg/g. Se registraron los mayores niveles de DA en 1992 (36-71 µg/g) en muestras retiradas desde enero a abril (Wekell *et al.*, 1994a, b). No estaba clara la fuente inmediata de DA para cangrejos Dungeness, considerados predadores y necrófagos oportunistas en el bentos marino. Es posible que se alimenten con navajuelas submareas tóxicas, aunque algunos habitan en zona de oleaje y otros persisten en regiones submareas. Por otra parte, se observaron también niveles elevados de DA en cangrejos provenientes de zonas con pocas o ninguna navajuela. Deben en consecuencia considerarse otras fuentes de DA béntico (Wekell *et al.*, 1994a).

Se encontró también DA en crustáceos bénticos, aunque no se han fijado las fuentes y caminos de transferencia a la comunidad béntica y no hay estudios realizados para determinar como la toxina acumulada podría afectar a los consumidores secundarios (Horner *et al.*, 1997).

En setiembre de 1991, murieron aves acuáticas, (pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) y cormoranes (*Phalacrocorax penicillatus*)) en la Bahía de Monterey, California, luego de consumir anchoas (*Engraulis mordax*) contaminadas con DA. En las vísceras de las anchoas se detectaron hasta 485 µg/g DA. Muestras de anchoas congeladas recogidas en abril de 1991, parecían contener en sus vísceras 270 µg/g de DA. En mayo, los niveles de DA en muestras de anchoas de la misma zona contenían menos de 1 µg/g. Las anchoas son primariamente carnívoras, aunque consumen fitoplancton de no haber otras fuentes de alimentación disponibles (Wekell *et al.*, 1994a). McGinness *et al.* (1995) demostraron que el estómago de las anchoas del norte (*Engraulis mordax*) de la Bahía de Monterey, California, (agosto de 1992) contenía nueve especies diferentes de *Pseudo-nitzschia*, inclusive cuatro productoras de DA, tanto en condiciones naturales como de laboratorio. El estudio demostró que las anchoas del norte son capaces de filtrar diatomeas emplumadas del agua de mar próxima a la superficie.

En enero de 1996, se atribuyó la muerte de pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) en el Cabo San Lucas en el extremo de la Península de Baja California (México) a la alimentación con caballa (*Scomber japonicus*) contaminado con *Pseudo-nitzschia* spp., productor de DA (Sierra-Beltrán *et al.*, 1997).

Más de 400 leones marinos californianos (*Zalophus californianus*) murieron a lo largo de la costa central de California en mayo y junio de 1998. El probable agente causante es el DA producido por *P. australis* y transmitido a los leones marinos por las anchoas septentrionales planctívoras (*Engraulis mordax*). Las mayores concentraciones de DA se encontraron en las vísceras (223 µg/g), con valores

siete veces superiores a los de los tejidos del cuerpo. Los niveles de DA analizados por CL en las heces de los leones marinos variaron de 136, 5 a 152 $\mu\text{g/g}$ (que necesita corregirse por interferencias de un compuesto no identificado; el ensayo de enlace con receptor correspondía con los valores por CL con un factor de dos) (Lefebvre *et al.*, 1999).

4.5 Toxicidad de las ASP

4.5.1 Mecanismo de acción

Se conoce el mecanismo de acción del DA en receptores de amino ácidos excitables y en transmisión sináptica. Los amino ácidos excitables, notoriamente L-glutamato y L-aspartato, son considerados desde hace tiempo como los neurotransmisores más probables. Se sabe que actúan sobre varios tipos de receptor, los mejor caracterizados reciben los nombres de los estimulantes exógenos selectivos N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato y quisqualato.

El DA es un análogo de glutamato que se une con alta afinidad a receptores glutamato del tipo quisqualato. El glutamato y también la subclase NMDA abriendo los canales de membrana permeables al Na^+ , resultando en entrada de Na^+ y despolarización de la membrana. Sólo el canal abierto por un receptor NMDA accesible al cainato, quisqualato y al DA, es además, altamente permeable al Ca^{2+} e inducía la entrada del Ca^{2+} celular con efectos letales. Las acciones sobre los receptores NMDA pueden antagonizarse selectivamente mediante concentraciones micromoleculares de iones magnesio; antagonistas orgánicos como el D-2-amino-5-fosfonovalerato (APV) y anestésicos disociativos, como la fenciclidina (Viviani, 1992). El ácido cinurenico, administrado intraperitonealmente a ratones, resultó un protector poderoso y significativo contra la neurotoxicidad inducida con extractos de mejillón (Pinsky *et al.*, 1989). Se ha considerado el uso como antídoto, para la intoxicación con domoato, de drogas que bloquean el receptor sensible al domoato (Lavery, 1993). El DA es un neuroexcitante dos a tres veces más potente que el ácido cainico, con el que está estructuralmente relacionado y hasta 100 veces más potente que el ácido glutámico. Es posible un efecto sinérgico entre el DA y otros amino ácidos neurotóxicos habitualmente presentes en mejillones (Ravn, 1995). El DA tiene dos blancos primarios en el sistema nervioso central: la formación hipocampal y sus regiones asociadas involucradas en los procesos de la memoria y, la región de la región peduncular del área postrema y núcleo del tracto solitario asociado con la función visceral (Peng *et al.*, 1994).

4.5.2 Farmacocinética

estudios en animales de laboratorio

La absorción del DA administrado oralmente a ratas es pobre, como lo demostrara la recuperación casi completa en las heces, sugiriendo que, comparado con seres humanos, la absorción de DA puede reducirse en roedores. Todo el DA se recuperó en la orina en 160 minutos y la excreción no se vio afectada por co-administración de probenecida, inyectada por vía intravenosa, para eliminar el impacto de la absorción. Los resultados de este estudio indican que el DA fue liberado del plasma por los riñones y, más específicamente por el proceso de filtración glomerular. La vida media del plasma en ratas fue de 21,6 minutos comparada con 114,5 minutos en monos. La eliminación seis veces más rápida del DA en ratas es al menos parcialmente responsable por su falta de sensibilidad comparada con monos (ver también el Capítulo 4.5.3) (Iverson y Truelove, 1994). No hubo evidencia de ninguna biotransformación del DA por el roedor o el primate ya que siempre se ha recuperado incambiado (Todd, 1993).

En ratones ICR hembra, la liberación del DA del suero fue mayor del 95 por ciento, luego inyectada i.p. una única vez con dosis entre 0,25 a 4,0 mg/kg pc a las dos horas; pasadas cuatro horas la liberación era completa (Peng y Ramsdell, 1996).

El DA no penetra bien la barrera sangre-cerebro en ratas adultas, ratones, monos y seres humanos. Se ha encontrado, sin embargo, que el DA es muy tóxico para ratones recién nacidos y ratones fetales *in utero*, dónde el DA claramente induce excitotoxicidad hipocampal. Se ha informado recientemente, que el DA era extremadamente neurotóxico para las ratas neonatas a niveles de exposición 40 veces inferiores en base peso corporal que los indicados para animales adultos. Una barrera sangre-cerebro no aun completa durante el neurodesarrollo, puede explicar la alta sensibilidad de los neonatos al DA (Mayer, 2000).

4.5.3 Toxicidad en animales de laboratorio

toxicidad aguda

Se han estudiado los efectos tóxicos del DA en ratones, ratas y monos *Cynomolgus*. La toxina induce síntomas muy característicos al inyectarse intraperitonealmente en ratones y ratas, un rascado peculiar de los hombros con la pata trasera, seguido de convulsiones y, a menudo, la muerte. Efectos más sutiles son hipoactividad, sedación-aquinesia, rigidez, esterotipia, perdida de control postural y temblores (Wright y Quilliam, 1995).

En una serie de publicaciones sobre los efectos neurotóxicos causados por el DA, se muestra que el agonista produjo pérdida de neuronas en la zonas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo, edema y degeneración neuronal en el núcleo arcuato y células vacuolizadas y picnotadas en la capa interior de la retina. Las lesiones hipocampales eran idénticas a las encontradas en víctimas humanas de ASP (Iverson y Truelove, 1994).

ratones

Se informó un valor intraperitoneal LD₅₀ en ratón de 3,6 mg DA (vía extractos de mejillón)/kg pc. (Todd, 1993). Se observó la hiperactividad como el primer efecto neuroexcitatorio sobre el comportamiento de ratones hembra ICR con una única dosis i.p. de 0,5 mg/kg pc. El comportamiento con rascado estereotípico se observó con dosis ≥ 1.0 mg/kg pc. A 2,0 mg/kg pc y superiores, tenían lugar convulsiones y ataques. A 4,0 mg/kg pc, se observaron convulsiones y ataques prolongados, muriendo 4/9 ratones dentro de las 24 horas. Se detectó la inducción de *c-fos* mRNA en el cerebro a 1,0 mg/kg pc, en tanto que se localizó en las células dentadas granulares del cerebro y en las piramidales de la formación hipocampal, un aumento de la inmuno-tintura Fos a 0,5 mg/kg pc. Estos resultados indican que el Fos en el hipocampo era un biomarcador sensible para los efectos neuroexcitatorios del DA, siendo inducido a dosis inferiores a las que promueven el comportamiento de rascado estereotípico (Peng y Ramsdell, 1996).

Se midió la toxicidad del DA a diferentes pHs en ratones CD hembra inyectados i.p., como el tiempo que demoraban en manifestarse los comportamientos de rascado, los ataques y la muerte. A pH 3,7 los tiempos eran de 12, 40 y 55 minutos, respectivamente. La toxicidad DA fue más baja a pH 7,4. El tiempo de comienzo del comportamiento de rascado no fue afectado por el pH a tres dosis diferentes (8,5; 11,5 y 14,5 mg/kg pc), pero si y claramente los tiempos para ataques y muerte. El efecto del pH disminuyó al aumentar la dosis de DA (a 14,5 mg/kg pc la toxicidad era la misma a pH 3,7 y 7,4) (Nijjar y Madhyastha, 1997).

Estudios en ratones indican que las acciones tóxicas del DA son generalmente insensibles a los receptores antagonistas NMDA (*N*-metil-d-aspartato), aunque el inicio de algunas respuestas podría demorarse con el CPP (ácido 3-(2-carboxipiperazina-4-il) propil-1-fosfónico). Las toxicidades debidas a domoato y cainato fueron reducidas con drogas (6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona=DNQX y 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo[*F*]quinoxalina=NBQX) que interactúan preferentemente con posiciones de enlace no receptoras de NMDA, pero que no distinguen entre diferentes posiciones de enlace de los cainatos. La recién desarrollada isatinoxima NS-102 antagonizaba selectivamente tanto

las toxicidades patológicas como de comportamiento del DA relativa al ácido canaico (Tasker *et al.*, 1996).

ratas

Se requería oralmente más de 10 veces la toxina necesaria para alcanzar los mismos efectos que con dosis i.p. Los ratones y ratas toleraban, oralmente, 30-50 mg DA/kg pc sin efectos observables (Todd, 1993).

Ratas a las que se administró oralmente DA, como extractos tóxicos de mejillón, con dosis de DA equivalente de ≥ 70 mg /kg pc, desarrollaron masticación y ataques y murieron con dosis ≥ 80 mg/kg pc. A 60 mg DA equivalentes/kg pc las ratas mostraban algunos síntomas clínicos (flacidez, cabeza apoyada en el piso e inactividad) pero no excitación. Sólo se observaron lesiones histopatológicas del sistema nervioso central a 80 mg/kg pc (Tryphonas *et al.*, 1990a). Su incapacidad de vomitar evitaba lo que parecía ser un síntoma clínico muy sensible de intoxicación por DA en seres humanos.

Las ratas se rascaban, caminaban a lo cangrejo, tenían “actitudes de oración”, pérdida de balance y ataques luego de una única dosis i.p. de 2,0-7,5 mg/kg pc de DA crudo (85 por ciento puro) (uno a cuatro animales por grupo). A 1 mg/kg pc los animales no estaban afectados. Eran evidentes lesiones histopatológicas luego de administrarles ≥ 2 mg/kg pc, en amígdalas, cortex, hipocampo, hipotálamo, sistema olfativo y retina (Tryphonas *et al.*, 1990b).

Sobotka *et al.* (1996) informan que dosis i.p. inferiores a 1 mg DA/kg pc ya producían efectos sobre el comportamiento, medibles en ratas adultas sin señales evidentes de disfunción neurológica o neuropatologías. Dosis ligeramente superiores a 1 mg/kg pc, de 1,32 mg/kg pc y 2,25 mg/kg pc, producían además de efectos, señales clínicas de neurotoxicidad y morbilidad ocasional, con daños hipocampales. El DA indujo convulsiones a 2,25 mg/kg pc y afectó la función cerebral, aun con manifestaciones pasadas entre seis a ocho días, por un metabolismo alterado de los ácidos grasos y gliosis (Appel *et al.*, 1997).

En ratas adultas Sprague-Dawley se incrementaron significativamente los niveles T3 y T4 en el suero (analizados mediante inmunoensayo enzimático) al administrárseles i.p. 1 mg DA/kg pc en medio salino a los 30, 45 y 60 minutos (fin del estudio) luego de la inyección. Los niveles de T3 y T4 en el suero no disminuyeron durante los 60 minutos siguientes a la inyección. Pasados cinco minutos los animales mostraban niveles muy incrementados de TSH en el suero (analizados por radioinmunoensayo), que permanecieron elevados durante los 60 minutos posteriores a la inyección (Alfonso *et al.*, 2000).

Xi *et al.* (1997) informaron, que una inyección intraperitoneal hacía a las ratas neonatas unas 80 veces más sensibles al rascado inducido por el DA y, aproximadamente 40 veces más sensibles a ataques y efectos letales que las adultas. Las LD₅₀ i.p. para los días postnatales dos y diez eran respectivamente de 0,25 y 0,7 mg/kg pc,. Mayer (2000) sostuvo que durante el neuro desarrollo en neonatos la barrera sangre-cerebro es incompleta, lo que puede explicar la mayor sensibilidad al DA.

También Doucette *et al.* (2000) informaron que el DA era una neurotoxina muy potente en ratas recién nacidas, con una potencia que progresivamente decrecía con edades mayores (ED₅₀ interpolada = 0,12; 0,15; 0,30 y 1,06 mg/kg pc al día post-natal 0, 5, 14 y 22, respectivamente).

Se compararon, los efectos inducidos con extractos de mejillones contaminados, con los inducidos por DA puro y por extractos de mejillones sin contaminar. El extracto de mejillones contaminado parecía ser la fórmula más potente, atribuido a una potenciación del efecto de excitación del DA por glutamato y aspartato; ambos amino ácidos con capacidad de excitación que se encuentran en los extractos de mejillón (Mariën, 1996).

monos

Los monos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) recibieron una única dosis oral de 0,5 a 10,0 mg DA/kg pc como extracto de mejillón o como extractos crudos o purificados de DA aislados de mejillones. Todos los animales a los que se administró estos extractos (~5,89-6,62 mg DA/kg pc) desarrollaron anorexia, salivación, arcadas, vómitos, diarrea y postración entre las dos horas y las 70 horas siguientes a la inyección. Se recuperaron todos los monos. Excepto por la diarrea y la postración, todos los monos a los que se les administró DA crudo o purificado (5 a 10 mg/kg pc) desarrollaron señales clínicas similares. Se mojaban, además, los labios y hacían sonidos con ellos, masticando en seco. Un mono al que se le administró 10 mg/kg pc de DA purificada, vomitó una hora después de la dosificación. No se apreciaron con 0,5 mg/kg pc de DA purificada señales clínicas. Se observaron lesiones histopatológicas suaves a moderadas del sistema nervioso central consistentes con neuroexcitación con dosis de 5 a 10 mg/kg pc (Tryphonas *et al.*, 1990a).

Además, Iverson y Truelove (1994) informaron que con dosis orales de 0,5 mg DA/kg pc no hubieron efectos en los monos *Cynomolgus*, pero que 5,0 mg/kg pc causaron vómitos, masticación y bostezos. Una única dosis oral de 1,0 mg DA ácido/kg pc resultó en vómitos, atoramiento y bostezos, aunque dosis únicas de 0,75 o 0,5 mg/kg pc no causaron efectos manifiestos. A 5,0 mg/kg pc oral no había evidencia de neurotoxicidad a nivel de microscopio óptico, pero sí a 10 mg/kg pc oral (Todd, 1993).

Al administrar a monos *Cynomolgus* (un animal por dosis) por vía intravenosa (i.v.) 0,025; 0,05; 0,2 o 0,5 mg/kg pc o intraperitonealmente (i.p.) 4 mg/kg pc de DA de mejillones de cultivo, las señales clínicas de neurotoxicidad fueron precedidas por un corto periodo pre-sintomático (dos a tres minutos) y un aun más corto periodo prodromal (0,5 a un minuto). El periodo sintomático estaba caracterizado por masticación persistente con babeo, diversos grados de atoramiento y vómitos. Con las dosis superiores se observaban posiciones anormales de cabeza y cuerpo, rigidez de movimientos, pérdida de balance y temblores. La duración de los síntomas dependía de la dosis. En el área postrema, en el hipotálamo y en las capas interiores de la retina se detectaron las lesiones excitotóxicas de vacuolación del neuropil, hinchazón astrocítica, contracción neuronal e hiper cromasia con una dosis i.v. de 0,5 mg/kg pc y una i.p. de 4 mg/kg pc. Podía concluirse que el DA es neuroexcitotóxico y fuertemente emético con dosis i.v. únicas de 0,025-0,2 mg/kg pc. El DA es fuertemente excitotóxico a dosis mayores (0,5 mg/kg pc i.v. y 4 mg/kg pc i.p.) (Tryphonas *et al.*, 1990c).

Administrado i.v. a dosis bajas, del orden de 12,5 µg/kg pc, indujo señales clínicas fácilmente observables en monos (respuesta tipo arcada). Sobre base mg/kg pc, este nivel es 1 000 veces menor al observado en el bioensayo en ratón usando la respuesta clínica como punto final (Iverson y Truelove, 1994).

Para evidenciar la degeneración en los cerebros de monos *Cynomolgus* a los que se les administró DA (i.v. 0-4 mg/kg pc), Schmued *et al.* (1995) aplicaron una técnica histoquímica de degeneración específica (método de de Olmos de plata cúprico). Este método revela la presencia de cuerpos celulares y de terminales neuronales en proceso de degeneración no solo en el hipocampo, sino también dentro de varias estructuras “límbicas”, como el cortex entorinal, el subiculum, el cortex piriforme, el septum lateral y el núcleo lateral dorsal del tálamo. El padrón degenerativo correlacionaba generalmente con las regiones con densidades de receptores de canabinos altas. Slikker *et al.* (1998) midieron los granos de plata que continuamente proveían datos dosis-respuesta. Los autores aplicaron los enfoques histoquímico cuantitativo, seguido del de factor de seguridad (FS, en este caso con un FS 300) y del comparativo, para estimar dosis aceptables de DA. Suponiendo una absorción oral de DA del 5 por ciento y un peso del cuerpo humano de 70 kg, la dosis aceptable se lograría si los individuos ingiriesen 200 g de frutos del mar con, respectivamente, 10, 12 y 6 mg DA/kg.

toxicidad de dosis repetida

ratones

Ratones de dos cepas (respectivamente interespecie e intraespecie sensible a ataques) recibieron una o cuatro inyecciones intraperitoneales (día por medio durante siete días) con dosis sub-sintomáticas (0,5 mg/kg pc) o sintomáticas sub-letales (2,0 mg/kg pc) de DA, para investigar la posibilidad de una toxicidad incrementada (respuestas de comportamiento observables) luego de exposición repetida. Los niveles de DA en el suero no diferían con exposiciones únicas o repetidas. Ambas cepas mostraron respuestas dependientes de la concentración comparables. El estudio no proporcionó evidencias de que exposiciones reiteradas de corta duración alterasen la liberación del DA del suero o resultasen en una respuesta más sensible o más neurotóxica que una única exposición (Peng *et al.*, 1997)

Se ha demostrado dosis únicas de DA inyectadas intraperitoneales en ratones, alteran la capacidad de aprendizaje medida por las tareas del laberinto de agua de Morris y del laberinto de ocho brazos radiales. En este estudio se examinó la capacidad de memoria de trabajo espacial en una tarea diferida de identificación de muestras, posterior a las inyecciones i.p. simples y repetidas a grupos de nueve a diez ratones macho DBA que recibieron una o cuatro inyecciones intraperitoneales (con intervalos de 48 horas) de 0; 1,0 o 2,0 mg DA/kg pc, usando como vehículo una solución salina estéril tamponada con fosfato. Los animales en los grupos de una dosis recibieron tres inyecciones con el vehículo adicionales en intervalos de 48 horas. Luego de la última inyección fue evaluada la toxicidad sintomática de los ratones: hipoactividad, sedación, hiperactividad, rascado, pérdida del control de balance, temblores-convulsiones, muerte. Las clasificaciones de toxicidad mostraron ser dependientes de la dosis, que no difería después de exposiciones simples y repetidas. En los grupos con dosis única, aparece alterada la memoria de trabajo espacial en la prueba de identificación de muestras; la mayor alteración fue con la dosis única de 2,0 mg/kg pc. Esto se traduce en que los animales fueron incapaces de formar una memoria persistente durante 24 horas y por tanto incapaces de usar las experiencias del día anterior. Los grupos sometidos a exposición repetida no tuvieron un comportamiento tan pobre como los tratados con una dosis única. Esto apunta a que para las tareas de la memoria de trabajo se utilizan caminos múltiples y que los animales parecen capaces de adaptarse por procesos desconocidos luego de exposiciones repetidas al DA (Clayton *et al.*, 1999).

ratas

Tres grupos de 10 ratas macho y de 10 ratas hembra recibieron diariamente y durante 64 días, por cebado, 0; 0,1 o 5,0 mg DA/kg pc disuelto en agua. No se observaron anomalías clínicas. La hematología, la química clínica y los pesos de los órganos no indicaron anomalías. No presentaban particularidades la histopatológica de diversos tejidos (incluyendo ojos y cerebro) y la inmuno-histoquímica de secciones seleccionadas del hipocampo y retina. Las determinaciones de DA en la orina y heces mostraron que la absorción era de aproximadamente el 1,8 por ciento de la dosis administrada (Truelove *et al.*, 1996).

monos

Tres monos *Cynomolgus* recibieron diariamente, por cebado, 0,5 mg DA/kg pc disuelto en agua, primero por 15 días y luego por otros 15, 0,75 mg/kg pc. Pasado el periodo de tratamiento de 30 días fueron sacrificados. Se registraron el peso y el consumo de agua y alimento; se hicieron observaciones clínicas, determinaciones químicas en el suero, hematología, histopatológica de todos los principales órganos (incluyendo cerebro y retina) e inmunohistoquímica de las glial-proteínas ácidas fibrilares. Todos los parámetros estudiados permanecieron normales. Se midieron en varios puntos las concentraciones de DA en orina y suero. La absorción en monos pareció ser de 4 a 7 por ciento (comparado con 1,8 por ciento en ratas) y la vida media del plasma fue de 114,5 minutos (comparada con 21,6 minutos en ratas) (Truelove *et al.*, 1997).

reproducción/teratogenicidad

Grupos de cinco ratones CD-1, grávidos, recibieron por inyección intravenosa 0 o 0,6 mg DA/kg pc (25 por ciento de la dosis convulsiva) al día 13 de la gestación permitiéndoles tener espontáneamente las crías. Se controló la progenie con EEG durante los días postnatales 10, 20 y 30 en busca de efectos residuales de exposición intrauterina al DA. Parecía que la excitotoxicidad hipocampal fuese inducida como consecuencia del aporte creciente de calcio neuronal por activación de los receptores de cainato. Los cambios histológicos apuntan a daños progresivos del hipocampo, aunque sin obvios ataques clínicos. La progenie mostró umbrales de ataque significativamente reducidos ante una dosis adicional, postnatal, de DA (Dakshinamurti *et al.*, 1993).

Se administró intraperitonealmente a nueve de 15 ratas preñadas por grupo, durante los días 7 a 16 de la gestación respectivamente 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,25; 1,75 o 2,0 mg DA/kg pc. En el día 22 de la gestación, se sacrificaron las madres y se examinaron los fetos en busca de cambios de desarrollo y anomalías viscerales. No se observaron señales de toxicidad materna hasta dosis de 1,25 mg/kg pc. Con una dosis de 2 mg/kg pc, murieron seis de nueve madres con dos dosis. Las tres madres restantes, en este nivel, abortaron luego de tres dosis. A 1,75 mg/kg pc, seis de doce madres abortaron antes de la cesárea. Se apreció a 1,0 y 0,5 mg/kg pc una reducción en fetos vivos/camada. Este efecto, sin embargo, no estaba relacionado con la dosis, ni asociado con una mayor incidencia de resorciones más fetos muertos. Se observó con 1,25 mg/kg de pc, una incidencia aumentada y estadísticamente significativa de osificación retardada del *sternebrae*, pero no se observó este efecto a ningún otro nivel. Al nivel más bajo de 0,25 mg/kg pc no se apreció toxicidad materna o fetal. No se observaron en el estudio efectos teratogénicos (Khera *et al.*, 1994).

mutagenicidad

Rogers y Boyes (1989) investigaron la mutagenicidad del DA en un ensayo mediado con hepatocitos usando fibroblastos de pulmón de hámster chino V79. Los puntos finales genéticos medidos fueron: mutación a la resistencia a la 6-tioguanina en el punto HPRT; mutación a la resistencia a la ouabaina en el punto Na⁺, K⁺-ATPase; intercambios cromátidos y frecuencia micronucleica. No se apreció citotoxicidad significativa. Ninguno de los puntos finales genéticos fue afectado significativamente por exposición al DA a niveles de dosis de 27,2 y 54,4 µg/ml con o sin activación metabólica por hepatocitos de rata recién aislados.

estudios in vitro

Un estudio *in vitro* con cardiomiocitos aislados de ratas mostró que el DA inhibió la acción del ATP extra celular, un neurotransmisor putativo que eleva la Ca²⁺ intracelular en los cardiomiocitos y que se considera regula la función cardíaca (Nijjar *et al.*, 1999)

El DA indujo la muerte de neuronas cultivadas de retina de embrión de pollo, así como la acumulación del trifosfato de isositol (ip₃) de 4 a 7x encima niveles basales, tanto en forma de concentración, como Ca²⁺-dependiente (Duran *et al.*, 1995).

4.5.4 Toxicidad para los seres humanos

Las anécdotas señalan que en otras épocas los isleños japoneses apreciaban los extractos de algas con DA como un tónico muy útil. El alga roja *Chondria armata* con DA ha sido usada para tratar ascárides durante siglos y como insecticida (Higa y Kuniyoshi, 2000). Aparentemente se hicieron pruebas para ensayar las propiedades antihelmínticas del DA, administrándose, sin efectos perjudiciales, dosis únicas de 20 mg de pureza desconocida a adultos y niños (Iverson y Truelove, 1994).

Sin embargo, el DA es tóxico tanto para el sistema nervioso central como para el periférico. El DA es un emético que provoca arcadas y vómitos, posiblemente por su efecto sobre el centro del vómito en la zona postrema del cerebro. Produce un síndrome de neuropatía axonal sensoriomotora, amnesia, ataques, coma y muerte. Debido a su impacto sobre la memoria, entre otros efectos perjudiciales, la intoxicación ha sido llamada intoxicación amnésica por mariscos (ASP) (Todd, 1993 y Watters, 1995).

Se informaron 107 casos, en el primer brote de ASP en 1997 en la Isla Príncipe Eduardo en Canadá. Los primeros síntomas se notaron entre los 15 minutos y las 38 horas (mediana 5,5 horas) luego de consumidos los mejillones. Los síntomas más comunes eran náusea (77 por ciento), vómitos (76 por ciento), calambres abdominales (51 por ciento), dolor de cabeza (43 por ciento), diarrea (42 por ciento) y pérdida de memoria (25 por ciento). La pérdida de memoria y la edad correlacionaban bien; aquellos con menos de 40 años eran más susceptibles a diarreas y los mayores de 50 años a pérdida de memoria. La pérdida de memoria era fundamentalmente de corto plazo. Los más seriamente enfermos fueron hospitalizados, 12 de ellos en unidades de cuidado intensivo (UCI). Ocho de ellos eran mayores de 65 años y los otros cuatro tenían enfermedades anteriores (diabetes, problemas renales crónicos o hipertensión). Los pacientes en UCI presentaron confusión, coma, mutismo, ataques, movimientos de masticación, muecas, hipo, falta de respuesta a estímulos dolorosos, llanto descontrolado o agresividad, profusa secreción respiratoria, y presión sanguínea inestable o arritmias cardíacas. Catorce pacientes mostraron persistentes defectos neurológicos. Se notaron en varios de ellos problemas en los ojos, incluyendo miradas disconjugadas, diplopia y oftalmoplejía, los que se resolvieron en 10 días (Todd, 1993). Sufrían además ataques, mioclonus, déficit de memoria anterior, metabolismo de la glucosa disminuido en los lóbulos temporales mediales bajo escaneo con tomografía de emisión de positrones (PET), y cambios EMG de axonopatías motoras puras o sensorimotoras. Cuatro de los 14 pacientes permanecieron en coma y fallecieron. La autopsia reveló necrosis y pérdidas neuronales, básicamente en el hipocampo y amígdalas (Teitelbaum *et al.*, 1990). Las cantidades de DA consumidas, iban de 15 a 20 mg/persona para un individuo no afectado a 295 mg/persona para un caso con síntomas neurológicos severos. Suponiendo un peso promedio de 50 a 70 kg la persona de sexo masculino no afectada ingirió 0,2-0,3 mg DA/kg pc. Algunas personas mostraron síntomas leves (principalmente gastrointestinales) después de consumir 60 a 110 mg de DA, equivalente de 0,9 a 2,0 mg/kg pc. Los casos más serios (déficit neurológico severo) consumieron de 135 a 295 mg, equivalentes de 1,9 a 4,2 mg DA/kg pc (Todd, 1993).

Se desconocen los efectos debidos a la exposición de largo plazo en seres humanos a concentraciones bajas de DA en mejillones o peces (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Un hombre de 84 años presentó un cuadro epiléptico seguido a una intoxicación aguda con DA. Luego de un año “silencioso”, desarrolló epilepsia temporal del lóbulo. Tres años después falleció de pulmonía. La autopsia mostró esclerosis bilateral severa del hipocampo. Esto indicó que el hipocampo humano es vulnerable a excitotoxicidad por receptores cainato (Cendes *et al.*, 1995).

4.5.5 Toxicidad en organismos acuáticos

En un estudio de laboratorio, el DA resultó tóxico para el copépodo marino (*Tigriopus californicus*) a concentraciones bajas. La LC_{50} (24 horas) resultó ser de 8,62 μ M (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). En el otoño de 1993, tuvo lugar en la Bahía de Fundy en Canadá una mortalidad inexplicada de vieiras marinas (*Placopecten magellanicus*). La glándula digestiva de los vieiras parecía contener 93,4 μ g DA/g. Aunque se ha informado que algunos moluscos bivalvos contienen niveles altos de DA sin ningún síntoma, *Chlamys hastata* murió rápidamente, dentro de las 12 horas, luego de la exposición a cultivos de *P. multiseriatus* tóxica (Douglas *et al.*, 1997).

Chlamys hastata podría originar la toxicidad en cangrejos. Las vieiras nadadoras *Chlamys hastata*, al exponerse al DA alimentándolos con *Pseudo-nitzschia multiseriatus*, perdió respuestas motoras o de fuga resultando presa fácil para depredadores como los cangrejos (Whyte *et al.*, 1997).

En un estudio de laboratorio, se alimentaron vieiras marinas (*Placopecten magellanicus*) con *P. multiseriatus* con una alto tenor de DA (4-6,6 pg/célula) por 22 días, seguido de 14 días de alimentación con microalgas no tóxicas. No se observaron en este estudio signos de enfermedad o mortalidad a pesar de la fuerte carga de DA. Sin embargo, el muestreo destructivo de las vieiras no permitió evaluar los efectos de largo plazo (Douglas *et al.*, 1997).

Se investigaron los efectos fisiológicos del DA en los invertebrados marinos, ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) y mejillón de California (*Mytilus californianus*), conocidos por acumular esta neurotoxina. Las ostras y los mejillones se expusieron continuamente por 48 horas a la diatomea productora de DA *P. pungens* f. *multiseries*, seguidos de un periodo de liberación de 120 horas. La ostra del Pacífico acumuló rápidamente cargas de DA en tejidos suaves, resultantes en una respuesta de estrés generalizada por el cierre de la caparazón cuatro horas después de introducir las algas, acidosis hemolínfica e hipoxia transitoria aguda. El mejillón de California pareció incrementar su flujo ventilatorio resultante en una suave alcalosis respiratoria no compensada (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

El DA en *Pseudo-nitzschia multiseries* inhibió la alimentación del rotífero, *Brachionus plicatilis*, con una condición nutricional posterior reducida y pérdida de fecundidad (Whyte *et al.*, 1997).

Más de 400 leones marinos californianos (*Zalophus californianus*) murieron a lo largo de la costa central de California durante mayo y junio de 1998. Fue identificado como el posible agente causante el DA producido por *P. australis* y transmitido a los leones marinos por las anchoas planctonívoras del norte (*Engraulis mordax*) (Levebvre *et al.*, 1999).

4.5.6 Toxicidad en aves acuáticas

En setiembre de 1991 murieron en la Bahía de Monterrey, California aves acuáticas (pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) y cormoranes (*Phalacrocorax penicillatus*)) después de consumir anchoas (*Engraulis mordax*) contaminadas con DA (Horner *et al.*, 1997). En enero de 1996 murieron pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) en el Cabo San Lucas en el extremo de la Península de Baja California, México. La muerte de estas por alimentarse con caballa (*Scomber japonicus*) contaminada por el productor de DA *Pseudo-nitzschia* spp. (Sierra-Beltrán *et al.*, 1997).

4.6 Prevención de la intoxicación por ASP

4.6.1 Depuración

No se han diseñado aun métodos útiles para reducir eficazmente las ficotoxinas en mariscos contaminados. Todos han resultado poco seguros, muy lentos, económicamente inviables o en productos inaceptables por su aspecto y gusto (Shumway *et al.*, 1995). Se ha informado que las almejas absorbieron rápidamente el DA, depurándolo también con rapidez, en tanto otros bivalvos lo retuvieron por periodos más prolongados. La depuración del DA por navajuelas es un proceso largo (Horner *et al.*, 1997). La depuración del DA de almejas y almejas privadas de alimento fue relativamente rápida (43 a 15 µg/g a 13 °C en 24 horas, con trazas remanentes por hasta seis días en la Bahía Passamaquaddy, Canadá, y 130 a 20 µg/g a 15 °C en cuatro a seis días en el río Cardigan, Canadá). La depuración completa, sin embargo, puede llevar más tiempo en el hábitat natural. La concentración de DA en la zona de la Bahía Cardigan, al este de la Isla Príncipe Eduardo, descendió a niveles despreciables entre los 40 y 50 días (Todd, 1993).

Las vieiras enteras (*Pecten maximus*) con carne contaminada con DA, mostraron una disminución del 43 por ciento (mayormente en el hepatopáncreas) del DA total pasados 180 días de almacenamiento congelado (-20 °C). Durante el almacenamiento, hubo transferencia de DA del hepatopáncreas al resto del cuerpo, con disminución neta en todo el producto. No continuaron disminuyendo el contenido de DA, el encurtido posterior de la carne o el envasado en salmuera y enlatado. Durante el enlatado hubo una notoria transferencia de toxina de las vieiras a la salmuera o al medio de encurtido (más del 30 por ciento del total de DA en el producto enlatado) (Leira *et al.*, 1998). Se ha informado que las vieiras marinas (*Placopecten magellanicus*) y mejillones rojos (*Modiolus modiolus*) retienen el DA por periodos prolongados (Stewart *et al.*, 1998). Se encontró que el nivel de DA en la glándula digestiva de vieiras marinas era sólo ligeramente inferior al cabo del estudio de depuración de 19 meses que a su inicio (Stewart *et al.*, 1998). Cangrejos Dungeness (*Cancer magister*) acumularon la toxina principalmente en las vísceras, aunque, de no habérselos eviscerados previamente, puede penetrar en

la carne durante la cocción (Villac *et al.*, 1993a). Cuando se cocinaron cangrejos enteros contaminados (22 µg DA/g confinados al hepatopáncreas) en agua limpia o salada, el DA de las vísceras se redujo entre el 67 al 71 por ciento. Luego de cocidos, el DA se detectó en el hepatopáncreas (6,4 µg/g) y en carnes del cuerpo (1,9 µg/g) y pata (1,1 µg/g). La mayor parte del DA se extrajo y se diluyó en el agua usada para la cocción. Al permanecer los cangrejos cocidos entre uno a seis días a 1 °C, se detectó DA en el hepatopáncreas (6,1 a 8,2 µg/g) y en carnes del cuerpo, pero no en la de las patas. Las carnes del cuerpo vecinas a las vísceras tenían niveles más elevados de DA (1,5 a 2,1 µg/g) que las distales (0,57 a 0,92). Al mantenerse los cangrejos cocidos por 90 días a -23 °C, se detectó DA en las vísceras (7,6 µg/g), carnes del cuerpo (0,67 a 0,79 µg/g) y pata (0,38 µg/g). Las condiciones de almacenamiento de los cangrejos cocidos de alguna manera afectaron la distribución, pero no el contenido total de DA en cada cangrejo (Hatfield *et al.*, 1995).

En estudios de laboratorio, Lund *et al.* (1997) demostraron que el DA era depurado eficazmente del hepatopáncreas de cangrejos Dungeness en tres semanas, una vez dejado de alimentar con carne de almeja contaminada. La depuración progresó más rápidamente cuando se alimentaron los cangrejos con carne de almeja libre de toxinas que cuando se los mantuvo sin alimento.

Los estudios de depuración con cangrejos Dungeness de la costa oeste de Canadá, indican que si los cangrejos se colocaban en agua de mar filtrada, los niveles de DA caían rápidamente en pocas semanas, aunque en jaulas con aguas del puerto (sin acceso a mariscos contaminados), los tenores de DA fluctuaban, pero no descendían (Todd, 1993).

Arévalo *et al.* (1998) informaron que la disminución media en la toxicidad era del 94 por ciento, (variando entre 82,3 a 100 por ciento), para muestras estándar del tejido completo de *Pecten maximus*, (homogeneizadas de 100 g de tejido total), luego de retirado el hepatopáncreas.

4.6.2 Medidas preventivas

Las floraciones tóxicas afectan adversa y a menudo imprevisiblemente las zonas de cosecha comerciales y la infraestructura de acuicultura. Un problema, es que algunas especies de algas, nunca antes habían estado presentes en una zona, pueden aparecer súbitamente causando dificultades con rapidez. Las medidas preventivas son, por tanto, difíciles de adoptar. Será necesario para prevenir incidentes de contaminación de mariscos y peces, una extensa vigilancia del ambiente marino y de los productos pesqueros posiblemente contaminados, unido a reglamentos (ver Capítulo 4.8). Las informaciones sobre la presencia de especies de algas tóxicas pueden indicar que toxinas son de esperar en periodos de floraciones de algas y que productos pesqueros debieran someterse a un control analítico. Para productos domésticos, varios países detienen su cosecha si los niveles de toxinas superan los límites, con un tiempo de espera que permita a las concentraciones situarse por debajo del nivel de aceptación (Shumway *et al.*, 1995). La producción de DA, dentro del género *Pseudo-nitzschia*, puede variar mucho con la especie, siendo vital poder distinguir entre especies (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Las concentraciones de toxina en productos pesqueros pueden variar también con la especie y con la zona de cosecha. Habitualmente se destruyen los productos cosechados con tenores de toxinas elevados. Las dosis tóxicas se estiman a menudo, de restos de frutos del mar, los que pueden no ser siempre representativos de los alimentos ingeridos (Shumway *et al.*, 1995).

El análisis directo del DA en muestras de fitoplancton seguirá siendo probablemente el método mas confiable para confirmar la presencia de DA (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Aunque se ha enfatizado frecuentemente la necesidad de vigilar rutinariamente el fitoplancton, sólo se ha implementado en unas pocas zonas (Horner *et al.*, 1997).

Resulta relativamente fácil identificar por microscopía común *Pseudo-nitzschia* en mezclas de plancton. Es sin embargo difícil y lleva tiempo, la identificación y enumeración en poblaciones naturales, de diferentes especies de *Pseudo-nitzschia* al ser necesarias observaciones morfológicas detalladas que frecuentemente requieren microscopía electrónica de barrido o transmisión. Se

desarrollaron, en consecuencia, grandes sensores del tipo subunidad ribosomal RNA (LSU rRNA)-marcados con DNA fluorescente para distinguir entre una variedad de especies de *Pseudo-nitzschia*, a.o. colecciones de la Bahía de Monterey, California. Los sensores se aplicaron utilizando tanto técnicas de célula entera como de hibridización sandwich (Miller y Scholin, 1998, 2000; Parsons *et al.*, 1999; Scholin *et al.*, 1997, 1999).

En Nueva Zelanda, se identificaron especies de *Pseudo-nitzschia* tóxicas con lectinas FITC-conjugadas. Se ha demostrado que la unión de lectinas FITC-conjugadas a azúcares específicos permite distinguir adecuadamente entre algunas especies de microalgas. La unión diferencial de las distintas lectinas FITC-conjugadas permitió discriminar aislados de especies neozelandesas de *P. multiseriata*, *P. pungens* y *P. australis* empleando microscopía de epifluorescencia, que no permitió, sin embargo, discriminar entre *P. delicatissima* o *P. pseudodelicatissima*. Los resultados eran distintos de los informados para especies de *Pseudo-nitzschia* en aguas gallegas (España) apuntando a una variabilidad en la producción de azúcares superficiales por aquellas diatomeas dependientes del origen geográfico y/o de las condiciones ambientales. En consecuencia, aun se prefieren los sensores RNA ribosomales- oligonucleótidos marcados como método para identificación de especies de *Pseudo-nitzschia* (Rhodes, 1998).

La vigilancia de mariscos entre mareas puede no ser un método particularmente sensible para detectar niveles bajos, pero significativos, de DA en plancton, dejando pasar todos excepto los eventos más extremos (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Esto es motivado por diferencias en la absorción y depuración en especies de mariscos. Se ha informado, por ejemplo, que las almejas, absorben el DA rápidamente, depurándolo también velozmente, en tanto que otros bivalvos retienen el DA por periodos más prolongados. La depuración del DA por navajuelas es un proceso largo (Horner *et al.*, 1997). Sin embargo, Whyte *et al.* (1997) sostienen que los estudios de absorción y depuración de DA por el mejillón *Mytilus californianus* han demostrado que esta especie era adecuada como organismo sentinela en un programa semanal de ensayos, a pesar de la eliminación relativamente rápida que hace del DA.

4.7 Casos y brotes de ASP

4.7.1 Europa

La Figura 4.2 ilustra la presencia de toxinas ASP en aguas costeras europeas.

Bélgica

Durante 2000 y 2001, se analizó ASP en 151 y 154 muestras respectivamente. No se detectaron episodios tóxicos en mariscos producidos en Bélgica (EU-NRL, 2001).

Dinamarca

Investigaciones realizadas en aguas danesas han demostrado que *P. seriata*, una especie ampliamente distribuida en las zonas más frías del hemisferio norte, produjo DA en concentraciones similares a las encontradas en Canadá con *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriata* (1-20 pg/célula). La encuesta, encontró en aguas danesas, cinco especies y una subespecie de *Pseudo-nitzschia*: *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. pungens* f. *multiseriata* y *P. seriata*. Los aislados de *P. seriata* parecían contener DA. No había DA en aislados de otras tres especies de *Pseudo-nitzschia* detectadas por esta encuesta, *P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima* y *P. pungens*. *P. seriata* es una de las especies más comunes de *Pseudo-nitzschia* en el Atlántico norte. Estos datos apoyan la idea de que en la misma especie de diatomea coexisten cepas tóxicas y no tóxicas (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Una floración importante fue detectada en 1992, causada por *P. pseudodelicatissima* (alrededor de 16×10^6 células/litro). No se detectó DA. Otra floración, en 1993, con una menor densidad (unas 5×10^5 células/litro) presentaba concentraciones pequeñas de DA (EU-NRL, 1996).

Francia

Se encontraron, en la costa francesa en mayo de 2000, niveles de DA en *Donax trunculus* superiores a los límites reglamentarios (27 a 53 µg/g (occidente de Bretaña). Las especies de algas responsables eran *P. pseudodelicatissima* y *P. multiseriis* (Amzil *et al.*, 2001). En 2002, se observó, a fines de abril y comienzos de mayo, un episodio sobre una zona de la costa del Mediterráneo de corta duración. Los niveles de toxina eran menores a 50 µg DA/g de carne (EU-NRL, 2002).

Irlanda

Se encontraron en Irlanda concentraciones muy elevadas de DA, hasta 3000 µg/g en el hepatopáncreas de vieiras, en diciembre de 1999. El DA estaba presente en todas las zonas de producción de las costas irlandesas. No se encontró DA en otras especies (EU-NRL, 2000).

Se analizaron, respectivamente, 738 y 500 muestras en 2000 y 2001 buscando toxinas ASP. En el 83 por ciento de los hepatopáncreas de las vieiras se encontraron toxinas ASP por encima del límite reglamentario, pero sólo 8 por ciento y 1 por ciento, respectivamente, en las gónadas y el músculo aductor (EU-NRL, 2001). En 2002 se hicieron 620 análisis de ASP. Se encontraron por primera vez, niveles de toxina ASP superiores a los límites reglamentarios en almejas de una zona de producción al noroeste de Irlanda. Las toxinas ASP, en las muestras de vieira, se hallaron en diversos lugares. El nivel máximo de DA en el músculo aductor era de 33,8 µg/g con un 2 por ciento de las muestras de músculo aductor con niveles de DA superiores a los límites reglamentarios. El tenor máximo de A en la gónada era de 79,9 µg/g y un 10 por ciento de las muestras de gónadas tenían niveles de DA superiores a los límites reglamentarios. El nivel máximo en el tejido total era de 574 µg/g y el 31,7 por ciento del total de las muestras de tejido total mostraban niveles superiores de DA a los límites reglamentarios (EU-NRL, 2002).

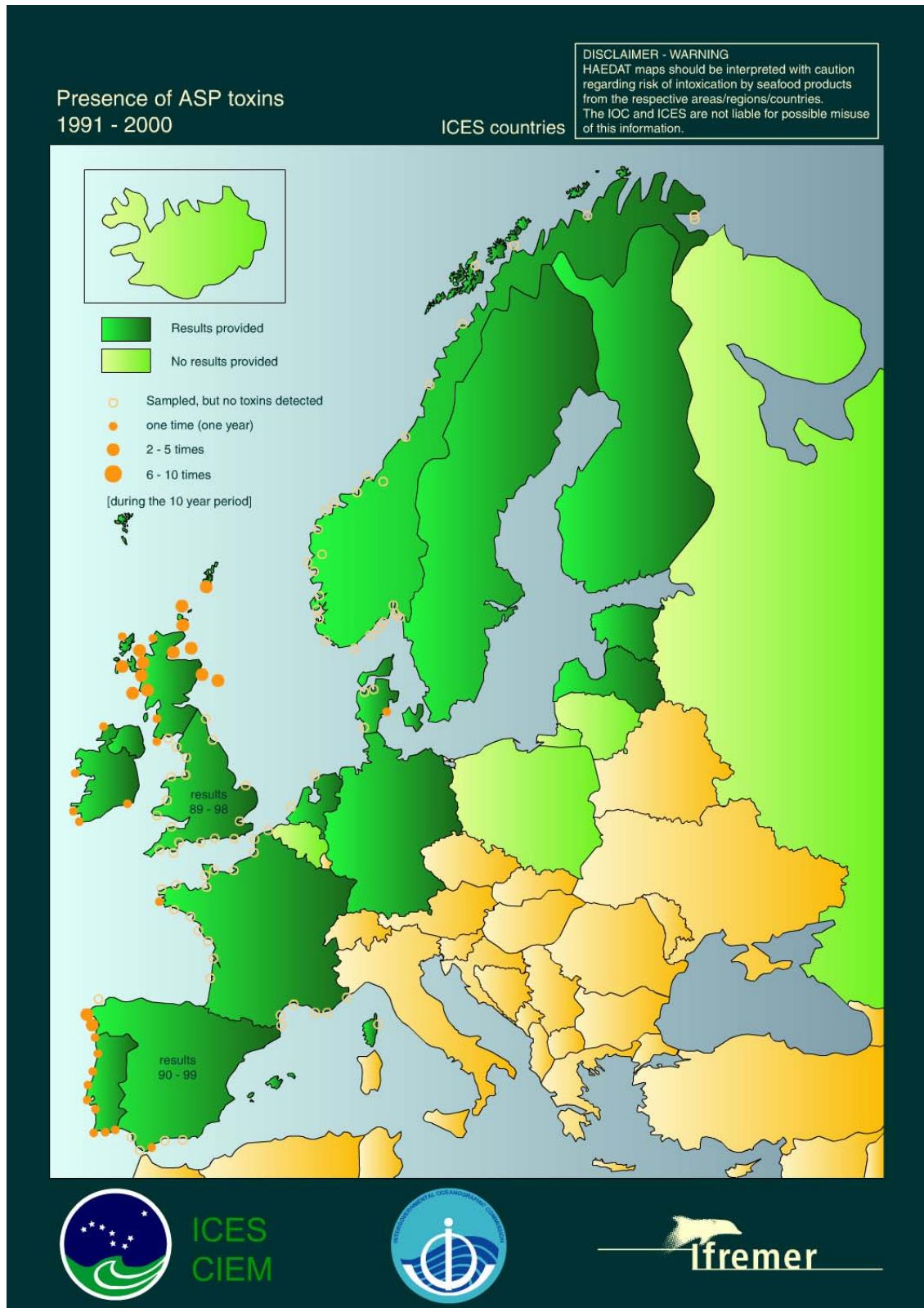
Italia

Ocasionalmente aparecen concentraciones altas (hasta 4×10^6 células/litro) de especies *Pseudo-nitzschia* (*delicatissima* y *pseudodelicatissima*) en el Golfo de Nápoles (Montresor *et al.*, 2000). Se encontró en julio de 2002, DA superior a los límites reglamentarios en *Pecten maximus* de Escocia (EU-NRL, 2002).

Países Bajos

En el Mar de Wadden holandés, entre noviembre de 1993 y julio de 1994 se encontraron especies de diatomeas del tipo *Pseudo-nitzschia*, formadoras de cadenas con cantidad de células entre 10^2 y 10^5 por litro. La microscopía electrónica de aislados cultivados y de muestras de campo mostraron que la mayoría pertenecía a *Pseudo-nitzschia pungens*. A comienzos de junio de 1994 se encontraba presente también, *P. fraudulenta* y ocasionalmente *P. delicatissima*. Un aislado mostraba la morfología característica de *P. multiseriis*. El aislado de *P. multiseriis* produjo DA; se encontraron 19 pg/célula luego de 55 días de crecimiento. La especie *Pseudo-nitzschia* encontrada en aguas costeras holandesas no ha sido aun relacionada con intoxicaciones por mariscos (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). En 2001, se encontraron algas productoras de DA, aunque no toxinas ASP, en mariscos (EU-NRL, 2001). Una única muestra de *Spisula*, en la primavera de 2002, contenía hasta 5 mg DA/kg (método CL-UV). No se encontró DA en un nuevo muestreo realizado tres días después DA (EU-NRL, 2002).

Figura 4.2 Presencia de toxinas ASP en aguas costeras de países europeos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



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

Noruega

No se ha informado de brotes de ASP a pesar de la gran abundancia de especies de *Pseudo-nitzschia* (EU-NRL, 1998). Se detectó DA, en 2000 y 2001, en mejillones y vieiras, aunque nunca por encima del límite reglamentario, aun durante una floración de *Pseudo-nitzschia* ($>4\,000\,000$ células/litro) (EU-NRL, 2001).

Portugal

En 1996, se encontró DA en cantidades muy pequeñas ($<20\,\mu\text{g/g}$) en casi todas las especies de bivalvos a lo largo de toda la costa portuguesa, por periodos cortos y espaciados, coincidiendo con la aparición de *Pseudo-nitzschia* spp., principalmente *P. australis* en concentraciones por debajo de 10^5 células/litro. En 1995, en chione liso de Callista (*Callista chione*), se encontró por primera vez DA en bivalvos por encima de $20\,\mu\text{g/g}$ (EU-NRL, 1998). En 1999, se analizaron un total de 960 muestras buscando toxinas ASP. El DA se detectó en 102 muestras, superándose sólo en dos el límite reglamentario (EU-NRL, 2000). En 2000 y 2001, se encontró DA en vieiras de pesquerías naturales (EU-NRL, 2001). El DA, es en los mariscos portugueses un suceso recurrente que afecta diversos recursos varias veces al año, fundamentalmente en primavera y otoño. Son frecuentes niveles dos veces superiores al límite reglamentario. Cunado varias especies de mariscos se explotan en la misma zona restringida, se encuentran entre las más tóxicas el berberecho común (*Cerastoderma edule*), un tipo de almeja babosa (*Venerupis pullastra*), surco de Peppery, almeja, mejillón, ostra y navajuela. En las sardinas enteras, el DA se detectó en niveles que ocasionalmente superan el límite reglamentario. Afortunadamente, la toxicidad se limita a los intestinos, no acumulándose en el tejido muscular (Vale y De Sampayo, 2001)

España

Se encontró, en octubre de 1994, por primera vez DA en almejas de cultivo ($\leq 20\mu\text{g/g}$) en Galicia noroeste de España, en coincidencia con una floración de *P. australis*. Otras cuatro, en aguas gallegas, *Pseudo-nitzschia* spp. (*P. fraudulenta*, *P. cuspidata*, *P. pungens*, *P. delicatissima*) eran de cultivo y no produjeron DA. Otras especies identificadas en estas aguas, aunque no aun cultivadas eran *P. multiseries*, *P. subpacifica* y *P. pseudodelicatissima* (Fraga et al., 1998). Nuevamente se detectó DA en abril de 1995, en almejas ($> 20\,\mu\text{g/g}$) (en las rías gallegas) coincidentemente con la aparición de *Pseudo-nitzschia australis*. Se encontró DA en almejas coincidiendo con la aparición de *Pseudo-nitzschia* spp, en agosto y octubre de 1995 y, en setiembre y noviembre de 1996 en las rías gallegas. En 1996 las almejas se detoxificaron rápidamente.

Desde setiembre a diciembre de 1995 y durante todo 1996, se encontró DA en vieiras (rías gallegas) en coincidencia con la aparición de *Pseudo-nitzschia* spp. Tuvo lugar una detoxificación lenta.

Se ha informado que unos pocos sucesos fueron muy virulentos, produciendo niveles de toxinas en mejillones y otros mariscos cercanos al valor guía y presentándose habitualmente en zonas restringidas. Desde 1995, está prohibida la cosecha de vieiras en la mayoría de las zonas de Galicia por la presencia de toxinas ASP (EU-NRL, 1998).

Se hicieron en 1999, 4 953 análisis de ASP por CL. En 1999, hubieron diferentes sucesos tóxicos que fueron vinculados con a.o toxinas. Esto determinó la prohibición de cosechar bivalvos en algunas de las zonas de producción (EU-NRL, 2000). En 2000 y 2001, hubieron muchos cierres por la presencia de toxinas DSP y ASP (EU-NRL, 2001). Ocurrieron en 2002, episodios tóxicos causados por ASP en Galicia y Andalucía (salvo las vieiras). Las zonas de producción fueron cerradas por la presencia de *Pseudo-nitzschia* spp. (EU-NRL, 2002).

Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Se encontraron por primera vez en 1997, trazas de DA en Escocia (Shetland). No hubo detalles disponibles (EU-NRL, 1998). En julio de 1999, se cerró como consecuencia de la aparición de toxinas ASP, una zona de pesca de vieira de 8 000 millas cuadradas en la costa oeste de Escocia (Wyatt, 1999). Se encontró que *P. australis* originó en 1999 y en 2000 la presencia de DA en *Pecten maximus* y *Chlamys opercularis* (Bates, 2000). El principal suceso tóxico de 1999 fue el cierre de 8 000 km² de zonas de pesca de vieiras al encontrarse DA. En almejas se encontraron niveles bajos de DA, que alcanzaron valores de hasta 250 µg/g en las gónadas de vieira y de hasta 500 µg/g en el tejido total (EU-NRL, 2000). Se encontraron en 2000 y 2001, toxinas ASP por encima del límite reglamentario en vieiras enteros y en tejido de gónadas de vieira provenientes de todas las principales zonas de pesca de vieiras escocesas. Se fijaron restricciones a las actividades pesqueras en todas las zonas afectadas (EU-NRL, 2001).

En el periodo del 1 de abril de 2002 al 31 de marzo de 2003, se examinaron mariscos de 76 zonas de producción cercanas a la costa, de 36 zonas secundarias y zonas pesqueras próximas a la costa en Escocia. Se analizaron un total de 5 409 muestras de moluscos. De este total, se analizó ASP en 2 788 muestras, encontrándose positivas 115 (Anonymous, 2003c).

Se encontraron en vieiras en 2001, en Irlanda del Norte, toxinas ASP que superaban el límite reglamentario (EU-NRL, 2001). La Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido, seguidamente anunció una veda para la pesca de vieiras en el mar adyacente a Irlanda del Norte (Anonymous, 2001a).

4.7.2 América del Norte

La Figura 4.3 ilustra la presencia de toxinas ASP en aguas costeras norteamericanas.

Canadá

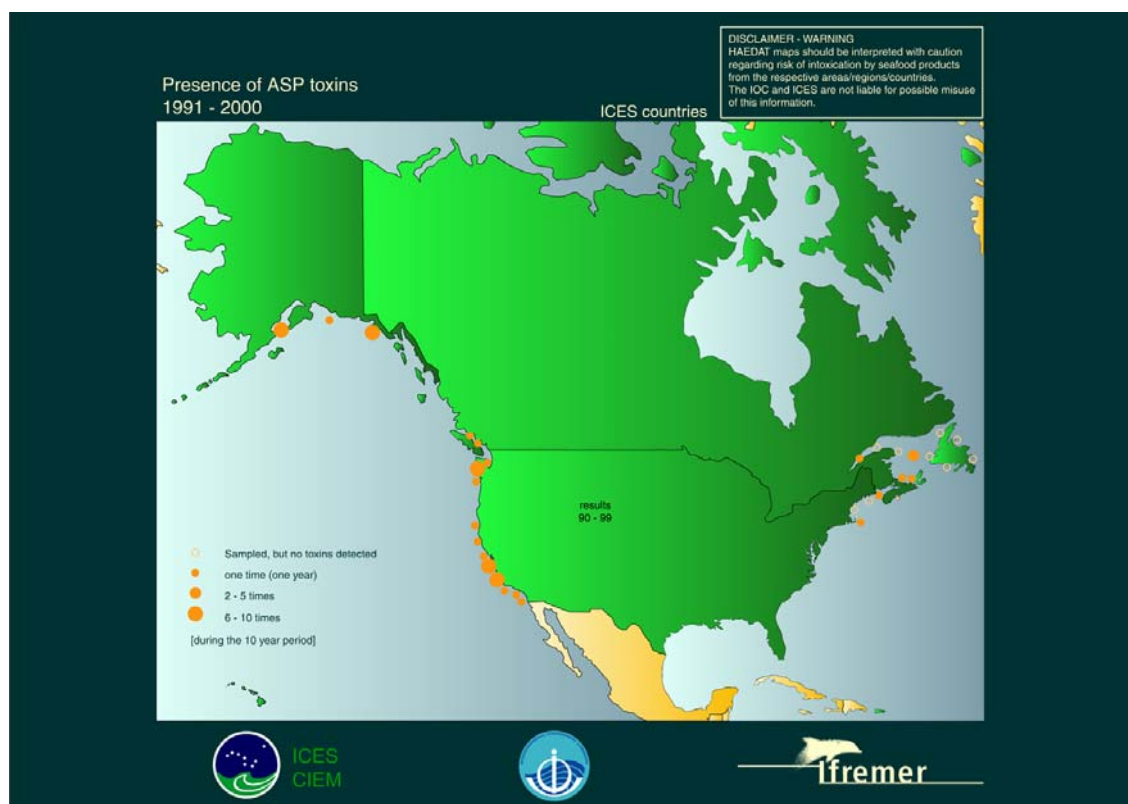
El primer informe de ASP en Canadá es de 1987. Un brote de intoxicación alimentaria en noviembre y diciembre de 1987 pudo rastrearse a cholgas de cultivo (*Mytilus edulis*) de la región de la Bahía Cardian en la Isla Príncipe Eduardo, al este de Canadá. Como consecuencia de ingerir almejas de la zona se registraron tres muertes y 105 casos confirmados de intoxicación aguda. La toxina fue identificada como DA y el organismo fuente pareció ser la diatomea emplumada *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseries*. Una floración de plancton coincidente con el brote, estaba formada casi únicamente por esta diatomea, encontrándose una correlación positiva entre la cantidad de células de *P. pungens* f. *multiseries* y la concentración de DA en el plancton. Este suceso tóxico causado por mariscos fue el primer brote conocido de intoxicación humana debida a ingestión de DA (Bates *et al.*, 1989). Se desconoce si antes de 1987 había aparecido la ASP, pero antes de 1980, la industria de las almejas estaba en su infancia. Un incidente tuvo sin embargo, lugar en 1984 en Calgary, Alberta, en el que 12 personas que habían ingerido almejas de la Isla Príncipe Eduardo presentaron vómitos, diarrea y visión borrosa entre la hora y media y tres horas después; persistiendo los síntomas entre uno y siete días. No se identificó ningún agente etiológico (Todd, 1993). En los años posteriores al incidente de 1987, las floraciones fueron menos intensas. Sólo en otoño, los niveles de DA en mariscos a veces alcanzaron el valor guía de cierre por un periodo corto de las zonas de cosecha. En octubre de 1991, se registró una floración limitada al norte de la Isla Príncipe Eduardo (Todd, 1997).

Desde 1988, se han recogido muestras de fitoplancton en cuatro estaciones al occidente de la Bahía de Fundy. Las floraciones de *P. pseudodelicatissima* en esta bahía suelen presentarse a fines del verano, con las concentraciones observadas más altas en 1988 y 1995 a fines de agosto y comienzos de setiembre (> 1.0x10⁶ células/litro), provocando el cierre de las zonas de cosecha mariscos (Martin *et al.*, 2001).

Se detectaron en un tipo de almejas (*Mya arenaria*) y cholgas (*Mytilus edulis*), provenientes del sudoeste de la Bahía de Fundy, New Brunswick, durante agosto a octubre de 1988, niveles de DA mayores que los aceptables para consumo humano (20 µg/g) determinando el cierre de algunas zonas de cosecha de mariscos. Se encontró que *P. pseudodelicatissima* era el origen del DA, detectándose en todo el plancton recogido (recogidos desde 1987). Durante todo el año se encontró *P. pseudodelicatissima* con concentraciones mayores en junio/julio, seguidas por las más elevadas concentraciones en setiembre, cuando las temperaturas del agua eran elevadas. La mayor concentración de *P. pseudo-delicatissima* (1.2×10^6 células/litro) fue medida en 1988 persistiendo en la columna de agua por un periodo mayor que en 1987, 1989 y 1990. El análisis de los nutrientes (clorofila a, salinidad, nitrato, fosfato, silicato superficial, a 10 y a 1 m por encima del fondo; medido, sin embargo, durante 1989 y 1990 pero no en 1988) no indicó una correlación evidente entre *P. pseudodelicatissima* y las concentraciones de nutriente (Martin *et al.*, 1993).

No se encontró DA en los músculos aductores de vieiras marinas próximas a la costa de Georges Bank, Browns Bank y la Bahía de Fundy, aunque en las glándulas digestivas, rutinariamente se encontraban cantidades importantes (10-200 µg/g). Solamente estaban disponibles para la venta los músculos aductores por contener habitualmente las glándulas digestivas toxinas paralíticas (PSP). En abril y mayo de 1995, un tipo de vieiras de Georges Bank tenían niveles de DA en sus glándulas digestivas por encima de 1 300 µg/g y de hasta 150 µg/g en las huevas, mientras las vieiras de Brown Bank contaban con más de 2 500 µg/g en sus glándulas digestivas. El valor individual más alto registrado en Brown Banks fue de 4 300 µg/g de glándula digestiva de vieiras en 1995. No se ha descubierto la fuente del DA en el episodio de 1995 (Stewart *et al.*, 1998). En setiembre de 2000, se hallaron almejas contaminados con DA en la costa este (Mos, 2001).

Figura 4.3 Presencia de toxinas ASP 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

Alaska

En Alaska, no han habido problemas severos con el DA, aunque se haya identificado el *Pseudo-nitzschia* spp, potencialmente tóxico en sus aguas. Se han ensayado, aproximadamente desde 1992, 3 000 muestras, básicamente de mariscos y peces de escama con valor comercial. El mayor valor de DA fue de 11,1 µg/g (para una navajuela) con sólo 17 valores superiores a 2 µg/g (Horner *et al.*, 1997)

Costa Oeste

A fines de octubre y en noviembre de 1991, los navajuelas (*Siliqua patula*) que habitaban en la zona de oleaje de las playas costeras sobre el Pacífico en Washington y Oregon contenían niveles de DA del orden de 154 µg/g (peso mojado) en sus partes comestibles (pie, sifón y manto). En consecuencia se prohibió la cosecha comercial y deportiva de las almejas (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Se informaron veinticuatro casos de seres humanos enfermos en el estado de Washington con síntomas gastrointestinales leves y un caso de falta de memoria, aunque nunca se confirmó la presencia de ASP. Los niveles de DA estaban aun por encima del valor de clausura de cosecha de 20 µg/g, al menos hasta mayo de 1992. Nunca se volvieron tóxicos otros mariscos del tipo molusco, incluso ostras comerciales en bahías costeras y almejas (Horner *et al.*, 1997).

Seguidamente, se encontró DA en las vísceras de cangrejos Dungeness (*Cancer magister*) en aguas costeras de California, Oregon y Washington. Como consecuencia, esta importante pesquería comercial fue cerrada por varias semanas mientras los investigadores decidían la limpieza correcta de los cangrejos antes que por cocción la carne comestible se mantenga libre DA (Horner y Postel, 1993). No se ha determinado la fuente de DA en navajuelas y cangrejos Dungeness en estos incidentes (Horner *et al.*, 1997).

Trainer *et al.* (1998b) sugirieron que *P. pungens* puede ser la especie responsable, al menos en parte, de la acumulación de DA en navajuelas a niveles por encima de 20 µg/g en aguas costeras del estado de Washington en 1991. Como los navajuelas depuran el DA lentamente de sus tejidos, la exposición crónica a niveles bajos de DA puede alcanzar para su acumulación.

En el Canal Hood, en el occidente de Washington en el otoño de 1994, persistió por más de seis semanas una floración de *P. pungens*, *P. multiseriata* y *P. australis*. Las almejas, organismo sentinela es este estado para las toxinas de algas, contenían aproximadamente 10 µg DA/g (peso mojado) y el fitoplancton alrededor de 14 µg/g (peso mojado), (Horner *et al.*, 1997).

En julio y agosto de 1997 se observó una floración de *Pseudo-nitzschia* spp. en Penn Cove, Washington. Se midieron niveles de DA en las almejas de hasta 3 µg/g. en el agua de mar, los niveles de DA iban desde 0,1 a 0,8 µg/L. se detectaron cuatro especies de *Pseudo-nitzschia*, a saber *P. pungens*, *P. multiseriata*, *P. australis* y *P. pseudodelicatissima*. La mayor concentración de *Pseudo-nitzschia* fue de 13×10^6 células/litro el 28 de julio de 1997 (Trainer *et al.*, 1998a).

En el otoño de 1998, los niveles elevados de DA clausuraron la recolección de navajuelas a lo largo de la costa de Washington. En abril de 2001, un pico en los niveles de toxinas marinas determinó la suspensión de la recolección de navajuelas en la zona de Twin Harbours, aunque cedió lo suficiente como para reasumirla en un mes. En octubre de 2002, las tres playas oceánicas al norte de Grays Harbour, Washington, que se pensaba abrirían a comienzos de octubre, permanecieron cerradas hasta nuevo aviso al detectarse DA en navajuelas por encima de la norma federal de 20 µg/g (Ayres, 2002). A fines de diciembre de 2002, los niveles de toxinas habían disminuido, aunque seguían por encima de 20 µg/g. Esto quiere decir que la recolección de navajuelas no se permitió en las playas de Washington durante la estación, hasta la primavera de 2003 (Ayres, 2003).

A comienzos de setiembre de 1991 (18 al 27 de setiembre de 1991), murieron o experimentaron síntomas neurológicos poco frecuentes más de 100 pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) y cormoranes (*Phalacrocorax penicillatus*) en la Bahía de Monterey, California Central, atribuidos a la neurotoxina DA. La fuente fue una floración de la diatomea emplumada *P. australis* (Horner *et al.*, 1997).

Los niveles de DA en las aguas costeras durante el pico de este incidente, eran de 10 µg/l, con *P. australis* en exceso de 10⁶/litro. En el *P. australis* se encontraron aproximadamente 100 µg DA/g (peso mojado). Se encontraron en los contenidos estomacales de las aves afectadas restos de frústulas de *P. australis* y niveles altos de DA (40-50 µg/g). Se encontró DA en las vísceras (hasta 190 µg/g) y en la carne (hasta 40 µg/g) de anchoas locales, una de las principales fuentes de alimento de las aves marinas. Algunos autores informan contenidos de DA en las vísceras de las anchoas de hasta 485 µg/g (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

En el otoño de 1991, además de *P. australis* en la Bahía de Monterey, California, había presente otros *Pseudo-nitzschia* spp. En diversos lugares de la costa oeste de los EEUU, desde California del Sur hasta la desembocadura del Río Columbia (Newport, Coos Bay, Ilwaco). En el otoño de 1992, además del *P. australis*, estaban presentes en la Bahía de Monterrey otros *Pseudo-nitzschia* spp. (*P. delicatissima*, *P. pungens* f. *multiseries* y *P. pseudodelicatissima*) productores potenciales de DA, aunque no se informó de ningún brote del mismo.

En la literatura hay evidencias claras que señalan a las especies *Pseudo-nitzschia* encontradas en 1991 y 1992, con excepción del *P. australis*, como parte de la comunidad de diatomeas de la costa oeste al menos desde la década de los años 1940 (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

Más de 400 leones marinos (*Zalophus californianus*) de California murieron a largo de la costa central del estado entre mayo y junio de 1998. Se identificó al DA producido por *P. australis* y transmitido a los leones marinos a través de las anchoas septentrionales (*Engraulis mordax*) como el posible agente causante. Contrariamente a los pescados, la cholga (*Mytilus edulis*) recogido durante el periodo de mortalidad de los leones marinos no contenía DA o sólo cantidades traza (Lefebvre *et al.*, 1999; Scholin *et al.*, 2000).

A lo largo de la costa de California (Bahía de Monterrey), a fines de agosto y principios de setiembre de 2000, tuvo lugar una gran floración de *Pseudo-nitzschia* asociada a muy altos niveles de toxinas ASP. En las floraciones anchoas, sardinas y krill acumularon suficiente DA como para resultar perjudiciales para los animales que los consumían (Anonymous, 2001c).

En mayo de 2002, sardinas, anchoas, cangrejos y mariscos a lo largo de la costa de California tenían niveles altos de DA, por lo que las autoridades aconsejaron no recolectarlos ni ingerirlos (Anonymous, 2002e). Morían, durante abril y mayo, un número creciente de mamíferos marinos y pájaros a lo largo de costa californiana. Unos 70 delfines terminaron sobre las playas del estado, en tanto que más de 200 leones marinos y 200 aves enfermaron o murieron. Se encontraron hasta 380 µg/g de DA en almejas de las aguas de Santa Bárbara. No se ha informado de seres humanos enfermos (Anonymous, 2002f).

Costa Este

Se aisló de las aguas de la Bahía de Massachusetts, cerca de Boston, la diatomea productora de DA, *P. pungens* f. *multiseries*. Produjo niveles de DA entre lo no detectable a 0,21 pg/célula. Se aisló también, *P. pseudodelicatissima* que no produjo niveles detectables de DA. Estos hechos ofrecieron al menos una fuente probable para la acumulación de DA en almejas de Nantucket en enero-febrero de 1991. El hecho es que nunca pudo atribuirse a organismo alguno la aparición, con valores la mitad de los reglamentarios, de DA en mariscos de Nantucket (Villareal *et al.*, 1994).

A menudo hay presentes y en gran abundancia especies de *Pseudo-nitzschia* en las aguas costeras de Louisiana, incluyendo zonas con ostras. Un estudio de varios años en aguas de plataforma y de estuarios de Louisiana mostró la presencia de *Pseudonitzschia* spp. En el 73 por ciento de las muestras de la plataforma y en el 20 por ciento de las muestras de estuarios, había, al menos, seis especies de *Pseudonitzschia*, teniendo *P. multiseriata* el mayor potencial para causar un brote de intoxicación por DA (Parsons *et al.*, 1998). Posiblemente debido a que no se han individualizado casos aislados o porque las ostras no se volvieron tóxicas, es que no han habido brotes conocidos de ASP en Louisiana (Dortch, 2002).

Golfo de México

El DA en fitoplancton apareció en extractos de mariscos y de fitoplancton del Golfo de México (2.1 pg/célula). En primer lugar se observó a la diatomea marina *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriata* como la especie dominante en el estudio de barrido del plancton de Offats Bayou, Bahía de Galveston, Texas del 25 de febrero de 1989, con microscopio electrónico. En las aguas alrededor de esta bahía, *P. pungens* f. *pungens* parece ser más dominante en los meses cálidos, siendo reemplazada gradualmente por *P. pungens* f. *multiseriata* con las tormentas de otoño e invierno. Se han obtenido cultivos viables, sin embargo, de ambas formas en aguas con temperaturas tan elevadas como 29,5 °C (Dickey *et al.*, 1992a).

No se cuenta con evidencias directas de la acumulación de toxinas ASP en mariscos del Golfo. Se han observado sólo *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriata* con densidades bajas en la Bahía de Galveston. La producción de DA del aislado de esta bahía (célula vs. cultivo entero) de *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriata* es equivalente al informado de aislados canadienses. Todos los clones de cultivo de esta forma aislada de la Bahía de Galveston han producido DA en las fases de crecimiento estacionarias y senescentes. No fueron consideradas como un riesgo a la salud pública las concentraciones de toxinas ASP en el fitoplancton del Golfo de México (Dickey *et al.*, 1992a).

En las plataformas continentales de Louisiana y Texas, desde 1990 a 1994, *Pseudo-nitzschia* spp. era en extremo abundante (hasta 10⁸ células/litro; presentes en el 67 por ciento de 2 159 muestras); y moderadamente abundante (hasta 10⁵ células/litro, (presentes en el 18 por ciento de 192 muestras) en cultivos de ostras en el estuario de Terrebonne Bay en Louisiana en 1993 y 1994. En la plataforma había un marcado ciclo estacional con máximos cada primavera durante 5 años y a veces en otoño, posiblemente vinculados al flujo del río, la estabilidad de la columna de agua y la disponibilidad de nutrientes. En cambio, en el estuario, no se observó ningún ciclo estacional de abundancia. En este estudio la *Pseudo-nitzschia* spp. no se identificó rutinariamente. Se han, sin embargo, identificado con microscopía electrónica de barrido, *P. multiseriata* productoras de toxinas de la Bahía de Galveston, en Texas (ver parágrafo anterior), y células de una floración en la plataforma de junio de 1993, como *P. pseudodelicatissima*, a veces tóxica. No se conocen brotes de ASP en esta zona (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

4.7.3 América Central y del Sur

Argentina

Se detectó ASP en Mar del Plata en el invierno del año 2000. La especie dominante era *P. australis*, con la toxina registrada en mejillones y peces (*Engraulis anchoita*) informándose también de dos episodios con mortalidad masiva de aves marinas (Ferrari, 2001).

Chile

La ASP posiblemente resulte una amenaza en Chile, ya que la diatomea *Nitzschia pseudoseriata* (*Pseudo-nitzschia australis*), uno de los organismos causantes propuestos productor de DA, ha sido frecuentemente descrito en las muestras de fitoplancton de aguas chilenas (Lagos, 1998).

El porcentaje de muestras de mariscos con niveles de DA superiores al límite reglamentario de 20 µg/g ha aumentado de forma sostenida desde 1997. Hasta 2001, no había registrado ningún caso de

intoxicaciones en seres humanos con ASP, pero la situación constituye una amenaza potencial para la salud pública (Suárez-Isla, 2001).

México

En enero de 1996, se encontraron 150 pelícanos marrones (*Pelecanus occidentalis*) muertos en un lapso de cinco días en el Cabo San Lucas en el extremo de la Península de Baja California. La muerte fue causada por alimentarse con caballa (*Scomber japonicus*) contaminado con *Pseudo-nitzschia* spp. productora de DA (Sierra-Beltrán *et al.*, 1997).

Ochoa *et al.* (1997) informaron que la Península de Baja California había sido testigo de varias floraciones de algas tóxicas de 1991 a 1996, entre ellas *Pseudo-nitzschia* spp. La Bahía Magdalena fue considerada como un sitio ideal para explotaciones de acuicultura y hay varios proyectos de envergadura en camino. En Bahía Magdalena se sugirió la presencia de DA en mariscos durante el invierno de 1994 a 1995. Se recomendó una vigilancia continua, aunque los niveles de DA estaban bien por debajo del valor guía. También se observó en febrero de 1996, una floración de *Pseudo-nitzschia* spp., pero sin detectarse toxinas.

En enero y febrero de 1997, tuvieron lugar intoxicaciones masivas y mortalidad de organismos marinos en el Golfo de California, afectando 766 loons comunes (*Gavia immer*) y 182 mamíferos marinos pertenecientes a cuatro especies diferentes. Se encontró en el estómago de los delfines comunes (*Delphinus capensis*), un resto de frústulas *Pseudonitzschia* y sardinas (*Sardinops sagax*). El análisis con CL de los tejidos probó la presencia de DA y de algunos de sus isómeros. También fueron detectados el DA y sus isómeros en muestras de diatomeas del estómago de sardinas. Se identificó *P. australis* como productor de toxinas (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998).

4.7.4 Asia

Japón

En el Japón se realiza desde 1991 un monitoreo de la toxina ASP en bivalvos de cultivo y en diatomeas. No ha sido detectado el DA en mariscos con importancia industrial desde 1991 a 1994, ni en diatomeas excepto en una muestra de *Pseudo-nitzschia pungens* (0,01 pg de DA por célula) recogidas de una marea roja producida en agosto de 1994, en la Bahía de Hiroshima. Por otra parte se detectaron grandes cantidades de DA en el alga roja *Chondria armata* presente en la Prefectura de Kagoshima, al sur del Japón. En esta zona el cangrejo xántido *Atergatis floridus* tenía 10 mg DA/kg. Como el cangrejo se alimenta de algas, se sugiere que el DA puede haber tenido su origen desde la red alimentaria (Van Apeldoorn *et al.*, 1999).

4.7.5 Oceanía

Australia, Tasmania y Nueva Zelanda

Se realizó una encuesta taxonómica cubriendo toda Australia de especies del género *Pseudo-nitzschia*, una diatomea potencialmente tóxica. Las especies dominantes, causantes de floraciones *Pseudo-nitzschia* en aguas costeras australianas eran *P. fraudulenta* (Nueva Gales del Sur), *P. pungens* f. *pungens* y *P. pseudodelicatissima* (aguas de Tasmania y de Victoria). Sólo en una ocasión se detectó *P. pungens* f. *multiseries*, y solamente como un componente menor (5 por ciento de la biomasa total) de una densa floración de *P. pungens* f. *pungens* en un estuario de Nueva Gales del Sur. Nunca se detectó *P. australis* en aguas australianas. Las poblaciones de diatomeas cultivadas de *P. pseudodelicatissima* de aguas costeras de Tasmania y Victoria eran consistentemente no tóxicas. Tampoco resultaron tóxicos los cultivos de *P. pungens* f. *pungens* de Australia (Hallegraeff, 1994) y Tasmania (Hallegraeff, 1994). Resultó también no tóxico *P. fraudulenta* (Hallegraeff, 1994). Se han detectado trazas de DA en algunas vísceras de vieiras tanto por CL como por EM, pero las concentraciones en productos de mariscos comestibles estaban todas bien por debajo de 20 µg/g de carne de marisco (Hallegraeff, 1994). En Nueva Zelanda, no se identificó el DA en 150 muestras de

mejillón Greenshell (*Perna canaliculus*) ni en muestras de plancton retiradas durante periodos de floración de *Pseudo-nitzschia* (Van Apeldoorn *et al.*, 1999). Durante los veranos de 1992 y 1993, el programa de biotoxinas marinas de Nueva Zelanda halló niveles bajos de DA en muestras de fitoplancton desde Otago a Northland. Se han encontrado cantidades bajas (hasta 3 000 células por litro) de *P. pungens* en la Bahía de las Islas, el Golfo Hauraki y la Bahía de Plenty (Smith *et al.*, 1993). Tanto *P. pungens* como *P. pseudoseriata* han sido encontradas en aguas de Nueva Zelanda, pero el ASP no se ha asociado nunca claramente con mariscos del Océano Pacífico. Se han identificado niveles bajos de DA por análisis químico de muestras de mariscos. El nivel más alto (16,5 µg/g) se encontró en Manukau Harbour. Otros niveles detectables estaban muy por debajo de 20 µg/g (Bates *et al.*, 1993).

Durante el periodo de enero de 1993 a julio de 1996, un 0,3 por ciento de las muestras de mariscos retiradas semanalmente de las costas de Nueva Zelanda, tenían toxinas ASP en exceso del límite reglamentario en un total de ocho eventos ASP (nivel máximo de 600 µg/g vieira). En el periodo de muestreo no hubo brotes de intoxicaciones en seres humanos (Sim y Wilson, 1997).

Los niveles más altos de DA encontrados en Nueva Zelanda hasta principios de 2003 fueron 187 µg/g en un tipo de almejas de Marlborough Sounds (diciembre de 1994), 72,4 µg/g en vieiras M&R de Tauranga Harbour (diciembre de 1994), 210 µg/g en vieiras enteras de la Bahía Whangaroa (noviembre de 1993) y 600 µg/g en intestinos de vieiras de la Bahía Doubtless (diciembre de 1994) (Anonymous, 2003b).

4.8 Reglamentación y seguimiento

4.8.1 Europa

En Estados Miembro de la Unión Europea, es válido un valor guía de 20 mg/kg para el total de toxina ASP en las partes edibles de moluscos (todo el cuerpo o cualquier parte comestible por separado). El método analítico a emplearse requiere de CL. Si una muestra, tal como se define en el Anexo, contiene más de 20 mg DA/kg, deberá destruirse toda la tachada (EC, 2002b).

Para los moluscos bivalvos de las especies *Pecten maximus* y *Pecten jacobus*, los estudios científicos han demostrado que con un DA total en el cuerpo entre 20 y 250 mg/kg, bajo ciertas condiciones restrictivas, el nivel de DA en el músculo aductor y/o en las gónadas destinadas a consumo humano normalmente es inferior al límite de 20 mg/kg. A la luz de estos estudios recientes, es apropiado fijar, sólo para la etapa de cosecha y sólo para los moluscos bivalvos de las especies antes mencionadas, un nivel de toxina ASP respecto al total cuerpo superior que el límite de 20 mg/kg. No debe permitirse la cosecha de *Pecten maximus* y *Pecten jacobus* durante un episodio tóxico con ASP activa en las aguas de las zonas de producción (EC, 2002b).

Puede darse inicio a un régimen restringido de cosecha de moluscos con concentraciones superiores a 20 mg/kg en todo el cuerpo si dos análisis consecutivos de las muestras tomadas entre uno y no más de siete días, indican concentraciones de DA en los moluscos enteros inferiores a 250 mg/kg y que la concentración de DA en partes para consumo humano, que deben analizarse por separado, resulte inferior a 4,6 mg/kg. Los análisis del cuerpo entero se harán en un homogenato de 10 moluscos. El análisis de las partes comestibles se hará sobre un homogenato de 10 partes individuales (EC, 2002b).

Dinamarca

El seguimiento de los mariscos por medio de reglamentos se realiza desde 1993 (Ravn, 1995). Se sigue el *Pseudo-nitzschia pungens*. Las zonas de cosecha se cierran con aproximadamente 5×10^5 células/litro (Shumway *et al.*, 1995).

Irlanda

El Programa de Vigilancia de Biotoxinas comenzó en Irlanda en 1984, basado inicialmente en la búsqueda de toxinas DSP por bioensayos. Recientemente, el esfuerzo volcado a la vigilancia se ha incrementado al agregarse otras toxinas, el DA y en particular las azaspirácidas, mediante análisis semanales empleando el bioensayo en ratón para DSP, la CL-EM (ácido ocadaico, DTX2, azaspirácidas) y la CL para el DA y el análisis de fitoplancton. Las autoridades reglamentadoras y sanitarias y los productores y procesadores reciben regularmente por fax o teléfono celular informes de las muestras analizadas. Para aumentar el acceso se está desarrollando un sistema de información por Internet (McMahon *et al.*, 2001).

4.8.2 América del Norte

Canadá

En 1998 entró en vigencia en Canadá, un reglamento con un valor guía de 20 mg DA/kg de mejillón. Las zonas productoras de productos de la pesca se cierran cuando los niveles de toxinas en mariscos son superiores al valor guía. La CL es el procedimiento analítico empleado. Se vigila la presencia de *Pseudo-nitzschia pungens* (Shumway *et al.*, 1995). Desde 1988, se recogen de cuatro estaciones en la Bahía de Fundy, al oeste del país, muestras de fitoplancton. La base de datos recopila más de 70 000 registros entre 1988 y 2001. Los planes futuros son continuar mejorando el sistema y el control de calidad y explorar mejor la variabilidad temporal y espacial de los patrones (Martin *et al.*, 2001).

Estados Unidos de América

En los EEUU se aplica un valor guía no oficial de 20 mg DA/kg para bivalvos. El método analítico emplea CL. El valor guía para cangrejos cocidos (vísceras y hepatopáncreas) es de 30 mg DA/kg. El método analítico emplea CL (Shumway *et al.*, 1995). El Departamento de Recursos Marinos realizó un programa limitado de muestreo del DA. Se dispone de información permanentemente actualizada del vecino Canadá. Se procede a los cierres una vez que los niveles alcanzan 20 mg/kg. Los mariscos exportados a la UE deben ir acompañados de un certificado sanitario (Shumway *et al.*, 1995).

4.8.3 América Central y del Sur

Argentina

La Argentina cuenta con un programa nacional de vigilancia de toxicidad en almejas en cada una de las provincias costeras, con laboratorios regionales y, un estación fija en Mar del Plata (Ferrari, 2001).

Brasil

Tuvo durante un año, una iniciativa de vigilancia piloto, pero no se ha establecido aun un programa nacional de vigilancia (Ferrari, 2001).

Chile

Están vigentes programas nacionales de vigilancia para mariscos y fitoplancton (Suárez-Isla, 2001).

Uruguay

El Uruguay tiene un programa nacional regular de vigilancia de almejas y fitoplancton tóxicos (Ferrari, 2001).

4.8.4 Oceanía

Australia

Desde 1993 existen programas de vigilancia basados en reglamentos para almejas y algas (Ravn, 1995).

Nueva Zelanda

Desde 1993 hay, para mariscos, vigilancia basada en reglamentos. El método analítico emplea CL (Ravn, 1995). El límite reglamentario es 20 mg DA/kg de carne de marisco (Sim y Wilson, 1997).

El Programa de Vigilancia de Biotoxinas de Nueva Zelanda combina ensayos regulares de mariscos y vigilancia del fitoplancton. Actualmente, los análisis de ASP en mariscos hacen una selección con bioensayo en ratón, seguido de análisis confirmatorios (CL y CL-EM) (Busby y Seamer, 2001).

Está en desarrollo un nuevo programa de seguimiento de biotoxinas que proporcionará datos muy precisos en menor tiempo y sin recurrir a bioensayos en ratón. Implementará métodos de ensayo basados en CL-EM, produciendo datos analíticos químicos sustitutivos de los bioensayos en ratón. Se discute el desarrollo e implementación de nuevos métodos de ensayo, incluidos sus fondos, la validación, los protocolos de ensayo, la disponibilidad de normas analíticas, la comparación con ensayos disponibles, los tipos de instrumentos y la cooperación internacional (McNabb y Holland, 2001).

5. Intoxicación neurológica por mariscos (NSP)

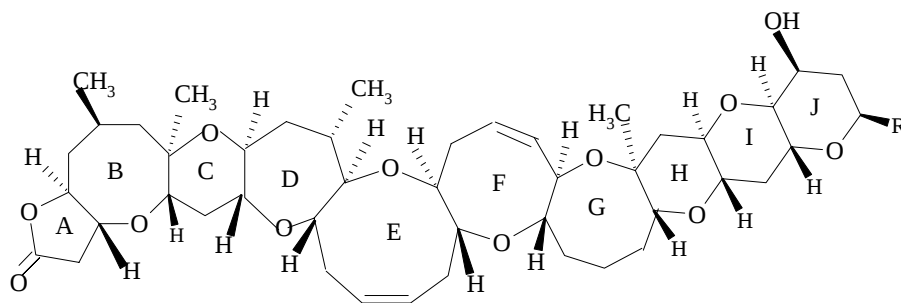
La intoxicación neurológica o neurotóxica por mariscos (NSP) es causada por brevetoxinas poliéteres producidas por un dinoflagelado sin blindaje, *Gymnodinium breve* (también llamado *Ptychodiscus breve*, y desde 2000 llamado *Karenia brevis*). Las brevetoxinas son tóxicas para peces, mamíferos marinos, aves y seres humanos, aunque no para los mariscos. Hasta 1992/1993, la intoxicación neurológica por mariscos era considerada endémica en el Golfo de México y la costa este de la Florida, de donde se han informado “mareas rojas” desde la temprana fecha de 1844. Una característica poco común del *Gymnodinium breve* es la formación por acción de las olas de aerosoles tóxicos que pueden resultar en síntomas similares al asma en los seres humanos. En 1987 la Corriente del Golfo dispersó hacia el norte un importante evento de floración, a aguas de Carolina del Norte, donde está presente desde entonces. A comienzos de 1993, se informaron más de 180 intoxicaciones en seres humanos por mariscos desde Nueva Zelanda causadas por un organismo similar al *G. breve*. Muy probablemente, este era un integrante de la flora oculta del plancton (presente previamente en bajas concentraciones), que se desarrolló convirtiéndose en una floración desencadenada por condiciones climáticas poco comunes (lluvias más abundantes y temperaturas inferiores a las habituales) coincidentes con el fenómeno de El Niño (Hallegraeff, 1995).

5.1 Estructuras químicas y propiedades

Las toxinas NSP, denominadas brevetoxinas, son neurotoxinas poliéter cíclicas insípidas, incoloras, estables al calor y a los ácidos, solubles en lípidos y producidas por el dinoflagelado marino *G. breve* (o *P. brevis*). Estructuralmente las brevetoxinas son moléculas con anillos, con 10 a 11 anillos transfundidos y con pesos moleculares de alrededor de 900. Se han aislado e identificado diez brevetoxinas en floraciones de campo y cultivos de *G. breve* (Benson *et al.*, 1999) (ver Figura 5.1). Estas brevetoxinas muestran enlaces específicos en la posición 5 de canales de Na⁺ sensibles al voltaje que conducen a su activación al potencial normal de reposo. Esta propiedad de las brevetoxinas es causante de los efectos tóxicos (Cembella *et al.*, 1995). La PbTx-2 es la principal toxina aislada del *G. breve*.

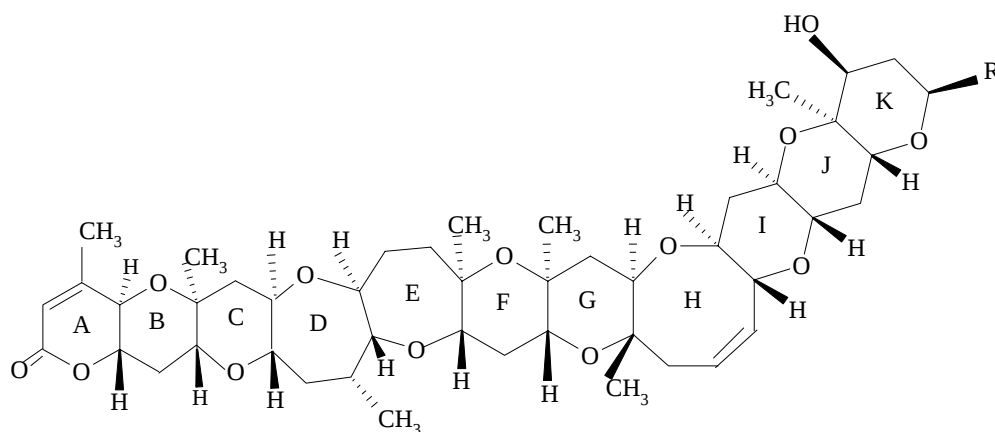
De los mariscos contaminados se aislaron cuatro análogos de las brevetoxinas (ver Figuras 5.2 y 5.3). El marisco resultó de incidentes de NSP en Nueva Zelanda. Se analizaron los análogos de las brevetoxinas en berberechos (*Austrovenus stutchburyi*) (BTX-B1) (Ishida *et al.*, 1995) y en un tipo de mejillones (*Perna canaliculus*) (BTX-B2, BTX-B3 y BTX-B4) (Morohashi *et al.*, 1995, 1999; Murata *et al.*, 1998), las que diferían de las brevetoxinas aisladas de los cultivos de dinoflagelados. Aparentemente las BTX-B1, BTX-B2, BTX-B3 y BTX-B4 son metabolitos formados por el propio marisco, pues no se encontraron en las floraciones o en los cultivos de *G. breve*. La presencia de BTX-B2, BTX-B3 y BTX-B4 en *Perna canaliculus* sugiere que los caminos metabólicos en esta especie son más complicados que los de los berberechos (*Austrovenus stutchburyi*). Debido a las dificultades extremas para aislarlas, las principales toxinas de los mariscos permanecen, sin embargo, sin aclarar (Morohashi *et al.*, 1999).

Figura 5.1 Estructuras químicas de las brevetoxinas de tipo A y B (Hua et al., 1996)



Brevetoxinas Tipo 1 (A):

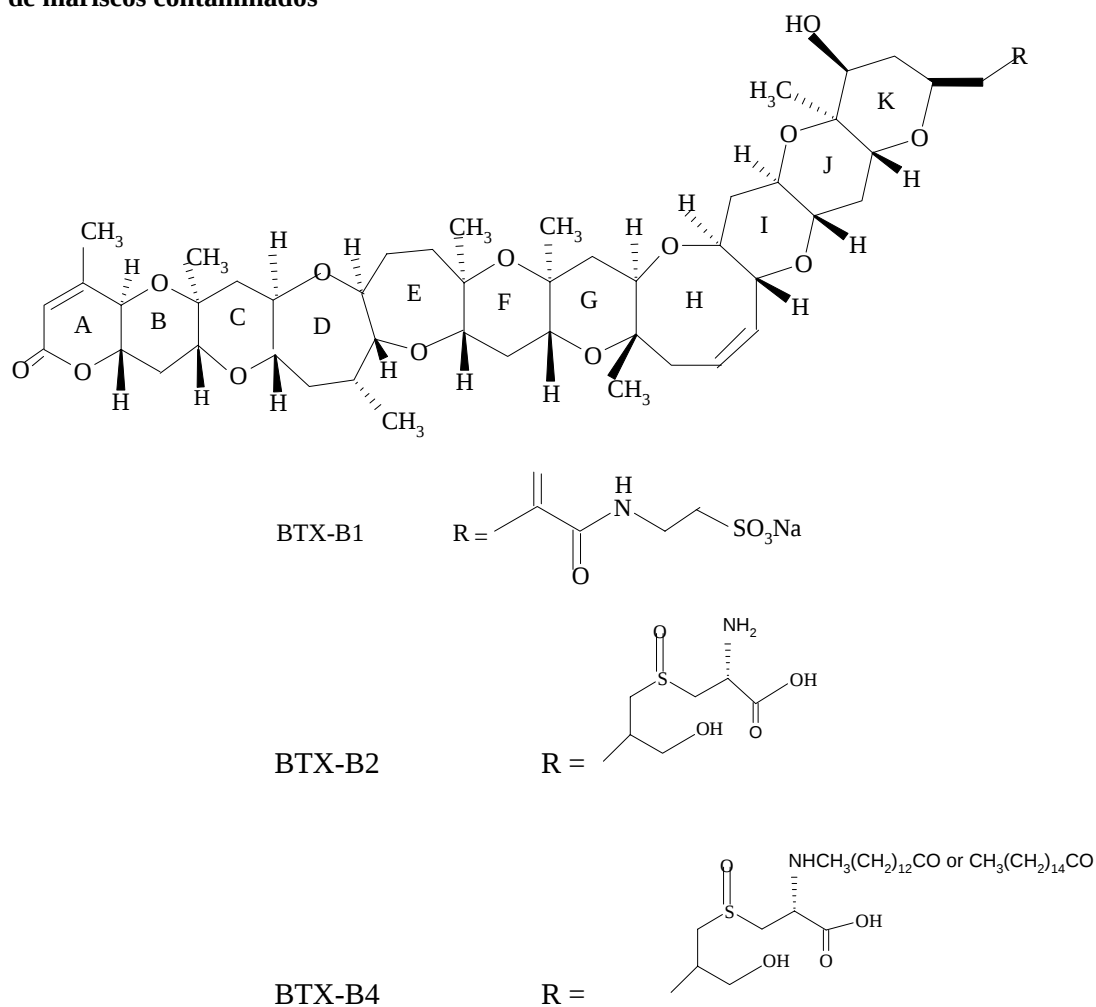
PbTx-1,	$R = \text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CHO}$
PbTx-7,	$R = \text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$
PbTx-10,	$R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$



Brevetoxinas Tipo 1 (B):

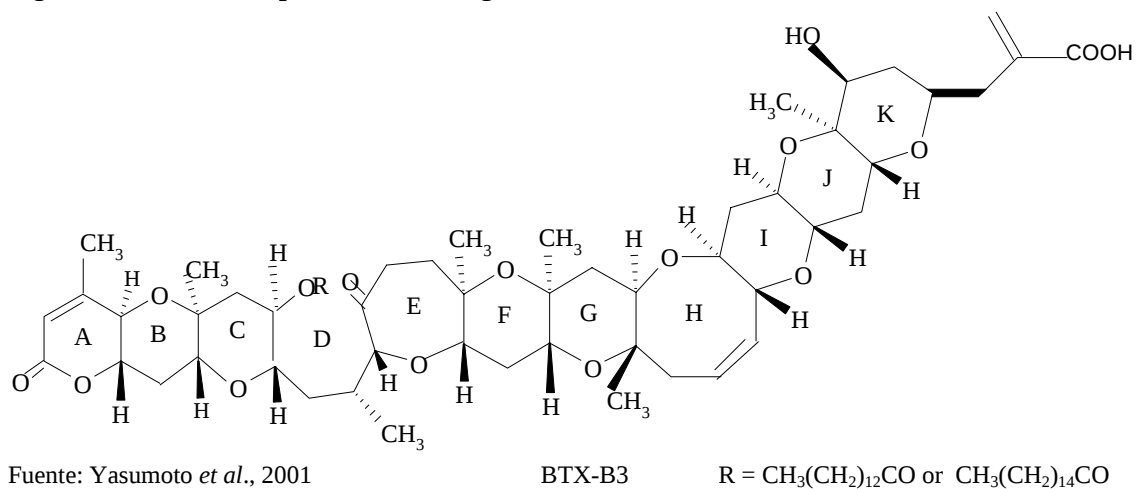
PbTx-2	$R = \text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CHO}$
oxidada PbTx-2	$R = \text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{COOH}$
PbTx-3	$R = \text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$
PbTx-8	$R = \text{CH}_2\text{COCH}_2\text{Cl}$
PbTx-9	$R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$
PbTx-5	anillo-K acetato de PbTx-2
PbTx-6	anillo-H epóxido de PbTx-2

Figura 5.2 Estructuras químicas de los análogos de las brevetoxinas BTX-B1, -B2 y -B4 aisladas de mariscos contaminados



Fuente: Yasumoto *et al.*, 2001

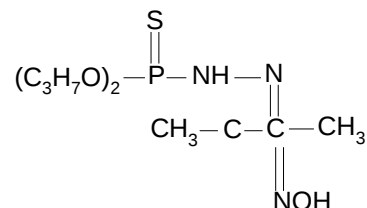
Figura 5.3 Estructura química del análogo de la brevetoxina aislada de mariscos contaminados



Fuente: Yasumoto *et al.*, 2001

Además de las brevetoxinas, se han aislado del *G. breve* algunos compuestos ictiotóxicos fosforados, que recuerdan a las anticolinesterasas. Un ejemplo, es un compuesto acíclico fosforado con un grupo oximino, y un grupo tiofosfato, la *O,O*-dipropil(*E*)-2-(1-metil-2-oxopropilideno) fosforohidrazidotioato-(*E*)oxima (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Figura 5.4 Toxina ictiotóxica fosforada aislada del *G. breve*.



5.2 Métodos de análisis

5.2.1 bioensayos

ensayos in vivo

bioensayo en ratón

En el bioensayo en ratón se evalúa la toxicidad inyectando intraperitonealmente extracto lípido en bruto de mariscos en ratones. Los resultados se expresan en unidades ratón (UR), (Hokama, 1993). Una UR se define como la cantidad de residuo tóxico en bruto que promedialmente matará al 50 por ciento de los animales de laboratorio (ratones de 20 g) en 930 minutos (Dickey *et al.*, 1999). El método aceptado actualmente es el procedimiento de la American Public Health Association (APHA) de 1985 basado en la extracción del tejido de mariscos con éter dietílico. Con posterioridad a la detección en Nueva Zelanda de NSP en 1983, la Autoridad Reglamentaria del MAF desarrolló una estrategia de gestión para controlar la NSP. El método de preparación de muestras empleado estaba basado en la extracción con acetona de estos componentes lipófilos seguido por separación con diclorometano. Este procedimiento permitía extraer eficazmente toxinas desconocidas solubles en lípidos de mariscos con toxinas NSP y presentaba algunas ventajas frente al protocolo de la APHA (más simple y más adecuado para la separación rápida y cuantitativa de las fases orgánica y acuosa del extracto y con una mayor eficiencia de extracción). Sin embargo, como resultado del descubrimiento de un nuevo compuesto bioactivo (la gimnodimina) producida por el dinoflagelado *Gymnodinium mikimotoi*, una especie común en aguas de Nueva Zelanda durante los eventos neurotóxicos, se volvió al procedimiento de la APHA de extracción con éter dietílico. La gimnodimina no es extraíble con éter dietílico, pero causa la muerte muy rápida de los ratones al usarse el procedimiento con diclorometano. Como no se considera que la gimnodimina presente riesgos a la salud humana, el programa de seguimiento emplea ahora la extracción con éter dietílico como forma de distinguir la actividad de la gimnodimina de la toxicidad NSP (Fernandez y Cembella, 1995).

Básicamente, cualquier nivel detectable de brevetoxinas por 100 g de tejido de marisco era considerado como potencialmente inseguro para consumo humano. En la práctica, se adoptó una toxicidad residual de ≥ 20 UR por 100 g de tejido de marisco, que permanece como el valor guía para prohibir la cosecha de mariscos (Dickey *et al.*, 1999).

Como dificultades, el bioensayo en ratón requiere cantidades grandes de animales y de extractos de tejido y los resultados son interpretados subjetivamente, no siendo específicos (Hokama, 1993).

bioensayo en pescados

Los ensayos con el pez *Gambusia affinis* se hacen en 20 ml de agua de mar (3,5 por ciento de salinidad) empleando un pez por recipiente con la toxina incorporada en 0,01 ml de etanol. Se determinaron cada una de las LD₅₀ preparando diluciones por triplicado al doble de cada toxina. La letalidad se determinaba pasados 60 minutos y la dosis letal media se determinaba con las tablas de Weil de 1952 (Baden *et al.*, 1988). El bioensayo con peces se emplea generalmente para determinar o la potencia del agua de mar contaminada o de extractos de toxinas en bruto o purificados (Viviani, 1992).

ensayos in vitro

ensayo con célula de neuroblastoma

Las toxinas causantes de la NSP ejercen sus efectos tóxicos uniéndose a determinados tipos de receptores biológicos sensibles al voltaje, los denominados canales de sodio. La base del ensayo con neuroreceptores es esta interacción altamente específica con receptores naturalmente presentes. Cualquier modificación de una molécula de toxina, que interfiere con su enlace con el receptor y consecuentemente con su detección en un ensayo basado en receptores, comprometería también su habilidad para fomentar una respuesta tóxica. La detección se basa entonces más en su habilidad funcional que en el reconocimiento de un componente estructural, como en los ensayos con anticuerpos. Más aun, la afinidad de una toxina con su receptor es directamente proporcional a su potencia tóxica. Para una mezcla de congéneres, un ensayo basado en los receptores dará una respuesta representativa de las potencias integradas de aquellas toxinas presentes (Cembella *et al.*, 1995).

Se ha desarrollado una técnica de cultivo de tejidos que emplea una línea de células establecida de neuroblastoma de ratón (Neuro-2a) para el ensayo de las toxinas que activan la posición 5 del canal de Na⁺, a.o, brevetoxinas. Este método de detección se basa en la determinación del punto final de la dehidrogenasa mitocondrial. El límite de detección para las PbTx es de 0,25 ng/10 µl de extracto de tejido. La PbTx puede detectarse dentro de las cuatro a seis horas, pero el límite de detección puede reducirse mediante un periodo de incubación de 22 horas. El método fue modificado y simplificado adicionalmente, incorporando un procedimiento colorimétrico basado en la capacidad de las células metabólicamente activas de reducir un compuesto de tetrazolio, el MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) a un producto de color azul oscuro de formazan (Manger *et al.*, 1993; 1995).

La brevetoxina más potente, la PbTx-1, podía detectarse en el bioensayo con células MTT a niveles sustancialmente inferiores a la LD₅₀ intraperitoneal en ratones luego de una exposición de cuatro a seis horas. Con fines comparativos la LD₅₀ para la PbTx-1 en ratones es de 0,01 mg/20 g animal, por inyección intraperitoneal, que correlaciona con 0,1 mg/100 g extracto de tejido o equivalente a 1 ng/10 µl de muestra en células de neuroblastoma (Manger *et al.*, 1993).

Otros métodos han utilizado el XTT (un reactivo soluble de formazan) para determinaciones colorimétricas (Yasumoto *et al.*, 1995). El ensayo con células de neuroblastoma puede utilizarse para detectar brevetoxinas en tejido contaminado de mariscos, aunque no puede distinguir entre las brevetoxinas individuales (Hua *et al.*, 1995).

Fairey *et al.* (1997) informaron de otra modificación del ensayo con receptores en las células de neuroblastoma de Manger *et al.* (1995), con un ensayo de gen indicador, que emplea generación de luz catalizada por la luciferasa como punto final y cuantificado mediante un luminómetro de microplaca. Un constructo de gen indicador *c-fos*-luciferasa se expresó de manera estable en el clon N2A de células de neuroblastoma de ratón, se optimizaron los parámetros del ensayo y se evaluó la sensibilidad al mismo de gen indicador a varias toxinas de algas que activan o inhiben los canales de sodio. La PbTx-1 causó un incremento de actividad de la luciferasa dependiente de la concentración y saturable. Aunque este ensayo aun requiere de una caracterización adicional para evaluar su comportamiento con diferentes matrices de pescados, mariscos, pigmentos de algas y otras clases de toxinas de algas, tal como se lo presenta tiene o supera la sensibilidad de los bioensayos disponibles para toxinas de algas mediante canales de sodio activos.

Los canales de sodio activables por voltaje son proteínas integrales, de membranas neuronales. Una proteína de membrana purificada, puede incorporarse a una doble capa lipídica formando en su presencia una vesícula, un proceso conocido como “reconstitución”. Una vez que se han aclarado cuales son los fosfolípidos adecuados para la reconstitución funcional de los canales de sodio, el canal reconstituido puede usarse como una herramienta para medir las uniones específicas de las toxinas de algas. Se probó la unión específica de la PbTx-3 a los canales de sodio purificados del cerebro de ratas, reconstituidos a vesículas de fosfolípidos. La demostración de una unión específica de canales de sodio allana el camino para el desarrollo de un ensayo funcional muy específico para determinar la presencia de estas toxinas en tejidos biológicos (Trainer *et al.*, 1995).

ensayo de enlaces competitivos con sinaptosomas

Es un ensayo de enlaces competitivos en el que una toxina NSP radio marcada y/o sus derivados compiten con una toxina NSP sin marcar por una cantidad dada de sitios receptores disponibles en un preparado de sinaptosomas de cerebro de ratas. La reducción porcentual en las uniones NSP radiomarcadas es directamente proporcional a la cantidad de toxina sin marcar presente en una muestra desconocida (Poli *et al.*, 1986). Como en el inmunoensayo (ver Capítulo 5.2.2), tanto la PbTx-2 como la PbTx-3 desplazaron a la ^3H -PbTx-3 de manera equivalente. Sin embargo la PbTx-2 oxidada no reemplazó a la ^3H -PbTx-3 como sucedía en el inmunoensayo (Baden *et al.*, 1988).

Van Dolah *et al.* (1994) desarrollaron para las brevetoxinas un ensayo de enlaces competitivos de alta capacidad empleando tecnologías de centelleo con microplaca. Este ensayo puede concluirse en tres horas, con un límite de detección inferior a 1 ng y con capacidad de analizar simultáneamente docenas de muestras. El ensayo es como útil para evaluar la toxicidad total de las algas, para purificar las brevetoxinas y para detectar brevetoxinas en frutos de mar.

Está en curso una prueba de evaluación entre pares, por parte de la AOAC, del método de Van Dolah *et al.* (1994) de la toxina en las ostras (Quilliam, 1999).

Whitney *et al.* (1997) informaron del complejo comportamiento de los tejidos de animales marinos en el ensayo con sinaptosoma de cerebro de ratas. Los extractos de tejidos de vacas de río, tortugas, pescado y almejas parecían contener componentes que interferían por inhibición cooperativa, no-competitiva del enlace específico ^3H -PbTx-3 e incrementaban el enlace no específico a las sinaptosomas. Whitney *et al.* (1997) desarrollaron un método correctivo para estos problemas.

ensayo con cortes hipocampales

Kerr *et al.* (1999) investigaron preparaciones con cortes hipocampales de rata *in vitro* como forma de detectar rápida y específicamente las toxinas STX de algas marinas, la brevetoxina y la DA en tejido de mariscos y peces de escamas identificando señales electrofisiológicas específicas de cada toxina. Se concluyó que los cortes hipocampales son útiles para detectar y analizar biotoxinas marinas en tejido contaminado de mariscos.

5.2.2 Ensayos bioquímicos

inmunoensayos

Se desarrolló, cuando sólo eran conocidas las estructuras de las PbTx-2 y las PbTx-3, un inmuno ensayo competitivo (RIE) para las PbTx-2 y PbTx-3 con una detectabilidad de 2 nM. Esta se ha posteriormente mejorado en aproximadamente 1 nM (Trainer y Baden, 1991). Se ha producido un antisuero en cabras empleando albúmina de suero bovino (=BSA) unido a la PbTx-3 como antígeno completo. La técnica RIE para la PbTx se basa en el desplazamiento competitivo de la ^3H -PbTx-3 por formación de un complejo con el anticuerpo. Las toxinas PbTx-2 y PbTx-3 se detectaron de forma aproximadamente equivalentes. No obstante, la PbTx-2 oxidada, no tóxica en los bioensayos en pescado o ratón, también desplazó la PbTx-3 en el RIE, señal que la potencia no se reflejaba en ensayos de desplazamiento competitivos empleando este anticuerpo (Trainer y Baden, 1991).

Han avanzado también los trabajos para preparar un ensayo ELISA confiable con anticuerpos monoclonales. Trainer y Baden (1991) desarrollaron un método ELISA empleando brevetoxina acoplada a peroxidasa de rábano picante o con ureasa con un anticuerpo de cabra a brevetoxina purificada. Se ha fijado un sistema potencialmente utilizable para detectar brevetoxina en extractos de dinoflagelados o pescados con un límite de detección de 0,04 pM. La toxina puede cuantificarse linealmente desde 0,04 a por lo menos 0,4 pM de brevetoxina. En las pruebas iniciales se utilizó PbTx-3 unida a BSA como antígeno con antisuero producido en cabras, que se encontró se unía competitivamente a la PbTx-2 y a la PbTx-3 (Cembella *et al.*, 1995). Como el ensayo es más estructural que funcional, el anticuerpo une también los derivados no tóxicos de la PbTx que posean una actividad de enlace similar. Cuando se utilizó hemocianina de lapa californiana (*Megathura crenulata*) (KLH) en lugar de BSA, se produjeron anticuerpos más eficientemente (Baden *et al.*, 1988). Estudios recientes de reconocimiento epitópico con derivados de las brevetoxinas naturales y sintéticas con dos sueros anti-PbTx diferentes, indican que los ensayos con anticuerpos simples pueden no resultar adecuados para detectar los metabolitos de las toxinas NSP. Se están desarrollando ensayos empleando más de un anticuerpo para el reconocimiento específico de diferentes zonas de la escalera de poliéteres (Baden *et al.*, 1988; Levine y Shimizu, 1992; Poli *et al.*, 1995; Trainer y Baden, 1991). En un estudio posterior (Baden *et al.*, 1995), se informan de otras modificaciones del método ELISA que mejoraron la especificidad y la detectabilidad. El ELISA no pudo emplearse hasta 1995 para determinar el contenido de brevetoxina en tejido de pescado por estar covalentemente conjugada mediante bien conocidos caminos de detoxificación citocroma P450-monooxigenasa y son también inducidas las actividades glutatona-S-transferasa. La extracción común de tejidos no libera las toxinas retenidas en los tejidos de pescado. El ELISA resultó completamente satisfactorio para detectar y cuantificar las brevetoxinas en las células de dinoflagelados, con tan solo 10 a 50 células. Si bien los mariscos pudieron analizarse con ELISA, lo fue a expensas de la detectabilidad. Las modificaciones y técnicas alternativas informadas por Baden *et al.* (1995) hicieron posible emplear el ELISA para detectar brevetoxinas en células de dinoflagelados, en muestras de mariscos y pescados, en agua de mar y medios de cultivo y en muestras de suero humano.

Naar *et al.* (1998) informaron del desarrollo mejorado para la producción de anticuerpos contra las brevetoxinas de tipo PbTx-2 con un nuevo radioinmunoensayo. El límite de detección para la PbTx-3 era de 0,33 picomoles con un rango de detectabilidad entre 0,01 y 1100 picomoles. En un estudio posterior, Naar *et al.* (2001) describieron la producción y caracterización de anticuerpos poli y monoclonales de ratón (MAbs) específicos para las toxinas de tipo PbTx-2, empleando conjugados portadores de PbTx-3 preparados a nivel nanomolar en un medio micelar invertido. Los autores consideraron muy prometedor este primer informe sobre la producción de MAbs para PbTxs para el desarrollo de ensayos basados en Mab para las potentes neurotoxinas marinas del tipo poliéteres escasamente disponibles. In 2002, Naar *et al.* informaron del desarrollo de una prueba ELISA competitiva para detectar brevetoxinas en agua de mar, extracto de marisco u homogenato y fluidos del cuerpo de mamíferos (orina y suero sin tratamiento previo, dilución o purificación) empleando anticuerpos de cabra anti-brevetoxinas obtenidos después de una inmunización con conjugados de hemocianina-brevetoxina de lapa californiana (*Megathura crenulata*), combinados con un proceso de amplificación de señal de tres etapas. El límite de detección para las brevetoxinas en ciertas ostras era de 2,5 µg/100 g de carne de marisco.

Garthwaite *et al.* (2001) desarrollaron un método ELISA grupal para las toxinas ASP, NSP, PSP y DSP incluyendo la yesotoxina como un sistema de selección para muestras de mariscos contaminadas. El sistema detecta muestras de mariscos sospechosas. Seguidamente las muestras sospechosas deben analizarse por métodos aprobados por autoridades reglamentadoras internacionales. La extracción con alcohol dio buenas recuperaciones para todos los tipos de toxinas.

5.2.3 Análisis químicos

detección con MEKC

Se empleó la cromatografía electrocinética capilar micelar (MEKC por sus siglas en inglés) con detector de fluorescencia inducida con láser (LIF por sus siglas en inglés) para medir cuatro brevetoxinas (PbTx-2, PbTx-3, PbTx-5, PbTx-9) a niveles sub-attomol. Las brevetoxinas fueron aisladas de cultivos celulares y de tejidos de pescado con un límite de detección del método de aproximadamente 4 pg/g (Shea, 1997).

CL/EM con electronebulización

Se empleó exitosamente la cromatografía líquida de fase invertida con espectroscopia de masas de ionización con electronebulización para la separación e identificación de brevetoxinas asociadas con algas de marea roja. Los límites de detección para las PbTx-9, PbTx-2 y PbTx-1 fueron respectivamente de 600 fmol, 1 pmol y 50 fmol. Además se detectaron una cantidad de compuestos desconocidos (seis componentes en total) entre los cuales posiblemente un isómero de la PbTx-9. Una ventaja de este método es que los compuestos que co-eluden pueden notarse mucho más fácilmente siendo posiblemente identificables mediante datos de espectros de masa (Hua *et al.*, 1995).

En una continuación del estudio, se extendió el uso del método CL-ESI-EM por primera vez para investigar la distribución de compuestos de brevetoxinas en las floraciones de marea roja recogidos de la Bahía de Sarasota, en la Florida. Se detectaron, respectivamente, las PbTx-2, PbTx-1 y PbTx-3 a niveles de 60, 10 y 5,7 µg/litro en muestras al natural de floraciones de marea roja. Esta distribución difería cualitativamente de la encontrada en muestras de extracto de marea roja de cultivo. No se detectó la PbTx-9 ni en extractos de floraciones de marea roja ni en extractos de cultivo de marea roja (Hua *et al.*, 1996).

CL/EM de nebulización iónica

Quilliam en 1996 desarrolló un método de spray de iones CL-EM. Pueden alcanzarse límites de detección de masa tan bajos como 10 pg (10 femtomol) empleando control de ión selectivo de los iones $(M+H)^+$. Se detectaron, con este método, todas las toxinas principales así como algunos componentes menores nuevos en un extracto crudo de *G. breve*. Recientemente el método se extendió para los metabolitos más polares identificados en mariscos de Nueva Zelanda. Los análisis con CL-EM pueden ser muy rápidos (menos de dos minutos en algunos casos) y automatizarse completamente (Quilliam, 1998b).

CL/EM/EM

Se empleó, basado en una CL de gradiente de fase invertida en tandem con espectrometría de masas, un procedimiento sobre tejidos de pescado (CL/EM/EM) para detectar PbTx-2 en éste. El límite de detección en la carne de pescado fue de al menos 0,2 ng/g (Lewis *et al.*, 1999).

5.2.4 En general

Las brevetoxinas conforman una familia con muchos componentes. Además de 10 brevetoxinas, se han identificado cuatro metabolitos en berberechos y algunas almejas en el caso de Nueva Zelanda. A pesar de no ser ictiotóxicos, los metabolitos son también capaces de activar los canales de Na. Según el método analítico usado pueden afectar sensiblemente los resultados analíticos y en consecuencia la comparación entre diversos métodos. Se comprobó también la presencia de metabolitos en caracoles marinos y almejas de una zona contaminada de la Florida, EEUU (Poli *et al.*, 2000). Los análisis RIE y de enlace con receptores tienen sensibilidades diferentes a los metabolitos. Dickey *et al.* (1999) informaron que el ensayo de citotoxicidad con neuroblastomas parece estimar por exceso la toxicidad compuesta, debido a una sensibilidad comparativamente incrementada a los metabolitos de la brevetoxina con el bioensayo en ratón. Los solventes empleados en los diferentes métodos de ensayo podrían haber influido en los resultados debido posiblemente a una mayor polaridad de los metabolitos

de las brevetoxinas que los de la toxina madre (comunicación personal de S. Hall). Por ejemplo Dickey *et al.* (1999) demostraron que, en un ensayo de citotoxicidad (en células de neuroblastoma de ratón), se obtenía una toxicidad PbTx-3 equivalente de 2,5 a 4 veces con muestras extraídas respectivamente con metanol y acetona que con las muestras extraídas con éter dietílico. La discrepancia en las estimaciones de la toxicidad equivalente de la PbTx-3 y la moderada correlación de los diferentes ensayos parecen resultar en parte de: a) la presencia y distribución en el tiempo de metabolitos en los mariscos; b) la eficiencia de los diferentes solventes empleados en las extracciones; y c) la diferente sensibilidad de los métodos de ensayo a los metabolitos de las brevetoxinas. En conjunto, esto puede traer consecuencias importantes sobre la inocuidad y las reglamentaciones de los frutos del mar pues los metabolitos activos probablemente sean la verdadera causa de la NSP (Poli *et al.*, 2000).

Cada uno de los métodos de análisis usados con las brevetoxinas tiene alguna desventaja (ver también Hannah *et al.*, 1998):

- El bioensayo en ratón, aunque habitualmente usado, no es específico y requiere animales de laboratorio.
- El ELISA emplea anticuerpos desarrollados solamente contra la PbTx-2, no es capaz de ensayar tejido de pescado y tiene solamente una limitada sensibilidad a los tejidos de mariscos.
- El ensayo con células de neuroblastoma, aunque sensible, tiene interferencias.
- El ensayo de enlace con receptor es rápido, sensible y específico, pero requiere compuestos radio-marcados.
- Aunque la CL/e es sensible y específica y detecta componentes individuales, requiere equipos muy costosos.

Hay además carencias crónicas de materiales de referencia para las brevetoxinas y sus metabolitos (tanto para calibrar como matrices).

5.3 Organismos fuente y habitat

5.3.1 Organismos fuente

La forma móvil de *G. breve* produce varias neurotoxinas, denominadas colectivamente brevetoxinas (Viviani, 1992). Se han aislado e identificado diez brevetoxinas de floraciones de campo y de cultivos de *G. breve* (ver Figura 5.1) (Benson *et al.*, 1999). Se consideraron como metabolitos formados de brevetoxinas en el marisco, a cuatro solamente análogos de brevetoxinas (ver Figuras 5.2 y 5.3) aislados de mariscos contaminados y no de floraciones en el campo o cultivos de *G. breve* (Ishida *et al.*, 1995; Morohashi *et al.*, 1995, 1999; Murata *et al.*, 1998). Además de las brevetoxinas neurotóxicas la *G. breve* produce también toxinas hemolíticas aunque en menor cantidad que brevetoxinas. La mortandad masiva de peces observada durante las mareas rojas en la Florida se debe principalmente a exposiciones a brevetoxinas neurotóxicas con una posible contribución de la fracción hemolítica. El organismo de *G. breve* es relativamente frágil y se rompiéndose rápidamente por acción de las olas en las playas liberando las toxinas. Durante una marea roja activa en playas, el aerosol contaminado de las olas contiene las toxinas y fragmentos de organismo tanto en las gotitas como agregadas a las partículas salinas pudiendo ser arrastrado tierra adentro según el viento y otras condiciones ambientales (Fleming y Baden, 1999).

Cuatro especies de algas de la clase *Raphidophyceae* además produjeron toxinas semejantes a las brevetoxinas. Se aislaron tres compuestos neurotóxicos de cultivos de *Chattonella antiqua*, los CaTx-I, CaTx-II y CaTx-III, que parecían corresponder a las brevetoxinas PbTx-2, PbTx-3 y a la PbTx-2 oxidada (iguales valores de Rf en cromatografía de capa fina e iguales tiempos de retención en HPLC). La cantidad de cada toxina variaba según la edad y la fase de crecimiento del cultivo.

Se identificaron provisoriamente cinco componentes neurotóxicos de cultivos de *Fibrocapsa japonica*, una especie responsable de la marea roja, los FjTx-I, FjTx-II, FjTx-IIIa, FjTx-IIIb y FjTx-IV. Estos componentes neurotóxicos se correspondían respectivamente con las PbTx-1, PbTx-2, PbTx-9, PbTx-

3 y la PbTx-2 oxidada. La cantidad de cada componente variaba también con la edad y la fase de crecimiento del cultivo.

En 1995 tuvo lugar una marea roja inusualmente grande de *Heterosigma akashiwo* en la Bahía de Kagoshima, Japón, causando una mortandad masiva de peces. Se aislaron cuatro componentes neurotóxicos, HaTx-I, HaTx-IIa, HaTx-IIb y HaTx-III correspondientes respectivamente a las PbTx-2, PbTx-9, PbTx-3 y la PbTx-2 oxidadas. Se aislaron cuatro componentes neurotóxicos de *Chattonella marina* identificados como PbTx-2, PbTx-3, PbTx-9 y la PbTx-2 oxidada (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.3.2 Condiciones favorables para el crecimiento

En la costa occidental de la Florida tienen lugar floraciones de *G. breve* de invierno a verano, y con más frecuencia en otoño. Los cambios en la aparición de las floraciones se correlacionan con las temperaturas del viento y de la superficie del agua. En verano las floraciones se originan en la costa cuando los vientos son más débiles. Sin embargo, también aparecen y continúan durante el otoño, una época de fuertes vientos marinos del este (Stumpf *et al.*, 1998).

Las corrientes pueden arrastrar las floraciones de *G. breve* también hacia la costa por las corrientes. Las floraciones de *G. breve* consumen niveles bajos de nutrientes y en las bahías costeras, pueden prolongarse, de contar con nutrientes adicionales de origen humano. En algún momento se creyó que la *G. breve* permanecía casi exclusivamente en el Golfo de México desde Yucatán a la costa de Texas (se la ha observado también en aguas de Alabama, Misisipi y Luisiana). Los investigadores han trazado una gigantesca “zona muerta” de aguas pobres de oxígeno en el Golfo de México a profundidades de 0,5 a 20 m. Luego de la Gran Inundación de Misisipi de 1993, que vertió en el Golfo grandes cantidades de nutrientes agrícolas de granjas del Medio Este, se duplicó el área de la zona muerta de 3 500 a 7 000 millas cuadradas. Recientemente, se ha documentado el transporte de dinoflagelados del Golfo. En 1987 y 1988, la Corriente del Golfo arrastró la *G. breve* a la costa este de la Florida, llevándola hacia el norte a Carolina del Norte. En enero de 1998, la *G. breve* fue trasladada nuevamente del Golfo de México al condado de Palm Beach en la costa este de la Florida (Tibbetts, 1998).

La *C. marina*, también productora de brevetoxinas, y perteneciente a las *Raphidophytes*, apareció en aguas costeras estancadas y ricas en materia orgánica (Hallegraeff y Hara, 1995). El crecimiento óptimo tuvo lugar a temperaturas de 20 a 25 °C, salinidades del 20-30 ‰, intensidades de luz de 60 a 140 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y con pH 7,5 a 8,5. A temperaturas inferiores a 15 °C o superiores a 30 °C y salinidades inferiores a 10 ‰ no hay crecimiento (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

H. akashiwo, que pertenece también a las *Raphidophytes* y que produce toxinas semejantes a las brevetoxinas, ha sido encontrada en aguas costeras y estancadas del Pacífico y del Atlántico (Hallegraeff y Hara, 1995). Las floraciones de *H. akashiwo* requieren metales, como hierro y manganeso, además de nitrógeno, fósforo y vitamina B₁₂. Estas sustancias nutritivas fueron suministradas por desbordes, formación de aguas de fondo de bajo contenido de oxígeno y turbulencias de los sedimentos del fondo inducidas por los vientos.

El *H. akashiwo* tiene un elevado potencial de crecimiento (de hasta cinco divisiones diarias) causantes de mareas rojas en un corto período. Las *Raphidophytes* aparecieron en aguas costeras japonesas con una temperatura mínima del agua de unos 16 °C. Por primera vez, en 1991 también se encontraron en aguas costeras holandesas las *Raphidophytes*, *C. antiqua*, *C. marina* y *F. japonica*, donde, excepto en verano, la temperatura está muy por debajo de la de las aguas costeras japonesas. Durante los periodos cálidos, las mismas condiciones que en Japón se dan en el Mar de Wadden en Holanda y en el estuario al sur del río Rin. Pueden haber presente especies adaptadas al ambiente más fresco del Mar del Norte. El crecimiento óptimo de las *Raphidophytes* tuvo lugar en Japón con salinidades entre 11 a 20 ‰, el mismo rango medido en el Mar de Wadden en Holanda y en el estuario al sur del río Rin. Por tanto no

era esperable la pequeña floración de *Chattonella* de mayo de 1993 al sur del Mar del Norte central con salinidades de 25 a 28‰. En las aguas costeras holandesas aun puede haber quistes de *Raphidophytes*. Las investigaciones indicaron que el enquistamiento tuvo lugar frecuentemente cuando las condiciones ambientales son poco favorables para un crecimiento “normal”. Ocasionalmente se dan en las aguas costeras holandesas los factores que estimulan el enquistamiento, como el agotamiento de nutrientes, la presencia de superficies sólidas a las que puedan adherirse los quistes y bajas intensidades de luz (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

La *C. marina* y la *C. antiqua* poseen un ciclo de vida diplóntico en el que se han observado, junto con los quistes, células mas pequeñas previas al enquistamiento. Sin embargo, estas células y quistes son desconocidos en las aguas costeras holandesas, quizás por falta de un muestreo adecuado. La *C. antiqua* tenía un crecimiento máximo a 25 °C, con salinidades entre 25 y 41‰ y con intensidades luminosas superiores a 0,04 ly min⁻¹ (1 ly=700W). En el rango de pH ensayado (7,6 a 8,3) no se apreciaron efectos significativos sobre el crecimiento de la *C. antiqua*, aunque se observó el crecimiento máximo.

La temperatura y la salinidad también afectaron la forma y motilidad de las células de *C. antiqua*. La intensidad de la luz no influenció la morfología en el rango de intensidades ensayado (20-180 µE/m²/s) en tanto que una buena motilidad se apreció a 60-180 µE/m²/s. El crecimiento de la *C. antiqua* fue beneficiado por nitratos y amonio, y hasta cierto punto por la urea, pero no por la glicina, alanina y glutamato. El ortofosfato sirvió como una buena fuente de P aunque no el glicerofosfato. El Fe³⁺ y la vitamina B₁₂ promovieron el crecimiento. La glucosa, el acetato y el glicolato no mejoraron el crecimiento con o sin luz (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.3.3 Hábitat

La *G. breve* aparece regularmente en el Golfo de México, aunque también se ha informado su presencia o de especies similares en el Atlántico occidental, España, Portugal, Grecia, Japón y Nueva Zelanda. No es seguro si las especies similares a la *G. Breve* deben atribuirse a ella misma o si representan especies diferentes, muy relacionadas (Smith *et al.*, 1993; Taylor, *et al.*, 1995). Se encontró una forma atóxica de la *G. breve* en el Mar Interior del Japón (Viviani, 1992).

En Nueva Zelanda, en 1993 la *G. breve* se identificó en las aguas de la costa al norte de Auckland después de un incidente de NSP en Orewa y en la Bahía de Plenty. También se encontraba en la región de Coromandel (conteos celulares de hasta 70 000 por litro) y en la Bahía Bream (conteos celulares de hasta 100 000 por litro) en enero de 1993. Los conteos celulares descendieron en febrero y marzo; en abril en la región de Coromandel había menos de 300 células por litro (Smith *et al.*, 1993).

En el verano de 1995 a 1996, se informó de un serio problema con toxinas en aerosol en Sud África en la Bahía False, que se extendió luego a Hermanus en la Bahía Walter, un lugar de vacaciones. La toxina en aerosol fue asociada a una floración de una especie de dinoflagelado tóxico, la *Gymnodinium*, informada por primera vez en 1988 en la Bahía False. A pesar de que estas especies han florecido varias veces desde entonces, los efectos nocivos sobre los seres humanos no fueron nunca antes tan evidentes como en 1995-96. La mortandad de la fauna fue sin embargo pequeña, con excepción de la sufrida por las larvas de varios criadores de abalone en tierra firme en la zona de la Bahía Walker. A lo largo de la costa sudafricana, comúnmente se vio implicado el dinoflagelado *Gymnodinium nagakiense* en casos de NSP. La mayor parte de los brotes han sido informados de Bahía False, donde son responsables de la decoloración verde-oliva, durante el otoño, del agua de mar (Van der Vyver, 2000).

Se demostró en 1986-87 la presencia de *Heterosigma akashiwo* y de *Fibrocapsa japonica* en las aguas costeras de las bahías de Tampa y Florida en la Florida. Se informó, además la presencia en 1990, de especies de *Chattonella* (*subsalsa* y *marina*). Se sabe que todas estas especies producen toxinas del tipo de las brevetoxinas. La presencia de estas especies en las aguas de la Florida se extendió a aguas

de temperatura templada a menores salinidades (menores de 32‰) y temperaturas mayores (mayores de 28 °C) que las previamente informadas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se informaron en mayo-setiembre de 1995-1996, en la Bahía de Pedro el Grande (Mar del Japón, Federación Rusa), floraciones masivas de *Heterosigma akashiwo* y *Chattonella* sp. (Orlova *et al.*, 1998). En el Japón, en 1972, *Fibrocapsa japonica* formó mareas rojas intensas en las zonas costeras de la Prefectura de Ehime y se informó posteriormente la presencia de este *Raphidophyte* en la Bahía Atsumi, en el Mar Interior Seto y Harima Nada. Se ha informado también la presencia de *F. japonica* en la zona holandesa del Mar del Norte y en las costas este y oeste de la Isla del Norte y en la costa este de la Isla del Sur de Nueva Zelanda (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). Además, Hallegraeff y Hara (1995) informaron que la *F. japonica* aparecía en las aguas costeras de Australia, California, América del Norte y Francia.

F. japonica y *Heterosigma akashiwo*, ambas causantes de muerte de peces, en la cercanía de las costas del Golfo de Hauraki en Nueva Zelanda, parecían dominantes en las floraciones rojas informadas en octubre y noviembre de 1992. La *F. japonica* persistió en bajas cantidades en el Golfo de Hauraki y en la Bahía Plenty hasta mediados de enero de 1993 (Smith *et al.*, 1993).

En bahías templadas y subtropicales del Japón, la República de Corea, Singapur, Canadá, Nueva Zelanda, Inglaterra, zonas occidentales y orientales de América del Norte y en Bermuda hubieron mareas rojas causadas por *H. akashiwo* (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). Según Hallegraeff y Hara (1995) el *H. akashiwo* es un organismo que causa problemas para la acuicultura de peces de escamas en Columbia Británica, Chile, Nueva Zelanda y posiblemente Singapur.

Se ha informado de fuertes mareas rojas causadas por *Chattonella antiqua* en regiones costeras de Japón (Khan *et al.*, 1996). También en el sudoeste asiático, la *C. antiqua* causó mortandad masiva de peces (Hallegraeff y Hara, 1995).

En la Bahía Boston, Australia Meridional, se encontraron niveles elevados de brevetoxinas en los hígados de atunes de cultivo (*Thunnus maccoyii*) muestreados en diversas épocas, durante un episodio de mortalidad. En la columna de agua se encontró *Chattonella marina* (Munday y Hallegraeff, 1998). Según Hallegraeff y Hara (1995) la *C. marina* apareció en aguas costeras estancadas en la India, Australia y Japón, ricas en sustancias orgánicas. Varias floraciones tóxicas extensas causadas por las células potencialmente tóxicas de *Chattonella* spp. tuvieron lugar desde la Bahía Alemana hasta casi el norte de Skagen entre fines de marzo y la primera mitad de mayo de 1998, 2000 y 2001 (Douding y Göbel, 2001)

5.4 Presencia y acumulación en frutos del mar

5.4.1 Incorporación y eliminación de las toxinas NSP en los organismos acuáticos

Se dispone de pocos datos cuantitativos sobre las velocidades de acumulación y depuración de las brevetoxinas en bivalvos. En presencia de 5 000 células/ml las ostras incorporan las toxinas en menos de cuatro horas y las depuran en 36 horas (60 por ciento). La potencia de la depuración depende de la especie y es muy variable, aun bajo condiciones controladas de laboratorio (Viviani, 1992).

Crassostrea virginica depuró las brevetoxinas entre las dos y las ocho semanas siguientes a una floración. La biotransformación es específica de cada especie y puede resultar en derivados más potentes. 72 horas después de administrar oralmente ¹⁴C- PbTx-3 en una pasta de carne de pescado al *Opsanus beta*, su sistema hepatobiliar contenía 40 por ciento de la contaminación, confirmando el papel clave de este sistema en la detoxificación y eliminación de las brevetoxinas. El tejido muscular contenía 27 por ciento, seguido del tracto gastrointestinal con el 25 por ciento. Cuando el pez del Golfo *Opsanus beta* recibió por vía intravenosa (mediante una cánula implantada en la vena caudal) 0,5 µg de ³H-marcada PbTx-3/kg pc, la radioactividad en la sangre cayó rápidamente con una T_{1/2} de 29 minutos. Un modelo abierto de tres componentes con compartimiento central representando la

sangre describió adecuadamente la tóxico-cinética. La distribución a los tejidos fue rápida. Una hora después de administrar la dosis se detectó radioactividad en todos los tejidos examinados, con las proporciones mas elevadas en músculos, intestinos e hígado (40,2, 18,5 y 12,4 por ciento de contaminación). Hasta las 96 horas la radioactividad en el hígado permaneció constante (7,8 por ciento), en tanto que los niveles en la bilis, riñón y piel aumentaron (34,5, 13,8 y 6,7 por ciento, respectivamente) disminuyendo los niveles en todos los otros tejidos, particularmente en el músculo (15,9 por ciento). En la vejiga, aproximadamente el 24 por ciento de la radioactividad administrada había sido excretada a las 96 horas. La extracción de la bilis reveló metabolitos de la PbTx-3 solubles tanto en agua como en solventes (>94 por ciento de radioactividad en la bilis). No se han identificado metabolitos (Van Apeldoorn *et al.*, 2001)

El corvinón ocelado joven (*Scianops ocellatus*) mostró una actividad significativamente más elevada de la enzima hepática P450 etoxiresorufina O-deetilasa (EROD) con la dosis mayor, luego de recibir oralmente, por cebado, 1,5 o 2,5 µg de PbTx-3/100 g pc en una pasta de carne de pescado. No se vieron afectadas las actividades de las enzimas hepáticas, P450 pentoxiresorufina O-depentilasa (PROD), ni de la citosólica, glutatona S-transferasa (GST). El citocroma total P450 no era superior en los peces tratados. (Van Apeldoorn *et al.*, 2001)

Se examinaron en la lubina estriada (*Morone saxatilis*) los efectos de la PbTx-2 sobre las enzimas xenobioticas metabolizantes y la posible identificación de marcadores biológicos potenciales de la exposición. A siete lubinas estriadas se las expuso durante cuatro días a una pasta con toxinas (~50 µg/100 g pc) administrada oralmente por cebado a un nivel de 0,5 g/100 g pc. Un grupo de control negativo recibió la pasta de control y otro positivo recibió por vía intraperitoneal β-naftoflavona (5 mg/100 g pc). Se buscó EROD, UDP glucuronosil transferasa, epóxido de hidrolasa microsomal, y cuatro isozimas de la glutatona-S-transferasa (GST). No se apreció un efecto significativo sobre el peso corporal en los peces tratados con PbTx-2. En los peces tratados con PbTx-2 se observaron un mayor índice hepatosomático y que tanto las proteínas microsomales como las cistosólicas del hígado eran significativamente inferiores. La PbTx-2 incrementó tres veces la actividad de la EROD, mientras que la β-naftoflavona la aumentó 30 veces. La PbTx-2 incrementó 35 y 50 por ciento la actividad de dos isoenzimas glutatona S-transferasa (GST). Los incrementos observados en las isoenzimas GST las convierten en biomarcadores potencialmente útiles. La PbTx-3 indujo la citocrome P-450IA, una enzima clave Fase I y la glutatona S-transferasa, una importante enzima Fase II. Los posibles senderos metabólicos incluyen la epoxidación en el doble enlace del anillo H, la hidrólisis del epóxido para formar el hidrodiool, el clivaje del anillo A de la lactona y la formación de conjugados de glutatona tanto en la función alcohólica de la PbTx-3 o en los metabolitos Fase I (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.4.2 Mariscos con toxinas NSP

El marisco es el fruto del mar con brevetoxinas más importante (Viviani, 1992). Se ha informado que varias especies (como las ostras, las almejas y mejillones) las acumulan. Estas especies son inmunes a las brevetoxinas, permaneciendo sanas; en tanto que los peces, aves y mamíferos son todos susceptibles a las brevetoxinas (Fleming y Baden, 1999).

Las PbTx-2 y PbTx-3 fueron detectadas en Nueva Zelanda en la ostra *Crassostrea gigas* (Ishida *et al.*, 1996), junto con cuatro análogos (ver Figuras 5.2a y 5.2b), la BTX-B1 en berberechos (*Austrovenus stutchburyi*) (Ishida *et al.*, 1995) y las BTX-B2, BTX-B3 y BTX-B4 un tipo de almejas (*Perna canaliculus*) (Morohashi *et al.*, 1995, 1999; Murata *et al.*, 1998). Estos análogos sólo se encontraron en mariscos contaminados y no en floraciones de campo de *G. breve* o en cultivos de *G. breve*, por lo que fueron considerados metabolitos de las brevetoxinas formados por el propio marisco (Morohashi *et al.*, 1999). Este marisco de Nueva Zelanda resultó de incidentes con NSP. Las BTX-B1, BTX-B2 y BTX-B4 no mostraron ictiotoxicidad pero mantenían su capacidad de activar los canales de sodio (Ishida *et al.*, 1995; Murata *et al.*, 1998; Morohashi *et al.*, 1999). La BTX-B3, administrada a ratones

intraperitonealmente a 300 µg/kg pc, no los mató (Morohashi *et al.*, 1995). No se dispone de datos sobre la ictiotoxicidad de la BTX-B3.

Se buscaron, con un radioinmunoensayo y con un radioensayo, brevetoxinas en caracoles marinos (*Busycon contrarium*) y almejas (*Chione cancellata* y *Mercenaria* spp.) recogidos de la Bahía de Sarasota, Florida (una zona en la que tres personas fueron afectadas por la NSP en 1996). La actividad encontrada era consistente con la de las brevetoxinas en las muestras de mariscos. Los análisis por HPLC de los extractos de marisco confirmaron la presencia de PbTx-2 y PbTx-3 así como de metabolitos conjugados de las PbTxs. No se ha aún aclarado la estructura de estos metabolitos (Poli *et al.*, 2000).

5.4.3 Otros organismos acuáticos con toxinas NSP

Se siguieron, en el laboratorio, las brevetoxinas de *G. Breve*, a lo largo de cadenas alimentarias experimentales desde el dinoflagelado, pasando por copépodos pastoreadores, a peces jóvenes. Se utilizaron tres combinaciones diferentes de copépodos y especies de peces jóvenes:

- (a) el copépodo *Temora turbinata*, el, *Euchinostomus argenteus*, y el *Fundulus majalis*.
- (b) el copépodo *Labidocera aestiva* y el *Lagodon rhomboides*
- (c) el copépodo *Acartia tonsa* y el *Leiostomus xanthurus*

Ninguna de las cuatro especies de peces murió luego de ingerir copépodos alimentados con *G. breve*.

En la experiencia (a) solamente se detectaron las brevetoxinas (PbTx-2 y -3) en los peces cuando los copépodos se alimentaron con cultivos con 600×10^3 células/litro de *G. breve*. No se encontraron toxinas en los peces alimentados con cultivos de 8×10^3 y 20×10^3 células/litro. Se apreció una transferencia de un 10 por ciento, en un plazo de digestión de dos horas, de los copépodos a las vísceras de los peces. En los experimentos (b) se apreció en dos horas la transferencia de las brevetoxinas de los copépodos a las vísceras de los peces (luego de alimentarlos durante 40-50 minutos con copépodos). Los niveles de toxinas en las vísceras disminuyeron dentro de las ocho horas; no se encontraron toxinas en el tejido muscular. Nuevamente en (c) se detectaron toxinas en los peces. Los niveles más elevados en las vísceras se encontraron a las dos horas; entre dos-seis horas y hasta 25 horas la toxina se transfería a los músculos (Tester *et al.*, 2000).

Las brevetoxinas han sido detectadas cuantitativamente en aves de Muir de la costa de California, en algunas muestras de atún de Australia y en lachas y lisas de la costa de la Florida (Bossart *et al.*, 1998; Quilliam, 1999).

5.5 Toxicidad de las toxinas NSP

5.5.1 Mecanismo de acción

Las brevetoxinas son sustancias depolarizantes que accionan los canales de sodio de las paredes celulares sensibles al voltaje. De esta forma se alteran las propiedades de membrana de las células excitables favoreciendo el flujo hacia el interior de iones Na^+ . Por incorporación externa de tetrodotoxina puede bloquearse esta corriente (Fleming y Baden, 1999). Las brevetoxinas actúan sobre la posición 5 con una estequiometría 1:1 (Rein *et al.*, 1994). La toxina parece que produce sus síntomas sensoriales al enlentececer los canales de sodio rápidos, resultando en una activación persistente y un gatillado repetitivo (Watters, 1995).

El análisis conformacional muestra que el anillo H no saturado de la brevetoxina B (ver Figura 5.1) favorece la conformación bote al igual que el anillo G saturado de la brevetoxina A (ver Figura 5.1). Por reducción, el anillo H de la brevetoxina B pasa a una conformación corona. Este sutil cambio en

las preferencias conformacionales induce un cambio significativo en la forma general de la molécula, que se cree causa pérdidas de afinidad y toxicidad (Rein *et al.*, 1994).

Los problemas respiratorios asociados con la inhalación de brevetoxinas en aerosol son posiblemente debidos en parte a la apertura de los canales de sodio. En ovejas, los broncoespasmos podían bloquearse con atropina. Además, parece que los mastocitos tienen su papel al poder bloquearse eficazmente el broncoespasmo en las ovejas con cromolina y clorfeniramina. Se informó que la brevetoxina podía combinarse con una posición separada a las puertas del canal de sodio, provocando la liberación de neurotransmisores desde las terminaciones nerviosas autónomas. En particular, puede liberar acetilcolina, que provoca contracciones moderadas de la tráquea y una desgranulación masiva de los mastocitos (Fleming y Baden, 1999).

Por ser además las brevetoxinas inhibidores enzimáticos de las proteinasas lisosomales conocidas como catepsinas, encontradas en células fagocíticas como los macrófagos y los linfocitos, es posible que puedan asociarse también efectos inmunológicos agudos y crónicos (incluida la liberación de intermediarios inflamatorios resultantes en un shock tóxico fatal) con la exposición a brevetoxinas en aerosol, especialmente crónicas y/o poblaciones susceptibles (Bossart *et al.*, 1998), aunque Fleming y Baden (1999) dudan del mecanismo de las catepsinas.

5.5.2 Farmacocinética

estudios en animales de laboratorio

administración oral

Las ratas macho F344 administradas con una única dosis oral de ^3H -PbTx-3 murieron pasadas 6, 12, 24, 48, 96 o 192 horas. Se analizó la radioactividad de los tejidos recuperados. A otro grupo de animales se le administró oralmente una dosis bolus de ^3H -PbTx-3 recogiéndose con intervalos de 24 horas durante siete días, la orina y las heces. La PbTx-3 se distribuyó ampliamente en todos los órganos disminuyendo gradualmente las concentraciones con el tiempo. El nivel más alto de PbTx-3 se encontró en el hígado durante todo el muestreo. También basado en los estudios intravenosos que se mencionan seguidamente, puede concluirse que el hígado recibió la PbTx-3 tanto del portal como de la circulación hepática y continuó acumulando PbTx-3. Siete días después de recibir la dosis bolus oral, aproximadamente el 80 por ciento fue excretada por la orina y las heces, en cantidades equivalentes. Sin embargo, en las primeras 48 horas se liberó más PbTx-3 por las heces, y seguidamente la mayor parte de la toxina fue eliminada por la orina (Cattet y Geraci, 1993).

administración intravenosa

Los estudios intravenosos en ratas Sprague-Dawley macho con ^3H -PbTx-3 mostraron una rápida desaparición de esta toxina del torrente sanguíneo (menos del 10 por ciento permanecía pasado un minuto), hígado (18 por ciento de la dosis pasados 30 minutos), músculo esquelético (70 por ciento de la dosis pasados 30 minutos) y tracto gastrointestinal (8 por ciento de la dosis pasados 30 minutos), la fase de distribución $T_{1/2}$ aproximadamente 30 segundos. El corazón, riñones, testículos, cerebro, pulmones y bazo contenían cada uno menos del 1,5 por ciento de la dosis. Al cabo de 24 horas la radioactividad en el músculo esquelético disminuyó a 20 por ciento de la dosis mientras permanecía constante la radioactividad en el hígado y aumentaba en el estómago, intestinos y heces lo que apunta a la excreción biliar como una ruta de liberación importante. Al sexto día, el 14,4 por ciento de la radioactividad había sido excretada por la orina y el 75,1 por ciento por las heces con un 9,0 por ciento en el cuerpo. La cromatografía en capa fina de orina y heces indicó una biotransformación en varios compuestos más polares.

Experiencias con hígados perfundidos y con hepatocitos aislados confirmaron que el mecanismo ocurre en el hígado y que la excreción biliar es una ruta importante para la eliminación de la toxina. La PbTx-3 fue excretada a la bilis como toxina madre junto con cuatro metabolitos más polares, uno de

los cuales parecía ser un derivado de epóxido. Se desconoce si este compuesto corresponde a la PbTx-6, al epóxido correspondiente de la PbTx-3 o a otra estructura (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Aplicación por la dermis

Se examinó la penetración percutánea *in vitro* de la ^3H -PbTx-3 en la piel humana y en la de cobayos, comparándose los resultados con tres vehículos (agua, metanol y dimetilsulfoxido, DMSO). Se ocluyeron las superficies epidérmicas con PbTx-3 en agua durante toda la duración de la experiencia (48 horas) para reducir la evaporación. Se expusieron superficies epidérmicas con PbTx-3 en metanol o DMSO, a condiciones ambientales (incubación de células de difusión a 36 °C). La penetración total a través de la piel humana aislada fue respectivamente de 0,43, 0,14 y 1,53 por ciento de la dosis con agua, metanol y DMSO como vehículo. La penetración total a través de la piel de conejillos de India fue respectivamente de 1,5, 3,4 y 10,1 por ciento de la dosis con agua, metanol y DMSO como vehículos. La penetración a través de la piel del cobayo fue significativamente más rápida que a través de la piel humana con metanol y DMSO como vehículos. El análisis del fluido receptor indicó que más del 80 por ciento de la radioactividad estaba asociada con PbTx-3 no modificada (Kemppainen *et al.*, 1989).

Se estudió la penetración y distribución en la dermis de ^3H -PbTx-3 en la piel de cerdo (0,3-0,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de piel) *in vivo* e *in vitro*. Se empleó como vehículo DMSO. En los estudios *in vivo* se cubrió el punto de aplicación con un elemento de protección no oclusivo. En los estudios *in vitro* las superficies de la epidermis se expusieron al medio ambiente (22 °C). Los estudios *in vivo* indicaron una absorción cutánea media del 11,5 por ciento de la dosis administrada durante 48 horas de aplicación tópica (calculada dividiendo el porcentaje de la dosis excretada luego de la administración tópica por el porcentaje de la dosis excretada luego de la administración subcutánea multiplicado por 100). En los estudios *in vitro* la absorción subcutánea media durante las 48 horas siguientes a la administración fue de 1,6 por ciento (basada en la radiactividad acumulada en el fluido receptor) o 9,9 por ciento (basada en el fluido receptor y la dermis). La penetración a través de la epidermis en la dermis fue rápida; la acumulación máxima en la dermis se apreció a las cuatro horas (9,1 por ciento *in vivo* y 18 por ciento *in vitro*). A las 24 horas disminuyó la cantidad en la dermis, respectivamente a 2,3 y 15 por ciento *in vivo* e *in vitro*. En el estudio *in vitro* más del 95 por ciento de la radioactividad en el fluido receptor no fue alterada por la PbTx-3 (Kemppainen *et al.*, 1991).

instilación intratraqueal

Se realizó un estudio con PbTx-3 en ratas para analizar la tóxica cinética de esta brevetoxina por ser el tracto respiratorio una de las principales rutas de exposición a las brevetoxinas en los seres humanos.

Por instilación intratraqueal se administró ^3H -PbTx-3 a ratas macho F344. Los animales fueron sacrificados a las 0, 5, 3, 6, 24, 48 o 96 horas posteriores a la exposición recogiendo orina, heces y tejidos. Más del 80 por ciento de la dosis se eliminó rápidamente (dentro de 0,5 hora) del pulmón distribuyéndose por el cuerpo, principalmente al músculo esquelético (49 por ciento), intestinos (32 por ciento) e hígado (8 por ciento); solo se encontró un 6 por ciento en el pulmón pasada 0,5 hora. Los menores niveles estaban en la sangre, cerebro y grasas. Por siete días se retuvo un 20 por ciento del nivel inicial en los tejidos. La mayor parte de la PbTx-3 fue excretada dentro de las 48 horas por las heces y orina, con aproximadamente el doble por las heces (60 por ciento) que por la orina (30 por ciento). No se han identificado los metabolitos. Los resultados de este estudio apuntan a que los efectos potenciales sobre la salud, asociados con las brevetoxinas inhaladas, pueden ir más allá de la irritación respiratoria pasajera observada en los seres humanos expuestos al aerosol proveniente del mar durante las mareas rojas (Benson *et al.*, 1999).

5.5.3 Toxicidad en animales de laboratorio

toxicidad aguda

Cuadro 5.1 Toxicidad aguda de las brevetoxinas en ratones suizos

brevetoxinas	ruta	Tiempo de observación (horas)	Valor LD ₅₀ µg/kg pc	vehículo	referencia
PbTx-1	intraperitoneal	24	> 100	0,9% salina + 0,1% Tween 60	Dechraoui <i>et al.</i> , 1999
PbTx-3	oral (hembras)	24	520	0,9% salina	Baden and Mende, 1982
PbTx-3	intraperitoneal (hembras)	24	170	0,9% salina	Baden and Mende, 1982
PbTx-3	intravenoso (hembras)	24	94	0,9% salina	Baden and Mende, 1982
PbTx-	oral (hembras)	24	6 600	0,9% salina	Baden and Mende, 1982
PbTx-2	intraperitoneal (hembras)	24	200	0,9% salina	Baden and Mende, 1982
PbTx-2	intravenoso (hembras)	24	200	0,9% salina	Baden and Mende, 1982

Cuadro 5.2 Toxicidad intraperitoneal aguda de análogos de la brevetoxina en ratones

análogos de la brevetoxina	ruta	tiempo de supervivencia	dosis letal mínima µg/kg pc	vehículo	referencia
BTX-B1	intraperitoneal	< 2 horas	50	metanol	Ishida <i>et al.</i> , 1995; 1996
BTX-B2	intraperitoneal	< 1 hora	306	agua	Morohashi <i>et al.</i> , 1999; Murata <i>et al.</i> , 1998
BTX-B3	intraperitoneal	no hubieron muertes dentro de las 24 horas	>300	desconocido	Morohashi <i>et al.</i> , 1995
BTX-B4	intraperitoneal	6-24 horas	100	1% Tween 60	Morohashi <i>et al.</i> , 1999

síntomas de intoxicación

Las brevetoxinas producen una variedad de efectos centrales y periféricos *in vivo*; incluyen una rápida reducción del ritmo respiratorio, problemas de conducción cardiacos y una disminución de las temperaturas corporales internas y periféricas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

La PbTx-3 ocasionó temblores en ratones alimentados oralmente, seguidos de marcadas contracciones musculares o fasciculaciones, fenómeno caudal de Straub, un periodo de respiración muy dificultosa y la muerte. Los ratones inyectados con PbTx-3 mostraron el síndrome de SLUD, salivación,

lacrimación, micción y defecación. El síntoma más pronunciado fue la hipersalivación y eran también comunes una micción y defecación copiosas. Ocasionalmente, a dosis superiores, se presentaban movimientos masticatorios compulsivos y rinorea. La dosificación intravenosa en los ratones produjo efectos inmediatos, y la intraperitoneal y oral resultó en respuestas latentes (respectivamente 30 minutos y 5 horas). La potencia dos veces superior de la PbTx-3, por administración intravenosa, comparada con la intraperitoneal apunta a una detoxificación o excreción parcial por la bilis durante el primer pasaje por el hígado (Baden y Mende, 1982). En ratas se observaron, movimientos respiratorios como los ocasionados por falta de aire, movimientos de la cabeza, depresión, ataxia y, en algunos animales, torsiones de la cabeza (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Con posterioridad a la inyección intraperitoneal, los análogos de la brevetoxina BTX-B2 y BTX-B4 causaron en ratones parálisis de los miembros posteriores, diarrea, dipnea y convulsiones (Morohashi *et al.*, 1999) y la BTX-B1 irritabilidad, parálisis posterior y/o de los cuartos posteriores, dipnea severa y convulsiones previas a la muerte por parálisis respiratoria (Ishida *et al.*, 1995; 1996).

antidotos

En un estudio profiláctico se pretrataron ratas macho en estado conciente con catéteres en la arteria carótida y en la vena yugular con 1 ml de la anti-brevetoxina IgG (PbAb) o del control IgG, por infusión intravenosa de 10 minutos. Veinte minutos después se administró durante una hora, PbTx-2 a las ratas (25 µg/kg pc = dosis subletal). Las ratas pretratadas con IgG de control mostraron signos de intoxicación con brevetoxina, que no se manifestaron en las ratas pretratadas con PbAb. En un estudio de terapia se administró 100 µg/kg pc de PbTx-2 (=LD₉₅), durante 1 hora a las ratas, inmediatamente seguido de 2 ml de PbAb o del control IgG durante 30 minutos. Durante la infusión con PbTx-2, ambos grupos mostraron signos de intoxicación por brevetoxinas. Las ratas tratadas con el IgG de control murieron dentro de las seis horas. La respiración de las ratas tratadas con PbAb volvió a valores normales casi inmediatamente y solo se apreciaron escasos signos neurológicos. Pasadas 24 horas, habían desaparecido casi todos los signos neurológicos con temperaturas internas y periféricas en valores normales. Todos los animales tratados con PbAb sobrevivieron por lo menos ocho días. Hubo una diferencia de tiempos entre dos grupos de signos, apuntando a compartimentos de alta y de baja accesibilidad para el anticuerpo que representa probablemente los sistemas nervioso central y periférico (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

dosificación intravenosa

En ratones, la LD₅₀ intravenosa pareció ser de 2-4 mg/kg pc para la fracción hemaglutinativa aislada de las mareas rojas de *Chattonella marina*. Los ratones mostraron parálisis respiratoria (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Fueron observadas durante seis horas o hasta la muerte grupos de cuatro ratas macho que recibieron una infusión intravenosa durante una hora, después de ser quirúrgicamente preparados y de una recuperación de 24 horas, o solo con vehículo o con 12,5, 25, 50 o 100 µg PbTx-2/kg pc. Todos los animales con dosis al nivel de 100 µg/kg pc murieron dentro de las dos horas. Uno de cada cuatro animales con 50 µg/kg pc murieron durante las seis horas de duración del estudio, sobreviviendo el resto. Las velocidades de respiración a 12, 5 µg/kg pc cayeron en 90 minutos a casi un 60 por ciento del valor de base y al 20 por ciento para 25, 50 y 100 µg/kg pc. La recuperación a los valores respiratorios normales tuvo lugar seis horas después de la exposición, excepto para el grupo de 50 µg/kg pc que recuperó solo 60 por ciento del valor base. Durante las primeras dos horas, se presentaron en todos los grupos tratados disminuciones de temperatura interna del cuerpo dependientes de la dosis, observándose una notoria caída de la temperatura periférica en todos los grupos con excepción del de 12,5 µg/kg pc. Se observó una disminución promedio de la temperatura corporal periférica de 0,5 °C en el grupo de 12,5 µg/kg pc. Los valores de gas en la sangre permanecieron normales, excepto en la fase terminal. La electrocardiografía mostró a dosis ≥25 µg/kg pc bloqueo del corazón, contracciones ventriculares prematuras y ritmos idioventriculares (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Cobayos Hartley macho cateterizados recibieron una infusión intravenosa de PbTx-3 a una velocidad de 0,63 µg/kg/min hasta la muerte del animal. El tiempo promedio para presentarse el paro respiratorio fue de 25 minutos. La dosis media de PbTx-3 en ese fue momento de 15,8 µg/kg. La PbTx-3 causó acidosis láctica temprana en el periodo de infusión, con etiología desconocida, compensada incrementando el flujo. No fue incrementada la resistencia de las vías respiratorias, ni disminuyó la acción dinámica durante la intoxicación, lo que sugiere que ni las vías respiratorias centrales (vías respiratorias superiores, traquea y vías respiratorias de segunda-tercera generación) ni las periféricas respondieron de manera significativa (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

dosificación intraperitoneal

No causó ningún síntoma anormal la inyección intraperitoneal en ratones de la fracción hemaglutinativa aislada de mareas rojas de *Chattonella marina*, en dosis de 2,5 mg (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

toxicidad con dosis repetidas

No hay información

teratogenicidad/reproducción

No hay información

mutagenicidad

No hay información

estudios in vitro con brevetoxinas

Se evaluaron en cortes de hígado de ratón los efectos de la PbTx-3 sobre diversos parámetros del metabolismo hepático. La PbTx-3 inhibió el consumo de oxígeno, incrementó el contenido de Na⁺ y, presumiblemente la concentración intracelular de Na⁺ de los cortes de hígado. La PbTx-3 activó también un camino de intermediario para el egreso del K⁺. No se observó ningún efecto de la PbTx-3 sobre la actividad de bombeo Na⁺-K⁺. La tetrodotoxina, un bloqueador de canales, suprimió el efecto de la PbTx-3 sobre el contenido de Na⁺ en los cortes de hígado. La tetrodotoxina también antagonizó la inhibición del consumo de oxígeno. La tetrodotoxina, no afectó el efecto de la PbTx-3 sobre los movimientos del K⁺ lo que apunta a la activación por la PbTx-3 de dos diferentes caminos o canales iónicos. Los resultados de este estudio sugieren que la PbTx-3 puede inducir sobre el hígado efectos que parecen similares a los observados sobre nervios y membranas musculares (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se estudiaron también en cortes de hígado los efectos sobre la estructura de las células hepáticas. La microscopia común mostró hipertrofia e incremento de los espacios vacíos en los hepatocitos y un incremento de la basofilia en la zona perivenosa de los lóbulos. Ultra estructuralmente, la vacuolación estaba relacionada al hinchamiento acuoso del retículo endoplasmático grueso y/o por retención de proteínas sin acumulación de gotitas grasas. La acumulación de proteínas y/o de ribosomas degranulados es responsable del incremento de la reacción basofílica de las células, especialmente en la región perivenosa, zona donde los lípidos son habitualmente procesados. El hinchamiento en el retículo endoplasmático suave, la de granulación del retículo endoplasmático grueso, las deformaciones y los *lytic cristae* en la mitocondria y, la presencia de lisosomas activos evidencian los efectos de la PbTx-3 sobre las células hepáticas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se observaron efectos inotrópicos y arritmogénicos positivos en preparaciones cardíacas aisladas de ratas y cobayos a concentraciones entre 1,25 x 10⁻⁸ y 1,87 x 10⁻⁷ M PbTx-2. Los estudios sugieren que la PbTx-2 es una poderosa cardiotoxina que actuó incrementando la permeabilidad sarcolemnal del

sodio y liberando catecolaminas de terminaciones nerviosas del nervio simpático (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Las preparaciones de brevetoxinas en bruto contraen de las vías respiratorias; se desconocía sin embargo si esta respuesta mecánica estaba asociada a cambios en el potencial de membrana de los músculos lisos de las vías respiratorias, sea directamente sobre las membranas de las células musculares o indirectamente por liberación de acetilcolina endógena a nivel de las terminaciones nerviosas periféricas. Por lo tanto se midieron los potenciales de membrana y la contractibilidad *in vitro* de preparaciones de músculos lisos traqueales caninos antes de y durante la exposición a toxinas en bruto (0,01-1,2 µg/ml), o a fracciones purificadas de PbTx-2 y PbTx-3 (0,01-0,07 µg/ml). Analogamente se estudiaron los potenciales de membrana en células de cultivo de músculos lisos de las vías respiratorias. La fracción en bruto de las brevetoxinas produjo despolarizaciones dependientes de la concentración en las preparaciones *in vitro* de músculos lisos de vías respiratorias, al igual que las fracciones purificadas de las PbTx-2 y PbTx-3 aunque con una potencia unas diez veces superior que las toxinas en bruto. En todos los casos las despolarizaciones se estabilizaron en menos de cuatro minutos. No hubo una diferencia significativa en la relación concentración-respuesta entre las PbTx-2 y PbTx-3. A los 30 minutos de su lavado del baño de cultivo, se revirtieron totalmente los efectos de las toxinas crudas y purificadas. Los resultados indican que las brevetoxinas no produjeron efectos de despolarización directa en las células musculares lisas de las vías respiratorias, pues las brevetoxinas no tenían ningún efecto significativo sobre las preparaciones *in vitro* tratadas con tetrodotoxina, o en las preparaciones con células de cultivo. La broncoconstricción inducida por la brevetoxina se debe probablemente al efecto despolarizador de la acetilcolina endógena liberada de terminaciones nerviosas periféricas en la célula muscular lisa de la vía respiratoria (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.5.4 Toxicidad en seres humanos

exposición oral

Cuando las brevetoxinas se acumulan en los mariscos, su consumo crudos o cocidos, puede causar NSP, un síndrome tóxico algo similar a las intoxicaciones PSP y ciguatera, aunque menos severo. Los síntomas de NSP aparecen entre los 30 minutos y las tres horas, duran unos pocos días con náuseas, vómitos, diarrea, chuchos de frío, sudoraciones, cambios de temperatura, hipotensión, arritmias, entumecimientos, hormigueo, parestesia labial, de la cara y de las extremidades, calambres, broncoconstricción, parálisis, ataques y coma. No se han informado síntomas crónicos o mortalidad (Cembella *et al.*, 1995; Fleming *et al.*, 1995; Tibbets, 1998). El tratamiento es básicamente de apoyo (Fleming y Baden, 1999).

exposición dérmica

Por su fragilidad relativa el organismo *G. breve*, se abre fácilmente por acción del mar liberando las toxinas (*G. breve* es un organismo "desnudo" desprovisto de caparazón externa de placas de polisacáridos como otros dinoflagelados). Al nadar en contacto directo con floraciones tóxicas, puede causar irritaciones de los ojos y membranas nasales (Cembella *et al.*, 1995; Fleming y Baden, 1999; Tibbets, 1998).

exposición por inhalación

Puede ocurrir también una exposición inhalatoria a las brevetoxinas resultante en dificultades respiratorias, así como irritación de las membranas nasal y de los ojos por la fragilidad relativa del organismo *G. breve* (Cembella *et al.*, 1995; Fleming y Baden, 1999; Tibbets, 1998).

Las toxinas de la *G. breve* estimulan fibras colinérgicas post-gangliónicas lo que puede resultar, por exposición a agua de mar en aerosol o a sus mareas rojas, en irritaciones respiratorias y conjuntivales, catarros con copiosos exudados, rinoreas, toses no productivas, y broncoconstricción. Algunas personas informan de otros síntomas como mareos, visión en túnel y sarpullidos de la piel. La irritación y la broncoconstricción son, en las poblaciones normales, rápidamente reversibles al abandonar las playas o al permanecer en zonas con aire acondicionado. Los asmáticos parecen ser, sin embargo, particularmente susceptibles. Además, hay informes anecdóticos de enfermedades

pulmonares prolongadas, especialmente en poblaciones susceptibles como ancianos o personas con enfermedades pulmonares crónicas (Fleming y Baden, 1999; Watters, 1995). Se supone que la PbTx además causa, inmunosupresión crónica, con posible intermediación de un blanco farmacológico adicional, las catepsinas de cisteína, presentes en las células inmunes e involucradas en la presentación de antígenos (Van Dolah *et al.*, 2001).

Se ha señalado a la PtBx-3 como la toxina primariamente responsable por molestias respiratorias en seres humanos (Benson *et al.*, 1999).

5.5.5 Toxicidad en organismos acuáticos

C. marina inhibió fuertemente la floración de la bacteria marina, *Vibrio alginolyticus*, en un co-cultivo de plancton/bacteria. La inhibición del crecimiento bacteriano causado por *C. marina* se relacionó con la densidad y el potencial metabólico de *C. marina*. El plancton rupturado no tenía efectos tóxicos sobre las bacterias. Fue completamente suprimido el efecto tóxico de *C. marina* en *V. alginolyticus* por agregado de catalasa y de superóxido dismutasa. Además de estas enzimas radicales eliminadoras de restos, el benzoato de sodio, un producto químico con la misma función, tenía también un efecto protector. Estos resultados sugieren que los radicales oxígeno son importantes en el accionar tóxico de *C. marina* (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

La incubación del erizo de mar (*Lytechinus variegatus*) y de la trucha marina (*Cynoscion nebulosis*) en la micro capa superficial marina recogida próxima a las costas de los Cayos de la Florida, particularmente la proveniente de rastrillajes, afectó la embriogénesis temprana tanto de los invertebrados como de los peces. Las muestras del estrato por debajo de la superficie del agua no presentaron casi ninguna respuesta adversa en los embriones de cultivo. Los resultados de un procedimiento de evaluación para identificar la toxicidad parcial mostraron que un compuesto orgánico con un grupo funcional no polar era el responsable primario de la toxicidad. A pesar de que los análisis subsiguientes por CG-EM no identificaron un compuesto en particular, permitieron descartar como posibles agentes tóxicos a xenobióticos comunes como los plaguicidas organoclorados. Ensayos preliminares indicaron que dos de las muestras más tóxicas de la micro capa superficial marina contenían una brevetoxina. Sin embargo, la identificación es siempre especulativa en ausencia de una evaluación completa que permita la identificación toxicológica (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Según Viviani (1992) los peces comienzan a morir cuando la cuenta de *G. breve* alcanza valores de 250 000 células/litro. Otros autores, sin embargo, informan que las muertes ocurrirán con cuentas de $\geq 100\,000$ células/litro (Landsberg y Steidinger, 1998).

Los síntomas ictio-tóxicos incluían sacudidas violentas y nado en tirabuzón, pérdida de equilibrio progresivo por las aletas pectorales y dorsales, seguidos de parálisis respiratoria y muerte. Se cree que estos síntomas comienzan con el enlace de la PbTx-3 a sitios receptores específicos de los tejidos excitables de los peces (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se hicieron ensayos de toxicidad con peces dorada de cinco a seis meses de edad (*Pagrus major*) en cultivos 1-l de *Chattonella antiqua*, *Fibrocapsa japonica* e *Heterosigma akashiwo*. En las etapas tempranas de crecimiento *C. antiqua* resultaba apenas tóxica hasta que la densidad celular alcanzó valores próximos a $1,95 \times 10^3$ células/ml. En cultivos de baja densidad (al segundo día) los peces no morían, aunque mostraban movimientos anormales durante 30 a 45 minutos; se recobraban gradualmente y a las pocas horas nadaban normalmente. Pasado este punto el incremento de la toxicidad parecía depender de la densidad celular. La toxicidad celular más elevada se observó durante la fase de crecimiento logarítmica temprana a media. La toxicidad decreció gradualmente durante la fase logarítmica tardía de crecimiento. En la fase logarítmica temprana el contenido de CaTx-II (~PbTx-3) era 14 veces superior al contenido de PbTx-3 en la fase de crecimiento logarítmica de los cultivos de *C. marina*, mientras que el contenido de CaTx-III (~ PbTx-2 oxidada) era solo dos veces superior que el de la PbTx-2 oxidada en *C. marina*. Como la PbTx-3 es 10 veces más ictiotóxica que

la PbTx-2 oxidada, *C. antiqua* parece ser mucho más icto tóxica que *C. marina*. No se detectó toxicidad atribuible a cultivos de *F. japonica* en dorada hasta que la densidad celular alcanzó las $4,1 \times 10^3$ células/ml. La ictiotoxicidad también parecía variar con las fases de crecimiento e incrementarse con la edad; al octavo día alcanzó los valores más elevados. De ahí comenzó a caer a valores menores a medida que las células entraban en la fase estacionaria temprana. En los cultivos de *H. akashiwo* el dorada del Japón (*Pagrus major*) no mostró ningún comportamiento anormal a densidades celulares de 34 000 células/ml aunque tuvo una parálisis violenta, que condujo a la muerte cuando la densidad celular superó las 120 000 células/ml. Al estar expuesto a una marea roja de *H. akashiwo* con densidades celulares de 30 000 células/ml, el dorada del Japón (*Pagrus major*) experimentó parálisis transitoria, aunque no mortal. La marea roja en la Bahía de Kagoshima, en Japón, mató peces con densidades celulares de $>100\,000$ células/ml (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Los huevos del pez Medaka (*Oryzias latipes*) micro inyectados con una dosis de 0,1-8,0 ng PbTx-1/huevo (seis a ocho horas luego de la post-fertilización), mostraron inhibición en los nacimientos dependiente de la dosis (la mitad del efecto máximo a unos 3 ng/huevo) y supervivencia de las larvas (mitad del efecto máximo a unos 4,5 ng/huevo). Se observó un incremento relacionado con la dosis de la actividad muscular (hipercinésis) al cuarto día embrionario con dosis de 0,1 a 0,9 ng/huevo y superiores. Luego de los nacimientos de encontraron anomalías morfológicas a los siguientes LAELs: 1,0 a 3,0 ng/huevo, curvatura lateral de la espina dorsal, cuya gravedad estaba relacionada con la dosis; 3,1 a 3,4 ng/huevo hernias del cerebro y las meninges por efectos craneales; y 3,4 a 4,0 ng/huevo ojo mal posicionado y ausencia de parte delantera del cráneo. Se observaron anomalías en los nacimientos con dosis $\geq 2,0$ ng/huevo (primero la cabeza en lugar de la cola) y con dosis $\geq 4,1$ ng/huevo se produjeron embriones que no dieron origen a nacimientos (Kimm-Brinson y Ramsdell, 2001).

Las mareas rojas de *H. akashiwo* dañaron el cultivo de peces en Japón (hamachi de cola amarilla y dorada del Japón (*Pagrus major*) en el Mar Interior de la isla Seto), Nueva Zelanda, Columbia Británica y Chile (salmón) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Varias floraciones importantes causadas por células de *Chattonella* sp., potencialmente tóxica ocurrieron entre la Bahía Alemana y el norte de Skagen entre marzo y la primera mitad de mayo de 1998, 2000 y 2001, resultando en mortandad de peces (Douding y Göbel, 2001).

En abril y mayo de 1996, murieron, luego de una floración, 1 700 toneladas de un atún de cultivo (*Thunnus maccoyi*) en Australia del Sur luego de una floración de *Chattonella marina* (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se estudió la toxicidad sobre peces mosquito hembra (*Gambusia affinis*) de las PbTx-1, 2, 3, 6 y 9. Los valores de LC_{50} (24 horas) fueron de respectivamente 2,57, 14,3, 15,8, 77,7 y 31,4 nM para las PbTx-1, 2, 3, 6 y 9 (Rein *et al.*, 1994).

Se aislaron fracciones neurotóxicas, hemolíticas y hemaglutinativas de mareas rojas de *Chattonella marina*. Se expusieron dorada del Japón (*Pagrus major*) juveniles a las tres fracciones (0,02 por ciento) en frascos con agua de mar. Los peces murieron por exposición a las fracciones neurotóxicas de entre siete a nueve minutos, mostrando edemas conspicuos en su segunda lamela. Expuestos a las fracciones hemolítica y hemaglutinativa murieron dentro de los 20 a 50 minutos con liberación notoria de mucosa sobre los filamentos de sus agallas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Las exposiciones dedorada del Japón (*Pagrus major*) a mareas rojas de *C. marina* disminuyeron significativamente las pulsaciones, presumiblemente resultante en anoxia por una circulación reducida en las agallas. Como las pulsaciones se recuperaron con atropina, pareció que el trastorno cardiaco estaba neurológicamente asociado con la cardiofisiología intrínseca del pez. Las pulsaciones son controladas principalmente por el nervio vago, de naturaleza parasimpática y que deprime las pulsaciones bajo condiciones de despolarización. Se ha informado que la atropina inhibe la función del nervio vago. Las fracciones de neurotoxinas de *C. marina* despolarizaron el nervio vago de los peces,

induciendo la reducción en las pulsaciones. Los exámenes histológicos mostraron poco daño branquial resultante de las fracciones de neurotoxinas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Durante el otoño e invierno de 1987 a 1988, el tercero de un estudio de larvas de ocho años de duración, tuvo lugar una floración de *G. breve* en aguas costeras de Carolina del Norte. Se compararon las densidades de nueve especies de peces larvales (*Paralichthys albigutta*, *Citharichthus spilopterus*, *Micropogonias undulatus*, *Lagodon rhomboides*, *Brevoortia tyrannus*, *Paralichthys lethostigma*, *Leiostomus xanthurus*, *Mugil cephalus*, *Myrophis punctatus*) en los años 1987 y 1988 con sus densidades durante las dos estaciones anteriores y las cinco siguientes a la floración. No hubo evidencias de un impacto severo sobre las larvas en su conjunto durante el año de la floración. Sin embargo, había diferencias según las especies a la presencia de *G. breve*. Dos especies (*Micropogonias undulatus* y *Lagodon rhomboides*) mostraron densidades en general normales o superiores, tanto durante la floración como en el resto de la estación de reclutamiento de larvas. Dos especies, (*Paralichthys albigutta* y *Citharichthus spilopterus*), habían tenían, consistentemente, densidades inferiores durante su periodo normal de reclutamiento, sugiriendo que el reclutamiento en estuarios pudo haber sufrido el impacto de efectos de *G. breve* aun terminada la floración. Las cinco especies restantes (*Brevoortia tyrannus*, *Paralichthys lethostigma*, *Leiostomus xanthurus*, *Mugil cephalus* y *Myrophis punctatus*) tenían densidades bajas durante la floración, las que se incrementaron fuertemente al avanzar la estación (Warlen *et al.*, 1998).

En 1996, por lo menos murieron 149 manatíes (*Trichechus manatus latirostris*) durante una epizootia sin precedentes a lo largo de la costa sudoeste de la Florida. Al mismo tiempo apareció en la misma zona una floración de *G. breve*. La exposición de manatíes tuvo lugar por ingestión oral e inhalación (Bossart *et al.*, 1998). Uno de los vectores posibles de la toxina son los ascidia (*Ecteinascidia turbinata*) que se alimentan por filtración (Marsden, 1993). En todos los casos se manifestaron congestiones nasofaríngeas severas, pulmonares, hepáticas, renales y cerebrales. También se observaron edemas nasofaríngeos y pulmonares. Las lesiones macroscópicas consistentes fueron rinitis con catarro, hemorragias y edemas pulmonares, hem siderosis de múltiples órganos y leptomeningitis no supurativa. Las tinturas inmunohistoquímicas que emplean un anticuerpo policlonal primario a la brevetoxina, mostraron tinturas positivas intensas de los linfocitos y macrófagos en el pulmón, hígado y tejidos linfoides secundarios. Además, los linfocitos y los macrófagos asociados con las lesiones respiratorias de las mucosas nasales y meninges también resultaron positivos a la brevetoxinas. Estos resultados involucran a la brevetoxicosis como un componente de, y quizás la principal etiología primaria de la epizootia. Los datos sugieren que la mortalidad resultante de la brevetoxicosis podría no ser necesariamente aguda, aunque puede durar días o incluso semanas después de la inhalación y/o ingestión de las brevetoxinas. Los signos neurológicos de cuatro manatíes rescatados con vida de la epizootia incluían fasciculaciones musculares, falta de coordinación e incapacidad de mantener un "righting reflex". Resultó positiva la tintura inmunohistoquímica con una enzima convertidora- interleuquina-1- β con un tropismo celular similar al de la brevetoxina. Esto sugiere que la brevetoxicosis podría ser iniciadora de una apoptosis y/o de la liberación de intermediarios inflamatorios que culminan en un shock tóxico fatal (Bossart *et al.*, 1998).

Se demostró que la brevetoxina (PbTx-3) se encontraba unida a preparaciones aisladas de nervios de cerebro de manatíes, con una afinidad similar a la de varios animales terrestres. Los estudios *in vitro* con ^3H -PbTx-3 mostraron la unión con alta especificidad y afinidad a las sinaptosomas del cerebro de los manatíes. La unión era saturable, con competencia por enlaces específicos y dependiente de la temperatura (afinidad tóxico-receptora disminuida y porcentajes medidos inferiores de enlaces específicos al aumentar la temperatura de 0 a 37 °C) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Los análogos de la brevetoxina (o metabolitos) encontrados en los berberechos silvestres (*Austrovenus stutchburyi*) (BTX-B1) y en las almejas Greenshell (*Perna canaliculus*) (BTX-B2 y BTX-B4) no mostraron ictiotoxicidad con los peces de agua dulce *Tanichthys albonubes* a 0,1 mg/litro a diferencia de las brevetoxinas (Ishida *et al.*, 1995; Morohashi *et al.*, 1999; Murata *et al.*, 1998).

Se observó la mortalidad causada por las brevetoxinas en los cormoranes de doble cresta (*Phalacrocorax auritus*) a lo largo de la costa del Golfo en la Florida (Fleming y Baden, 1999). La brevetoxina causó una mortalidad veraniega en California, que afectó los arao comunes (*Uri aalge*) (Fleming y Baden, 1999).

5.5.6 Estudios de toxicidad con un componente de *G.breve* con fósforo

Además de las potentes brevetoxinas, se han aislado de *G. breve* algunos componentes tóxicos fosforados. Se aisló uno de ellos (ictiotóxico) determinándose posteriormente su estructura. El nombre químico es *O,O*-dipropil (*E*)-2-(1-metil-2-oxopropilideno)-fosforohidrazidotioato(*E*)oxima. Posee una estructura química similar a un organotiofosfato (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

ratones

Se ha estudiado en ratones la toxicidad intraperitoneal aguda de la oxima anterior (sintética) y la de algunos análogos, prestando especial atención a la inhibición (IC_{50}) en los tejidos cerebrales y periféricos de la acetilcolinesterasa (AChE). La oxima pareció ser un inhibidor más potente *in vivo* de la AChE que los análogos; la alta toxicidad se asocia con algunos análogos lo que sugiere que otros factores afectan la toxicidad más que la inhibición AChE. Los ratones expuestos a la oxima y sus análogos mostraron hiperactividad, temblores y convulsiones no muy severas. Generalmente estos síntomas aparecen en animales expuestos a agentes AChE cuando se observa una inhibición superior al 40 por ciento de la AChE cerebral. En este estudio, se inhibió en un 36,6 por ciento la actividad AChE cerebral luego de una dosificación intraperitoneal de la oxima. Esta inhibición puede causar solo síntomas ligeros (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

ratas

Ratas macho Wistar anestesiadas recibieron una única inyección intravenosa con 16, 24, 48 o 72 $\mu\text{g/kg}$ pc de la oxima. Se observó una actividad depresora cardiovascular dependiente de la dosis, como lo indican disminuciones tanto en la presión arterial media como en el ritmo cardíaco. Solamente, se apreció una recuperación dependiente del tiempo, con las dosis inferiores (16, 24 $\mu\text{g/kg}$ pc). A dosis superiores la toxina causó hipotensión y bradicardia reversibles. Los animales murieron por paro cardíaco inmediatamente después de administrarles 72 $\mu\text{g/kg}$ pc intravenosa. Los efectos no fueron acompañados de constricción o espasmo en respuesta traqueo bronquial. La hipotensión y la bradicardia se dieron aun con ratas ventiladas artificialmente. El tetraetilamonio actuó como antagonista de los efectos cardiovasculares, en tanto que no pudieron modificarlos ni el bloqueo de los receptores colinérgicos e histaminérgicos ni la inhibición de la síntesis de la prostaglandina. Esto indica que probablemente son mediados los efectos cardiovasculares por bloqueo α -adrenérgico y gangliónico acompañado por modulación de la actividad del canal de K^+ (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Gatos

Se estudiaron los efectos sobre la tensión arterial media, el perfil del ECG, la descarga unitaria de los baroreceptores y la actividad respiratoria inyectando por vía intravenosa la oxima a gatos anestesiados. Una caída de la tensión sanguínea, dependiente de la dosis, resultó de la administración intravenosa de dosis de 0,25 a 1,5 mg/kg, asociada con bradicardia. Se observó una apnea respiratoria inicial seguida de velocidad y profundidad de la respiración incrementadas (hiperapnea). El efecto hipotensivo fue acompañado por una disminución en la actividad del baroreceptor aórtico medido por el ritmo cardíaco en los aferentes aórtico-cervicales. El ECG mostró bloqueo de la conducción atrioventricular, arritmia y depresión del segmento S-T y de la onda T, indicios de una insuficiencia coronaria. Posiblemente la propiedad vaso-depresora de la toxina sea de naturaleza muscarínica, ya que la atropina actuó contrarestando la vaso depresión (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

peces

la oxima, pareció ser muy ictiotóxica (0,9 mg/L against *Lebistes reticulatus*) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.6 Prevención de la intoxicación NSP

5.6.1 Depuración

Detoxificación de mariscos

La velocidad con la que pierden la toxina los bivalvos depende del lugar donde se acumule, que puede diferir para las distintas ficotoxinas. Las almejas son la especie más estudiada, para la que se ha sugerido una detoxificación en dos etapas: una pérdida inicial rápida con una velocidad semejante a la de la acumulación seguida de una fase más lenta. Durante este proceso, el perfil de la toxina puede cambiar entre tejidos como el riñón y el manto, con transferencia de toxina entre los compartimentos de tejidos o los órganos antes de ser excretadas o segregadas al medio ambiente. Los bivalvos comúnmente se auto depuran, habitualmente trasladándolos a agua limpia. La cocción y el congelado no son efectivos. Uno de los tratamientos mas promisorios parece ser con ozono, que se ha demostrado ayuda a la depuración de NSP del tejido de las almejas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Las ostras acumulan brevetoxinas en menos de cuatro horas en presencia de 5 000 células/ml, y depuran en 36 horas el 60 por ciento de la toxina acumulada. La potencia de la depuración depende de las especies y es muy variable, aun bajo condiciones de laboratorio controladas. Los bivalvos comerciales pueden ingerirse sin riesgo de uno a dos meses después de terminado un episodio de floración aislado. El enlatado disminuye la concentración de brevetoxina en los bivalvos (Viviani, 1992).

En *Crassostrea virginica* la depuración de las brevetoxinas tiene lugar entre dos a ocho semanas de desaparecida la floración. Con un diseño de experiencias semi-factorial, se cultivaron y alimentaron ostras del Pacífico (*Crassostrea gigas*) con células de *G. breve* a velocidades entre 10 y 25 millones de células por ostra en períodos de 24 horas. Posteriormente se detoxificaron en varios tanques de laboratorio por períodos de cinco días. Los bioensayos con ratón mostraron niveles iniciales entre 25 y 100 unidades ratón (UR) por 100 g de carne de ostra escurrida; las ostras grandes acumulando más toxinas que las más pequeñas. Los factores experimentales eran la temperatura (15 y 20 °C), salinidad (24 y 33-34 ‰), filtrado versus no filtrado (5 µm) y tratamiento con ozono (a un potencial redox de 350 mV en los tanques de mariscos) versus esterilización pasiva con luz UV. Dos experiencias compararon ostras alimentadas con *G. breve* durante cinco días (5,0 o 3,5 millones de células por ostra/día) con las alimentadas por 24 horas (10 o 25 millones de células por ostra). Con excepción de uno (cuatro tanques), todas las combinaciones de tratamientos resultaron en una disminución inicial del nivel de la brevetoxina que alcanzó un mínimo <20 UR por 100 g al tercer día independiente del nivel de toxina inicial o de si la toxina se había acumulado en uno o cinco días. El período de disminución de tres días fue seguido de un período con reducciones mínimas. Ninguno de los factores experimentales era estadísticamente significativo sobre los niveles finales de toxinas sugiriendo que las ostras se detoxificarán independientemente de las condiciones una vez se encuentren en un ambiente libre de algas tóxicas. Se observaron en algunas muestras de cuatro tratamientos niveles de brevetoxina finales ligeramente superiores a 20 UR por 100 g (20,6 UR por 100 g) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Disminución de las células de G.breve y reducción de las toxinas

Se sometieron a irradiación con microondas cultivos celulares de *G. breve* en agua de mar sintética a 2 450 MHz. Se irradió durante cuatro intervalos de 60 segundos, seguidos por períodos de enfriamiento de cinco minutos a 25 °C, disminuyendo la cantidad de células. En función de la potencia aplicada (0-0,113 kJ/ml cultivo), las células sobrevivientes disminuyeron en un 14 por ciento. Con niveles de energía superiores a 0,08 kJ/ml de cultivo, se apreció una disminución pronunciada del efecto de umbral (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se estudió el efecto sobre las toxinas y células de *G. breve* del agua de mar sintética ozonizada. Al agregarse a cultivos de *G. breve* agua de mar sintética ozonizada durante 60 segundos, las células sobrevivientes disminuyeron en aproximadamente el 80 por ciento ($t_{1/2}$ =10 segundos). No se encontraron células intactas al ozonizarse directamente cultivos de *G. breve* en agua de mar sintética

durante 60 segundos ($t_{1/2}$ =2.5 segundos). Experiencias realizadas en agua de mar sintética han demostrado que las toxinas extraídas de la *G. breve* (PbTx-1, -2, -3, -5, -7 y -9), al igual que las toxinas en los cultivos celulares enteros, mostraron una marcada disminución al aumentar su exposición al ozono, durante 0,1, 5 o 10 minutos, luego de ser reintroducidas en agua de mar sintética. La concentración total de toxinas se redujo en un 99,9 por ciento luego de 10 minutos de ionización determinada por análisis con HPLC. Los bioensayos con el pez *Cyprinodon variegatus* confirmaron la reducción de la toxina. En ambas experiencias, con brevetoxinas extraídas y brevetoxinas de células enteras, pudo apreciarse un ligero incremento de la PbTx-7 con una exposición al ozono de 1 minuto, causado probablemente por la reducción de la PbTx-1, forma aldehído de las brevetoxinas de tipo A, a PbTx-7, forma alcohol de la misma estructura. Las cantidades totales de todas las toxinas se redujeron, al incrementarse a cinco minutos la exposición al ozono. (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Doucette *et al.* (1999) estudiaron el papel de las bacterias algicidas activadas frente a la *G. breve*. Dos cepas bacterianas aisladas del Golfo de México parecieron resultar letales para la *G. breve*. Se caracterizó la actividad algicida de una de estas dos cepas. La cepa aislada provenía de aguas libres de células de *G. breve*, lo que sugiere que estas bacterias son parte de la comunidad microbiana del ambiente y no se limitan a zonas con alto contenido de *G. breve*. La cepa bacteriana estudiada, produjo (un) compuesto(s) algicida disuelto liberado en el medio de cultivo, siendo efectivo contra los cuatro aislados ensayados de *G. breve* del Golfo de México, así como con *G. mikimotoi*, una especie HAB muy relacionada, también presente en la zona.

Pérez *et al.* (2000) destacaron el descubrimiento de varias algas productoras de alelopáticos, denominados APONINs, que pueden afectar la *G. breve*. Se diseñó un modelo de computación dinámico basado en estudios de laboratorio para evaluar la eficacia del tratamiento de las floraciones de *G. breve* con el alga alelopática, *Nannochloris oculata*, productora de la sustancia cistólica APONIN-3, que retarda el crecimiento de la *G. breve*. Hay sin embargo que considerar ciertas condiciones de contorno y/o supuestos que influyen. El modelo demostró que la *N. oculata* erradicaría el brote de *G. breve* en poco menos de dos días y que es un método potencial de gestionar las floraciones de *G. breve*, aunque se requieren experiencias complementarias.

Detoxificación de las brevetoxinas

Las brevetoxinas con un grupo funcional aldehído sobre la cadena lateral terminal "cola", son fácilmente convertidas a estructuras dimetilacetal en solución ácida, en tanto que es lenta la reacción para formar el metil éster sobre el anillo de lactona del lado de la "cabeza". La reactividad de las brevetoxinas al ataque ácido sigue el orden: PbTx-1>PbTx-2>PbTx-9. Bajo condiciones básicas, la apertura del anillo de lactona del lado de la "cabeza" iniciado por ataques con iones hidróxido se completa en, respectivamente, 120 y 50 minutos para la PbTx-2 y la PbTx-9, mientras para la PbTx-1 no estaba completada pasados 120 minutos. La hidrólisis básica es más rápida que la ácida bajo condiciones ácidas o básicas comparables. Sin embargo, estas hidrólisis pueden ser reacciones reversibles y no resultar confiables para detoxificar. Las brevetoxinas son oxidadas fácilmente por el permanganato de potasio por adición a los dobles enlaces seguida de clivaje. El tratamiento por oxidación de la brevetoxina es irreversible y relativamente rápido, por lo que puede ser una buena manera de detoxificar las brevetoxinas (Hua y Cole, 1999).

5.6.2 Medidas preventivas

Las floraciones tóxicas de *G. breve* se detectan generalmente por confirmación visual (decoloración del agua y mortandad de peces), por los consumidores de mariscos enfermos y/o la irritación respiratoria en los seres humanos, con la toxicidad real solo comprobada mediante prolongados análisis químicos para las brevetoxinas contenidas en muestras de mariscos y por bioensayos en ratones. No están bien comprendidas las condiciones ambientales exactas que conducen a floraciones de algas perjudiciales. Como resultado, resulta extremadamente difícil predecir la magnitud y la presencia de una floración, asegurando, una estrategia de gestión "después de los hechos" dependiente de una evaluación precisa de la calidad del agua. Los programas de seguimiento basados en la

identificación y enumeración microscópicas de las taxa perjudiciales contenidas en muestras de agua resultan generalmente suficientes para prevenir la intoxicación en los seres humanos. Sin embargo, el seguimiento basado en observaciones microscópicas requiere un alto nivel de conocimientos de taxonomía, habitualmente lleva mucho tiempo y puede ser muy variable según quienes lo realizan. En consecuencia, es muy deseable un procedimiento alternativo para predecir la aparición de floraciones y su dinámica. Las firmas del pigmento para diagnóstico y los espectros de densidad óptica *in vivo* pueden diferenciar eficazmente entre la mayor parte de los grupos filogénicos de micro y de macro algas y, a veces, la taxa con una variedad de habitats. Podría desarrollarse un protocolo "biomarcador" rápido, objetivo y económico si estos pigmentos de diagnóstico y/o espectros permitiesen detectar la presencia de taxa perjudicial previo a declararse la floración. El diéster de giroxantina puede ser un pigmento de diagnóstico para la *G. breve* en las aguas costeras de la Florida. Este pigmento ha sido solo informado del *Gyrodinium aureolum*, *Gymnodinium galatheanum* y *G. breve*. De estas taxa, solamente *G. breve* puede considerarse como una especie de agua cálida y sería de esperar que se presente en aguas costeras de la Florida. Además el diéster de giroxantina era un componente menor, aunque estable, de los carotenoides totales en la *G. breve*, resultando detectable consistente y cuantificablemente en poblaciones expuestas a todos los tratamientos irradiantes.

Se evaluó en cultivos de laboratorio y en condiciones naturales la utilidad de los foto-pigmentos y de las firmas de absorción para la detección y enumeración de *G. breve*. La presencia del diéster de giroxantina permitió delinear la *G. breve* de otras taxa dentro de conjuntos de fitoplancton en la Florida. Además, la buena correlación de este carotenoide con la abundancia de células de *G. breve* permitió seguir el desarrollo y la senescencia de las floraciones. No obstante, el diéster de giroxantina tan solo ofrece una contribución menor a la absorción celular, tiene máximos de absorción similares a los de otros carotenoides y a la clorofila *c*, no alterando su presencia de manera dramática los espectros de absorción de un conjunto mixto. Los adelantos tecnológicos en equipos computarizados estimularán el uso más frecuente de metodologías bio-ópticas para la detección y caracterización potenciales del plancton perjudicial (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Kirkpatrick *et al.* (2000) compilaron información sobre pigmentos y datos de espectros de absorción de floraciones naturales del este del Golfo de México entre agosto de 1995 y agosto de 1997. La cuantificación del diéster de giroxantina y de la clorofila *a* permitió estimar la fracción de la biomasa en poblaciones mixtas asociadas a *G. breve*. La regresión de los índices de semejanza de *G. breve* con las fracciones de biomasa de *G. breve* produjo una correlación lineal significativa. Parece ser promisorio la tecnología que emplea una célula capilar con guía de onda líquida para automatizar esta técnica.

Se compararon métodos microfotométricos y espectrofotométricos convencionales para evaluar los espectros de absorción de cultivos de monoespecies. Se comprobó la viabilidad de emplear micro fotometría para caracterizar los coeficientes de absorción de los espectros de a.o. *G. breve*. Se evaluó una aproximación para detectar *G. breve* en una población mixta sobre la base de las firmas en espectros de absorción. El desarrollo de hiperespectros mejorados *in situ* o de sensores aero transportados puede incrementar las capacidades para controlar la presencia y evolución de floraciones de algas perjudiciales. Las fases de las floraciones de *G. breve* incluyen: a) iniciación próxima a la costa; b) transporte a mitad de la plataforma y c) crecimiento. Varios aspectos de la biología y ecología de *G. breve* permiten que sea una especie que posiblemente pueda detectarse y seguirse mediante control remoto. Mientras que un conteo celular de 5 000 células/litro alcanza para prohibir la cosecha de los cultivos de mariscos, en general, la detección visual de las floraciones de *G. breve* a simple vista solo puede hacerse cuando las concentraciones celulares son próximas a 10^6 células/litro, momento en el que ya se manifiestan irritación respiratoria, contaminación de mariscos y mortandad de peces. En tanto la concentración de biomasa es por zonas, los valores de clorofila *a* de >1 a 100 mg/m^3 hacen la superficie del agua decolorada detectable con sensores colorimétricos en satélites (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se informó por control remoto de un nivel de detección mínimo de aproximadamente 100 000 células/litro; 10 veces más sensible que la detección visual. En este caso, podría haber un mínimo de

tres a seis días entre la detección de la biomasa de la floración y el crecimiento de la población a niveles conocidos como causantes de mortandades masivas de peces. Entretanto puede comprobarse la presencia de *G.breve* (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.7 Casos y brotes de NSP

5.7.1 Europa

Francia

En octubre de 1991 se informó por primera vez la presencia de *Fibrocapsa japonica* sobre las costas del Canal de la Mancha, en Normandía, Francia (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). Las tomas de video desde la costa francesa de *H. akashiwo* mostraron una fuerte semejanza con especímenes encontrados en el Mar del Norte holandés en 1994 y en el Mar de Wadden en 1997 (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Alemania

Se detectó la presencia el 26 de agosto y el 15 de diciembre de *H. akashiwo* en el Mar de Wadden (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

En el verano de 1997, se observó cerca de Sylt *Fibrocapsa japonica*. Desde julio, en el verano de 1995 se ha encontrado *F. japonica* en muestras de fitoplancton del Mar de Wadden próximo al puerto de Büsum sobre la costa oeste de Schleswig-Holstein. También en 1996 y 1997 fue mencionada, *F. japonica* en los mensajes del “Algenfrühwarnsystem” alemán para el Mar de Wadden. En el puerto de Büsum las concentraciones de *F. japonica* aumentaron de valores máximos de 25 y 30 células/cm³ en 1995 y 1996 respectivamente, a 115 células/cm³ en 1997. El máximo valor con 327 células/cm³ se registró el 24 de julio de 1997 (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

En el verano de 1997 se observó también *H. akashiwo* en aguas alemanas, en Friedrichskoog. Resultó difícil contar las concentraciones celulares (Rademaker *et al.*, 1997).

Varias floraciones extensas, causadas por *Chattonella* sp., potencialmente tóxico, tuvieron lugar desde la Bahía Alemana hasta casi Skagen del Norte desde fines de marzo a la primera mitad de mayo de 1998, 2000 y 2001 con mortandad de peces (Douding y Göbel, 2001).

Grecia

Se ha informado de una especie similar a *G. breve* en el Mar Egeo, aunque sin efectos adversos (Smith *et al.*, 1993).

Países Bajos

Se detectaron por primera vez en 1991 y luego en 1992 y 1993, *Raphidophyceae Fibrocapsa japonica*, *Chattonella antiqua* y *Chattonella marina* en el Mar de Wadden, en el Mar del Norte y/o en la zona del delta al sur del estuario del Rin. En los Países Bajos no se han registrado eventos perjudiciales causados por *Raphidophyceae*, pero no puede descartarse un brote pues potencialmente la especie detectada puede presentarse cada año (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se encontró en el verano de 1997, *F. japonica* en casi todas las muestras del Programa Holandés de Floración de Algas a lo largo de la costa holandesa desde Noordwijk a Borkum. Las densidades celulares en las muestras eran de 2 células/cm³. En agosto de 1994 por primera vez se encontró el potencialmente tóxico *Raphidophyte Heterosigma akashiwo* en una floración de algas próxima a Noordwijk con conteos celulares de aproximadamente 2 400 células/cm³ (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Portugal

Se ha informado de una especie similar a *G. breve* en la costa atlántica de Portugal, aunque sin efectos perjudiciales (Smith *et al.*, 1993).

Federación Rusa

En setiembre de 1987, una marea roja causada por *Chattonella* sp. Causó mortandad de peces en la Bahía de Amurskii (Orlova *et al.*, 1998).

España

Se ha informado de una especie semejante a *G. breve* en la costa atlántica de España pero sin efectos perjudiciales (Smith *et al.*, 1993).

Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Se han informado mareas rojas de *Heterosigma akashiwo*, causantes de mortandad en peces de cultivo, desde Inglaterra a Bermuda (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.7.2 Africa

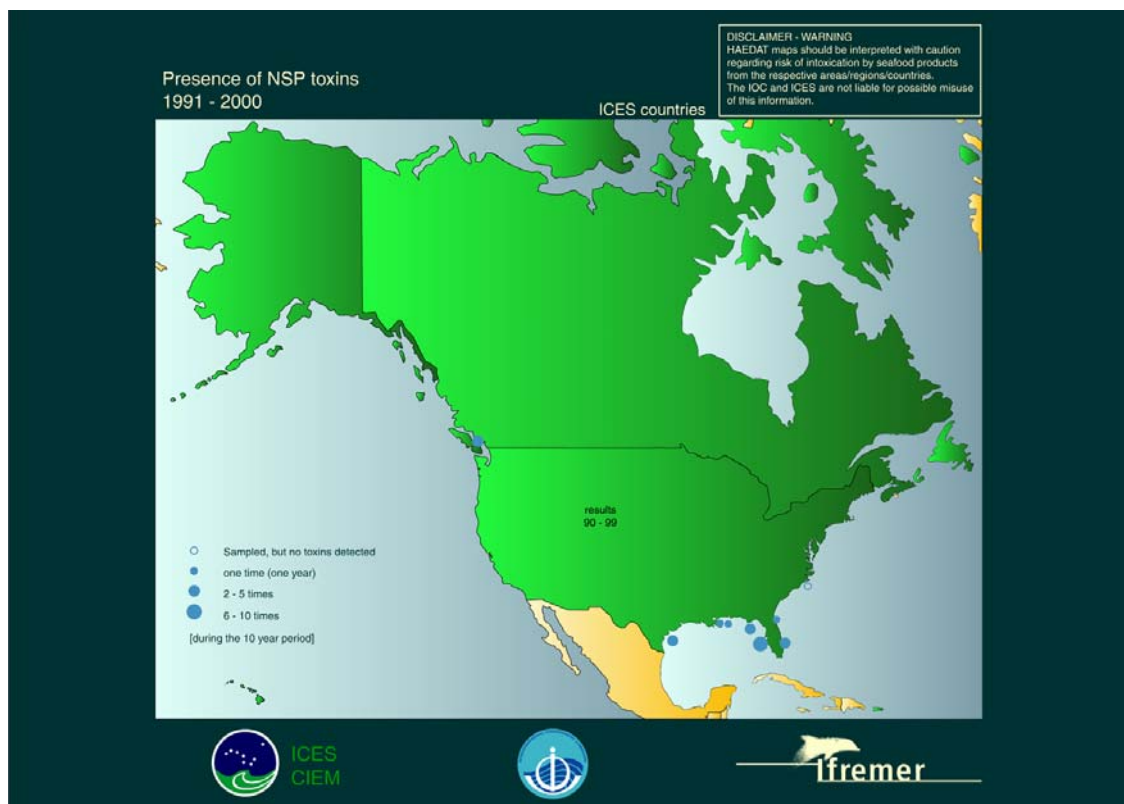
Sud Africa

En el verano de 1995 a 1996, se informó un serio problema de toxinas en aerosol en la Bahía False, que posteriormente se extendió al balneario costero de Hermanus en la Bahía Walker. En personas que concurrieron a las playas y en los residentes vecinos a la costa se observaron tos, quemaduras de las vías nasales, dificultades respiratorias, ojos y piel irritados. La toxina en aerosol se vinculó con la floración de una especie de dinoflagelado tóxico *Gymnodinium*, registrada por primera vez en la Bahía False en 1988. A pesar de otras floraciones de la especie en varias ocasiones desde entonces, los efectos nocivos sobre los seres humanos no habían sido nunca antes tan evidentes como en 1995-96. Las mortandades de la fauna fueron, sin embargo, pequeñas, con excepción de las larvas sufridas por cultivadores de abalone en tierra firme, en la zona de la Bahía Walker. A lo largo de la costa sud africana usualmente aparece implicado en casos de NSP el dinoflagelado *Gymnodinium nagasakiense*. La mayor parte de los brotes han sido informados de la Bahía False, donde son responsables de la decoloración verde-oliva del agua de mar durante el otoño., De la HF Reserva Marina de Verwoerd en 1989 fueron lavadas treinta toneladas de abalone, luego de floraciones de *Gymnodinium nagasakiense* (Van der Vyver *et al.*, 2000).

5.7.3 América del Norte

La Figura 5.5 ilustra la presencia de toxinas NSP en los países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000.

Figura 5.5 Presencia de toxinas NSP en los países norteamericanos miembro del CIEM desde 1991 a 2000



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

Canadá

Se han informado mareas rojas de *Heterosigma akashiwo* (pertenecientes a la clase *Raphidophyceae*), causantes de mortandades de peces de cultivo en aguas de bahías (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Estados Unidos de América

Costa Este

Se postuló que la mortandad de una variedad de delfines (*Tursiops truncatus*) estaba asociada con brevetoxinas (a lo largo de la costa del Atlántico medio de los Estados Unidos desde 1987 a 1988 (Bossart *et al.*, 1998).

Se identificó *G. breve* (6×10^6 células por litro) en muestras de agua retiradas de la costa de Carolina del Norte el 2 de noviembre de 1987. Este fue el primer registro de la presencia de *G. breve* al norte de la Florida, extendiendo el rango de este dinoflagelado subtropical tóxico en más de 800 km hacia el norte. Antes de la finalización de esta floración y transcurridos tres meses y medio, había informados 48 casos de NSP en seres humanos con más de 1 480 km² aguas en que se cosechan mariscos (ostras y almejas) cerradas en el pico de la cosecha. Se informó, además en algunas zonas de mortandades importantes de vieiras. Se ha sugerido que el sistema de la Corriente del Golfo en la Florida transportó *G. breve* hacia el norte a la costa de Carolina del Norte en octubre de 1987. Durante las fases de floración de *G. breve* en Carolina del Norte las concentraciones de fitoplancton crecieron con el tiempo en todas las estaciones independientemente de las concentraciones de *G. breve* (hasta 3.27×10^5 células/litro) o del grado de desarrollo de la floración. Esto contrasta con las floraciones de *G. breve* en el Golfo de México típicamente mono específicas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). Se han informado mareas rojas de *Heterosigma akashiwo* (perteneciente a la clase *Raphidophyceae*) en las aguas de

bahías de la Costa Este como causantes de mortandad en peces de cultivo (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Diez eventos de mortandad de peces, involucrando principalmente a menhaden del Atlántico, tuvieron lugar desde julio a setiembre de 2000 en varias bahías y cañadas en Delaware. Dos de los eventos resultaron en mortandades importantes estimadas entre 1,5 a 2 millones de peces en Bald Eagle Creek, Bahía de Rehoboth. Se demostró la presencia de *Chattonella cf. vericulosa* con una densidad máxima de $1,04 \times 10^7$ células/litro. También se detectaron PbTx-2, PbTx-3 y PbTx-9 (Bordelais *et al.*, 2002).

Florida y Golfo de México

El 16 de junio de 1996, el Departamento de Salud del Condado de Sarasota, la Oficina de Epidemiología Ambiental, el Departamento de Protección Ambiental de la Florida y la FDA diagnosticaron NSP en tres pacientes. Todos habían ingerido almejas (*Chione cancellata*) y especies no identificadas de caracoles marinos cosechadas de una zona de recolección prohibida desde el 31 de enero de 1996 al 8 de junio de 1996 por una marea roja de *G. breve*. Fue cerrada nuevamente el 11 de junio. Las almejas habían sido cocidas hasta su apertura, desconociéndose el tiempo de cocción de los caracoles marinos (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Desde comienzos de marzo a fines de abril de 1996, por lo menos 149 manatíes (*Trichechus manatus latirostris*) murieron en una epizootia sin precedentes a lo largo de unas 80 millas de la costa sudoeste de la Florida (zona de Charlotte Harbour). Casi simultáneamente en la misma zona geográfica de la epizootia que afectó a manatíes, una floración ocasionó una importante marea roja, mayoritariamente de *G. breve*, productora de brevetoxina. Las cuentas celulares de *G. breve* eran de aproximadamente $23,3 \times 10^6$ células/litro. La autopsia indicó una neurointoxicación facilitada por exposición oral y por inhalación. Existen tres rutas potenciales para la intoxicación: i) inhalación de aerosoles tóxicos; ii) ingesta de alimentos tóxicos; y iii) ingesta de agua de mar tóxica. Una especulación análoga se hizo para las mortandades de manatí en el sudoeste de la Florida en 1963 y 1982 (Bossart *et al.*, 1998).

En la Florida, se ha informado de la intoxicación de manatíes por brevetoxinas en tunicados pelágicos unidos a pasto de mar (Hallegraeff, 1995). Se han detectado también brevetoxinas en menhaden y lisas de la costa de la Florida (Quilliam, 1999).

Se ha postulado la mortandad asociada con brevetoxinas en un tipo de delfines (*Tursiops truncatus*) ocurrida en 1946 y 1946 en el sudoeste de la Florida (Bossart *et al.*, 1998), debido a una floración de *G. breve* identificado en 1947 como el agente etiológico y considerado como único responsable de todos los brotes descritos desde 1844. Además, se había observado la mortandad asociada a las brevetoxinas en estos delfines a lo largo de la costa del Atlántico en 1987 y 1988 (Bossart *et al.*, 1998).

Todas las mareas rojas en la Florida se han asociado con mortandades masivas de animales marinos. Se observaron estos fenómenos 24 veces desde 1844 a 1971 y su origen natural se ve comprobado por haber ocurrido antes del desarrollo de la agricultura, de las ciudades, industrias y turismo. Se han notado también los problemas causados por ingestión de mariscos infestados con toxinas o inhalación de células en aerosoles (Viviani, 1992).

A lo largo de la costa del Golfo en la Florida se ha observado la mortandad entre los cormoranes de doble cresta (*Phalacrocorax auritus*) (Fleming y Baden, 1999).

A fines de octubre de 1996 y hasta diciembre de 1996, tuvo lugar por primera vez una floración de *G. breve* en aguas de baja salinidad en el norte del Golfo de México. Las densidades deben ser considerablemente inferiores a las normales para que aparezca *G. breve*. Los cultivos de ostras permanecieron cerrados de noviembre de 1996 a fines de abril de 1997 (Dortch *et al.*, 1998).

Costa Oeste

La brevetoxina fue la causa de la mortandad estival en California de araos (*Uri aalge*) (Fleming y Baden, 1999).

Se han informado mareas rojas de *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*) en aguas de bahías de la Costa Oeste, causando mortandades en peces de cultivo (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.7.4 América Central y del Sur

Brasil

Chattonella sp. y *Heterosigma akashiwo* representan un riesgo para los cultivos intensivos de camarones y mariscos en Santa Catalina (Ferrari, 2001).

México.

En el Golfo de México, *G. breve* es la especie dominante, que desarrolla floraciones importantes casi todos los años en el otoño, con mortandad de peces a lo largo de las costas de los estados de Veracruz y Tamaulipas, afectando a veces otros estados del Golfo de México. Desde 1994, los eventos se han hecho más permanentes (alcanzando más de 100 días durante el otoño de 1997), tanto por sus consecuencias ambientales como por sus efectos sobre la salud humanas, con grandes mortandades de peces y muchas personas afectadas por la exposición a los aerosoles de agua de mar o por inmersión en ella (Sierra-Beltrán *et al.*, 1998).

5.7.5 Asia

China, Hong Kong Región Administrativa Especial

Heterosigma akashiwo causó la primera floración perjudicial de *Raphidophytes* en Yim Tim Tsai, en aguas de la Región Administrativa Especial de Hong Kong en marzo de 1987. Una floración de *Chattonella marina* tuvo lugar en 1991, resultante en mortandad de peces. También fue identificada la *Chattonella antiqua*. Estas floraciones de *Raphidophytes* pueden representar una seria amenaza a la acuicultura de peces de escama (Songhui y Hodgkiss, 2001).

Japón

Se ha informado de mareas rojas provocadas por *Heterosigma akashiwo* en aguas de bahías, resultando en mortandad de peces de cultivo (colas amarillas jóvenes en jaulas, *Seriola quinqueradiata*) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se ha informado en 1972 de mareas rojas de *Fibrocapsa japonica* primero en aguas costeras de la Prefectura de Ehime, causantes de fuertes mortandades de peces cola amarillo jóvenes enjaulados (*S. quinqueradiata*) y luego en la Bahía de Atsumi Bay (1973), el Mar Interior de Selo (1987) y Harima Nada (1989) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Chattonella antiqua formó mareas rojas muy densas en regiones costeras del Japón matando gran cantidad de peces de cultivo (colas amarillas enjaulados) (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

República de Corea

Se ha informado de mareas rojas de *Heterosigma akashiwo* responsables de mortandad de peces de cultivo en aguas de bahías (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Malasia

Se ha informado de mareas rojas de *Heterosigma akashiwo* responsables de mortandad de peces de cultivo en aguas de bahías en Singapur, (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.7.6 Oceanía

Australia

En la Bahía Boston, Australia Meridional, se encontraron niveles altos de brevetoxinas (hasta 142 µg/100 g) en los hígados de atunes de aleta azul (*Thunnus maccoyii*) muestreados en diferentes momentos de un episodio de mortandad importante. Las muestras de plancton revelaron una floración del *Raphidophyte Chattonella marina* de hasta 66 000 células/litro). Había tenido lugar una exposición a *C. marina*, tanto antes, como por lo menos un mes después, de que ocurriera el principal episodio de mortandad. La patología de las agallas del atún indicó una marcada hinchazón epitelial, epitelio levantado y copiosa producción de mucus. Las evidencias apoyando la acción de microalgas tóxicas fueron la patología típica, la alta relación entre el área de las agallas y el peso del cuerpo y el extremadamente alto volumen de ventilación del atún que maximizaría la exposición a los efectos tóxicos de la *C. marina*. El hecho que los atunes de cultivo hayan recibido como alimento carne de pescado altamente oxidada usado en anzuelos habría agotado los antioxidantes endógenos en los atunes y causado una sensibilidad exquisita del pez a los radicales oxígeno activados.

Se sabe que *C. marina* resulta tóxica para los peces mediante al menos dos mecanismos, la producción de radicales oxígeno reactivos y la producción de brevetoxinas ictiotóxicas (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). En enero de 1994, asociadas con una floración del tipo *G. breve*, las almejas de la isla de Tamboon Inlet en la costa de Gippsland, en Victoria contenían un nivel de toxina NSP de 27,5 MU/100 g (ANZFA, 2001).

Nueva Zelanda

Se asociaron enfermedades humanas y animales durante el verano de 1992/1993 con biotoxinas marinas en mariscos. Aunque se demostró la presencia de cuatro tipos de toxinas diferentes, solo la NSP y posiblemente la DSP se asociaron con enfermedades clínicas. Algas semejantes, pero no idénticas a *G. breve* se consideraron como responsables de síntomas típicos de NSP y de la irritación respiratoria aguda asociados con fragmentos del alga transportados en aerosol. En toda Nueva Zelanda se registraron 186 casos de NSP (Van Apeldoorn *et al.*, 2001). Durante el brote de intoxicaciones con mariscos de 1993, el nivel de toxinas NSP alcanzó a 592 UR/100 g para mariscos comestibles (ANZFA, 2001). En el período de setiembre de 1994 a julio de 1996, 0,2 por ciento de las muestras retiradas semanalmente a lo largo de la costa de Nueva Zelanda presentaron un nivel de toxina NSP superior al límite reglamentario en un total de 10 eventos con NSP (nivel máximo 26 UR/100 g (para diversas especies de mariscos)). En el noreste de la Isla del Norte hubo una intoxicación NSP muy extendida con 186 personas afectadas (ver también arriba) (Sim y Wilson, 1997).

A comienzos de 1993, fue encontrada *Fibrocapsa japonica*, en las costas este y oeste de la Isla del Norte y en la costa este de la Isla del Sur (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Se ha informado la presencia de *Heterosigma akashiwo*, causante de mortandades en peces de cultivo, en mareas rojas en aguas de bahías en Nueva Zelanda (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Inmediatamente después de una serie de episodios resultantes en la muerte de peces y otra fauna marina, unidos a brotes de enfermedades respiratorias en seres humanos próximos a la costa de Wairarapa y a la Bahía de Hawke en la costa este de la Isla del Norte, Wellington Harbour sufrió un severo brote tóxico que persistió de mediados de febrero a abril de 1998. Este brote decimó casi toda la vida marina (incluso algas) en el puerto. Durante estos brotes poco comunes, se encontró que las anguilas y los lenguados fueron los primeros en sucumbir, extendiéndose luego a otros peces pelágicos e invertebrados marinos. Ochenta personas en Wellington Harbour experimentaron enfermedades respiratorias; las personas que concurrieron a las playas, nadadores y wind-surfistas se quejaron todos de tos seca, dolores severos de garganta, nariz con mucosidades e irritaciones de los ojos. Además los trabajadores de los cultivos y los buzos experimentaron, entre otros síntomas, severos dolores de cabeza y sensación de quemaduras en la cara como las causadas por el sol. Se encontró que esta floración sin precedentes, estaba dominada por una *Gymnodinium* sp. no descrita ($33,3 \times 10^6$ células/litro). Los caracteres morfológicos de esta nueva especie recordaban al *Gymnodinium*

mikimotoi japonés. La toxina de Wellington Harbour era estable tanto en condiciones ácidas como alcalinas, aunque inestable en medio ácido débil. Esto hace que sea menos probable que resulte al ser ingerido en un riesgo a la salud humana. Al calentarse a 100 °C la toxina perdió la mayor parte de su toxicidad. Era, también muy oxidable pudiendo consecuentemente destruirse por ozonización. Una de las características notables de la floración en Wellington Harbour de 1998 fue la aparición de una extendida espuma de mar, persistente por varias semanas. Los impactos sobre la vida marina de este nuevo *Gymnodinium* sp. son seguramente más severos que los causados por el *G. mikimotoi* de Japón, *G. breve* de la costa atlántica de los Estados Unidos, *G. cf. mikimotoi* de Europa Occidental y *G. galatheanum* del Mar del Norte. En lo que hace a los impactos de las toxinas transportadas por aire o por agua sobre los seres humanos, esta nueva *Gymnodinium* sp. es muy similar a las de *G. breve* de la costa atlántica de los Estados Unidos y a la recientemente informada *Gymnodinium* sp. de Sud Africa (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

5.8 Reglamentaciones y seguimiento

5.8.1 Europa

Dinamarca

Existe, para varias especies de algas, un programa de seguimiento de *Gymnodinium* spp. Las zonas de cosecha de productos pesqueros se cierran cuando se alcanzan las $5,10^5$ células/litro (según las especies) (Van Egmond *et al.*, 1992; Shumway, 1995)

Italia

Se hace el seguimiento de las algas productoras de NSP y se cierran las zonas de cosecha de productos pesqueros cuando simultáneamente aparecen algas en el agua y toxinas en almejas. En Italia, la legislación se basa en el bioensayo en ratón con un valor "no detectable" para mariscos (Van Egmond *et al.*, 1992; Viviani, 1992).

5.8.2 América del Norte

Estados Unidos de América

La FDA actúa cuando el nivel en mariscos es de 80 µg PbTx-2/100 por g de tejido de marisco (0,8 mg/kg o 20 UR/100 g o 4 µg/ratón) analizado según el bioensayo en ratón (FDA, 2000). El uso en los reglamentos de información resultante del bioensayos en ratón está basado en estudios de la década de 1960 en los que se compararon las incidencias de enfermedades en seres humanos con la muerte de ratones inyectados con extractos en bruto de mariscos en dietiléter (Van Apeldoorn *et al.*, 2001).

Florida y el Golfo de México

El departamento de Recursos Naturales de la Florida tiene desde mediados de la década de 1970 un programa general de control. Solamente en 1984, se indicaron específicamente en los reglamentos empleados en las floraciones de *G. breve*. Los cultivos de mariscos se cierran cuando las concentraciones de *G. breve* superan 5 000 células/litro. Los cierres se mantienen desde unas pocas semanas hasta los seis meses. Se realizan los primeros bioensayos en ratón de los mariscos dos semanas después que las concentraciones de *G. breve* caen por debajo de 5 000 células/litro. Cuando los niveles son inferiores a 20 UR/100 g se reabren los cultivos. El sistema de bioensayos es lento; los resultados tardan casi una semana. Se está desarrollando un kit de campo (Viviani, 1992). Las medidas anteriores debieran evitar casos de NSP relacionados con consumo de mariscos contaminados en la mayor parte de la población humana de la Florida, aunque no podrán prevenir la irritación respiratoria asociada con la exposición a las toxinas en aerosol de las mareas rojas. Aunque otros estados, como Tejas han procedido de otra manera, en la Florida donde las mareas rojas ocurren casi todos los años, las playas no se cierran a las personas que trabajan en ellos, aun con floraciones muy activas próximas a las costas (Fleming y Baden, 1999).

5.8.3 América Central y del Sur

Argentina

La Argentina cuenta con un programa nacional de seguimiento de la toxicidad de almejas en cada provincia costera con laboratorios regionales y una estación fija en Mar del Plata (Ferrari, 2001).

Brasil

El Brasil tuvo una iniciativa piloto durante un año, pero carece de un programa nacional de seguimiento (Ferrari, 2001).

Uruguay

El Uruguay tiene un programa nacional de seguimiento de la toxicidad de almejas y del fitoplancton tóxico (Ferrari, 2001).

5.8.4 Oceanía

Nueva Zelanda

Desde la detección de NSP a comienzos de 1993, Nueva Zelanda ha desarrollado rápidamente una estrategia de gestión. Se toman muestras semanalmente de todas las zonas de cultivo de mariscos, comerciales y no comerciales, a lo largo de toda la faja costera durante todo el año. La mayor parte de las zonas comerciales de cultivo cuentan con programas semanales de muestreo del fitoplancton y se ha comenzado con un sistema de "biblioteca" de muestreo de cosechas para cubrir la distribución temporal y espacial de eventos tóxicos. Esta vigente un bioensayo en ratón (método APHA) con 20 UR/100 g como nivel aceptable. Este nivel corresponde a un tiempo de supervivencia de seis horas para los ratones (Trusewich *et al.*, 1996).

Actualmente el ensayo de mariscos implica un bioensayo en ratón de cribado de toxinas NSP con pruebas confirmatorias (Busby y Seamer, 2001).

Está en desarrollo un Programa de Seguimiento de Biotoxinas que proporcionará datos muy precisos, en menor tiempo y sin bioensayos en ratón. Implementará métodos de ensayo basados en CL-EM, resultantes en datos químicos analíticos en lugar de resultados de bioensayos. Está en discusión el desarrollo y la implementación de nuevos métodos de ensayo, así como su financiación, la validación, el reglamento de ensayo, la disponibilidad de normas analíticas, la comparación con ensayos existentes, los tipos de instrumentos y la cooperación internacional (McNabb y Holland, 2001).

