



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE
CIGUATOXINAS EN PECES CARNÍVOROS
DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biología Marina)

P r e s e n t a

Nombre

TAI COH LEY MARTÍNEZ

La Paz, Baja California Sur, septiembre 2018

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9:00 horas del día 22 del mes de Agosto del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Identificación y cuantificación de ciguatoxinas en peces carnívoros de la Península de Yucatán"

Presentada por el alumno:


Tai-Coh Ley Martínez


Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biología Marina


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

LA COMISIÓN REVISORA


Dr. Eduardo Francisco Balart Páez
Co-Director de Tesis


Dr. Carlos Antonio Poot Delgado
Co-Director de Tesis


Dr. Christine Johanne Band Schmidt
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité tutorial

Dr. Eduardo Francisco Balart Páez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
Co-Director de Tesis

Dr. Carlos Antonio Poot Delgado
Instituto Tecnológico Superior de Champotón
Co-Director de Tesis

Dra. Christine Johanna Band Schmidt
Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN
Tutor

Comité Revisor de Tesis

Dr. Eduardo Francisco Balart Páez
Dr. Carlos Antonio Poot Delgado
Dra. Christine Johanna Band Schmidt
Biol. Mar. Erick J. Núñez Vázquez

Jurado de Examen

Dr. Eduardo Francisco Balart Páez
Dr. Carlos Antonio Poot Delgado
Dra. Christine Johanna Band Schmidt

Suplente

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Resumen

La ciguatera es una intoxicación por el consumo de peces arrecifales, los cuales acumulan en sus tejidos (músculo y vísceras) toxinas tipo poliéter conocidas como ciguatoxinas (CTX). Estas son producidas por dinoflagelados bénticos del género *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* que a través de la red trófica son asimiladas por los peces. Al consumir peces con CTX las personas presentan un cuadro variado de sintomatología de tipo gastrointestinal, cardiovascular y neurológico, este último suele perdurar y en algunos casos evolucionar a una enfermedad crónica. En la Península de Yucatán (PY, Caribe Mexicano y Golfo de México- parte México) la ciguatera ha sido pobremente estudiada. Con el objetivo de evaluar la presencia y concentración de CTX se obtuvieron 96 tejidos (músculo y vísceras) de peces carnívoros de importancia comercial pertenecientes a 11 familias (Carangidae, Carcharhinidae, Centropomidae, Haemulidae, Labridae, Lutjanidae, Sciaenidae, Scorpaenidae, Serranidae, Sphyrnidae, Sphyrnidae) a lo largo de las costas de la PY (Campeche [$n= 30$]; Quintana Roo [$n= 41$] y Yucatán [$n= 25$]). Los extractos obtenidos fueron evaluados por bioensayo en ratón (BR; método de oficial en México para el análisis de este tipo de toxinas), ensayo en *Artemia salina* (ARTOX) ($n= 72$), como método experimental, un ensayo de toxicidad basada en la reducción de la bioluminiscencia en *Vibrio fischeri* [Microtox[®]] ($n= 10$). Los extractos tóxicos resultado del BR ($n= 23$) fueron evaluados por el ensayo de unión a receptores específicos fluorescentes [RBA_(F)]. Los principales signos clínicos observados en el BR fueron diarrea, hipersalivación, disnea, espasmos, problemas de coordinación y locomoción, letargo, parálisis, saltos, convulsiones y paro respiratorio (adicionalmente, algunos ratones mostraron pilo-erección *post-mortem*). En ARTOX se presentó nado errático, giros, golpeteos entre los organismos, letargo, cambios de coloración, pérdida de toracópodos y muerte. El total de extractos letales fue de 25% por BR y 65% por ARTOX. Extractos evaluados por Microtox[®] presentaron toxicidad (considerando toxicidad de manera cualitativa), sin embargo al correlacionarlos con el BR no se obtuvo una correlación positiva entre los métodos. El análisis de los extractos de mayor toxicidad por medio de RBA_(F) mostraron una aparente toxicidad de manera cualitativa con una mayor sensibilidad que el BR. Se confirma la presencia de CTX de manera cuantitativa por BR y ARTOX así como cualitativa por Microtox[®] y RBA_(F) en los tres estados de la PY. Se detecta por primera vez la presencia de CTX en Campeche. La concentración de estas toxinas fue por arriba de las 2 UR (límite máximo permisible -LMP-en la regulación internacional) o 2.5 UR (LMP en la regulación nacional), en peces de importancia comercial representando un riesgo a la salud pública. Este estudio contiene información necesaria para poder establecer medidas de protección para el consumidor en la PY donde la ciguatera parece ser un problema de salud pública en aumento.

Palabras clave: Ciguatera, ciguatoxinas, métodos de detección, Península de Yucatán, RBA_(F).



V.o. B.o. Dr. Eduardo F. Balart Páez



V.o. B.o. Dr. Carlos A. Poot Delgado

Summary

Ciguatera fish poisoning (CFP) is a foodborne illness caused by the consumption of tropical reef fishes, whom have accumulated the polyether toxins known as ciguatoxins (CTX's) in viscera and muscle. These toxins are produced by benthic dinoflagellates of the genus *Gambierdiscus* and *Fukuyoa*, and are obtained by the fishes through the trophic web. In humans the clinical signs and symptoms are at gastrointestinal, cardiovascular and neurological level. In the Yucatan Peninsula (YP, Mexican Caribbean and Gulf of Mexico, (Mexican coast) CFP had been poorly studied. For the aim of this work we obtained tissues of carnivorous fishes to evaluate the presence and concentration of CTXs in flesh and viscera ($N= 96$). We collected carnivorous fishes of 11 families (Carangidae, Carcharhinidae, Centropomidae, Haemulidae, Labridae, Lutjanidae, Sciaenidae, Scorpaenidae, Serranidae, Sphyraenidae, Sphyrnidae) that have commercial importance along the coast of the YP (Campeche [$n= 30$]; Quintana Roo [$n= 41$] and Yucatán [$n= 25$]). Toxicity was evaluated by different analysis: mouse bioassay (MBA, the current official detection method in Mexico; $N= 96$), performed by intraperitoneal administration (i.p.); the brine shrimp assay (ARTOX, $n=72$), a new experimental method with the use of the bioluminescent bacteria (*Vibrio fischeri*) [Microtox® assay, $n=10$]. The toxic samples detected by MBA ($n= 23$) were analyzed by the fluorescent receptor binding assay [$RBA_{(F)}$]. The main clinical signs in the MBA were diarrhea, hypersalivation, dyspnea, spasms, incoordination, locomotion and breathing problems, lethargy, paralysis, snaking jumps, convulsions and respiratory arrest (in addition some mice showed *post mortem* pilo-erection). In ARTOX the signs were erratic and nonproductive swimming movements, color change, loss of thoracopods and death. The totally of the lethal extracts were 25% by MBA and 65% for ARTOX. The Microtox® assay only displayed a qualitative toxicity, but it did not have a good correlation with the MBA. The $RBA_{(F)}$ detect the presence of toxicity with a higher sensibility than MBA. The detection and presence of CTXs in the three states of the YP was demonstrated qualitatively by Microtox® and $RBA_{(F)}$ and quantitatively by MBA and ARTOX assays. This is the first time that the presence of CTXs are reported in Campeche. The concentration of these toxins was above 2 MU (regulatory limits established by US-FDA) or 2.5 MU (regulatory limits in Mexico) in commercial scalefishes, representing a safety risk for consumers. In this study we present the necessary information for the use and applicable rules in sanity and trade for the protection and safety of the consumers in the YP, where CFP is an important health issue that is growing up.

Keywords: Ciguatera, ciguatoxins, detection methods, Yucatan Peninsula, $RBA_{(F)}$.



V.o. B.o. Dr. Eduardo F. Balart Páez



V.o. B.o. Dr. Carlos A. Poot Delgado

Résumé

La ciguatera est une intoxication alimentaire liée à la consommation de poissons contaminés par des toxines appelées ciguatoxines (CTX) qui se cumulent dans le muscle et les viscères des poissons. Les toxines sont produites par les dinoflagellés du genre *Gambierdiscus* et *Fukuyoa* qui à travers du réseau trophique sont assimilées par les poissons. Les personnes qui consomment des poissons avec la toxine présentent une symptomatologie du type gastro-intestinal, cardiovasculaire et neurologique, les dernières généralement perdurent et se développent jusqu'à devenir une maladie chronique. Dans la Péninsule de Yucatan (PY, Caraïbes mexicain et Golfe du Mexique-Côte du Mexique) la ciguatera a été peu étudiée. Avec le but d'évaluer la présence et la concentration de CTX ont été obtenues 96 tissus (muscle et viscères) des poissons carnivores d'intérêt commercial qui font partie des 11 familles (Carangidae, Carcharhinidae, Centropomidae, Haemulidae, Labridae, Lutjanidae, Sciaenidae, Scorpaenidae, Serranidae, Sphyraenidae, Sphyrnidae) tout au long des côtes de la PY (Campeche [$n=30$]; Quintana Roo [$n=41$] y Yucatán [$n=25$]). Les extraits obtenus ont été évalués par le bioessai souris (BS, méthode officielle au Mexique par l'analyse de ce type de toxines), bioessai en *Artemia salina* (ARTOX) ($n=72$), comme une méthode expérimentale, un test de toxicité basé en la diminution de la bioluminescence en *Vibrio fischeri* [Microtox[®]] ($n=10$). Les extraits toxiques du BS ($n=23$) ont été évalués pour le test d'union aux récepteurs spécifiques fluorescents [RBA_(F)]. La principale symptomatologie provoquée par les ciguatoxines ont été: diarrhée, hypersalivation, dyspnée, spasmes, problèmes de la coordination et la locomotion, léthargie, paralysie, sauts, convulsions et arrêt respiratoire (à plus quelques souris démontrent pilo-érection *post-mortem*). Dans ARTOX a été présenté de la natation de manière imprévisible sans mouvements productifs, changement de la coloration, perte des toracopodes et la mort. La totalité des extraits létaux ont été 25% par BS et 65% par ARTOX. Le Microtox[®] test a montré seulement une toxicité qualitative, mais sans bonne corrélation avec le BS. Le RBA_(F) a détecté la présence de la toxicité avec une grande sensibilité plus que le BS. La détection et la présence de CTX dans les trois états de la PY a été démontré qualitativement pour les méthodes de Microtox[®] et RBA_(F) et quantitativement pour les bioessais (BS et ARTOX). Il s'agit de la première occasion qui a été démontré la présence de CTX à l'état de Campeche. La concentration des toxines a été plus que 2 US (limite réglementaire pour la US-FDA) ou 2.5 US (limite réglementaire en Mexique) chez les poissons d'intérêt commercial, ce qui représente un risque pour la santé publique. Avec cette étude nous présentons l'information nécessaire pour l'utilisation et application de la réglementation de l'hygiène dans l'exportation des produits qui garantit la santé des consommateurs à la PY, où la ciguatera est un problème de santé publique qui augmente.

Mots clés: Ciguatera, la gratte, ciguatoxines, méthodes de détection, Péninsule de Yucatan, RBA_(F).



V.o. B.o. Dr. Eduardo F. Balart Pérez



V.o. B.o. Dr. Carlos A. Poot Delgado

Dedicatoria

“Los amigos se pueden dividir en dos categorías: Unos emergen de tu entorno y por algún tiempo se vuelven parte de tu vida. Como en los bailes con cintas, atraviesan rápidamente tu vida.

A algunos los recuerdas, a otros, los olvidas.

Pero existen amigos no tan numerosos, yo los llamaría "elegidos"; con ellos te relaciona un afecto verdadero, se quedan para siempre, y si las circunstancias lo permiten, te acompañan a lo largo de toda tu vida”.

Agatha Christie

A mis “elegidos” que siempre están conmigo a pesar de la distancia.

Viridiana

Edwin

Mario

Alberto

Mes amis.

A mi madre, mi padre, mis hermanos, “Reicolle”, Elián y Leía

A mis abuelitos Laura y Gabriel

à mon vieux moi

In memoriam Edgar Landin Olivas

退拉



Agradecimientos

Académicos e Institucionales.

Al **Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR)** por otorgarme un lugar en su Programa de Posgrado en Maestría en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales así como todas las facilidades dentro de sus instalaciones para poder desarrollar esta tesis.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca nacional otorgada (No. de Becario 521496), durante dos años de la Maestría.

A mi comité de Maestría:

Al **Dr. Eduardo F. Balart-Páez (Coordinador del Programa de Ecología Pesquera e Investigador Titular del CIBNOR)**, quiero agradecerle de la manera más atenta por ser parte de este proyecto desde principio a fin, sus sugerencias de libros, revistas y demás material científico, por la ayuda brindada económica y académica dentro y fuera del CIBNOR para poder forjar objetivos académicos y personales en mi preparación de Maestro. Así como las charlas de peces, pero sobre todo la paciencia y confianza que me ha tenido por largos años, muchísimas GRACIAS.

Al **Dr. Carlos A. Poot-Delgado (ITESCHAM)** por aceptar ser parte de mi Comité, por sus sugerencias, revisiones y la practicidad para compartir material académico en esta tesis; así como otras muchas pláticas alrededor de la temática de FAN, por todas las facilidades brindadas para mis estancias en la “ville” de Champotón y obviamente por su valiosa amistad, de verdad MERCI BEAUCOUP.

A la **Dra. Christine J. Band-Schmidt (Departamento de Plancton y Ecología Marina CICIMAR-IPN)** muchas gracias por aceptar ser parte de mi Comité revisor, sus acertadas sugerencias fueron muy valiosas para entender mi redacción (sobre todo en el “summary”), así como sus correcciones en el documento. Quiero agradecerle especialmente por el tiempo y dedicación para poder tener todo en orden a pesar de mis prisas y por las enseñanzas fuera de las aulas del CIBNOR, la pase de maravilla con las raphidophyceas y el resto de sus cultivos de microalgas, de verdad gracias por todo el aprendizaje compartido a lo largo de estos años.

Y al **Biol. Mar. Erick J. Núñez-Vázquez (CIBNOR; INCODE)** quiero agradecerte por toda la paciencia que has tenido hacia mi persona a lo largo de este camino, por hacer uso de tu conocimiento para realizar este proyecto de tesis con sus debidas correcciones, guía y asesoramiento. Además de la infinita sabiduría que me compartes día con día dentro y fuera del CIBNOR; por las largas charlas y por la confianza para poder llevar a cabo este proyecto conmigo. Gracias por todas las minuciosidades que me hiciste tener en la cabeza para poder escalar mis proyectos como Maestro y además de todo los personales. Infinitas gracias por tu confianza y amistad al abrirme las puertas del Laboratorio de Toxinas Marinas (mi casa en La Paz por ya varios años) y de todos los proyectos que se generan dentro y fuera de él.

Al personal de Posgrado: la **Lic. Osvelia Ibarra-Morales** y **Tania V. Núñez-Valdez** del Departamento de Control Escolar por su asesoría y atención oportuna y ayuda en todos los trámites requeridos a lo largo de la Maestría pero sobre todo por su calidez humana. A la **Lic. Leticia González Rubio Rivera** por orientación para todos los trámites de beca y apoyos dentro y fuera de la institución. Al **Lic. Horacio Sandoval-Gómez** por toda la ayuda administrada dentro y fuera del Laboratorio de Computo, un excelente caballero y persona del cual el Posgrado no sería lo mismo. De la misma forma pero no menos importante, a la **Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra** por sus observaciones a la tesis, así como las facilidades otorgadas dentro del Programa de Posgrado, muchas gracias a todos por hacer amena la burocracia.

Al **Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos** de la **SULSA, CIBNOR**; donde esta tesis fue realizada bajo la coordinación y asesoría del **B. M. Erick J. Núñez Vázquez (TTC, responsable del análisis de Toxinas Marinas)**, especialista en toxinología marina. También quiero agradecer la asistencia técnica por el uso de equipo e instalaciones al **p. B. M. Daniel O. Ceseña Ojeda**; infinitas gracias por compartir conmigo siempre toda su experiencia y amistad en este “mundo tóxico”.

Al área del **Bioterio del CIBNOR** para la realización de los bioensayos, así como para el responsable el **Dr. Amaury Cordero Tapia** y el **Técnico Guadalupe Sánchez Castro** por su apoyo, asistencia y compañerismo para poder realizar de manera más eficiente mis objetivos durante los métodos de BR y ARTOX.

Al **Dr. Dariel Tovar-Ramírez (Investigador Titular del Programa de Acuicultura del CIBNOR)** así como a su Técnico la **Biol. Patricia Hinojosa Baltazar (TTC, responsable del Laboratorio de Fisiología Comparada y Genómica funcional del CIBNOR)** gracias a ambos por la guía, y capacitación para poder llevar a cabo parte de los experimentos con el uso de equipo y materiales de su laboratorio empleados en la técnica de RBA_(F), de verdad muchas Gracias.

Al **Dr. Francisco E. Hernández-Sandoval (TTC, responsable del Laboratorio de Microalgas Nocivas del CIBNOR)** por la asesoría, préstamo de equipo y su confianza para el uso de su laboratorio a lo largo de los variados experimentos con toxinas marinas durante esta etapa; infinitas gracias.

Al **Técnico Pablo Monsalvo Spencer (SULSA: Laboratorio de Aclimatación y Mantenimiento de Organismos Acuáticos)** por su colaboración en la crianza y suministro de artemia, así como de microalgas para su manutención durante el ensayo ARTOX, muchas gracias por toda la ayuda para poder cumplir mis objetivos.

Al **M. C. Manuel Moreno Legorreta (Laboratorio de Microbiología Ambiental del CIBNOR)** por la asesoría en software estadístico, además de la elaboración del mapa de la Península de Yucatán que se encuentra en este contenido, muchas gracias por todas sus prontas atenciones.

Al personal de la Biblioteca “Daniel Lluich Belda”; la **Lic. Ana M. Talamates-Cota** y **Susana Luna-García**, por su amabilidad y con esas ganas de ayudar siempre apoyando para tener acceso de la manera más rápida y precisa; con especiales agradecimientos a la **Lic. M. Esther Ojeda-Castro** por siempre brindarme apoyo para la búsqueda de artículos científicos vía electrónica, de verdad su ayuda fue muy valiosa para culminar este trabajo, muchísimas gracias.

Quiero agradecer al **Instituto Tecnológico Superior de Champotón (ITESCHAM)**, por haberme brindado un espacio en su recinto, abrirme las puertas para formar parte de su comunidad y otorgarme una beca para poder llevar a cabo mi manutención durante mi estancia en la comunidad de Champotón, Campeche. Muchísimas gracias por su cordialidad y calidez humana a todos los involucrados se les agradece infinitamente.

A la Red temática de CONACYT sobre Florecimientos Algales Nocivos (**RedFAN**), por darme un lugar como estudiante y permitirme realizar esta tesis en diversos aspectos, gracias a los apoyos económicos para llevar a cabo mis estancias en el estado de Campeche, así como la presentación de la misma en diversos foros académicos sobre el tema de FAN.

Agradezco el apoyo financiero durante la estancia en el Caribe Mexicano así como para la culminación de mi tesis por parte de Investigación para la Conservación y el Desarrollo A. C. (**INCODE**); el cual fue una fuente muy importante para la realización de esta tesis, así como para mi manutención.

A todas las personas en el Caribe mexicano que me ayudaron a cumplir los objetivos de este estudio, reiterando mi agradecimiento al **Dr. Antonio Almazán-Becerril (CICY-UCIA-)** por la ayuda económica brindada con becas, la facilidad para adquirir literatura, así como por su compañía de principio a fin en esta travesía “ciguatérica” y del mismo modo agradecer al resto de su familia por su hospitalidad y apoyo en esta aventura recolectando peces y toxinas.

A la **M. C. Yolanda Pica Granados** y la **Técnico Giselle Trujillo Domínguez** del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (**IMTA**), por su asesoría en el uso y manipulación de la técnica del Microtox®, toda una experiencia poder colaborar con tan buen equipo de trabajo, les agradezco mucho su tiempo y dedicación para poder lograr los objetivos.

A las autoridades y personal científico-técnico del **INAPESCA** (en especial a la **Bióloga Sofía Barón-Campis** y el **Q.F. B. Casimiro Ramírez-Camarena**) y el CRIP-Yucaltepén, en Yucatán. Gracias por las muestras donadas de pez león, así como de otros peces carnívoros para la evaluación de CTX y por permitirnos llegar este trabajo hasta Yucatán.

Agradezco a las **Biólogas Elpis J. Chávez-Calderón** y **Selene E. Jacobo-Cabral** por el acercamiento, donación de datos y muestras de pez león (*P. volitans*) así como las demás facilidades en Pto. Morelos, Quintana Roo; así como al **Dr. J. Adán Caballero-Vázquez (CICY-UCIA-)** por la guía para poder contactarlas y las facilidades otorgadas durante mi estancia en la ciudad de Cancún, muchas gracias.

Personales.

Al resto de los Dres. de diferentes instituciones que me han ayudado y motivado a seguir adelante en el camino de las FAN gracias por su conocimiento, tiempo, amistad, consejos, sugerencias y jalones de orejas. Dr. José J. Bustillos Guzmán, Dr. David J. López Cortés. Dr. Francisco E. Hernández Sandoval del **CIBNOR**; al Dr. Ernesto García Mendoza, la M. C. Jennifer Medina Elizalde del **CICESE**, a la Dra. Mary Carmen Ruíz de la Torre de la **UABC** y al Dr. Aldo Aquino Cruz de la **UAM-Xochimilco**.

Al **M. C. Gabriel R. Castro-Núñez (Director de Biotecnología –en la empresa Microalgas Oleas de México S.A. de C.V.-)** por su guía y apoyo financiero en diferentes temas de FAN y microalgas, pero sobre todo por tu sincera amistad y confianza a lo largo de los diversos proyectos académicos y de la vida diaria muchísimas gracias, amigo.

A mis compañeros y amigos de la **RedMAR**: a Benjamín (Gino), Damaris y Jenny del CICY (UCIA) por hacer mi estancia en la ciudad de Cancún nuevamente mágica, así como los apoyos otorgados a lo largo del **4° Congreso de la SOMEFAN**. A Onil y Yonkany por todo el apoyo brindado a lo largo de mis estancias en la ciudad de Champotón y Campeche, sin Uds. no hubiera sido lo mismo muchas gracias. A Yaireb, Mattus, Sampetro, Valeria, Dulce, Ernestina, Melany, Miriam y Luis; así como el resto de los que conformamos esta red, por todo el apoyo en los cursos y congresos a lo largo de la maestría, a las siempre enérgicas pláticas de FAN y sus toxinas, la diversión nocturna y su valiosa y sincera amistad, les deseo mucho éxito en el resto de sus proyectos.

A mis compañeros y amigos en la maestría: (Alfredo, Amaral, Carmen Fraga, Carmen Pasos, Caroli, Carolina, Caro (Mushasha), Catalina, César, Daniel, Emilio, Gregorio, Guadalupe, Guillermo, Jeb, Jessica, José-Luis, Josué, Karina, Idael, Isaí, Leilani, Marelene, Mayela, Miguel, Nuria, Paulina, Tomás, Yareth), por todo el apoyo tanto académico y moral a lo largo de estos años en el CIBNOR, nunca los olvidaré ha sido una etapa única en mi vida, muchas gracias por todo lo bueno y malo que pudimos vivir dentro y fuera de las aulas del CIBNOR.

A mi **Madre** quiero darte las gracias por todo el apoyo que me das todos los días a pesar de la distancia, por ayudarme a ser una mejor persona, por tu cariño y comprensión que nunca faltan. Sabes que a pesar de las distancias todo lo podemos lograr con perseverancia y con tu amor. Gracias por no derrumbarte mi gran pilar y por cobijarme cuando lo necesito. Un logro más gracias a tu esfuerzo. Te amo.

A mi **Padre**–“Josh” por tu paciencia y apoyo para poder conquistar mis sueños, por brindarme una mano a pesar de la distancia y por todo lo bueno que vivimos, aprecio que siempre puedas decirme un te quiero y gracias a tus enseñanzas y perseverancias que me han ayudado a mantenerme a flote aún en las carencias y pesares hemos conquistado un logro más. Quiero agradecerte por todo lo que has forjado en mí. Te amo.

A mis buenas amigas **Carmen Vacio Fraga** y **Nuria Meza Cuellar**, por las innumerables pláticas en todo momento y el apoyo incondicional durante los días más oscuros, gracias por esa fortaleza y por su sincera amistad, las quiero...sobrevivimos a la maestría !!! ;)

A **J. Viridiana L. Álvarez** muchas gracias por siempre tener una palabra de aliento para mí aún en los días más drásticos tu apoyo y compañía es una herramienta básica y compleja que hace fluir el motor de mi vida. Sabes que nuestra conexión no se puede describir en un simple párrafo, pero más allá de todo quiero que sepas que agradezco cada uno de los momentos que me brindas, que aún podemos conquistar el mundo y que este logro más nos abrirá la puerta a nuevos caminos. Te amo. ¡FUERZA, MENTE Y CORAZÓN!!!

A mi buen amigo **José A. Valencia García**, por siempre tener las puertas de su casa abiertas para mí, por toda la dedicación y atenciones hacia mi persona, porque mi estadía en casa no sería tan amena sin su presencia, de verdad muchas gracias por hacernos la vida más fácil y feliz a Viri y a mí.

A mi buen **Hugo “Ik”** por su apoyo, ánimos y buena vibra para poder esclarecer y concretar los proyectos.

A mi buena amiga **Ana Laura González Castro** por darme un lugar “copilotando” a las bellas playas paceñas (...y más allá) destino... olvidar las penas siempre grata de escucharme. También a la Srita. **Xochitl V. Astorga Hernández** por hacer nuestras vidas siempre más a menas y coloridas, muchas gracias ambas.

A **J. Ángel G. Trasviña** gracias por mantenerme loco, sensato y cuerdo...y aún en las discusiones...¡VIVO!!!

A la familia **Núñez-Heredia** (Erick, Ale y Brisa) por abrirme la puerta de su hogar y darme un lugar acogedor en La Paz, así como la confianza y apoyos brindados a través de estas “toxínicas” travesías, MUCHÍSIMAS GRACIAS por todo.

A la familia **Hernández-Rodríguez** (Paco, Lucía, Michelle y Janine) por abrirme la puerta de su casa, regalarme ratos de su tiempo en familia y mostrarme su calidez humana en todo momento muchas gracias a todos Uds. por compartir su hogar de la manera más grata.

A Jorge Mares, Violeta Martínez, Ismael Ortíz, Javier Espinoza y Javier por su apoyo amistad y hacer amenos, culturales y coloridos los días fuera y lejos de La Paz.

A mis amigos en GDL Mario, Fany, Nyree, Julieta, Karina, Omar, Mara, Nico, Beto (Rojo), Edwin, Nayeli, Jorge y “Balú” por estar siempre conmigo a pesar de la distancia, por su apoyo y amistad a través de los años.

A mis amigos paceños: Luna, Laura, Berny, Pris, Roberto, Isma, Mariana y Joel, por su amistad, apoyo, chismorreo y conversaciones interminables de organismos marinos, así como todo aquello que se extraña cuando no hay mar de por medio.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Résumé	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Contenido	x
Lista de figuras	xii
Lista de tablas	xiii
Abreviaturas	xiv
Glosario	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	11
2.1 La ciguatera en el Caribe.....	11
2.2 El caso de México.....	11
2.3 La Ciguatera en la Península de Yucatán.....	13
2.4 Dinoflagelados béticos asociados a la ciguatera en la Península de Yucatán.....	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos particulares.....	16
6. MATERIAL Y MÉTODOS	17
6.1 Área de estudio.....	17
6.2 Trabajo de Campo.....	18
6.2.1 Obtención de muestras.....	18
6.2.1.1 Muestreo en el año 2013.....	18
6.2.1.2 Muestreo en el año 2015.....	19
6.3 Trabajo de laboratorio.....	20
6.3.1 Extracción e identificación de ciguatoxinas.....	20
6.3.1.1 Extracción de ciguatoxinas.....	20
6.3.1.2 Detección de ciguatoxinas por medio del bioensayo en ratón (BR).....	22
6.3.1.2.1 Cálculo de la toxicidad de ciguatoxinas en el BR.....	22
6.3.1.3 Detección de ciguatoxinas por medio del bioensayo en <i>Artemia salina</i> (ARTOX).....	24
6.3.1.4 Detección de ciguatoxinas por medio del bioensayo en la reducción de la bioluminiscencia de la bacteria <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®).....	26
6.3.1.4.1 Equipo.....	26
6.3.1.4.2 Reactivos.....	28
6.3.1.4.3 Preparación de la prueba.....	28
6.3.1.4.4 Preparación del control de prueba.....	28
6.3.1.4.5 Preparación de diluciones.....	30
6.3.1.4.6 Inoculación y lectura de prueba.....	30
6.3.1.5 Detección de ciguatoxinas por medio del ensayo de unión a receptores específicos fluorescentes RBA _(F)	32

6.3.1.5.1 Preparación de la prueba.....	32
6.3.1.5.2 Período de incubación.....	34
6.3.1.5.3 Transferencia al filtro de placa y lectura del filtro de placa.....	35
7. RESULTADOS.....	36
7.1 Extractos de ciguatoxinas.....	36
7.1.1 Muestreo 2013.....	36
7.1.2 Muestreo 2015.....	37
7.2 Identificación y cuantificación de ciguatoxinas.....	48
7.2.1 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del bioensayo en ratón.....	48
7.2.2 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del bioensayo en <i>Artemia salina</i> (ARTOX).....	55
7.2.3 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del bioensayo en <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®).....	65
7.2.4 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del ensayo de unión a receptores específicos fluorescentes RBA _(F)	68
8. DISCUSIÓN.....	71
8.1 Intoxicaciones por ciguatera en el Caribe.....	71
8.2. Ciguatoxinas en Quintana Roo.....	71
8.2.1 Toxicidad en <i>S. barracuda</i>	72
8.2.2 Toxicidad en el pez león (<i>Pterois volitans</i>).....	78
8.3 Ciguatoxinas en Yucatán.....	83
8.4 Ciguatoxinas en Campeche.....	88
8.5 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del ensayo en <i>Artemia salina</i> (ARTOX).....	92
8.6 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del bioensayo en la reducción de la bioluminiscencia de la bacteria <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®).....	100
8.7 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del ensayo de unión a receptores específicos fluorescentes RBA _(F)	106
8.8 Generalidades sobre los métodos de evaluación de ciguatoxinas.....	109
9. CONCLUSIONES.....	111
10. LITERATURA CITADA.....	113
11. ANEXOS.....	131
11.1 Anexo A.....	131
11.2 Anexo B.....	131
11.3 Anexo C.....	132
11.4 Anexo D.....	133

Lista de figuras

Figura 1. Origen, transmisión y acumulación de ciguatoxinas a través de la red trófica.....	2
Figura 2. Principales estructuras química de las ciguatoxinas.....	3
Figura 3. Modo de acción de las ciguatoxinas.....	4
Figura 4. Distribución de la ciguatera.....	12
Figura 5. Área de estudio: Península de Yucatán.....	17
Figura 6. Modelo en ratón cepa ICR (CD-1).....	23
Figura 7. Modelo en <i>Artemia salina</i> (ARTOX).....	25
Figura 8. Bioensayo en la reducción de la bioluminiscencia de la bacteria <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®).....	27
Figura 9. Procedimiento de prueba para el uso de Microtox®.....	29
Figura 10. Ensayo de unión a receptores específicos fluorescentes RBA _(F)	33
Figura 11. Tejidos de peces procesados para la extracción de ciguatoxinas.....	37
Figura 12. Toxicidad por BR en la Península de Yucatán.....	50
Figura 13. Toxicidad por tejido.....	51
Figura 14. Signos clínicos por BR para el estado de Campeche.....	52
Figura 15. Signos clínicos por BR para el estado de Quintana Roo.....	53
Figura 16. Signos clínicos por BR para el estado de Yucatán.....	54
Figura 17. Mortalidad en <i>A. salina</i> : Controles utilizados.....	55
Figura 18. Toxicidad por ARTOX en la Península de Yucatán.....	60
Figura 19. Mortalidad en <i>A. salina</i> : diferentes tejidos viscerales de peces carnívoros de Yucatán.....	61
Figura 20. Mortalidad en <i>A. salina</i> : barracudas (<i>S. barracuda</i>) de Campeche.....	62
Figura 21. Mortalidad en <i>A. salina</i> : barracudas (<i>S. barracuda</i>) y jureles (<i>C. hippos</i>) de Campeche.....	63
Figura 22. Mortalidad en <i>A. salina</i> : diferentes tejidos viscerales de peces carnívoros de Campeche.....	63
Figura 23. Mortalidad en <i>A. salina</i> : tejidos viscerales de barracuda (<i>S. barracuda</i>) y pez león (<i>P. volitans</i>) de Quintana Roo.....	64
Figura 24. Acomodo en placa para el RBA _(F)	68
Figura 25. Toxicidades letales por especie evaluadas en BR.....	79
Figura 26. Origen y acumulación de CTX en la Red Trófica: según Kelly <i>et al.</i> (1992).....	98

Lista de tablas

Tabla I. Métodos de detección y cuantificación de ciguatoxinas.....	7
Tabla II. Peces carnívoros procesados para la extracción de ciguatoxinas en la Península de Yucatán.....	21
Tabla III. Condiciones recomendadas para la prueba de toxicidad aguda con <i>Vibrio fischeri</i>	30
Tabla IVa. Toxicidad determinada por bioensayo en ratón para la detección de toxinas tipo ciguatoxinas de tejidos de peces carnívoros del año 2013 en la Península de Yucatán.....	38
Tabla IVb. Toxicidad determinada por bioensayo en ratón para la detección de toxinas tipo ciguatoxinas de tejidos de peces carnívoros del año 2015 en la Península de Yucatán.....	43
Tabla V. Signos clínicos de ciguatoxinas presentes en el bioensayo en ratón.....	49
Tabla VI. Toxicidad aguda en <i>Artemia salina</i>	56
Tabla VII. Signos clínicos de ciguatoxinas presentes en el bioensayo en <i>Artemia salina</i>	59
Tabla VIII. Clasificación de toxicidad para Microtox®.....	65
Tabla IX. Bioensayo en la reducción de la bioluminiscencia de la bacteria <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®) para muestras de ciguatoxinas de la Península de Yucatán.....	66
Tabla X. Curva de brevetoxina (PbTx) estándar por medio de RBA (<i>F</i>) en microplaca.....	69
Tabla XI. Detección de ciguatoxinas en peces de la Península de Yucatán por medio de RBA(<i>F</i>) en microplaca.....	70
Tabla XII. Toxicidad de barracudas (<i>Sphyraena</i> spp.) asociadas a la ciguatera en el Mar Caribe y otras regiones del mundo.....	75
Tabla XIII. Toxicidad de pez león (<i>P. volitans</i>) asociadas a la ciguatera en el Mar Caribe y aguas adyacentes.....	82

Abreviaturas

ARTOX	Bioensayo en <i>Artemia salina</i>
BR	Bioensayo en ratón
CFP	(Ciguateric Fish Poisoning) Envenenamiento por pescado ciguatérico
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
CICY	Centro de Investigación Científica de Yucatán
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CONAGUA	Comisión Natural del Agua
CONANP	Comisión Natural de Áreas Naturales Protegidas
CRIP	Centro Regional de Investigación Pesquera
CTX	Ciguatoxina (s)
C-CTX	Ciguatoxina del Caribe
C-CTX-1	Ciguatoxina número 1 del Caribe
DSP	(Diarrhetic Shellfish Poisoning) Intoxicación diarreica por marisco
DTX	Dinophysistoxina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Food Drug Administration, (E.U.A)
GTX	Gambiertoquina
INAPESCA	Instituto Nacional de Pesca
i.p.	Inyección intraperitoneal
ITESCHAM	Instituto Tecnológico Superior de Champotón
MEB	Microscopía electrónica de barrido
N	Número de muestra
Na⁺	ión sodio
NH₃⁺	Grupo amino
NOM	Norma Oficial Mexicana
OH	Radical Hidroxilo
PbTxs	Brevetoxinas
P-CTX	Ciguatoxina del Pacífico
P-CTX-1	Ciguatoxina número 1 del Pacífico
PSP	(Paralytic Shellfish Poisoning) Intoxicación paralítica por mariscos
Pto.	Puerto
PTX	Palytoxina
PY	Península de Yucatán
RBA	Receptor Binding Assay
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
STX	Saxitoxina
UR	Unidades ratón

GLOSARIO

Arrecife: Comunidad marina de aguas poco profundas cercanas a la costa, dominada por comunidades coralinas y estructuras rocosas, con una gran diversidad de especies de algas, invertebrados y peces. Pueden ser coralinos, rocosos, mixtos y artificiales.

Ansiedad: (del latín *anxietas*, 'angustia, aflicción') es una anticipación de un daño o desgracia futuros, que se acompaña de un sentimiento desagradable o de síntomas somáticos de tensión. Suele ser una sensación o un estado emocional normal ante determinadas situaciones y constituye una respuesta habitual a diferentes situaciones cotidianas estresantes.

Ataxia: f. (Patol. Neurol.) Pérdida de la capacidad de ejecutar movimientos de manera voluntaria, ordenada y suavemente. Puede afectar a tronco, extremidades, faringe, laringe, etc. Se debe a la afectación de algunas estructuras del sistema nervioso.

Artralgia: f. Dolor en articulación sin lesión aparente en ella.

Bioensayo: Procedimiento para evaluar la actividad biológica, la presencia o la cantidad de una sustancia (tóxico, toxina, hormona, antibiótico, etc.) mediante la medida de sus efectos sobre un organismo o cultivo celular en comparación con una preparación estándar apropiada

Bradycardia: Relacionado con el ritmo cardíaco. La bradicardia es caracterizada por la disminución en el número de contracciones: 60 por minuto. Puede ser fisiológica o patológica.

Cianosis. Coloración azulada de la piel, mucosas y lecho ungueal, causado por elevada proporción de la hemoglobina reducida en la sangre, a consecuencia de deficiente oxigenación.

Concentración letal (CL). Proporción de una sustancia tóxica en un medio, que causa la muerte después de un cierto período de exposición

Convulsiones: Síntomas de un problema cerebral. Ocurren por la aparición súbita de una actividad eléctrica anormal en el cerebro. Es la sacudida rápida y descontroladamente del cuerpo.

Cuadro Clínico: Es la lista de todos los síntomas y signos clínicos del paciente. Para ello, el médico debe interrogar al paciente, pueden variar mucho de una enfermedad a otra aunque algunos son característicos de ciertas patologías que nos ayudan a determinar cierta enfermedad.

Depresión: f. En psiquiatría, alteración afectivo-conductual, caracterizada por sentimientos de tristeza, inhibición de ideas y psicomotora. Quizá esta tríada se deba a una disminución de la vitalidad, que se expresa tanto en la esfera psíquica como en la corporal.

Dinoflagelado: (del griego *dinos*, girar y latín *flagellum*, látigo), son microorganismos, unicelulares clasificados como protistas. Tienen dos flagelos, los cuales le permiten la locomoción y la alimentación. Integran el fitoplancton marino siendo el segundo grupo más importante en la producción primaria del Océano y tienen una distribución cosmopolita.

Disestesia: Referido a la alteración neurológica propioceptiva de carácter sensitivo caracterizado por la presencia de una disminución o exageración de la sensibilidad.

Disnea: Dificultad para respirar.

Dosis: Cantidad de sustancia administrada o absorbida por un individuo en proporción a su peso o volumen corporal, ordinariamente en 24 horas.

Dosis Letal: Mínima cantidad de una sustancia por unidad de peso corporal, que mata a la totalidad de los animales ensayados bajo condiciones definidas.

Envenenamiento: Acción y efecto de ingerir sustancias venenosas. 2.-Estado patológico agudo o crónico producido por la ingesta de veneno.

Epímero: Es un estereoisómero de otro compuesto que tiene una configuración diferente en uno solo de sus centros estereogénicos.

Estereotipias: Las estereotipias son patrones de comportamiento repetitivos e invariables que no tienen un objetivo o una función obvias. Parecen ser que están restringidas a animales en cautividad y a humanos con enfermedades o disminuciones mentales, así como a individuos a los que se les han suministrado drogas estimulantes.

Fármaco: 1.- Es una sustancia química que interacciona con los organismos vivos para producir unos efectos farmacológicos. 2.- Sustancia química biológica capaz de modificar procesos bioquímicos o fisiológicos de los seres vivos. 3.- Principio activo de un medicamento.

Fatiga crónica: También conocida como astenia crónica, es utilizado el cansancio, se convierte en un síndrome cuando la existencia del cansancio es mayor a seis meses de evolución y que produce una reducción de hasta el 50% para realizar las actividades diarias,

Hipertensión: Elevación de la presión sanguínea.

Hipotensión: Disminución de la presión sanguínea.

Hipotermia: Disminución de la temperatura corporal por debajo de los límites considerados como normales. Puede deberse a causas naturales, tras una exposición prolongada al frío, diversos tipos de infecciones o por enfermedades endocrinas.

Inocuo: No peligroso, inofensivo.

Intoxicación: Proceso patológico, con signos y síntomas clínicos, causado por una sustancia de origen exógeno o endógeno.

Lipofílico: Comportamiento de toda molécula que tiene afinidad por los lípidos. En una disolución o coloide, las partículas lipófilas tienden a acercarse y mantener contacto con los lípidos.

Paraestesia: Anomalía de la percepción de las sensaciones, consistente en: retardo, persistencia, de las excitaciones táctiles, dolorosas, térmicas o vibratorias. Sensaciones penosas variadas que sobrevienen sin causa aparente, tales como hormigueos, embotamiento, pinchazos, calor o frío, constricción localizada, impresión de andar sobre algodón, etc.

Pez: (lat. *piscis*) m. Vertebrado acuático, de respiración branquial, generalmente con extremidades en forma de aleta, aptas para la locomoción y sustentación en el agua. La piel, salvo raras excepciones, está protegida por escamas. La forma de reproducción es ovípara en la mayoría de estos animales.

Prurito: Es un hormigueo o irritación de la piel que provoca el deseo de rascarse en el área afectada. El prurito o picazón puede ocurrir en todo el cuerpo o solamente en un lugar.

Signo: Evidencia objetiva de una afección o enfermedad, perceptible por un observador.

Síntoma: Evidencia subjetiva de una afección o enfermedad, percibida por el propio sujeto que la sufre.

Toxicidad: Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.

Tóxico: Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso para la salud. Todos los agentes físicos y químicos son tóxicos potenciales, ya que su acción depende de la dosis y de las circunstancias individuales y ambientales

Toxicología: 1. Disciplina científica dedicada al estudio del peligro actual o potencial presentado por los efectos nocivos de las sustancias químicas sobre los organismos vivos y ecosistemas, de las relaciones de tales efectos nocivos con la exposición, y de los mecanismos de acción, diagnóstico, prevención y tratamiento de las intoxicaciones. 2. Ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto que son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad.

Toxina: Sustancia venenosa producida por un organismo, (animal, bacteria, hongo, planta, protista, etc).

Toxinología: Disciplina científica dedicada al estudio de la química, bioquímica, farmacología y toxicología de las toxinas.

Veneno: 1. Toxina animal utilizada para autodefensa o depredación y liberada normalmente por mordedura o picadura. 2. Tóxico usado intencionadamente. 3. Mezcla de uno o varios tipos de toxinas.

Referencias:

Garnier, M., V. Delamare, J. Delamare, T. Delamare-Riche. 1992. Dictionnaire des termes de médecine, 23^e Édition. Paris.

Mason, G. J. 1991. Informe crítico sobre las estereotipias. Subdepartamento de Comportamiento Animal. Universidad de Cambridge. *Animal Behaviour*. 41: 1057-1037

Morin Y. 1998. Larousse Médical. Paris

Real Academia de la Lengua Española (<http://www.rae.es/>)

<http://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/arrecifes.html>

<http://www.cun.es/diccionario-medico>

<http://definicion.de/>

<http://dicciomed.eusal.es/palabra/ataxia>

<http://salud.doctissimo.es/diccionario-medico>

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003075.htm>

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003217.htm>

<http://www.plantasyhongos.es/glosario>

http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Parestesia

<http://www.ser.es/wiki/index.php/Disestesia>

1. INTRODUCCIÓN

Entre las latitudes 35° N y 35 ° S se encuentra el cinturón circumtropical, área se distribuyen los principales sistemas arrecifales, como atolones e islas, que se caracterizan por una rica biodiversidad de peces (De Fouw, 2001; Lange *et al.*, 1992; Lehane y Lewis, 2000). En este tipo de ecosistemas, una de las principales fuentes de proteína se adquiere a partir del consumo de peces y es aquí donde se encuentran descripciones de intoxicaciones por consumo de organismos marinos desde hace siglos en lugares como China (618-907 A. C.), Cuba (1787), Islas Cook (1606), entre otros; siendo la más conocida hasta hoy la ciguatera (De Fouw *et al.*, 2001; Poli *et al.*, 1997; Valentino-Márquez *et al.*, 2011).

La ciguatera es una intoxicación por el consumo de peces tropicales contaminados con toxinas. En el humano afecta con una sintomatología variada provocando disturbios a nivel gastrointestinal, neurológico y cardiovascular, siendo los dos últimos los más agudos y raros, los cuales en algunos casos pueden ser fatales (Hamilton *et al.*, 2010; Lehane y Lewis, 2000; Yasumoto *et al.*, 1977).

La intoxicación por peces ciguatos es abreviada internacionalmente como CFP, (por sus siglas en inglés: *Ciguateric Fish Poisoning*). Esta intoxicación es causada por un grupo de toxinas marinas llamadas ciguatoxinas (CTX), compuestos de tipo poliéter, de naturaleza lipofílica formadas por 13-14 anillos unidos por enlaces éter. Son resistentes al calor, además se mantienen estables después de someterse a la cocción y de exponerse ante condiciones ácidas y básicas suaves, así como el congelamiento (FAO, 2005; Lehane y Lewis, 2000; Fig. 1). Las ciguatoxinas se encuentran en el músculo, vísceras y otros tejidos de los peces ciguatos, -en mayor concentración, hasta 9 veces más en el hígado- (Jiang *et al.*, 2012).

Estas toxinas son el resultado de la biotransformación de una toxina precursora; la CTX 4-B (descrita originalmente como gambiertoxina, -GTX-), la cual es producida por dinoflagelados bénticos del género *Gambierdiscus* y del recientemente descrito género *Fukuyoa* (Gómez *et al.*, 2015). Ambos géneros de dinoflagelados se pueden encontrar como epífitos de macroalgas y corales muertos, así como arena, rocas y pastos marinos (Fig. 2; Adachi y Fukuyo, 1979; Holmes y Lewis, 1994; Lehane, 1999; Mak *et al.*, 2013; Yasumoto *et al.*, 1977).

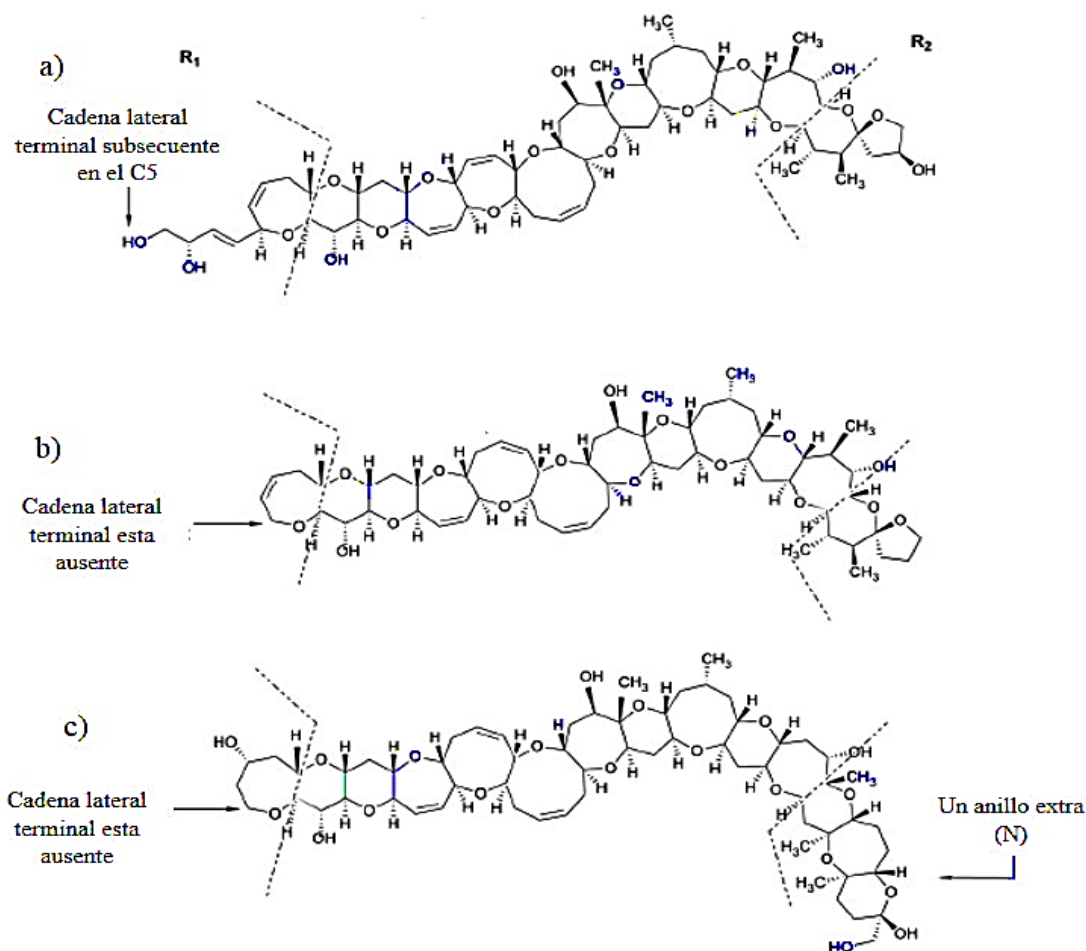


Figura 1. Principales estructuras químicas de las ciguatoxinas. a) P-CTX-1 (Murata *et al.*, 1990); b) P-CTX-3C (Satake *et al.*, 1993) y c) C-CTX-1 (Lewis *et al.*, 1998). Difieren en el número de anillos y en los grupos hidroxilo que le proporcionan la polaridad a la molécula, características que influyen en su toxicidad. Se encuentran en diferentes proporciones en tejidos de peces, invertebrados y dinoflagelados. (Imagen modificada de Soliño y Costa, 2018).

Las ciguatoxinas alteran el sistema nervioso, actúan sobre el “sitio número 5” del canal de sodio. Estas toxinas despolarizan la membrana, dando como resultado una apertura en el canal y con ello un aumento del flujo de iones sodio (Na^+) hacia el interior de la célula que causan cambios en los potenciales de acción (neuronas y células musculares). Esto ocasiona una inestabilidad a nivel celular, al no mantenerse el ambiente osmótico interno desencadenando cambios en los niveles bioenergéticos, los cuales se ven manifestados en

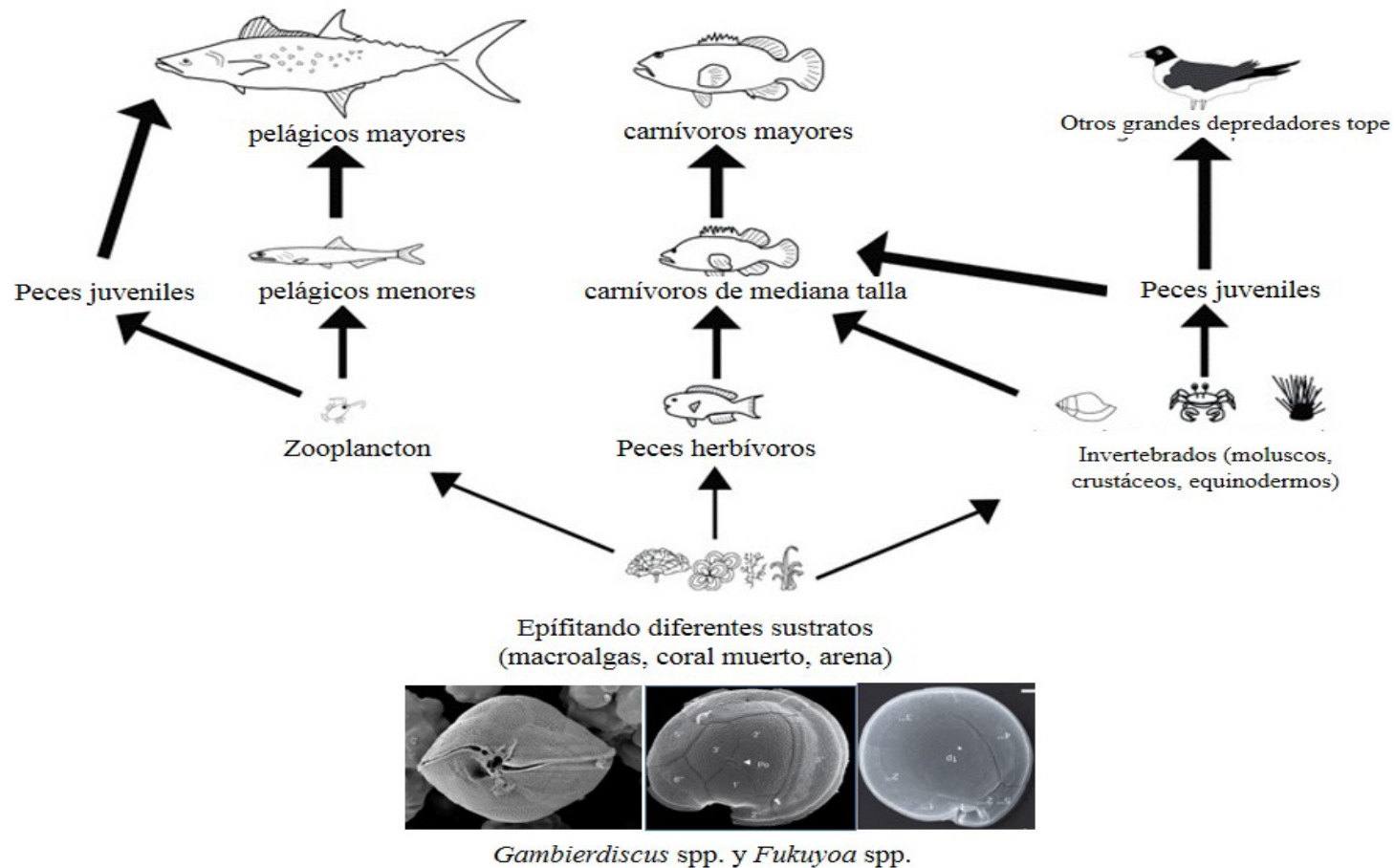


Figura 2. Origen, transmisión y acumulación de ciguatoxinas a través de la red trófica. Las toxinas son producidas y transmitidas por dinoflagelados benthicos del género *Gambierdiscus* spp y *Fukuyoa* spp, los cuales epífitan diferentes sustratos, que al ser consumidos por diferentes organismos (zooplancton, invertebrados, peces herbívoros y/o ramoneadores), se acumulan a otros niveles tróficos que a su vez son alimento de otros organismos superiores en la red trófica (peces carnívoros de diferentes tallas). Se detallan las posibles vías de adquisición de las toxinas en diferentes organismos de la red trófica, que al ser ingeridos por el ser humano pueden provocar síntomas característicos de ciguatera. (Imagen modificada de Heimann *et al.*, 2011)

tejido celular y mitocondrias cuando sobreviene “la hinchazón” y aparición de “ampollas” en su superficie (Graham y Lewis, 2006; Wang, 2008; Fig. 3).

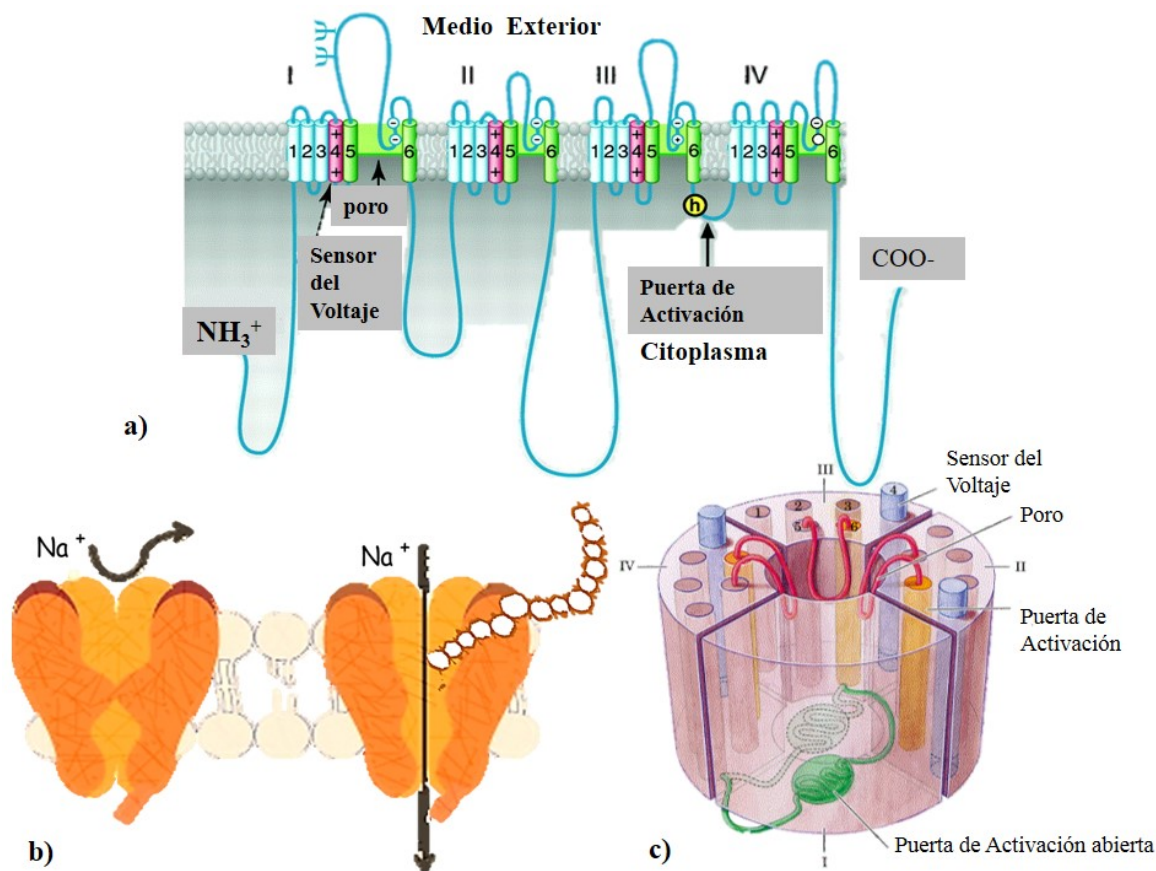


Figura 3. Mecanismo de acción de las ciguatoxinas. a) El canal de sodio dependiente del voltaje, es el principal sitio de acción de varias neurotoxinas; se encuentra en la membrana celular y su principal función es el intercambio de iones. Está compuesto por una subunidad α formada de cuatro dominios (I-IV) y seis sitios activos (s1-6). b) Las CTX tienen una fuerte afinidad por el sitio número 5 del canal de sodio permitiendo la entrada de iones sodio, despolarizando la membrana y produciendo una descompensación en el balance osmótico de la célula, la cual termina por inflamarse al igual que sus mitocondrias observándose “ampollas” en su superficie. c) Esquema general en tercera dimensión del canal de sodio donde se observa el arreglo de sus dominios y sitios activos. (Imágenes modificadas de Wakeling *et al.*, 2012 y Yu *et al.*, 2005).

Las intoxicaciones humanas por consumo de pescados y mariscos contaminados con toxinas marinas es un problema en todo el mundo, por lo que se han implementado programas de monitoreo y detección de toxinas en varios países para la protección del consumidor, así

como para evitar las pérdidas económicas debido al decomiso y no comercialización de productos contaminados (Caillaud *et al.*, 2010; Kato y Yasumoto, 2017; Sérandour *et al.*, 2012).

Hasta el momento no existe una forma práctica, rápida y efectiva para identificar la presencia de CTX en los peces, ya que estos poseen olor, sabor y textura igual a la de cualquier otro pez. Es por ello que para identificación de esta toxina se han utilizado diversos métodos, dentro de los que destaca el bioensayo en ratón (BR), como el método más utilizado para la detección de toxinas marinas a nivel mundial (FAO, 2004; Kato y Yasumoto, 2017; Lewis, 1995; Sérandour, *et al.*, 2012; Vilariño *et al.*, 2010).

El BR permite corroborar la presencia de CTX mediante la aplicación una dosis del extracto purificado o crudo por medio de dos vías de administración: que puede ser vía oral (v. o.) o intraperitoneal (i. p.). Se realizan observaciones minuciosas de los signos clínicos durante las primeras dos horas y de ahí periódicamente hasta las 24 h; la concentración de toxinas se representan en unidades ratón (UR) y/o en microgramos equivalentes de ciguatoxinas (Blythe *et al.*, 1994; Caillaud *et al.*, 2010; Lewis, 1995).

Sin embargo, con base a las recomendaciones éticas en el uso de animales de experimentación, se ha recomendado métodos que reduzcan el uso de vertebrados; proponiendo el uso de invertebrados, plantas y/o microorganismos (hongos, algas, bacterias, entre otros). Es necesario implementar nuevos métodos con una mayor sensibilidad y especificidad que el BR para la evaluación de ciguatoxinas (Dvorak *et al.*, 2012; Kato y Yasumoto 2017; Sérandour *et al.*, 2012; Vilariño *et al.*, 2010).

Estudios recientes se han enfocado en el desarrollo de métodos alternativos al BR para la detección de toxinas marinas (EFSA, 2010; Hardison *et al.*, 2016; Soliño *et al.*, 2015). Aunque la completa sustitución de este método parece difícil debido a los requerimientos en las regulaciones vigentes para la protección del consumo humano; por lo que se ha propuesto que los métodos alternativos al menos deben de considerar reducir el número de bioensayos realizados (Caillaud *et al.*, 2010; Vilariño *et al.*, 2010).

Los métodos utilizados actualmente para la detección de toxinas marinas pueden clasificarse en dos grandes grupos: los métodos analíticos, como los físico-químicos los cuales son capaces de identificar y cuantificar las toxinas, (por ejemplo los cromatográficos acoplados

a diversos detectores: HPLC-FLD, HPLC-UVD, HPLC-MS-MS), y los ensayos que aunque no son capaces de identificar los diferentes análogos de un grupo de toxinas presentes en la muestra si permiten estimar la concentración global de toxinas; éstos incluyen los métodos de tipo biológico como son los bioensayos (ratón, artemia, líneas celulares, inmunoensayos, radio inmunoensayos-RBA) los cuales, en algunos casos no necesitan de disponibilidad de estándares de los diversos análogos, lo que les otorga una ventaja, tomando en cuenta que uno de los mayores problemas o dificultades de llevar a cabo los métodos analíticos es la falta de estándares de toxinas comerciales, como es el caso de los distintos análogos de las ciguatoxinas (Tabla I; Caillaud *et al.*, 2010; Dvorak *et al.*, 2012; Vilariño *et al.*, 2010).

Factores ambientales (blanqueamiento del coral, cambio climático, huracanes, tsunamis, etc.) y factores humanos (actividades militares, colecta de organismos marinos, construcción de muelles y marinas, derrame de aguas residuales, plantas petroleras, trabajos submarinos, entre otros), cambian la dinámica en los sistemas arrecifales, así como la presencia de ecotipos propios de las especies de *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* producen zonas con alto riesgo de ciguatera y zonas ausentes de esta toxina, incluso en zonas que están adyacentes (Bagnis, 1994; Kholer y Kholer, 1992; Lehane, 1999; Lewis, 2001; Villareal *et al.*, 2007).

Se consideraba que la ciguatera estaba limitada a zonas costeras, islas, y archipiélagos, donde el consumo de peces es la principal fuente de proteínas, siendo poblaciones isleñas las más afectadas. Sin embargo en la actualidad, con el aumento del comercio de peces para el consumo alrededor del mundo y el incremento del turismo hacia zonas costeras tropicales, ha provocado que esta enfermedad se extienda hacia cualquier región donde exista una demanda del producto, el cual puede contener toxinas marinas (Chan, 2015; Legrand, 1998; Lehane y Lewis, 2000; Wong *et al.*, 2005).

En la actualidad la ciguatera es la intoxicación alimentaria por consumo de productos marinos con mayor incidencia. Se ha estimado que anualmente suceden alrededor de 10,000 a 50,000 casos por este síndrome. Este dato podría ser mayor, si se toma en cuenta que muchos de los síntomas son confundidos con otras intoxicaciones, y/o qué muchos de los casos no son reportados (Dickey y Plakas, 2010; Legrand, 1998; Lehane y Lewis, 2000; Lewis, 2001).

Con base a lo descrito sobre el comercio y dinámica de los ecosistemas arrecifales, se han registrado nuevos casos de ciguatera en las costas europeas, principalmente por el consumo

de peces importados o por turistas que viajan a zonas donde la ciguatera es recurrente; por lo que este tema ha sido discutido recientemente en Europa donde las ciguatoxinas y sus métodos de cuantificación siguen sin ser validados y por tanto regulados.

Actualmente investigadores europeos se han enfocado a la investigación debido a la falta de información para poder hacer frente a esta intoxicación que está en aumento (Caillud *et al.*, 2010; EFSA, 2010).

Tabla I. Ventajas y desventajas de métodos de detección y cuantificación de ciguatoxinas.

A. Ensayos con animales.	
Bioensayo en ratón	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ○ No es necesario el uso de equipo altamente especializado. ○ Con base a los signos clínicos se puede descartar o asegurar la presencia de la toxina de interés. ○ Provee de una relación entre el tiempo de muerte y la concentración de toxina, pudiendo determinar una cierta toxicidad (LMC: 0.56 µg/kg para P-CTX-1). ○ Es el modelo más aceptado y el oficial en algunos países, ya que al ser mamífero comparte canales de sodio similares al del humano. ○ Adecuado para el uso como “toxico-vigilante” al ser utilizado en términos de investigación. 	<ul style="list-style-type: none"> ● Baja especificidad. ● No permite descartar entre los diferentes análogos de un grupo de toxinas. ● Límite de detección alto: por lo que no siempre se cumple con los estándares de protección para la salud humana. ● Aunque es de fácil manejo, requiere de instalaciones especiales para su cuidado así como insumos para su manutención. ● Debido a razones éticas algunos laboratorios no hacen uso de este método. ● Es difícil estandarizar pruebas interlaboratorios con este método, debido a las diferentes características (sexo, dieta, estrés, cepa, etc.) del ratón utilizado, por lo que los resultados pueden variar.
Bioensayo en <i>Artemia</i> spp	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ○ Genero distribuido mundialmente. 	<ul style="list-style-type: none"> ● La solubilidad de algunos compuestos químicos no suele ser la mejor en agua salina, aunque pueden utilizarse algunos otros agentes para contrarrestar este factor.

- Alta fecundidad, ciclo de vida corto y variadas formas de reproducción.
- Debido a su tamaño pequeño pueden usarse tanto nauplios como adultos.
- Descrito como sencillo, preciso y de bajo costo, ya que el mantenimiento por insumos no es elevado, este organismo no posee una alimentación selectiva.
- Los resultados obtenidos mediante este método suelen tener buenas correlaciones con otros ensayos animales.
- Es un organismo adecuado para el uso en ecotoxicología y en estudios de toxicidad en el medio acuático.
- El organismo tiene alta sensibilidad a un sin fin de compuestos.
- Los métodos necesitan estandarizarse y adecuarse para poder obtener resultados óptimos.
- Es necesario tener presente el tipo de reproducción de la cepa utilizada ya que el organismo posee reproducción sexual y por partenogénesis.
- No es posible adecuarlos con métodos de agentes químicos que requieran la activación de procesos metabólicos en mamíferos.
- Debido a la ausencia de este organismo en el medio marino es necesario adaptarlo a diferentes condiciones de dicho medio.

B. Ensayos biomoleculares.

Ensayo celular: Neuro 2a.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ○ Alta sensibilidad a CTX, puede detectar toxinas en el orden de magnitud del que no sea un riesgo para humanos (LMC: 0.0096 µg de P-CTX-1 /kg). ○ Puede ser utilizado para establecer un perfil general de CTX presentes y estimar el contenido equivalente de un análogo en particular. ○ Posee repetitibilidad, ya que se usa un modelo de líneas celulares. ○ Pueden hacerse múltiples repeticiones a la vez, ya que para llevarlo a cabo se utiliza una placa de 96 pozos. ○ Su emplea en varios laboratorios. 	<ul style="list-style-type: none"> ● No provee información sobre cada uno de los análogos de CTX presentes en la muestra. ● No se han validado las pruebas inter-laboratorio para este método. ● Es posible que exista interferencia debido a los variados tipos de matrices utilizadas. ● Pueden presentar falsos positivos entre PbTx y CTX, ya que ambas se unen al mismo sitio en el canal de sodio.

Ensayo de unión a receptores específicos (RBA, por sus siglas en inglés).

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ○ Provee estimaciones cualitativas y cuantitativas de CTX presentes en muestras biológicas, ha sido probado en diferentes matrices (dinoflagelados, peces, cianobacterias, invertebrados marinos). 	<ul style="list-style-type: none"> ● No permite discernir entre la variedad de análogos de CTX.

- Puede ser utilizado para establecer un perfil general de CTX presentes.
- Alta sensibilidad: LMD de hasta 0.065 $\mu\text{g P-CTX-1kg}^{-1}$ y LMC: hasta 0.13 $\mu\text{g P-CTX-1kg}^{-1}$ (matriz de pez).
- Puede ser usado con extractos crudos o parcialmente purificados.
- Pueden hacerse múltiples repeticiones a la vez, ya que para llevarlo a cabo se utiliza una placa de 96 pozos.
- Si se considera el uso de RBA_(F) (detección por fluorescencia) es posible que haya una mayor distribución y uso en laboratorios de todo el mundo.
- Tiene mayor especificidad que el bioensayo en ratón.
- Existen falsos positivos con PbTx_s y otras toxinas que se unan al sitio 5 del canal de sodio.
- Debido al uso de sustancias radioactivas es posible que no pueda ser usado en la mayoría de los laboratorios.
- Es altamente dependiente de la fuente de receptores utilizados.
- Es un método no validado.

C. Métodos físico-químicos

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, siglas en inglés) / Fluorescencia (HPLC-FLD)

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ○ Más económico que el HPLC-MS. ○ Parcialmente específico para CTX. ○ Diferencia algunos de los análogos de ciguatoxinas. 	<ul style="list-style-type: none"> ● El grupo de CTX con un grupo hidroxilo primario no pueden ser detectadas. ● Se requiere de un proceso de derivatización para el grupo de las CTX. ● No provee límites bajos de detección. ● Desde 1995 no se ha continuado la investigación sobre el uso de este método.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a masas (HPLC-MS)

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ○ Alta sensibilidad a CTX. ○ Es la única técnica conocida que identifica las toxinas. ○ Es posible cuantificar las toxinas con un estándar o un control positivo. <p>LMC: 0.03 $\mu\text{g P-CTX-1}$</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● Equipo y material complejo de manejar. ● Costo de análisis elevados. ● Inadecuado para analizar un gran número de muestras a la vez. ● El manejo del equipo debe estar a cargo de un profesional capacitado. ● Las pruebas inter-laboratorio no han sido validadas para este método.

LMC= límite máximo de cuantificación; LMD= límite máximo de detección. (Caillud *et al.*, 2010; EFSA, 2010).

Una persona se puede intoxicar al consumir tan solo 5 ng de ciguatoxinas por gramo de músculo de pez, siendo el nivel mínimo de toxicidad para humanos (Legrand, 1998). Existe mucha controversia en el límite máximo permisible para el consumo de ciguatoxinas entre las autoridades reguladoras. El límite máximo permisible de toxinas propuesto por la FDA (Food and Drug Administration) de los E.U.A. encargada de regular el consumo, exportación e importación de peces en algunos países del Caribe es de 0.1 μg de C-CTX-1 o 2 UR/100g (FDA, 2011; 2013). La “Autoridad Europea para la Sanidad de los Alimentos” (EFSA, por sus siglas en inglés) considera el límite máximo permisible de 0.01 μg equivalentes de P-CTX-1/ kg de pez el uso de UR en este caso no es aplicable al desuso del BR como método de regulación por esta comunidad (EFSA, 2010), y en México según la Norma Oficial Mexicana (NOM-242-SSA1-2009) establece un límite máximo permisible de ciguatoxinas de 2.5 UR/100g de tejido.

2. ANTECEDENTES

2.1 La ciguatera en el Caribe

En América, las intoxicaciones ocurren principalmente en la costa este de los Estados Unidos de América (Carolina del Norte, Florida, Texas), algunos de sus territorios y países dependientes en el Caribe (Islas Vírgenes Americanas y Puerto Rico,) y en Hawái en el Océano Pacífico (Lange *et al.*, 1992; Pottier *et al.*, 2001 Villareal *et al.*, 2007).

Otros países del Mar Caribe como (Antigua, Las Antillas Francesas, Colombia, Cuba, Dominica, Haití, Islas Vírgenes Americanas y Británicas, Jamaica, México, Montserrat, St. Martin y Venezuela) son zonas de alto riesgo por ciguatera (Fig. 4; Farstad y Chow, 2001; Pottier *et al.*, 2001). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, otros países y lugares lejanos a la costa pueden presentar intoxicaciones por la importación de productos pesqueros y/o la intoxicación de turistas al consumir organismos portadores de toxinas (Barton *et al.*, 1995; De Haro *et al.*, 1997 a, b; Geller *et al.*, 1991; Farstad y Chow, 2001). En esta región, la ciguatera es considerada un problema “endémico” y recurrente (Tosteson, 1995; 1996), en la que la barracuda (*Sphyraena* spp) es uno de los principales vectores de este síndrome (Olsen *et al.*, 1984; Tosteson *et al.*, 1988).

2.2 El caso de México.

Los primeros registros históricos de ciguatera en México se remontan a 1862 año en el que una tripulación francesa se intoxicó por consumo de peces perico (*Scarus* spp.) en el Golfo de México (Halstead, 1968 en Núñez-Vázquez *et al.*, 2018).

A nivel nacional, una revisión reciente realizada por Núñez-Vázquez *et al.* (2018) demostró una morbilidad de 464 casos durante 25 eventos de 1984 a 2013: 240 (51.72%) en Baja California Sur, 164 (35.12%) en Quintana Roo, 45 (9.69%) en Yucatán y 16 casos (3.44%) por turistas mexicanos intoxicados en Cuba. Estos casos de intoxicación estuvieron relacionados con el consumo de peces carnívoros, como pargos (*Lutjanus* spp.) meros, cabrillas y garropas (*Epinephelus* spp y *Mycteroperca* spp) en el Océano Pacífico y la barracuda (*S. barracuda*) y el pargo (*Lutjanus* sp.) en el Atlántico (Golfo de México y Mar Caribe) (Núñez-Vázquez *et al.*, 2018).

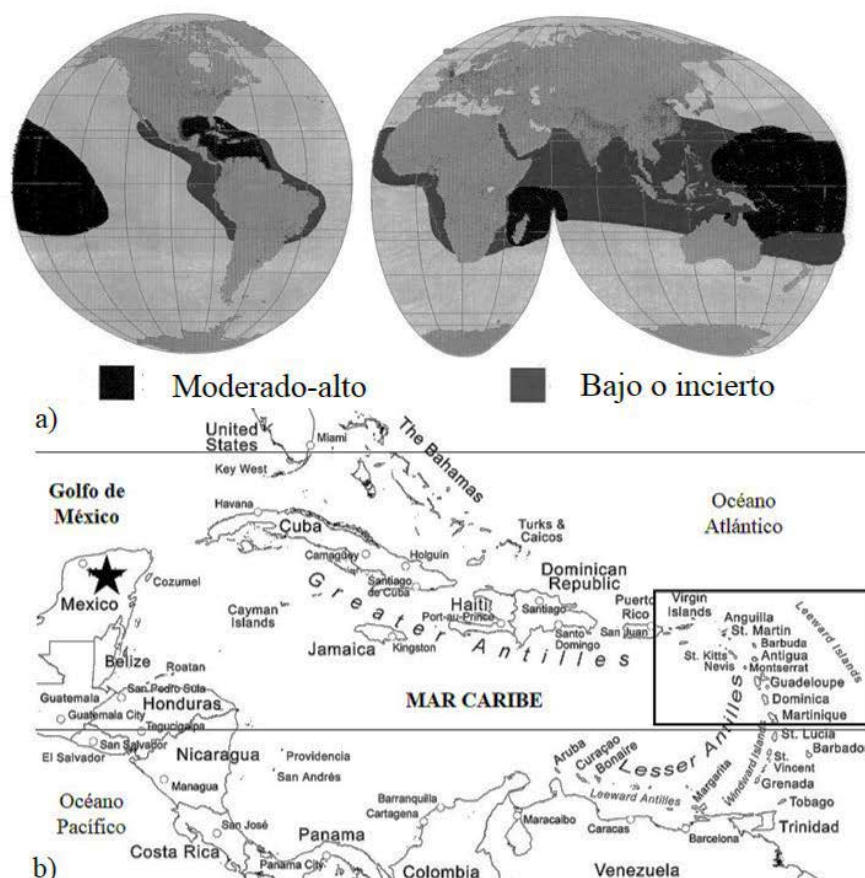


Figura 4. Distribución global de la ciguatera. a) lado superior izquierdo: incidencia de moderada a alta (sombra negra); lado superior derecho, incidencia de baja a incierta (sombra gris). b) Mapa del Caribe. Se señalan los límites de alta incidencia de CFP por líneas horizontales. En el recuadro se indica la región donde existen casos recurrentes. La estrella muestra la zona muestreada en este estudio. Imágenes modificadas de <http://ggpics.xyz/map-of-caribbean/> y Lewis (2001).

Un estudio llevado a cabo por Barra-González *et al.* (2017), en Tuxpan, Veracruz en el Golfo de México; demostró la presencia de ciguatoxinas en barracudas (*S. barracuda*) y otros peces carnívoros de importancia comercial como el jurel (*Caranx hippos*) y el boquinete (*Lachnolaimus maximus*), así como en el músculo de pez león (*Pterois volitans*); todos superaron el límite máximo permisible en la regulación nacional (2.5 UR). Otros peces herbívoros y coralívoros de arrecifes de la misma zona como peces loro (*Scarus vetula*) y damiselas (*Halichoeres radiatus*), también presentaron toxicidad, pero por debajo del LMP. Cabe destacar que en este estudio además del ecosistema arrecifal se cuenta por primera vez en México con la presencia de toxinas en arrecifes artificiales como lo son las plataformas

petroleras; el único caso de estudio en el Golfo de México fue en la zona noreste (parte E.U.A.) por Villareal *et al.* (2007).

2.3 La ciguatera en la Península de Yucatán

En un reciente estudio realizado por Núñez-Vázquez *et al.* (2018), durante el periodo de 1994 al 2013 registra hasta ahora un total de 14 eventos de ciguatera en el Atlántico Mexicano (PY); con un total de 172 casos, de los cuales 61 casos fueron en Isla Mujeres, 29 en Playa del Carmen, 20 en Isla de Cozumel, 14 en Cancún y 5 en Puerto Aventuras, Quintana Roo. Por otra parte en Yucatán han sucedido 26 casos en Mérida, 11 en Progreso y 6 en Kanasín. Otros 16 casos reportados fueron por turistas mexicanos intoxicados en Cuba, todos provocados por el consumo de barracuda (*S. barracuda*).

Sin embargo, existe un sub-registro de casos ya que en la PY (principalmente en el Caribe Mexicano), la ciguatera parece ser un problema añejo que va en incremento y ha sido pobremente estudiado (Arcila-Herrera *et al.*, 2000).

Ley-Martínez *et al.* (2014), demostraron la presencia de ciguatoxinas en vísceras y músculo de peces carnívoros como barracudas (*S. barracuda*) y peces león (*P. volitans*) en Quintana Roo; de la misma manera en otros carnívoros de importancia comercial como pargos (*Lutjanus synagris*, *Osyurus chrysurus*) meros (*Epinephelus morio*), hemúlidos (*Haemulon plumierii*) y cazones (*Rhizoprionodon terraenovae*) en Yucatán, siendo el primer registro publicado que evalúa la presencia de estas toxinas en el Atlántico mexicano.

En el Caribe mexicano particularmente en Isla Mujeres, Quintana Roo (una de las principales zonas con brotes de ciguatera en México), Tuz-Paredes *et al.* (2017) desarrolló un estudio en la parte occidental de la isla dirigido a la evaluación toxicológica de la barracuda (*S. barracuda*), como especie clave, ya que es el principal vector de ciguatera en la región, así como un recurso importante de carácter nutricional asociado a los usos y costumbres culinarias en la zona norte de Quintana Roo. Durante este estudio, se recolectaron 19 ejemplares de los cuales se obtuvieron 36 extractos de ciguatoxinas. Se corroboró la presencia de este tipo de toxinas en la región y su acumulación en estos peces carnívoros, pero en concentraciones bajas. Ellos concluyen que es posible que solo las barracudas de la zona oriental sean las que ocasionen casos de ciguatera, mientras que las de la zona occidental

sean seguras para el consumidor, lo que coincide con el conocimiento popular descrito por los habitantes de la isla.

Actualmente los reportes sugieren que la ciguatera ocupa la segunda posición en intoxicaciones humanas por el consumo de alimentos marinos en México, siendo superada sólo por la intoxicación paralizante por consumo de mariscos -PSP-(con 505 casos y 21 muertes en el mismo período de 34 años) (Núñez-Vázquez *et al.*, 2018).

2.4 Dinoflagelados bénticos asociados a la ciguatera en la Península de Yucatán.

A nivel internacional existen colecciones que cuentan con varias cepas potencialmente productoras de ciguatoxinas de algunas de las especies de dinoflagelados aislados en aguas adyacentes a la PY. Sin embargo, en la mayoría de los casos la toxicidad (perfil toxicológico y niveles), genética y fisiología aún es desconocida (Núñez-Vázquez *et al.*, 2018).

En la PY el estudio de los dinoflagelados asociados con la ciguatera ha sido escaso. Sin embargo, hay evidencia de la presencia de especies relacionadas, como *Gambierdiscus belizeanus*, *G. toxicus*, *Fukuyoa yasumotoi* (antes *G. yasumotoi*), *Ostreopsis belizeanus*, *O. heptagona*, *O. ovata* y *O. siamensis*; *Prorocentrum arenarium*, *P. belizeanum*, *P. caribaeum*, *P. concavum*, *P. elegans*, *P. emarginatum*, *P. foraminosum*, *P. hoffmanianum*, *P. lebourae*, *P. lima*, *P. maculosum*, *P. mexicanum*, *P. ruetzlerianum* y *Amphidinium operculatum* (Almazán-Becerril *et al.* 2012; Hernández-Becerril y Almazán-Becerril, 2004; 2015; Núñez-Vázquez *et al.*, 2018; Okolodkov *et al.*, 2007, 2009, 2014).

En estudios recientes en la parte norte de Quintana Roo, Irola-Sansores (2016) reportó nuevos registros del género *Gambierdiscus*, tres de los cuales aún no se han logrado identificar a nivel de especie y otra más identificada como *G. cf carolinianus*. Sin embargo, especies del género *Ostreopsis* tuvieron una mayor dominancia; destacando la presencia de *O. cf marinus* y *O. cf heptagona*, además de los géneros *Prorocentrum* y *Coolia*.

3. JUSTIFICACIÓN

La ciguatera es una de las intoxicaciones alimentarias más importantes a nivel mundial, común en zonas tropicales, como lo es El Caribe y zonas adyacentes, donde presenta una incidencia recurrente.

En la PY esta intoxicación y su fase crónica ha estado presente desde hace mucho tiempo pero ha sido pobremente estudiada. En las últimas dos décadas inicia el estudio de algunos aspectos de este síndrome, sin embargo las investigaciones aún son incipientes y se requieren estudios más profundos.

El hecho de que no existan suficientes estudios (como por ejemplo: qué especies de peces son más tóxicas, qué tallas son de mayor riesgo, cuál es la distribución anatómica de la toxicidad en los peces, temporalidad de la toxicidad, que variables ambientales –naturales o antropogénicas- influyen o incrementan los casos de ciguatera, zonas de mayor riesgo, ecología de especies de microorganismos precursores, flujo de las toxinas en la cadena alimentaria; naturaleza química de las toxinas, desde los dinoflagelados productores, en los peces herbívoros hasta los peces carnívoros, entre otros) para este síndrome pone en riesgo la salud pública de los habitantes residentes, así como de turistas nacionales y extranjeros que visitan el Caribe Mexicano, región de gran importancia para la industria turística en nuestro país.

La información que se genere en este estudio contribuirá a determinar qué tipo de toxinas se encuentran en dichos peces, su concentración; que tejidos representan mayor riesgo para el consumidor, cuáles son los mejores métodos para su evaluación, entre otros.

Así mismo, se establecerán las bases de investigaciones encaminadas a la protección de la salud pública, disminución de pérdidas económicas derivadas del decomiso de productos pesqueros, entre otros, lo que puede ser de utilidad a las autoridades pesqueras, sanitarias e indirectamente al sector turístico.

4. HIPÓTESIS

En México, existe la presencia de ciguatoxinas en el músculo e hígado de peces carnívoros en la Península de Yucatán (Caribe Mexicano y Golfo de México) y su perfil de toxinas es distinto al de otras regiones.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la toxicidad y el tipo de ciguatoxinas en músculo e hígado de peces carnívoros de la Península de Yucatán (Caribe Mexicano y Golfo de México).

5.2 Objetivos particulares

1. Extraer toxinas tipo ciguatoxinas en músculo e hígado de peces carnívoros de la Península de Yucatán (Caribe Mexicano y Golfo de México).
2. Evaluar la toxicidad en tres bioensayos: modelo en ratón, modelo en *Artemia salina* y Microtox[®], ensayo basado en la reducción de la bioluminiscencia en *Vibrio fischeri*.
3. Determinar de manera cualitativa la presencia de ciguatoxinas, mediante el ensayo RBA_(F) basado en la unión a receptores específicos fluorescentes.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

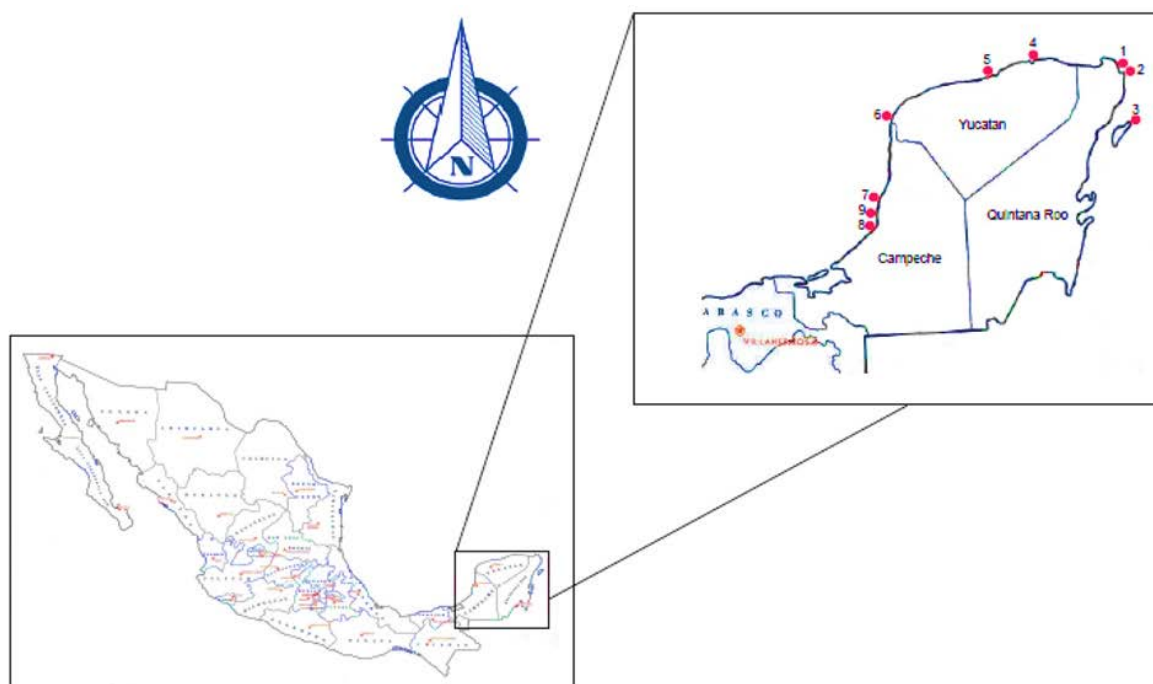


Figura 5. Puntos de muestreo en el litoral de la Península de Yucatán. 1-Puerto Juárez e Isla Mujeres. 2-Puerto Morelos. 3-Isla de Cozumel. 4-Puerto San Felipe. 5-Dzilam de Bravo. 6-Celestún. 7-Campeche. 8-Champotón. 9-Seybaplaya. (Imagen realizada por Moreno-Legorreta, 2018).

La PY es una plataforma originada en la Era Cenozoica, que divide el Golfo de México del Mar Caribe, que se encuentra entre las coordenadas $19^{\circ} 40' - 21^{\circ} 37' N$ y $87^{\circ} 30' - 90^{\circ} 26' O$; conformada por Campeche, Yucatán y Quintana Roo, los cuales suman una extensión territorial de $141,736 \text{ km}^2$ aproximadamente; alrededor del 2% de la superficie de México. Se encuentra delimitada al suroeste por la Laguna de Términos en Campeche; al noroeste por la ría de Celestún y el puerto de Sisal en Yucatán; al noreste por Cabo Catoche y al sureste, por la bahía de Chetumal, ambos en Quintana Roo. El litoral se encuentra conformado por las aguas del Golfo de México en la parte suroccidental y hasta la parte norte de la Península; mientras que del otro extremo, en la parte oriental se localiza el Mar Caribe donde existen complejos insulares de importancia turística y económica a nivel mundial, como Isla Mujeres e Isla de Cozumel (Schmitter-Soto *et al.*, 2002; <http://www.cuentame.inegi.org.mx/default.aspx>).

La mayoría del terreno es de piedra caliza (parte norte) por la cual se abre paso una red pluvial de ríos subterráneos que desembocan en el mar y dentro de los cuales se encuentran acumulaciones de agua en cavernas llamados “cenotes” usados ancestralmente por la civilización maya (Bauer-Gotwein *et al.*, 2011; Schmitter-Soto *et al.*, 2002; <http://www.cuentame.inegi.org.mx/default.aspx>).

La Península posee tres temporadas al climáticas: i) caliente y seca, de marzo a mayo, ii) tormentas invernales, de noviembre a febrero, y iii) lluvias de junio a octubre. Es cálido subhúmedo con una temperatura media anual de 26°C y temperaturas máximas promedio de 42.5°C siendo el estado más caluroso Yucatán. La precipitación máxima es en septiembre con una media anual de 232 mm aproximadamente. No se hay elevaciones de gran tamaño y la región es rica en flora y fauna terrestre que habitan en la selva húmeda, los manglares y cenotes, así como una de las redes de arrecifes coralinos más grandes del mundo (Schmitter-Soto *et al.*, 2002; <http://www.cuentame.inegi.org.mx/default.aspx>).

6.2 Trabajo de Campo

6.2.1 Obtención de muestras

La obtención de organismos se realizó mediante dos muestreos independientes en diferentes puntos a lo largo del litoral de la PY, el primero en el año 2013 y el segundo durante 2015.

6.2.1.1 Muestreo en el año 2013

En el otoño del 2013 se obtuvieron 7 ejemplares de barracuda (*S. barracuda*) de la zona norte de Quintana Roo (Isla Mujeres y Puerto Juárez) en el Caribe mexicano (Fig. 5), a través de la colaboración con el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY)-Unidad de Ciencias del Agua. Se realizaron salidas de pesca contando con una lancha con motor fuera de borda, desde la cual se lanzó una línea de pesca con carnada hacia el agua y se hizo un recorrido a baja velocidad para extraer los peces (técnica de “curricaneo”); posteriormente fueron resguardados en una hielera para ser transportados al laboratorio donde fueron medidos, pesados y disectados.

Mediante el apoyo de la Comisión de Áreas Nacionales Protegidas (CONANP) en el Parque Nacional Arrecifes de Cozumel y el Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos y con la ayuda de cooperativas pesqueras: Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Cozumel S.

C. de R. L. (Isla de Cozumel, Q. Roo) y la Cooperativa de pescadores de Puerto Morelos, (Pto. Morelos, Q. Roo), en septiembre del 2013 se obtuvieron 27 peces león (*P. volitans*) - 23 ejemplares de Cozumel y cuatro de Pto. Morelos- los cuales se les midió, pesó (con una balanza granataria) y tomaron fotografías.

Los peces fueron disectados en el CICY-Unidad de Ciencias del Agua y en las Cooperativas Pesqueras respectivamente. Se extrajeron músculos (filetes) y las vísceras; la piel, el esqueleto y las espinas venenosas fueron removidos por completo. Las muestras se colocaron en bolsas herméticas y fueron congeladas. Posteriormente se enviaron al Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos (CIBNOR). Donde se realizó la extracción de ciguatoxinas a partir del músculo e hígado con base en el método de Gamboa *et al.* (1992) y Lewis *et al.* (1995, 2003). En colaboración con el Instituto Nacional de la Pesca (INAPESCA) y la donación de ejemplares por parte del Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP de Yucalpetén, Yucatán), se obtuvieron muestras en congelación de vísceras de ocho especies de peces carnívoros (*Caranx* sp., *Cynoscion nebulosus*, *Epinephelus morio*, *Haemulon plumierii*, *Lutjanus synagris*, *Ocyurus chrysurus*, *P. volitans*, *Rhizoprionodon terraenovae*) de puertos pesqueros del estado de Yucatán, adyacentes al Caribe mexicano, así como nueve peces león enteros, los cuales fueron procesados para la extracción de ciguatoxinas en el laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos del CIBNOR.

6.2.1.2 Muestreo en el año 2015

Durante diciembre se realizó un muestreo para la colecta de peces en Campeche (Tablas II y Vb). Tomando como referencia el muestreo del 2013, se procedió a obtener peces carnívoros de gran tamaño y de importancia comercial como barracudas (*S. barracuda*), jureles (*Caranx* spp), meros (*Epinephelus* spp) y/o pargos (*Lutjanus* spp), los cuales se han relacionado con casos de ciguatera en los estados de Yucatán y Quintana Roo.

Se obtuvieron peces en los mercados locales del municipio de Champotón y de San Francisco de Campeche, así como con la ayuda de pescadores a lo largo de litoral pesquero en la localidad de Seybaplaya, municipio de Champotón.

Se consiguieron 10 organismos completos de barracudas (*S. barracuda*) en el municipio de Champotón, en las localidades de Seybaplaya ($n=2$) y Champotón ($n=8$). A estos organismos se les tomó peso y talla, además de la disección para la obtención de tejidos (músculo y

vísceras) en el Instituto Tecnológico Superior de Champotón, Campeche (ITESCHAM). En la localidad de Champotón, se consiguieron vísceras de los siguientes organismos: un jurel (*C. hippos*), cuatro boquinetes (*L. maximus*) y dos cazones (*Sphyrna tiburo*).

Finalmente en el municipio de San Francisco de Campeche se lograron obtener vísceras de tres jureles (*C. hippos*) y un robalo (*Centropomus undecimalis*), así como un organismo completo de rubia (*L. synagris*). Cabe señalar que los peces fueron pesados y medidos con anticipación. En total se consiguieron 23 ejemplares de seis especies de peces carnívoros en tres localidades a lo largo del litoral campechano.

Todas las muestras fueron congeladas a -20°C en el ITESCHAM en bolsas de plástico herméticas para su posterior transportación al Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos de la SULSA, CIBNOR, donde se procedió a la extracción de ciguatoxinas.

6.3 Trabajo de laboratorio

6.3.1 Extracción e identificación de ciguatoxinas

6.3.1.1 Extracción de ciguatoxinas

Las extracciones de ciguatoxinas de tejidos de los peces se realizaron con base en los protocolos descritos en Gamboa *et al.* (1992) y Lewis *et al.* (1995, 2003). A cada 100 g de tejido homogeneizado (o su equivalente en peso: volumen) se le agregaron 200 mL de acetona, se homogenizó y se dejó reposar por 24 h, en oscuridad.

El extracto obtenido se filtró con un lienzo de gasa y un filtro Whatman No. 1 en un embudo Buchner, para después evaporar la acetona a 60°C en un rota-evaporador.

El residuo se disolvió en 200 mL de éter: agua (4:1). Se procedió a eliminar el éter a 40°C en el rota-evaporador y el residuo se resuspendió en 20 mL de metanol: agua (4:1) y se lavó por tres ocasiones con 40 mL de hexano utilizando un embudo de separación y agitando vigorosamente la muestra para su homogenización. La fracción acuosa-metanol (suspendida en la parte inferior del embudo) se secó a 70°C con la ayuda del rota-evaporador. Finalmente, el residuo se resuspendió en 10 mL de 0.15 M de NaCl con 1% de solución Tween 60.

Tabla II. Peces carnívoros procesados para la extracción de ciguatoxinas en la Península de Yucatán.

Campeche ²	Número de ejemplares	Yucatán ¹	Número de ejemplares	Quintana Roo ¹	Número de ejemplares
<i>Caranx hippos</i>	4	<i>Caranx</i> sp.	1	<i>P. volitans</i>	18
<i>Centropomus undecimalis</i>	1	<i>Cynoscion nebulosus</i>	1	<i>S. barracuda</i> ^m	7
<i>Lachnolaimus maximus</i>	4	<i>Epinephelus morio</i>	2		
<i>Lutjanus synagris</i>	1	<i>Haemulon plumieri</i>	2		
<i>Sphyraena barracuda</i> ^m	10	<i>L. synagris</i>	2		
<i>Sphyrna tiburo</i>	2	<i>Ocyurus chrysurus</i>	1		
		<i>Pterois volitans</i>	9		
		<i>Rhizoprionodon terranovae</i>	1		
		<i>S. barracuda</i> ^{2 m}	1		
Total	22		20		25 67

1= Muestreo realizado en el año 2013; 2= Muestreo realizado en el año 2015; m= Muestras de las que se obtuvieron tejido muscular para el análisis de ciguatoxinas.

6.3.1.2 Detección de ciguatoxinas por medio del bioensayo en ratón (BR)

La toxicidad de cada extracto fue determinada mediante un modelo *murino* (Fig. 6), siguiendo las metodologías descritas por Lewis *et al.* (1991, 1995, 2003) y Fernández *et al.* (2003) las cuales consisten en un BR, por medio de una inyección intraperitoneal de 0.5 mL del extracto y es aplicada en grupos de 2 ratones por extracto (ratones albinos CD-1, macho), de un peso entre 20-22 g (obtenidos de Harlan de México®), mantenidos en cautiverio en el Bioterio del CIBNOR según las recomendaciones descritas por la NOM-062-200-1999 de la SAGARPA para producción, cuidado y uso de animales de laboratorio así como los protocolos descritos para eutanasia, realización de las disecciones y análisis a la necropsia en la NOM-062-200-1999; (Feldman y Seelly, 1988; Hedrich *et al.*, 2004) además de un grupo control inyectado sólo con solución salina con 1% de Tween 60.

Los animales fueron observados durante 24 h y se registraron los signos clínicos que presentaron. Las unidades ratón, (una UR es igual a 5 ng CTX-1) se calcularon con base en el tiempo de muerte en horas. La relación entre la dosis y el tiempo de muerte fue usada con base a lo descrito por Lewis *et al.* (1991, 1995) para cuantificar la toxicidad de cada extracto.

6.3.1.2.1 Cálculo de la toxicidad de ciguatoxinas en el BR.

Para la mezcla de ciguatoxinas, típica en peces carnívoros, esta relación según Lewis *et al.* (1991, 1995) se aproxima a la siguiente ecuación:

$$\log UR = 2.3 \log (1 + T^{-1}) \quad (1)$$

Dónde: UR= número de las unidades ratón de ciguatoxina inyectada y T= tiempo de muerte en horas.

Modelo de bioensayo en ratón cepa ICR/CD-1



a)



b)

Características generales de la cepa

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> •Pelaje albino •De fácil manejo | <ul style="list-style-type: none"> •Promedio de la camada: 11.5 crías •Excelente reproducción y cuidado maternal. |
| <ul style="list-style-type: none"> •Posee una alta incidencia de degeneración de la retina. | |

Usos en investigación

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> •Bacteriología •Inmunología •Neurología •Teratología | <ul style="list-style-type: none"> •Comportamiento •Oncología •Nutrición •Toxicología: toxinas marinas (ej. ácido domoico, brevetoxinas, entre otras), hepatotoxicidad, entre otras. |
| <ul style="list-style-type: none"> •Vacunas | <ul style="list-style-type: none"> •Virología |

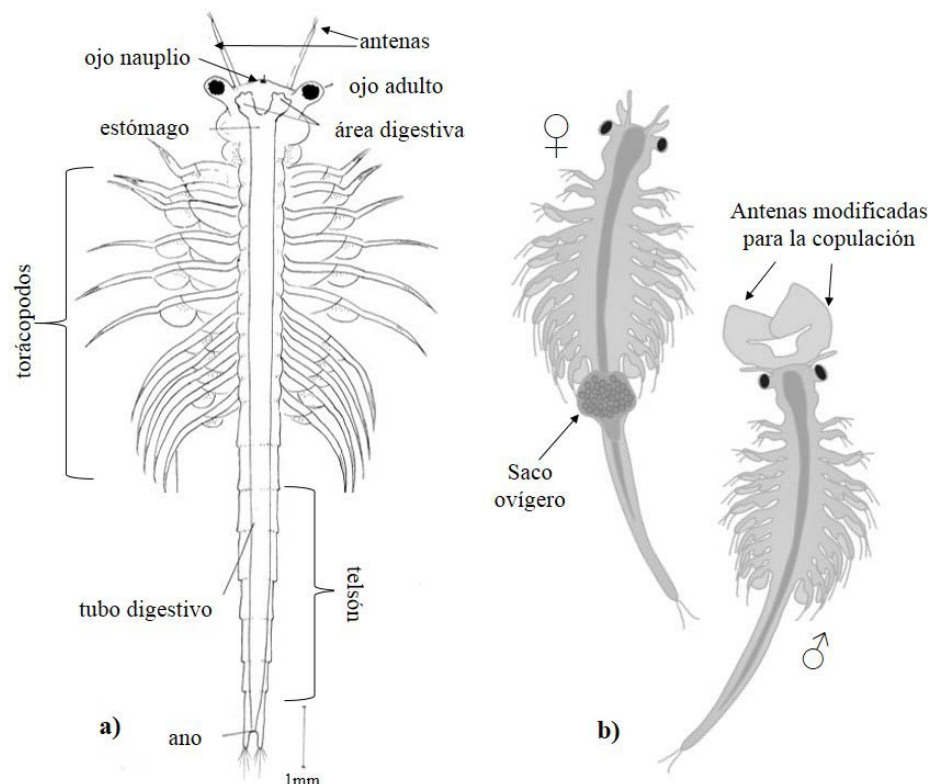
Figura 6. Características del modelo en ratón (*Mus musculus*) cepa ICR (CD-1) utilizados para el análisis de ciguatoxinas. (a. Imagen e información tomada de Harlan, Envigo, 2017, <https://www.envigo.com/products-services/research-models-services/models/search-research-models/>; b. Imagen de inyección intraperitoneal (i. p.- Imagen Núñez-Vázquez, CIBNOR).

6.3.1.3 Detección de ciguatoxinas por medio del bioensayo en *Artemia salina* (ARTOX)

Se utilizaron organismos adultos de *Artemia salina* (Marca INVE, lata de 454 gr, calidad Premium, Lote # 20150336342, E. U. A.; Fig. 7), los cuales se mantuvieron con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad), aireación constante, temperatura de 23°C y alimentadas con microalgas (*Isochrysis* spp). Para la prueba se seleccionaron organismos de un tamaño homogéneo, con movilidad, con coloración, nado normal y vigoroso. Se utilizó agua de mar previamente filtrada (filtros de celulosa Milipore de 0.2 µm) y esterilizada con autoclave, la cual se probó con los organismos antes de iniciar el análisis. Para la evaluación toxicológica de cada extracto se seleccionaron 12 organismos de *A. salina* los cuales fueron colocados en viales de vidrio de 15 mL donde se agregaron 9.5 mL de agua de mar y 0.5 mL del extracto de ciguatoxinas (volumen total de 10 mL). Además se llevó a cabo un control negativo con agua de mar y otro con el vehículo (0.5 mL de solución salina con Tween 60 al 1%).

Debido a la falta de estándares comerciales de ciguatoxinas fueron utilizados como controles positivos dos estándares internos con toxinas marinas poliéter con perfil definido: uno correspondió a un extracto semi-purificado con toxinas diarreicas (ácido okadaico + dinofisistoxina-1) obtenido de *P. lima* cepa PRL-1 y otro extracto semi-purificado con brevetoxinas (PbTx-2 y PbTX-3) obtenido de *Karenia brevis*, cepa KB-3. Ambos fueron obtenidos y proporcionados por el Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos del CIBNOR. El bioensayo duró 24 h y se realizaron observaciones y el registro del comportamiento de los organismos de todos los tratamientos. Se registró la mortalidad inicial cada tres horas aproximadamente (tres, seis, nueve, 12 y 24 h). Se consideraron organismos muertos aquellos que se encontraban totalmente inmóviles (sin ninguna motilidad y sin movimiento de branquias), los cuales se observaron flotando en la parte superficial del vial o tendidos en el fondo de los mismos.

Modelo en *Artemia salina* (ARTOX)



Características generales

- Género distribuido en todo el mundo
- Tamaño hasta 30 mm (estándar 18 mm)
- Eclosión de 20-48 h
- Fase final (adulto) 8-10 días
- Inanición hasta 120 h (*in vitro*)
- Fácil manejo y mantenimiento

Usos en investigación

- Contaminantes en aguas residuales.
- Extractos de plantas.
- Solventes orgánicos (antihelmínticos, herbicidas, insecticidas, pesticidas).
- Toxicidad de metales pesados (Cu, Hg, Pb).
- Efectos en radiación cósmica y rayos UV.
- Farmacéutica, farmacognosia y medicina.
- Toxinas acuáticas (ácido okadaico, cianotoxinas, brevetoxinas, ciguatoxinas, palytoxinas, tetrodotoxina).
- Nuevos agentes toxicológicos y terapéuticos.

Figura 7. *Artemia salina* como modelo de estudio. Estos organismos han sido utilizados (tanto nauplios como adultos) en contaminación, ciencias farmacéuticas, farmacología, farmacognosia, medicina, toxicología, toxicología, modelos biológicos e investigaciones para evaluar compuestos con actividad biológica. a) Anatomía general; b) Dimorfismo sexual: el macho ha modificado sus antenas en forma de pinzas utilizadas para sostener a la hembra durante la copulación. La hembra presenta el saco ovífero donde carga los huevos. Las hembras suelen ser de mayor tamaño que los machos. (Imágenes modificadas de Dvorak *et al.*, 2012; Faimali *et al.*, 2012; Granade *et al.*, 1976 y http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Artemia_spp/en).

6.3.1.4 Detección de ciguatoxinas por medio del bioensayo en la reducción de la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri* (Microtox®)

Se utilizó la bacteria marina gram negativa *V. fischeri*, la cual posee bioluminiscencia, y es un anaerobio facultativo (Fig. 8a). Dada la característica de *V. fischeri*, este ensayo de toxicidad aguda se basa en la medición de la luminiscencia emitida por dichas bacterias después de su exposición a una muestra problema (disminución de la luminiscencia) por un periodo de 5 min a <1 h. (Pica-Granados y Trujillo-Domínguez, 2008).

La intensidad de la luz emitida por las bacterias expuestas a la muestra problema se compara con la emitida por bacterias que permanecen en las condiciones óptimas del sistema control (Fig. 8c; Pica-Granados y Trujillo-Domínguez, 2008).

Este ensayo se basa en las recomendaciones descritas en MICROBICS (1992) y en la Norma Mexicana NMX-A-112-1995-SCFI (SECOFI, 1995), con modificaciones por el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).

Con base a su toxicidad y como un método experimental, de potencial aplicación para la detección de ciguatoxinas solo se seleccionaron nueve muestras, previamente positivas por BR (de un total de 96 extractos) para evaluar su toxicidad por medio de este método; además se evaluó como control negativo el vehículo de solución salina con Tween 60 al 1%.

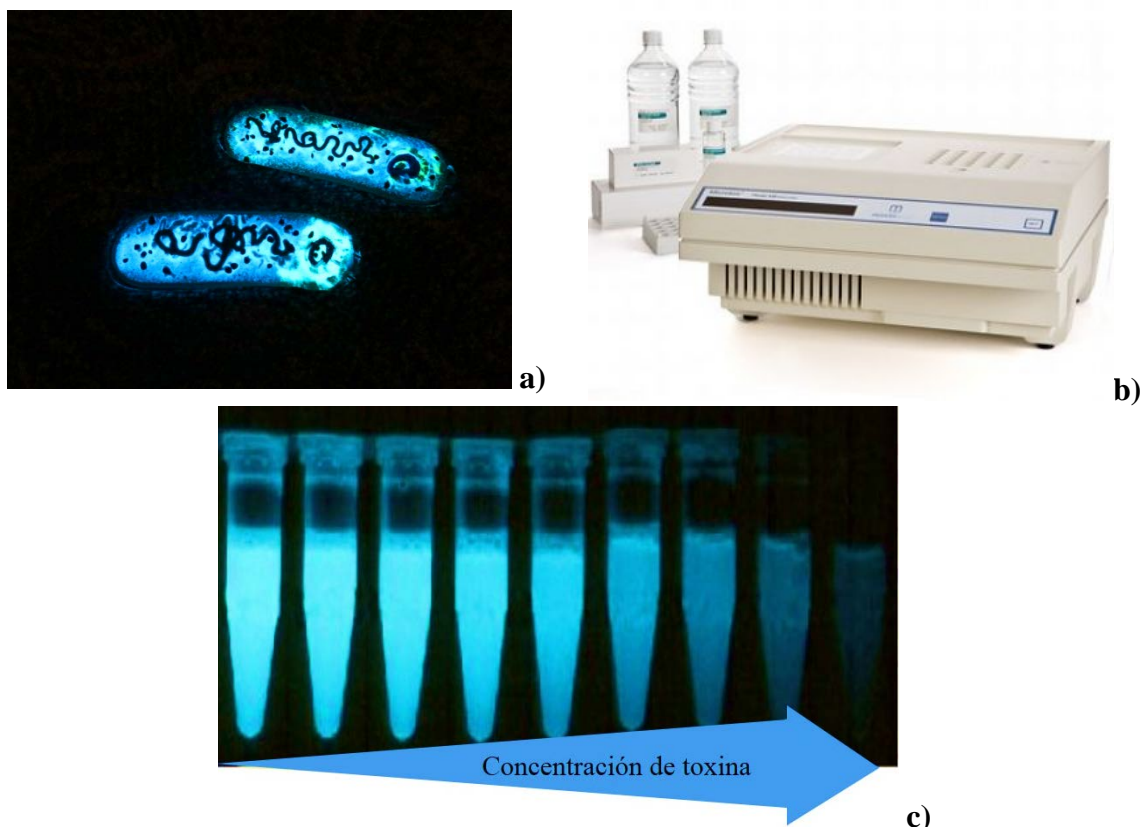
Las muestras fueron trasladadas en refrigeración al Laboratorio de Calidad de Agua, perteneciente al IMTA en la Ciudad de Jiutepec, Morelos, México, para la realización de los ensayos respectivos.

Este laboratorio está acreditado por la Entidad Mexicana de Acreditación, A. C. (EMA) y aprobado por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) para análisis y muestreo de agua con aprobación No. CNA-GCA-759.

6.3.1.4.1 Equipo

En el análisis, se utilizó un sistema estandarizado denominado Microtox® Modelo 500 constituido por: un foto-sensor (luminómetro); pozos de incubación con una temperatura controlada a 15°C; el pozo para el reactivo se mantiene controlado a 5°C (pozo activación) y congelador a una temperatura de -20° C (Fig. 8b). El equipo también cuenta con un sistema de cómputo con “software” acoplado a sistema Microtox®, en este caso fue utilizado el programa “Probit” (Pica-Granados y Trujillo-Domínguez, 2008).

**Bioensayo en la reducción de la bioluminiscencia de la bacteria
Vibrio fischeri (Microtox®).**



Características generales de *V. fischeri*

- | | |
|-------------------------|--------------------------------|
| • Bacteria marina | • Bioluminiscente |
| • Gram negativa | • Emisión de luz verde-azulada |
| • Anaerobia facultativa | • Lectura a 490-505 nm |

Usos en investigación

- | | |
|--|---|
| • Efluentes de agua residuales | • Monitoreo de: agua de consumo; biocidas en aguas industriales; identificación de posibles fuentes de contaminación de aguas superficiales |
| • Ensayos en sedimentos | |
| • Toxinas: micotoxinas, cianotoxinas, saxitoxina | |

Figura 8. Ensayo Microtox® empleando a la bacteria *V. fischeri* (a); (b) Medición de la bioluminiscencia a través del equipo denominado Microtox®. c) Gradiente de bioluminiscencia, una mayor medición de bioluminiscencia expresa una menor toxicidad en la muestra a evaluar, por el contrario la falta de una lectura de irradiancia en la muestra denotará una mayor toxicidad.

6.3.1.4.2 Ensayo con *V. fisheri* (Pica-Granados y Trujillo-Domínguez, 2008)

Se utilizó como organismo experimental la bacteria liofilizada, solución diluyente (NaCl al 2%), solución de ajuste osmótico (NaCl 22 %) y solución de reconstitución (agua deionizada).

La bacteria *V. fisheri* puede obtenerse liofilizada o cultivarse siguiendo la metodología descrita por Knie y Lopes (2004). Durante su traslado debe conservarse siempre a una temperatura de $-20 \pm 4^{\circ}\text{C}$ (Knie y Lopes, 2004). En nuestro caso se trabajó con bacteria liofilizada reactivada para la prueba por medio del equipo Microtox®.

6.3.1.4.3 Preparación de la prueba

Para llevar a cabo el análisis de toxicidad de los extractos con ciguatoxinas fue necesario realizar las siguientes actividades, tal como se indica en el protocolo para el análisis de agua epicontinental; el sistema se prepara de acuerdo a la tabla III:

1. Se agregan 1000 μL de solución diluyente en las celdillas 1, 2, 3 y 4 en el Sistema Microtox® (Fig. 9).
2. Agregar 250 μL de solución de ajuste osmótico y 2500 μL de la muestra problema en la celdilla 5. Mezclar (por pipeteo).

Para análisis de agua marina y salobre se preparan 2 sistemas de prueba: uno igual al de muestras de agua epicontinental (pasos 1-2), y otro preparado sin la solución de ajuste osmótico, es decir 2750 μL de la muestra problema, esto con el fin de evaluar en las mejores condiciones para la bacteria, debido al choque osmótico que pudiera afectar la bioluminiscencia.

6.3.1.4.4 Preparación del control de prueba (Pica-Granados y Trujillo-Domínguez, 2008)

En forma paralela se prepara muestras replicadas, blancos (cuando esto aplique), así como un control positivo y otro negativo.

1. Control positivo. Se prepara con una solución de fenol (compuesto tóxico de referencia para la prueba con *V. fisheri*).
2. Se expusieron (5 min) los microorganismos de prueba a una serie de cuatro diluciones (Sol. Fenol). El efecto medido permitirá la determinación de la CE_{50} correspondiente.

La solución de prueba (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm)) se valoró periódicamente (por lo menos una vez cada tres meses) y se mantuvo en oscuridad a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. En estas condiciones, la solución puede preservarse por un promedio de 20 días.

Se puede continuar su uso si el valor de CE_{50} no exceda los límites de respuesta preestablecido para el compuesto toxico de referencia (13-26 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de 5 min. de exposición).

1. Control negativo. Preparar con una solución de agua deionizada libre de compuesto tóxicos, adicionada con solución diluyente al 2%. Los valores de luminosidad en el control negativo deben ser siempre superiores al valor de 90.

En este caso existió una modificación del control negativo, donde se utilizó solución salina con Tween 60 al 1%, la cual forma parte de los extractos de ciguatoxinas (ver punto 6.3.1.1). Cuando los valores de CE_{50} para el control positivo o los de luminosidad para el control negativo excedieron los intervalos establecidos, la prueba se repitió.

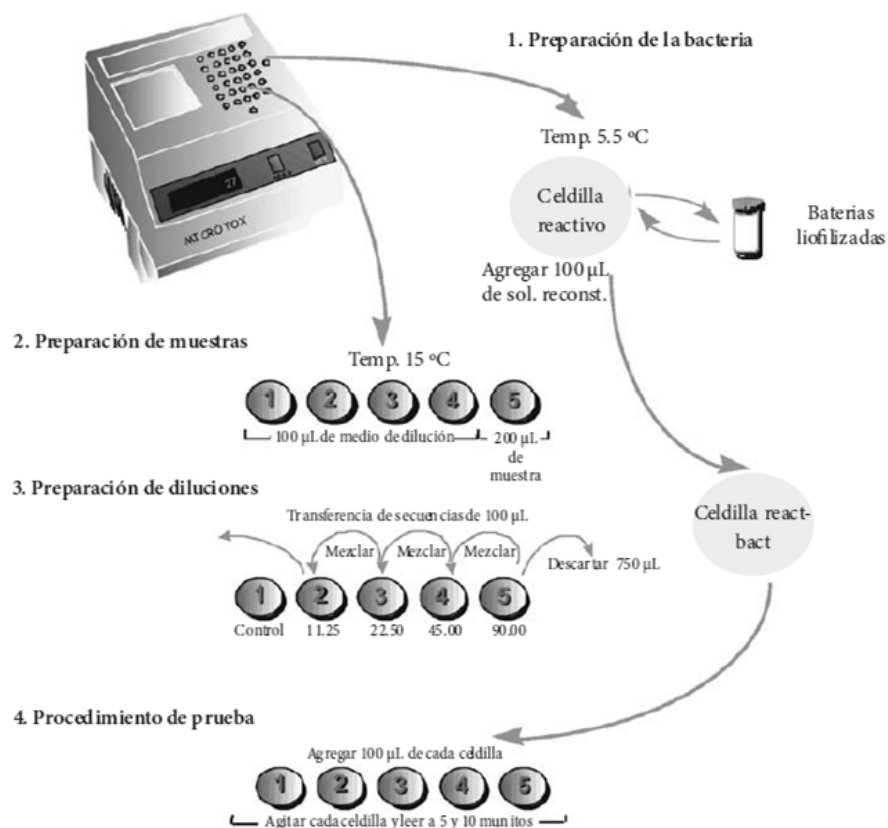


Figura 9. Procedimiento de prueba para el ensayo con *V. fischeri* (Imagen tomada de Pica-Granados y Trujillo-Domínguez, 2008).

Tabla III. Condiciones recomendadas para la prueba de toxicidad aguda con *Vibrio fischeri* (Pica-Granados y Trujillo-Domínguez, 2008).

Tipo de ensayo	Estático
Organismo de prueba	<i>Vibrio fischeri</i> , cepa NRRL B-11177 liofilizada
Equipamiento	Fotómetro Microbiocs (Microtox®)
Temperatura	15 ± 0.3°C
Recipientes de prueba	Viales de 2 mL
Volumen de la solución de prueba	1 mL
Número de organismos por recipientes	Aproximadamente 1 x 10 ⁶ bacterias
Número de replicas	No requiere replicas
Número de diluciones	≥ 4
Agua de dilución	Agua destilada con NaCl al 2%
Factor de dilución	0.3 o 0.5
Duración de la prueba	5-15 min o el tiempo (< 1 hora) o el apropiado para los objetivos
Efecto medido	Inhibición de la emisión luminosa
Resultado final	CI ₅₀ o CE ₅₀ (Concentración Efectiva media)
Aceptabilidad de los resultados	La emisión luminosa en el control negativo debe ser > 90
Control positivo	Solución de fenol

6.3.1.4.5 Preparación de diluciones (Pica-Granados y Trujillo-Domínguez, 2008)

Se siguieron las recomendaciones del protocolo de este método de emplear diluciones seriadas transfiriendo 1000 µL de la celdilla 5 a la 2, mezclando cada vez. Se realizó la transferencia en el orden indicado y uniformando volúmenes (1000 µL).

La celdilla 1 fue el control negativo. Las celdillas permanecieron en el interior de los pozos del equipo Microtox® (aprox. 5 min) para la estabilización de la temperatura (15±1°C, Fig. 9).

6.3.1.4.6 Inoculación y lectura de prueba (Pica-Granados y Trujillo-Domínguez, 2008)

Una vez revitalizada la bacteria en el pozo de activación y preparadas las diluciones:

1. Se añadieron 10 µL de la bacteria reconstituida a cada una de las celdillas del sistema experimental, se cronometró el tiempo de exposición seleccionado (5, 10 o 30 min).
2. Al término del tiempo de exposición, se realizaron las lecturas de las celdillas, colocando la celdilla 1 (control negativo) en el pozo de lectura y efectuando la auto-calibración.

3. Después se les dio lectura al resto de las celdillas (extractos), iniciando con la de menor concentración.

Los resultados se expresaron a través de la CE_{50} y las unidades fueron registradas en unidades de toxicidad (UT).

6.3.1.5 Detección de ciguatoxinas por medio del ensayo de unión a receptores específicos fluorescentes RBA_(F).

El ensayo de unión a receptores específicos fluorescentes o RBA_(F) es un método innovador el cual puede ser utilizado para detectar toxinas marinas de la familia de las brevetoxinas (PbTx) y las ciguatoxinas; es comercializado a través del Laboratorio SeaTox Research Inc. en E.U.A. (Fig. 10 a). Se tiene como principio que tanto las PbTx como las CTX comparten estructuras químicas y mecanismos de acción similares. Ambas se adhieren y sobreactivan el sitio número 5 del canal de sodio, aunado a esto se lleva cabo la despolarización de la membrana (ver Fig. 3). Es por ello que en este ensayo es posible utilizar estándares de PbTx (a falta de estándares comerciales de ciguatoxinas) para probar la presencia de este tipo de toxinas en las muestras a problema. El principio del método es evaluar la fluorescencia a través de un lector de placas en donde la luminosidad de la fluorescencia es inversamente correlacionada con la cantidad de toxina en la muestra; es decir, a menor fluorescencia mayor cantidad de toxina y viceversa (Figs. 10 b-d).

Este método puede determinar la presencia de CTX y PbTx de manera tanto cuantitativa como cualitativa. Para poder llevar a cabo la primera de ella, es necesario contar con la presencia de estándares, que en el caso de las CTX es una dificultad debido a la falta de suministro comercial, es por ello que por este método, en nuestro caso solo se trabajó de manera cualitativa.

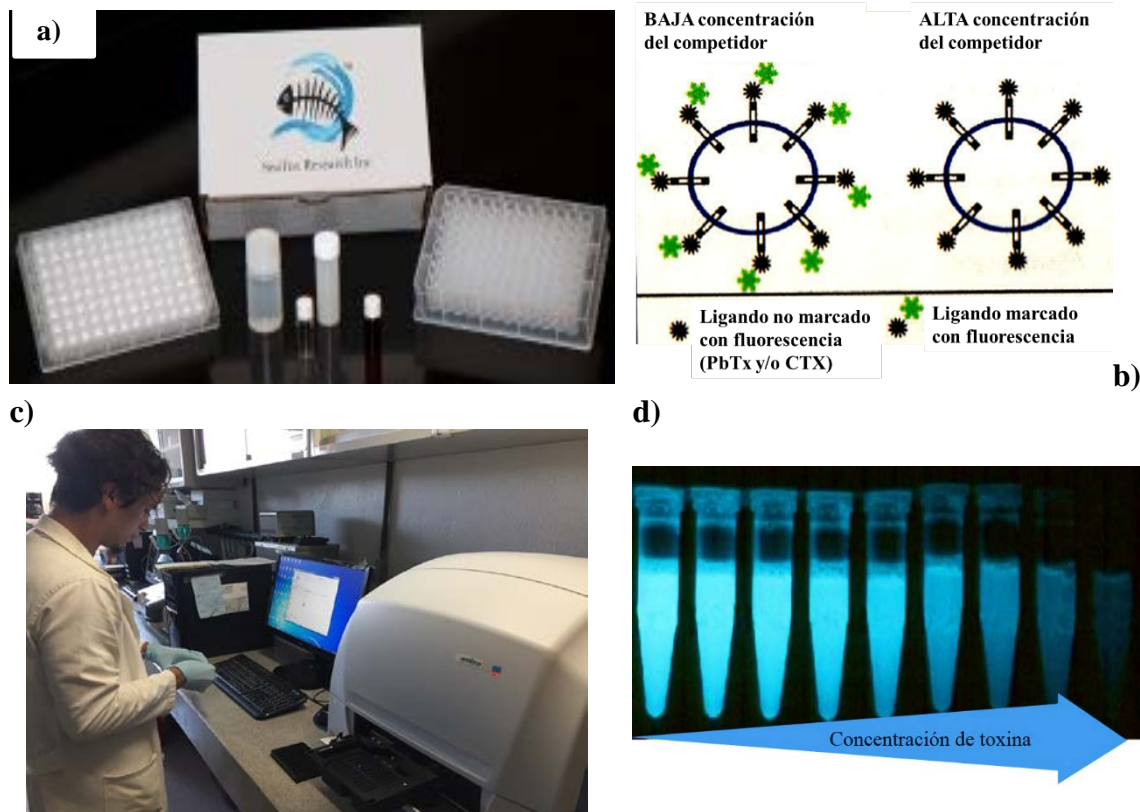
La metodología que se llevó a cabo en el presente estudio se realizó siguiendo las recomendaciones descritas por Litaker *et al.* (2014) y Hardison *et al.* (2016), con algunas modificaciones para la limpieza de los extractos de ciguatoxinas, como tratamiento previo al análisis por RBA_(F).

La selección de las muestras se hizo con base a su toxicidad obtenida por BR, considerando todas aquellas como letales y de las que se obtuvieron UR.

6.3.1.5.1 Preparación de la prueba

Durante todo el procedimiento los estándares, reactivos y muestras problemas fueron mantenidos en frío con la ayuda de hielo en una hielera y protegidos de la luz para no activar los reactivos.

Ensayo de unión a receptores específicos fluorescentes RBA(F).



Características generales

- Arreglo del método en microplaca.
- Estándar de PbTx necesario.
- Sinaptosomas de rata.
- Longitud de banda 505 nm.
- Filtro de emisión: 520-10 nm.
- Alta afinidad por la toxina de interés.
- Uso de lector de placa.
- Uso de ligandos fluorescentes.
- Filtro de excitación: 490-10 nm.

Usos en investigación

Neurotoxinas terrestres: arañas, alacranes, plantas.

Neurotoxinas marinas: caracoles marinos (conotoxinas); dinoflagelados marinos: **a)** inhibidores de canales dependientes de Na^+ (saxitoxina, tetrodotoxina); **b)** activadores de canales dependientes de Na^+ (brevetoxina, ciguatoxina).

Figura 10. Ensayo de unión a receptores específicos fluorescentes RBA(F) **a)** Se evalúa la respuesta de unión de ligandos no marcados (toxinas: CTX/PbTx) y de ligandos marcados con fluorescencia **(b)**, determinando la presencia y/o cantidad del compuesto por medio de la lectura de fluorescencia en un lector de microplacas **(c)**. Las mayores lecturas reflejan menor cantidad de toxina resultan en mayor cantidad de ligandos fluorescentes, a menor fluorescencia detectada mayor será la cantidad de toxina en la muestra **(d)**.

La prueba se realizó de la manera más rápida posible para evitar la interacción de los reactivos con el ambiente.

Utilizando la placa de ensayo de 96 pozos, se marcó un perímetro imaginario, sin utilizar los de la parte exterior de la placa (columnas 1, 11, 12 y filas A y H).

Con la ayuda de una micropipeta se tomaron 5 μL de los estándares de PbTx (1-5) y se colocaron individualmente llenando cada uno de los pozos.

De la misma forma se procedió a tomar 5 μL de los extractos problema a evaluar, los cuales fueron analizados por duplicado y colocados en los pozos individualmente.

Como control negativo se usó etanol, del cual también se tomaron 5 μL que se colocaron en la placa.

Con la ayuda de una octamicropipeta se tomaron de un dispensador 195 μL de la solución buffer la cual fue añadida individualmente a cada uno de los respectivos pocillos con muestra.

Con la octamicropipeta multicanal se añadieron 50 μL de la solución de sinaptosomas, 50 μL de los ligandos fluorescentes y 200 μL de la solución buffer.

Se utilizaron en cada uno de los reactivos puntas diferentes para evitar la contaminación cruzada.

Cada pozo al final contenía un volumen total de aproximadamente 500 μL .

6.3.1.5.2 Período de incubación

La placa de ensayo fue cubierta por papel parafilm y transferida a la hielera para mantener la temperatura y protegerla de la luz.

La hielera fue colocada en una tabla de agitación a 80 rpm donde se mantuvo durante dos h, esta homogeneización permitió el efecto de unión entre los diferentes reactivos (a esta etapa se le conoce como incubación).

Mientras la etapa de incubación se llevaba a cabo, se ajustó el lector de placas (Thermo Scientific Varioskan Flash) a una longitud de banda de 505 nm, el filtro de excitación a 490-10 nm y el filtro de emisión a 520-10 nm.

6.3.1.5.3 Transferencia al filtro de placa y lectura del filtro de placa

Una vez terminado el período de incubación el contenido de los pozos se transfirió de la placa de ensayo hacia el filtro de ensayo con la ayuda de la octamicropipeta multicanal. Se hizo un enjuague del filtro de placa añadiendo 250 μL de la solución buffer.

Finalmente el filtro de placa se dejó secar, por alrededor de un min.

Fue necesario que el filtro estuviera completamente seco para poder llevar a cabo la lectura fluorométrica de la placa en el lector. Para asegurar la sequedad del filtro de placa, se colocó en una centrifuga de placas durante 30 s.

Finalmente el filtro de placa fue colocado en el lector de placas (Thermo Scientific Varioskan Flash) con las características antes programadas (longitud de banda de 505 nm, el filtro de excitación a 490-10 nm y el filtro de emisión a 520-10 nm) para poder realizar la lectura, la cual se llevó a cabo en pocos segundos.

7. RESULTADOS

7.1 Extractos de ciguatoxinas

Se recolectaron un total de 67 organismos (44-en el 2013 y 23 en el 2015) de 13 especies de peces carnívoros (*Caranx* sp., *Caranx hippos*, *Centropomus undecimalis*, *Cynoscion nebulosus*, *Epinephelus morio*, *Haemulon plumierii*, *Lachnolaimus maximus*, *Lutjanus synagris*, *Ocyurus chrysurus*, *Pterois volitans*, *Rhizoprionodon terraenovae*, *Sphyrna barracuda* y *Sphyrna tiburo*) pertenecientes a 11 familias (Carangidae, Carcharhinidae, Centropomidae, Haemulidae, Labridae, Lutjanidae, Sciaenidae, Scorpaenidae, Serranidae, Sphyrnaeidae y Sphyrnidae) capturados en 12 localidades a lo largo de la PY (Caribe Mexicano y el Golfo de México; Fig. 5). Con estos ejemplares se obtuvieron un total de 96 extractos (65 en el 2013 y 31 en el 2015) los cuales fueron procesados a partir de dos tejidos: músculo y vísceras de cada pez en algunas de las muestras, solo se contó con un solo tejido, en otros se pudo procesar separadamente el hígado y gónadas (Fig. 11).

7.1.1 Muestreo 2013

En Puerto Juárez, Cancún e Isla Mujeres, se obtuvieron muestras de cuatro barracudas enteras (*S. barracuda*), con pesos entre 0.6 y 10 kg y tallas entre 50 y 75.5 cm (Tabla IV_(a)); además de vísceras, principalmente hígados de otros tres organismos de los cuales se obtuvieron un total de 14 extractos.

A través de las Cooperativas Pesqueras mencionadas (ver sección de material y métodos) se consiguieron 18 ejemplares de “peces león” (*P. volitans*), de los cuales diez estaban completos; de otros cuatro más, se obtuvo solamente el músculo (filetes) en la localidad de Cozumel y de los cuatro restantes solo se consiguieron vísceras, adquiridas en Pto. Morelos. Gracias a la donación de ejemplares por parte del CRIP Yucaltepén y el INAPESCA, (en colaboración con el CIBNOR), se consiguieron otros nueve organismos enteros, en tres localidades del estado de Yucatán: Cordilleras ($n=4$), Celestún ($n=3$) y Oeste de Desterradas ($n=2$). Con lo que se obtuvo un total de 27 “peces león” con pesos que estuvieron entre los 181.6 y 1500 g y tallas entre 23.8 y 48.2 cm (Tabla IV_(a)). Obteniendo así un total de 40 extractos (músculos y vísceras).

En colaboración con el INAPESCA se obtuvieron vísceras de 10 ejemplares de peces carnívoros de importancia comercial (chac-chí, cazón, corvina, jurel, meros, pargos y rubia),

de los cuales en algunos ejemplares pudieron separarse en vísceras e hígado (Fig. 11), pertenecientes a puertos pesqueros localizados en Yucatán (Dzilam de Bravo y San Felipe; Fig. 5)

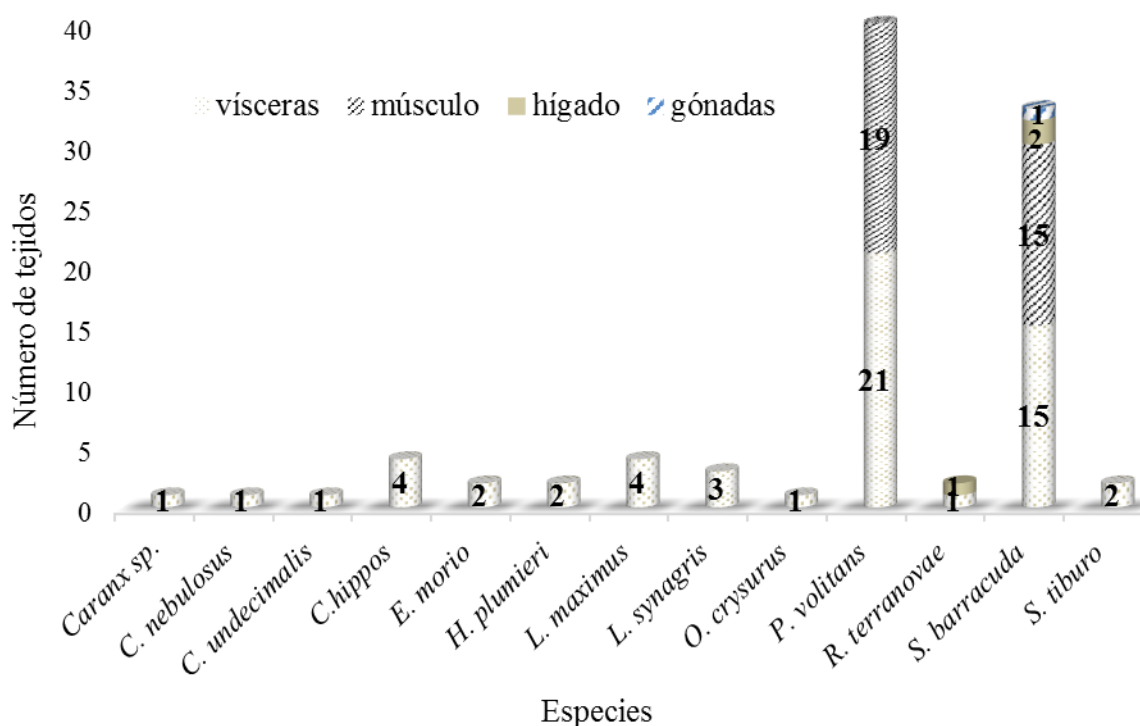


Figura 11. Tejidos de peces procesados para la extracción de ciguatoxinas. Se obtuvieron un total de 96 tejidos (N), dentro de los que destacan vísceras y músculo, de pez león (*P. volitans*, $n=40$) y barracuda (*S. barracuda*, $n=33$); el resto pertenecen a vísceras casi en su totalidad ($n=19$) de diferentes especies de peces carnívoros procedentes de Campeche y Yucatán.

7.1.2 Muestreo 2015

En diciembre del 2015 en Campeche se obtuvieron 10 barracudas (*S. barracuda*) con pesos entre 0.45 y 4.450 kg en las localidades de Champotón y Seybaplaya. Se disectaron y se obtuvieron vísceras ($n=10$) y músculos ($n=8$), de los cuales se consiguieron un total de 18 extractos. En la localidad de Champotón se obtuvieron además vísceras de cuatro boquinetes (*L. maximus*) con un peso entre 1.3-3.5 kg, dos cazones (*S. tiburo*) con pesos de 2.3 y 3 kg y un jurel (*C. hippos*) de 2.7 kg con los cuales se consiguieron siete extractos más. En mercado municipal de la capital del Estado se obtuvieron vísceras de tres jureles (*C. hippos*) que pesaron 5.5- 8 kg, un robalo (*C. undecimalis*) de aproximadamente 6 kg, y una rubia (*L.*

Tabla IV_(a). Toxicidad determinada por bioensayo en ratón para la detección de toxinas tipo ciguatoxinas en tejidos e peces carnívoros del año 2013 en la Península de Yucatán.

Lugar y fecha de colecta	Especie/ No. de Ejemplar	Peso total/ Tejido	Peso (g)	Actividad	Signos clínicos	Toxicidad UR
Aguas aledañas a Isla Mujeres y Puerto Juárez, Quintana Roo 07/09/2013	<i>S. barracuda</i> /1	Total	2200			
		Vísceras	98.2	(+)	Espasmos, letargo, problemas de respiración y de locomoción, salivación y pequeños saltos.	Subletal
		Músculo	171	(+)	Letargo, parpadeo, problemas de locomoción, bamboleo, cabeza de lado, diarrea leve, pelo erizado.	Subletal
	2	Total	1200			
		Vísceras	46.2	(+)	Diarrea moderada a severa, parpadeos, estereotipias.	Subletal
		Músculo	139.3	(+)	Respiración agitada, disnea, diarrea.	Subletal
	3	Total	600			
		Vísceras	21.5	(-)	Diarrea moderada, sin signos de intoxicación.	Negativo
		Músculo	106.3	(+)	Letargo, espasmos, disnea, sin signos de intoxicación..	Subletal
	4	Total	750			
Vísceras		27.8	(+)	Letargo, incoordinación motora, espasmos, salivación, masticación	Subletal	
	Músculo	120	(-)	No presentó signos de intoxicación	Negativo	
Pto. Juárez, Cancún, Quintana Roo. 28/09/2013	5	Total	10000			
		Hígado	27	(+)	Letargo, diarrea leve, problemas de respiración y de locomoción.	Subletal
		Gónadas	82.9	(+)	Letargo, espasmos, problemas de respiración y de locomoción, diarrea leve	Subletal
	Vísceras	190.5	(+)	Letargo, disnea, respiración agitada, espasmos, salivación, parpadeo, vascularización de orejas, palidez, pequeños saltos, cuerpo pegado al ras del suelo, muerte.	1.67	
Nd.	6	Vísceras	134.9	(+)	Letargo, diarrea leve, temblor, disnea, saltos, problemas de respiración y locomoción.	Subletal
Nd.	7	Hígado	58.7	(+)	Letargo, espasmos, disnea, temblor, ataxia, saltos, dificultad de respiración y locomoción, serpenteo de la cola, convulsiones, paro respiratorio, piloerección y muerte en 1/2 ratones.	>5

Lugar y fecha de colecta	Especie/ No. de Ejemplar	Peso total/ Tejido	Peso (g)	Actividad	Signos clínicos	Toxicidad UR	
		Vísceras	101.3	(+)	Letargo, disnea, espasmos, problemas de respiración y locomoción.	Subletal	
Pto. Morelos, Quintana Roo. 26/09/2013	<i>P. volitans</i> / 1	Total	650	(+)	Letargo, respiración agitada, ataxia, palidez, espasmos constantes, problemas de locomoción.	Subletal	
		Vísceras	47.6				
		2	Total	700			Subletal
		3	Vísceras	88.3	(+)	Letargo, problemas de locomoción, respiración agitada, espasmos.	Subletal
	Total		550				
		4	Vísceras	46.8	(+)	Diarrea leve, espasmos, parpadeo, problemas de locomoción.	Subletal
	Total		1500				
	Isla de Cozumel, Quintana Roo. 21/09/2013	5	Vísceras	76.2	(-)	Respiración agitada, letargo, sin signos de intoxicación.	Negativo
			Total	600			
			6	Músculo	110	(-)	Letargo, pelo erizado, espasmos esporádicos, diarrea mucosa, sin signos de intoxicación.
Total		875					
		7	Músculo	160	(+)	Letargo, espasmos esporádicos, respiración agitada, problemas de locomoción, saltos pequeños, diarrea mucosa, pelo erizado.	Subletal
Total			965				
		8	Músculo	170	(+)	Letargo, espasmos, hiperactividad ocasional, parálisis de cuartos traseros, diarrea mucosa, pelo erizado.	Subletal
Total			465				
		9	Músculo	135	(-)	Espasmos continuos, sin signos de intoxicación.	Negativo
Total			885				
	10	Vísceras	50.1	(-)	Diarrea leve, sin signos de intoxicación.	Negativo	
Músculo		255	(+)	Problemas de locomoción y respiración, espasmos constantes, parálisis de cuartos traseros, parpadeo.	Subletal		
		Total	1130				
		Vísceras	46.2	(+)	Problemas de locomoción y respiración , falta de equilibrio, disnea, espasmos constantes, sacudidas, serpenteo de la cola, hiperactividad, saltos pequeños, convulsiones, arqueamiento corporal, muerte; todo durante la 1° hora.	>5	

Lugar y fecha de colecta	Especie/ No. de Ejemplar	Peso total/ Tejido	Peso (g)	Actividad	Signos clínicos	Toxicidad UR
		Músculo	169.4	(-)	Espasmos, respiración agitada, problemas de locomoción, sin signos de intoxicación.	Negativo
	11	Total	750			
		Vísceras	33.8	(-)	Respiración agitada, espasmos, problemas de locomoción, sin signos de intoxicación.	Negativo
		Músculo	72.4	(-)	Espasmos, sin signos de intoxicación.	Negativo
	12	Total	1100	(-)	Espasmos, problemas de locomoción, diarrea leve, sin signos de intoxicación.	Negativo
		Vísceras	33.7			
		Músculo	117	(-)	Diarrea leve, sin signos de intoxicación.	Negativo
	13	Total	900			
		Vísceras	32	(+)	Letargo, Problemas de locomoción, espasmos, pequeños saltos.	Subletal.
		Músculo	160	(-)	No presento signos de intoxicación.	Negativo
	14	Total	825			
		Vísceras	40.7	(-)	Letargo, espasmos leves, parpadeo, diarrea leve, sin signos de intoxicación.	Negativo
		Músculo	170	(-)	Diarrea leve, sin signos de intoxicación.	Negativo
	15	Total	630			
		Vísceras	35.8	(-)	Problemas de locomoción y espasmos.	Negativo
		Músculo	130	(-)	Espasmos, diarrea leve.	Negativo
		Total	550			
	16	Vísceras	22	(-)	Letargo, diarrea leve- moderada, problemas de locomoción, espasmos leves, arqueamiento corporal.	Negativo
	17	Total	990			
		Vísceras	59.6	(+)	Letargo, espasmos, problemas de locomoción, salivación.	Subletal
		Músculo	160	(-)	Espasmos, sin signos de intoxicación.	Negativo

Lugar y fecha de colecta	Especie/ No. de Ejemplar	Peso total/ Tejido	Peso (g)	Actividad	Signos clínicos	Toxicidad UR
	18	Total	670			
		Vísceras	108.3	(-)	Letargo, diarrea, sin signos de intoxicación.	Negativo
		Músculo	155	(-)	No presento signos de intoxicación.	Negativo
Cordilleras, Yucatán. 27/08/2013	19	Total	871			Subletal
		Vísceras	53	(+)	Letargo, temblores, salivación, diarrea leve, (muestra muy aceitosa).	
		Músculo	104.6	(+)	Defecación abundante, pelo erizado, espasmos, disnea, problemas de locomoción, pequeños saltos.	Subletal
	20	Total	718.1			
		Vísceras	39.4	(+)	Letargo, problemas de respiración y locomoción, parpadeo, diarrea.	Subletal
		Músculo	105.3	(+)	Letargo, problemas de locomoción, defecación abundante, espasmos, pequeños saltos.	Subletal
	21	Total	425.6			
		Vísceras	34.5	(+)	Letargo, espasmos ocasionales, bamboleo, problemas de locomoción, salivación.	Subletal
		Músculo	56.6	(-)	Letargo, problemas de locomoción, espasmos, defecación abundante.	Negativo
	22	Total	330.4			
		Vísceras	26.3	(+)	Problemas de locomoción y respiración, disnea, temblores, bamboleos, saltos pequeños, mucosidad en las heces.	Subletal
		Músculo	56.6	(+)	Letargo, problemas de locomoción, espasmos, parpadeo, disnea, defecación abundante, temblores en la zona abdominal, pelo erizado.	Subletal
Oeste de Desterradas, Yucatán. 14/11/2013	23	Total	503.5			
		Vísceras	37.6	(-)	Letargo, palidez, parpadeo.	Negativo
		Músculo	102.4	(+)	Letargo, espasmos, parpadeo, disnea, defecación abundante.	Subletal.
	24	Total	1040.6			
		Vísceras	81	(-)	Letargo, sin signos de intoxicación.	Negativo

Lugar y fecha de colecta	Especie/ No. de Ejemplar	Peso total/ Tejido	Peso (g)	Actividad	Signos clínicos	Toxicidad UR
		Músculo	59.2	(+)	Espasmos severos, problemas de locomoción, pelo erizado.	Subletal.
Celestún y Cordilleras, Yucatán	25	Total	327.5			
		Vísceras	45.1			
		Total	181.6			
	26	Vísceras	16.1	(-)	Diarrea, sin signos de intoxicación.	Negativo
	27	Total	353.4			
		Vísceras	32.3			
San Felipe, Yucatán. 29/Jun/2013.	<i>H. plumierii</i> /1	Vísceras	74.2	(+)	Saltos, disnea, serpenteo de la cola, muerte rápida.	>10
	<i>L. synagris</i> / 1	Vísceras	160	(+)	Neurotoxicidad: Hiperactividad en los primeros 15 min., disnea, saltos, ataxia, respiración agitada, masticación compulsiva, palidez, temblores, rascado de hocico, estereotipias, sacudidas, problemas de locomoción, muerte.	>5
	<i>O. chrysurus</i> / 1	Vísceras	78.9	(+)	Saltos, disnea, salivación, temblores, serpenteo severo de la cola, piloerección, muerte rápida.	>10
San Felipe, Yucatán. 27/Sep/2013	<i>R. terraenovae</i> / 1	Vísceras	518	(+)	Letargo, espasmos , parpadeo, disnea, ataxia, temblores, salivación, poliuria, latigüeo de cola, convulsiones, saltos, muerte	>5
		Hígado	248.2	(+)	Letargo, espasmos, palidez, curvado de la cola, respiración agitada, problemas de locomoción, parálisis de cuartos traseros, poliuria.	Subletal
	<i>E. morio</i> /1	Vísceras	143	(+)	Problemas de locomoción, parálisis de los cuartos traseros, disnea, saltos, convulsiones, muerte, piloerección <i>postmortem</i> .	>5
Dzilam de Bravo, Yucatán. 26/Sep/2013	<i>E. morio</i> /2	Vísceras	187	(-)	Diarrea severa acuosa, sin ningún otro signo.	Negativo
	<i>C. nebulosus</i> / 1	Vísceras	147	(+)	Problemas de locomoción, tembor, parálisis de cuartos traseros, poliuria, latigüeo de cola, curvado de cola, disnea, saltos, convulsiones, muerte.	1.93
	<i>Caranx sp.</i> / 1	Vísceras	26	(-)	Problemas de locomoción, espasmos, diarrea.	Negativo

Lugar y fecha de colecta	Especie/ No. de Ejemplar	Peso total/ Tejido	Peso (g)	Actividad	Signos clínicos	Toxicidad UR
	<i>H. plumierii</i> /2	Vísceras	25	(+)	Espasmos, problemas de locomoción y respiración, parpadeo, ataxia, latiguo de cola, saltos, convulsiones, muerte.	>5
	<i>L. synagris</i> /2	Vísceras	55	(+)	Letargo, palidez, espasmos, respiración agitada (muy marcada), parpadeo, estereotipias, diarrea leve, ataxia, disnea, serpenteo de cola, convulsiones, muerte.	>5
(localidades) n=9	n(especies)=9 / n(ejemplares)=44	n(muestras) =65		n (+)= 40		

Tabla IV_(b). Toxicidad determinada por bioensayo en ratón para la detección de toxinas tipo ciguatoxinas en tejidos de peces carnívoros durante el muestreo del año 2015 en la Península de Yucatán.

Lugar y fecha de colecta	Especie/ No. De Ejemplar	Peso total/ Tejido	Peso (g)	Actividad	Signos clínicos	Toxicidad UR
Champton, Campeche 14/12/2015	<i>S. barracuda</i> / 1	Total	3600		Espasmos, letargo, saltos, ataxia, temblores, palidez, parpadeo, problemas de locomoción, respiración agitada, parálisis de cuartos traseros, convulsiones, curvado de cola, paro respiratorio, muerte, piloerección <i>postmortem</i> .	1.2
		vísceras	41.6	(+)		
		músculo	85.5	(+)		
	2	Total	3400		Letargo, problemas de locomoción, parpadeo.	Neg
		vísceras	71.2	(-)		
		músculo	70	(-)		
	3	Total	4150		Letargo, problemas de respiración, cambio de coloración ocular, problemas de locomoción, paro respiratorio, muerte, piloerección <i>postmortem</i> .	2.5
		vísceras	110.2	(+)		
		músculo	73	(+)		
	4	Total	4450		Ojos saltados, letargo, espasmos, pelo erizado, defecación.	<1
		vísceras	108.7	(-)		
		músculo	68.2	(-)		

Lugar y fecha de colecta	Especie/ No. De Ejemplar	Peso total/ Tejido	Peso (g)	Actividad	Signos clínicos	Toxicidad UR
	5	Total	2252			
		vísceras	31.6	(-)	Disneas, sin otro signo	Neg
		músculo	77.5	(+)	Poliuria, espasmos, pelo erizado, temblores, respiración agitada, ataxia, cambio de la coloración ocular.	<1
	6	Total	3630			
		vísceras	121	(-)	No presento signos de intoxicación	Neg
		músculo	74.7	(+)	Letargo, parpadeo, cambio de coloración ocular, ataxia, temblores, respiración agitada.	<1
Seybaplaya, Campeche 15/12/2015	7	Total	1500			
		vísceras	89.9	(+)	Letargo, cambio de coloración ocular, espasmos, convulsiones, parálisis de cuartos traseros, curveo de cola, paro respiratorio, muerte.	2.5
		músculo	66.5	(+)	Hiperactividad, diarrea, problemas de respiración, espasmos, letargo.	<1
	8	Total	1670			
		vísceras	110	(-)	Espasmos, problemas de locomoción, parálisis de cuartos traseros.	Neg
		músculo	59.2	(-)	Diarrea, hiperactividad.	Neg
Champotón, Campeche 15/12/2015	9	Total	631.2			
		músculo	72.4	(+)	Respiración agitada, espasmos, cambio de la coloración ocular, letargo, parpadeo, parálisis de cuartos delanteros, temblores, masticación.	<1
	10	Total	448.1			
		músculo	70	(-)	Letargo, problemas de locomoción, disnea.	Neg
Yucatán 11 /2015	11	Total	Nd			
Champotón, Campeche. 15/12/2015		músculo	365.2	(+)	Espasmos, boqueo, cambios de coloración de los ocular, respiración agitada, ataxia, problemas de locomoción, curveo de cola, diarrea.	<1
		Total	2700			
	<i>Caranx hippos/</i> 1	vísceras	138.4	(+)	Respiración agitada, espasmos, cambio de la coloración ocular, letargo, problemas de locomoción, parálisis de cuartos traseros, pelo erizado, temblores, vascularización de orejas, salivación moderada disnea, saltos, convulsiones, latiguo y serpenteo de cola, paro respiratorio, muerte.	>10
Campeche, Campeche 16/12/2015	2	Total	5500			
		vísceras	242.4	(+)	Espasmos, Problemas de locomoción, curveo de cola, diarrea, parálisis de cuartos delanteros y traseros, letargo, saltos, cianosis y oscurecimiento de la cola, convulsiones, paro respiratorio, muerte.	>10

		Total	6500			
		3	vísceras 251.8	(+)	Parpadeo, cambio de coloración ocular, espasmos, curvado de cola, salivación, ataxia, disnea, problemas de locomoción, parálisis de cuartos delanteros y traseros, convulsiones, paro respiratorio, muerte.	>10
			Total 8000			
		4	vísceras 352.7	(+)	Disnea, letargo, Problemas de locomoción, cambios de coloración ocular, curvado de cola, saltos, parálisis de cuartos delanteros, serpenteo de cola, paro respiratorio, muerte.	>10
Champotón, Campeche 13/12/2015	<i>Sphyrna tiburo</i> / 1		Total 2300		Disnea severa, pelo erizado, rascado de cola, espasmos, letargo, saltos, hiperestesia, temblores, convulsiones, paro respiratorio, muerte.	2.5
			Total 3000		Disnea, espasmos, hiperactividad, problemas de locomoción, desequilibrio, cambio en la coloración ocular, poliuria, letargo, temblores, parálisis de cuartos delanteros y traseros, saltos, ataxia, curvado de cola, paro respiratorio, muerte, piloerección <i>postmortem</i> .	2.5
Campeche, Campeche 17/12/2015	<i>Centropomus undecimalis</i> / 1	2	vísceras 88	(+)	Respiración agitada, espasmos, letargo, problemas de locomoción, tensión y curvado de cola, pelo erizado, muerte.	1.2
			Total 6000	(+)		
			vísceras 209.4			
Champotón, Campeche 15/12/2015	<i>Lachnolaimus maximus</i> / 1		Total 1350	(+)	Espasmos, temblores, ataxia, problemas de locomoción, letargo, cambio de coloración ocular, cianosis, tremor, salivación, disnea, saltos, convulsiones, parálisis de cuartos traseros, paro respiratorio, muerte.	>10
		2	Total 1450		Espasmos, letargo, parálisis de cuartos traseros, temblores, ataxia, disnea, cambio de coloración ocular, pelo erizado, hipersalivación, saltos, convulsiones, paro respiratorio, muerte.	>10
			vísceras 25.5	(+)		
		3	Total 1550		Letargo, respiración agitada, saltos, salivación, curvado de cola, paro respiratorio, muerte	>10
			vísceras 39.6	(+)		
Champotón, Campeche 13/Dic/2015		4	Total 3500			
Campeche, Campeche 19/12/2015	<i>L. synagris</i> / 3		vísceras 133.6	(-)	Diarrea moderada, letargo	Neg
			Total 1000			
			vísceras 43.8	(-)	Espasmos, problemas de locomoción, diarrea moderada.	Neg
Localidades n= 3	n (especies)= 6 / n (ejemplares)= 23	n(muestras) = 31		n (+)= 19		

<1= En este caso las muestras han sido consideradas como subletales; ya que se presentan signos de neurotoxicidad pero el modelo *murino* no murió, por lo que no se pudieron evaluar las UR respectivas. Nd= No determinado.

synagris) de 1 kg, con los cuales se obtuvieron los últimos cinco extractos. En total se obtuvo 30 extractos (Tabla V_(b)).

7.2 Identificación y cuantificación de ciguatoxinas

7.2.1 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del bioensayo en ratón

En la tabla V se comparan los signos clínicos presentes en el modelo en ratón por la intoxicación con ciguatoxinas, descrita en la literatura especializada comparados con los obtenidos en este estudio. Los extractos que presentaron concentraciones letales (Figs. 12 y 13) fueron los únicos con los que pudo determinarse la toxicidad respectiva a través del logaritmo de Lewis, (1995). Estos signos fueron semejantes entre sí, con un efecto principalmente neurotóxico y digestivo y se caracterizaron por: diarrea, disnea (sensación de ahogo), hipersalivación, lagrimeo, letargo, falta de movilidad y control en los cuartos traseros, piloerección en algunos casos erección peneana *post-mortem*, saltos, convulsiones y muerte. Sin embargo, se registraron también otros signos adicionales como: arqueamiento corporal, espasmos, estereotipias, hiperactividad, lagrimeo, letargo, mucosidad en heces, palidez, serpenteo y curvatura de la cola, temblor, temblores, vascularización de orejas, entre otros (Figs. 14-16). Las variaciones en los signos clínicos observados puede obedecer no solo a la concentración si no a la posible presencia de diversos análogos de las ciguatoxinas presente en los extractos.

El estado con el mayor número de signos clínicos de intoxicación en el BR observados fue Campeche ($n= 38$), seguido de Yucatán ($n= 36$) y Quintana Roo ($n= 33$); a pesar de que el mayor número de muestras fue de esta última entidad (Figs. 14-16).

En todos los estados se pudieron observar signos cardiovasculares ($n= 3$), gastrointestinales ($n= 5$) y neurológicos, siendo estos últimos los que tuvieron mayor representación en el BR (hasta 26 signos neurológicos pudieron registrarse, los cuales no variaron mucho entre las muestras obtenidas en las diversas regiones de la PY).

Varios ratones no presentaron ningún signo de intoxicación o fueron signos menores por lo que estos extractos fueron considerados inocuos; otros extractos presentaron signos clínicos característicos de intoxicación por ciguatoxinas que fueron de moderados a graves, pero no provocaron la muerte de los animales por lo que son considerados como extractos que contenían concentraciones subletales.

Tabla V. Signos clínicos en el modelo en ratón producidos por una intoxicación por ciguatoxinas descritos en la literatura científica y en este estudio.

Signos clínicos	
Descritos en la literatura especializada*	Este estudio
Ataxia, convulsiones, cianosis, diarrea, disnea, Sialorrea (salivación o hipersalivación), hipoactividad, hipotermia, lagrimeo, parálisis de los cuartos traseros, paro respiratorio, piloerección, problemas de locomoción, saltos.	Arqueamiento corporal, ataxia , bamboleo, cambio de coloración ocular, convulsiones , defecación abundante, diarrea , disnea , enoftalmia, espasmos, estereotipias, exoftalmia hiperactividad, lagrimeo , letargo, mucosidad en heces, palidez, parálisis de los cuartos delanteros y traseros , paro respiratorio , piloerección , poliuria, problemas de locomoción y respiración, sialorrea , saltos , serpenteo y curveo de la cola, tembor, temblores, vascularización de orejas.

*(Diogène *et al.*, 2017; Landsberg, 2002; Lewis, 1995; Pottier *et al.*, 2001).

Con base a estos resultados, las muestras fueron clasificadas como:

Concentración inocua ($n= 36$): ratones cuyo comportamiento fue normal o con leves signos anormales, recuperación total al poco tiempo después de la inyección del extracto, se encontraron activos y consumiendo alimentos.

Concentración subletal ($n= 36$): ratones que presentaron conductas anormales, se destacando signos como: defecación abundante, diarrea (de moderada a severa), espasmos, disnea, problemas de locomoción, hipersalivación, lagrimeo, pequeños saltos, convulsiones; pero sin llegar a ser letales. Los ratones no murieron y se recuperaron a las 24 h.

Concentración letal ($n= 24$): animales que presentaron un cambio de comportamiento severo, caracterizado por un efecto toxico y cuyos signos clínicos fueron además de los descritos en el criterio anterior, problemas de respiración, parálisis de los cuartos traseros (en algunos casos también delanteros), saltos, convulsiones, curveo de cola, paro respiratorio y la muerte, la cual fue en pocos minutos o en horas, (con lo que se pudo determinar la toxicidad de la muestra). En el caso de las muestras que provocaron la muerte en pocos minutos se realizaron diluciones para poder obtener la toxicidad respectiva mediante el uso de animales adicionales de experimentación.

Estos registros se describen en las tablas IV_(a) y IV_(b), donde las muestras principales fueron aquellas que fueron letales y en las que se pudieron asignar las concentraciones respectivas (Fig. 12).

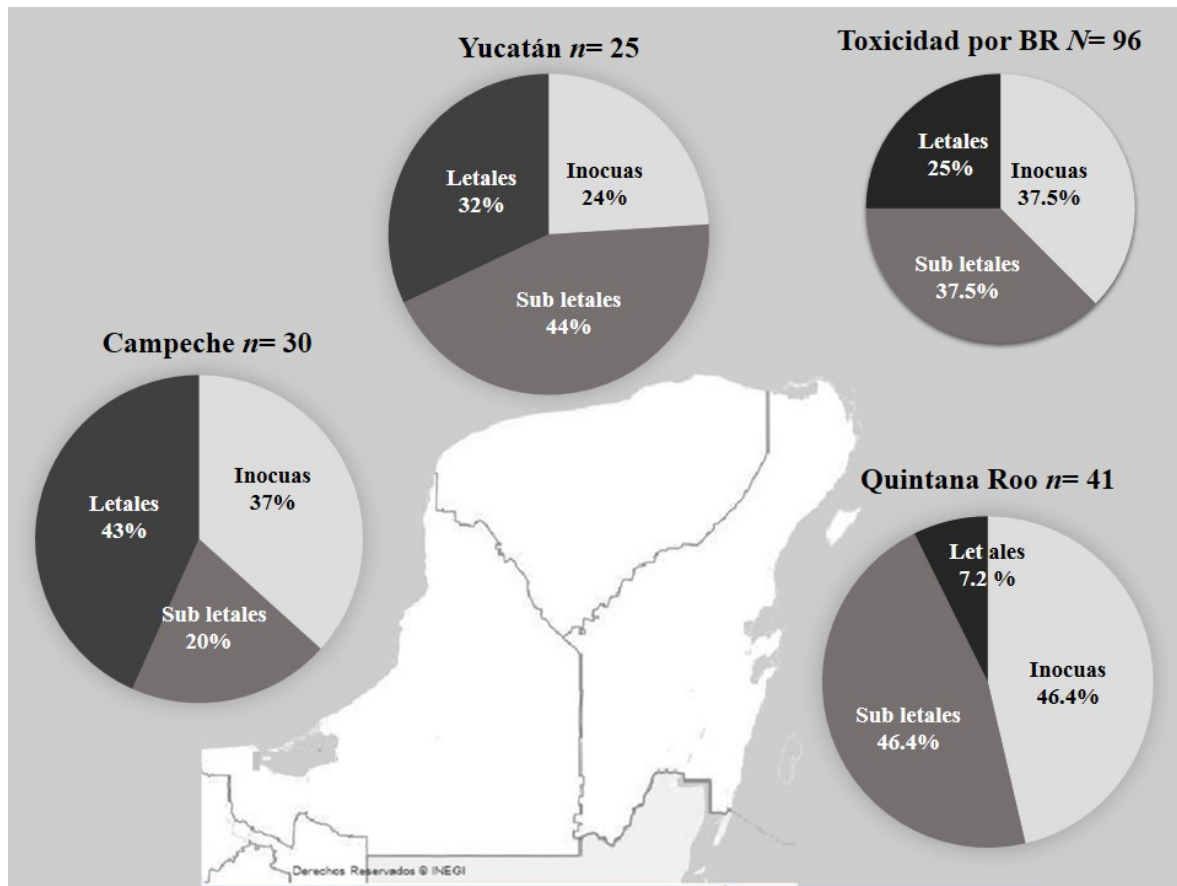


Figura 12. Toxicidad por bioensayo en ratón. Número de muestras (n) y nivel de toxicidad (letal, subletal e inocua) en porcentajes para cada uno de los estados de la Península de Yucatán. (Mapa modificado de INEGI, 2018).

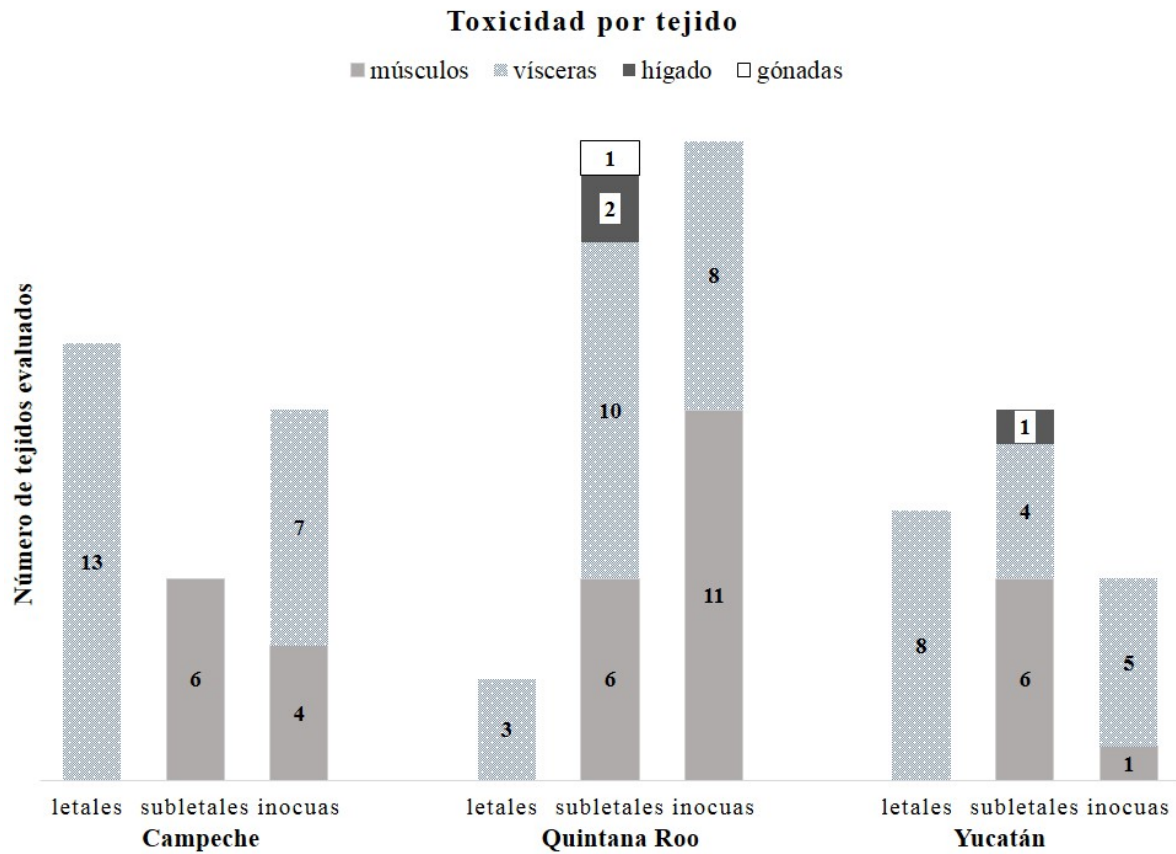


Figura 13. Toxicidad por tejido. Se indica el número de tejidos evaluados en su grado de toxicidad (letal, subletal e inocuo) por medio del BR. Se muestran cuatro tipos de tejidos: gónadas ($n= 1$, barra blanca), hígado ($n=3$ barra oscura), músculos ($n= 34$ barra gris) y vísceras ($n= 58$, barra punteada).

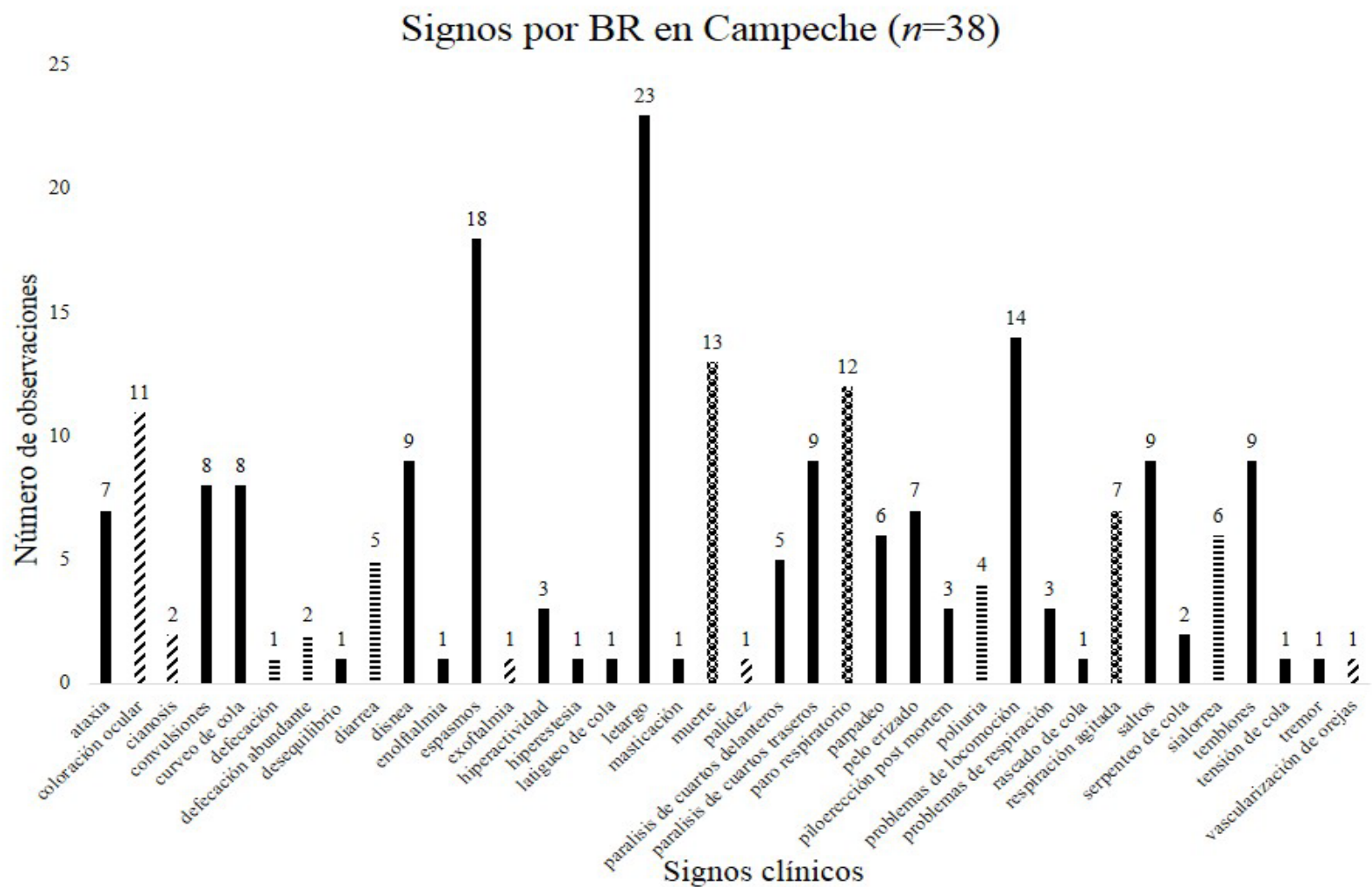


Figura 14. Signos clínicos observados en el BR en muestras de Campeche. Destacan los signos gastrointestinales (líneas horizontales, $n= 5$), neurológicos (barras negras, $n= 25$) y cardiovasculares (líneas diagonales $n= 5$) y otros signos restantes (círculos negros, $n= 3$).

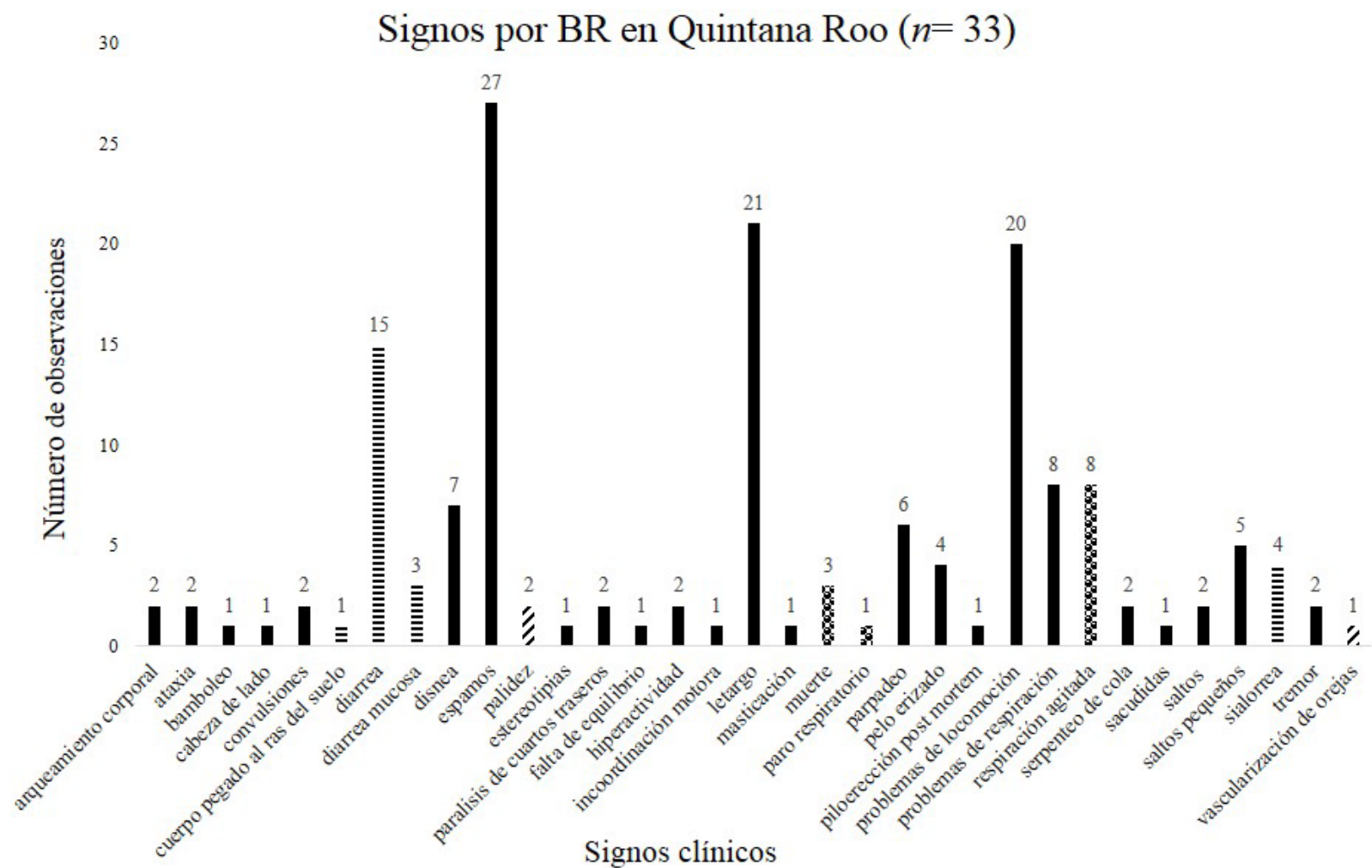


Figura 15. Signos clínicos observados en el BR en muestras de Quintana Roo. Destacan los signos gastrointestinales (líneas horizontales, $n= 4$), neurológicos (barras negras, $n= 24$) y cardiovasculares (líneas diagonales $n= 2$) y otros signos restantes (círculos negros, $n= 3$).

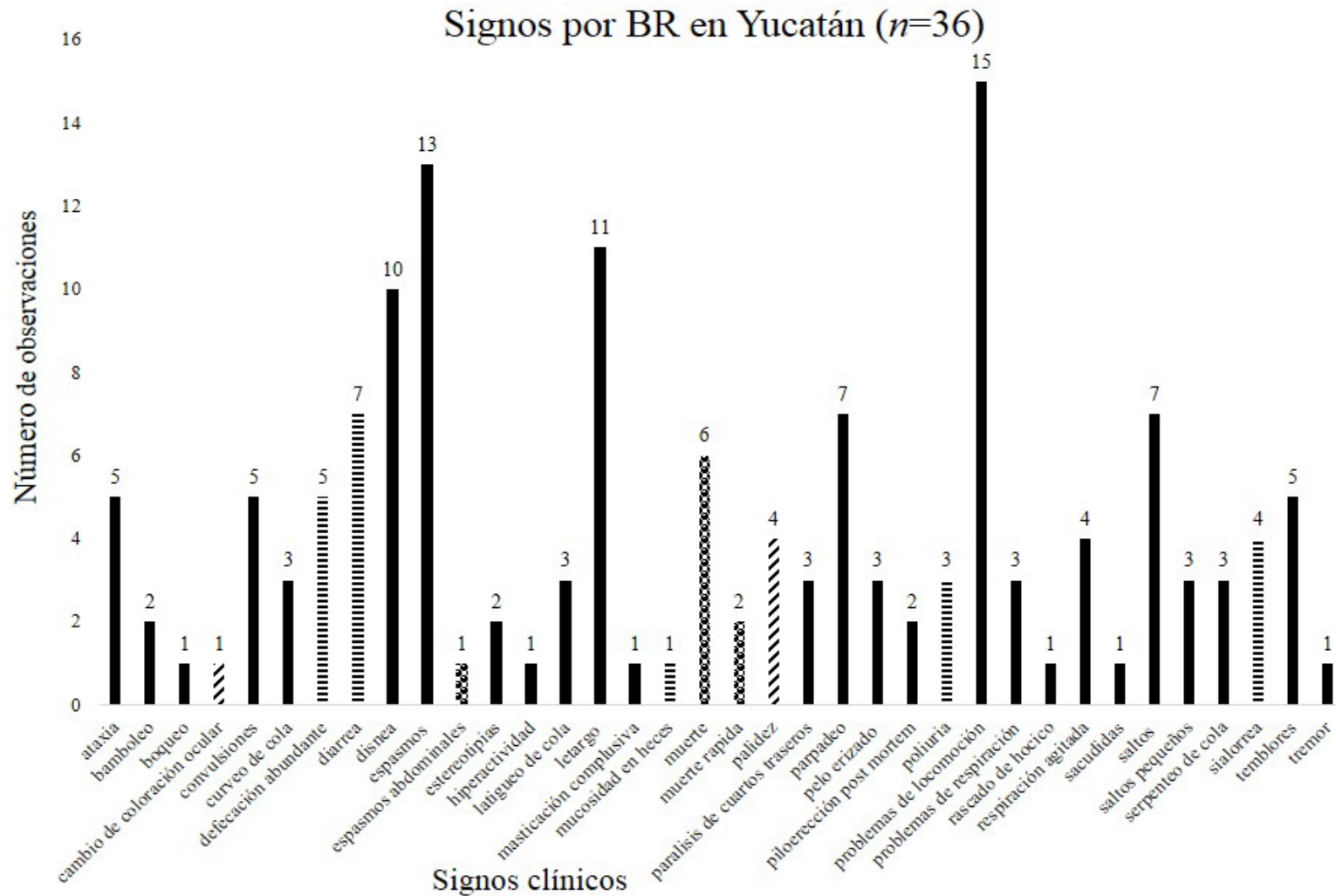


Figura 16. Signos clínicos observados en el BR en muestras de Yucatán. Destacan los signos gastrointestinales (líneas horizontales, $n= 5$), neurológicos (barras negras, $n= 26$) y cardiovasculares (líneas diagonales $n= 2$) y otros signos restantes (círculos negros, $n= 3$).

7.2.2 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del bioensayo en *Artemia salina* (ARTOX)

Se realizaron ensayos en *A. salina* de 72 extractos de ciguatoxinas. Los controles negativos de agua de mar y el vehículo (solución salina con Tween 60 al 1%) (ambos por duplicado), no mostraron nula mortalidad en el primer caso y muy baja mortalidad (8%; en una de dos replicas) en el segundo. (Fig. 17), mientras que los controles positivos (por duplicado) con toxinas marinas mostraron 100% y 50% de mortalidad para DSP y PbTx, respectivamente (Fig. 17).

Las muestras fueron seleccionadas con base a su toxicidad a partir del BR y fueron agrupadas por estado de la PY (Fig. 18). En total, 28 extractos son de muestras de peces de Campeche, 20 de Yucatán y los 24 restantes son de Quintana Roo.

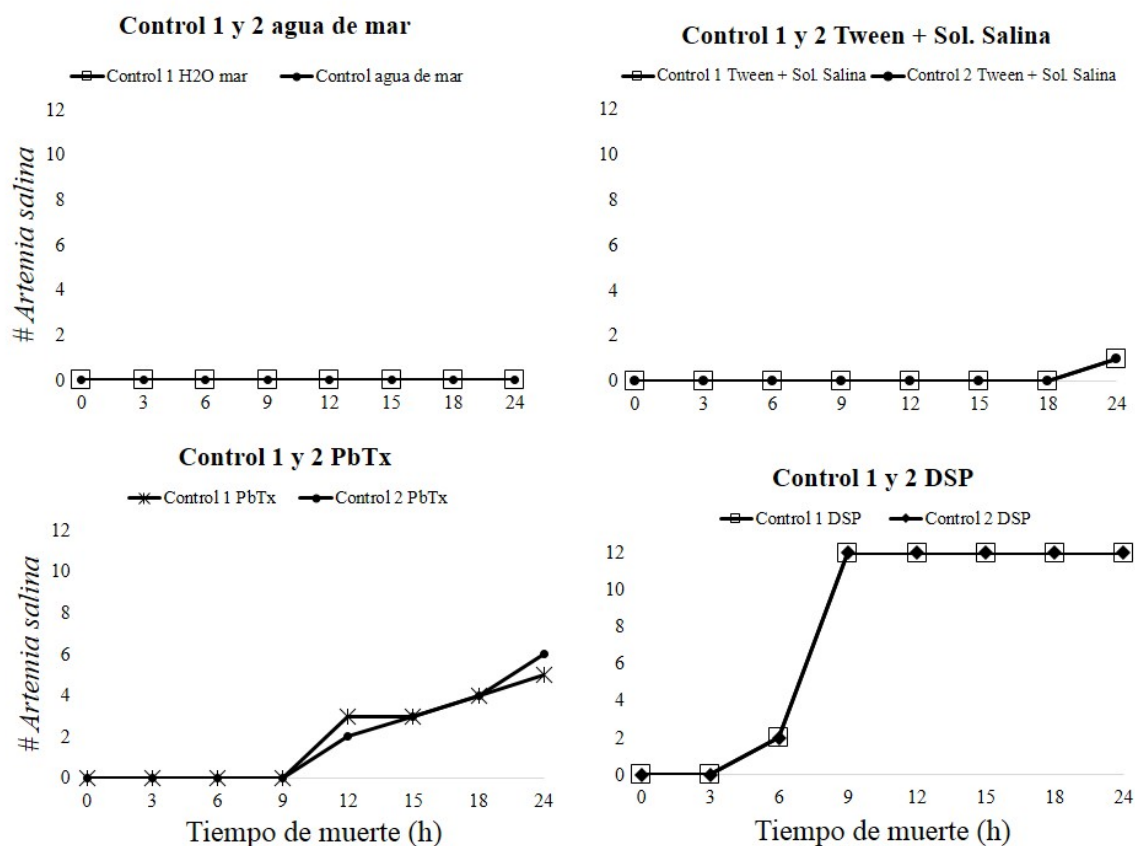


Figura 17. Mortalidad en *A. salina* (adultos) expuestos durante 24 horas (h). Controles negativos (izquierda: agua de mar esterilizada y derecha: solución salina con Tween 60 al 1%). Abajo Controles positivos (izquierda: PbTx y derecha: DSP) por duplicado.

La toxicidad de estas muestras se evaluó a partir del registro en el número de organismos muertos durante el bioensayo agudo que duró 24 h aproximadamente, en el cual el máximo de organismos muertos es 12 y el mínimo es cero (Tabla VI).

Tabla VI. Toxicidad aguda en *Artemia salina*. Los criterios de toxicidad fueron: No tóxico (-): 0-20% mortalidad; poco tóxico (+): 21-50% mortalidad; medianamente tóxico (++) : 51-80% mortalidad; tóxico (+++): 81-100% mortalidad.

Lugar	Especie/ No. de ejemplar	Clave	Mortalidad (Número)	Mortalidad (%)	Toxicidad
Isla Mujeres y Pto. Juárez, Q. Roo	<i>S. barracuda/</i> 1	Sb 1 vísceras	11	91.60	+++
		Sb 1 músculo	1	8.34	-
		Sb 2 vísceras	5	41.66	+
		Sb 2 músculo	0	0	-
		Sb 3 vísceras	0	0	-
Pto. Juárez, Q. Roo	5	Sb 3 músculo	0	0	-
		Sb 4 vísceras	0	0	-
		Sb 4 músculo	0	0	-
		Sb 5 vísceras	9	75	++
Pto. Morelos, Q. Roo	6	Sb 5 hígado	0	0	-
		Sb 6 hígado	9	75	++
Pto. Morelos, Q. Roo	<i>P. volitans/</i> 1	PM 7 vísceras	10	83.33	+++
		PM 8 vísceras	10	83.33	+++
		PM 9 vísceras	10	83.33	+++
Cozumel, Q. Roo	4	PV 1 músculo	0	0	-
		PV 3 músculo	0	0	-
		PV 5 músculo	7	58.33	++
		PV 8 vísceras	0	0	-
		PV 8 músculo	1	8.3	-
		PV 9 vísceras	9	75	++
		PV 14 vísceras	8	66.7	++
		PV 17 vísceras	7	58.3	++
		PV 20 vísceras	0	0	-
		PV 23 músculo	11	91.60	+++
Celestún, Yucatán	13	C PV 1 músculo	1	8.3	-
		C PV 1 vísceras	1	8.3	-
		C PV 2 músculo	0	0	-
Celestún, Yucatán	14	C PV 2 vísceras	2	16.7	-

Lugar	Especie/ No. de ejemplar	Clave	Mortalidad (Número)	Mortalidad (%)	Toxicidad
	15	C PV 3 vísceras	6	50	++
		C PV 3 músculo	0	0	-
	16	CPV 4 vísceras	0	0	-
		CPV 4 músculo	0	0	-
	17	OD 1 músculo	0	0	-
	18	OD 2 vísceras	0	0	-
		OD 2 músculo	0	0	-
Dzilam de Bravo, Yuc.	<i>Caranx</i> sp./ 1	<i>Caranx</i> sp. vísceras	9	75	++
	<i>C. nebulosus</i> / 1	<i>C. nebulosus</i> vísceras	0	0	-
	<i>H. plumierii</i> / 2	<i>H. plumierii</i> vísceras	12	100	+++
	<i>L. synagris</i> / 2	<i>L. synagris</i> vísceras	12	100	+++
	<i>E. morio</i> / 1	<i>E. morio</i> vísceras	11	91.6	+++
San Felipe, Yucatán	2	<i>E. morio</i> vísceras	2	16.7	-
	<i>R. terraenovae</i> / 1	<i>R. terraenovae</i> vísceras	9	75	++
		<i>R. terraenovae</i> hígado	0	0	-
Yucatán	<i>S. barracuda</i>	<i>S. barracuda</i> músculo Yuc.	12	100	+++
Campeche, Campeche	<i>L. synagris</i> / 3	<i>L. synagris</i> vísceras	12	100	+++
	<i>C. undecimalis</i> / 1	<i>C. undecimalis</i> vísceras	10	83.3	+++
	<i>C. hippos</i> / 1	<i>C. hippos</i> 1 vísceras	12	100	+++
	2	<i>C. hippos</i> 2 vísceras	12	100	+++
	3	<i>C. hippos</i> 3 vísceras	12	100	+++
Champotón, Campeche	4	<i>C. hippos</i> 4 vísceras	12	100	+++
	<i>L. maximus</i> / 1	<i>L. maximus</i> 3 vísceras	12	100	+++
	2	<i>L. maximus</i> 4 vísceras	12	100	+++

Lugar	Especie/ No. de ejemplar	Clave	Mortalidad (Número)	Mortalidad (%)	Toxicidad
Seybaplaya, Campeche	<i>S. tiburo</i> 1	<i>S. tiburo</i> 1 vísceras	12	100	+++
	2	<i>S. tiburo</i> 2 vísceras	12	100	+++
	7	<i>S. barracuda</i> 1 vísceras	12	100	+++
	8	<i>S. barracuda</i> 1 músculo	3	25	+
		<i>S. barracuda</i> 2 vísceras	11	91.6	+++
	9	<i>S. barracuda</i> 2 músculo	6	50	++
		<i>S. barracuda</i> 3 vísceras	12	100	+++
	10	<i>S. barracuda</i> 3 músculo	10	83.3	+++
		<i>S. barracuda</i> 4 vísceras	8	66.7	++
	11	<i>S. barracuda</i> 4 músculo	6	50	++
		<i>S. barracuda</i> 5 vísceras	12	100	+++
	12	<i>S. barracuda</i> 5 músculo	11	91.6	+++
		<i>S. barracuda</i> 6 vísceras	3	25	+
	15	<i>S. barracuda</i> 6 músculo	7	58.3	++
		<i>S. barracuda</i> 9 músculo	9	75	++
	16	<i>S. barracuda</i> 10 músculo	4	33.3	+
		<i>S. barracuda</i> 7 vísceras	3	25	+
	13	<i>S. barracuda</i> 7 músculo	7	58.3	++
		<i>S. barracuda</i> 8 vísceras	12	100	+++
	14	<i>S. barracuda</i> 8 músculo	3	25	+

Los signos observados durante el bioensayo se resumen en la tabla VII. Algunas de las manifestaciones dentro de los primeros min. fueron: nado errático, giros, agitación de los torácopodos, hiperactividad y defecación; conforme transcurrió el bioensayo se observaron cambios de coloración en los organismos, hipoactividad, letargo, contracciones, espasmos y la nado de los organismos, a estar por la parte superficial o en el piso del vial. En algunas de las muestras también se observaron organismos que perdían el sentido de la orientación en la columna de agua y/o preferían mantenerse cerca de otros organismos, con choques ocasionales usando su parte anterior (cabeza). Un total de 13 muestras presentaron una muerte en un tiempo muy corto la cual fue confirmada por la apreciación de los organismos flotando en la superficie o yaciendo en el fondo del vial, además la mayoría de los organismos presentaron pérdida de coloración, en algunos casos pérdida de torácopodos.

Tabla VII. Signos clínicos observados en el ARTOX por ciguatoxinas descritos en la literatura científica y en este estudio.

Signos clínicos	
Descritos en la literatura *	Este estudio
Hundimiento, pérdida del equilibrio y/o desorientación, reducción de la capacidad natatoria, maniobras para mantenerse en la columna de agua, movimientos de antenas y mandíbulas, contracciones, deslizamiento en el fondo del reservorio, liberación de heces o pseudo-heces, muerte.	Agitación de los torácopodos, nados erráticos, nados en círculos, nados hacia la superficie, nados hacia el fondo, encuentros constantes con otros organismos, golpes “choques” de cabeza, espasmos, giros, defecación, contracciones y/o posibles convulsiones, pérdida de coloración, pérdida de torácopodos, hipo-actividad, letargo, muerte.

*(Ajuzie, 2007; Kelly *et al.*, 1992; Neves *et al.*, 2017).

En Yucatán, se cuenta con puertos pesqueros de suma importancia comercial. En nuestro estudio a través de este bioensayo se pudieron evaluar 20 muestras, siendo el estado con el menor número de muestras (Fig. 18) pero con la mayor diversidad de muestras de peces, sin embargo solo se contó con vísceras de las mismas y un de músculo de barracuda (ver Tablas IV_(a) y IV_(b)). El 65% de las muestras ($n= 13$) no presentaron signos de toxicidad (Fig. 18).

Tampoco se registraron muestras con poca toxicidad (Tabla VI) y pocas muestras tuvieron una mediana toxicidad ($n= 3$, 15%) procedentes de vísceras de un pez león, un jurel y de un cazón, todas de diferentes localidades. Por último solo el 20% ($n= 4$) de las muestras fueron tóxicas, estas muestras fueron vísceras de mero, chac-chí, rubia, y de músculo de barracuda (Fig. 19).

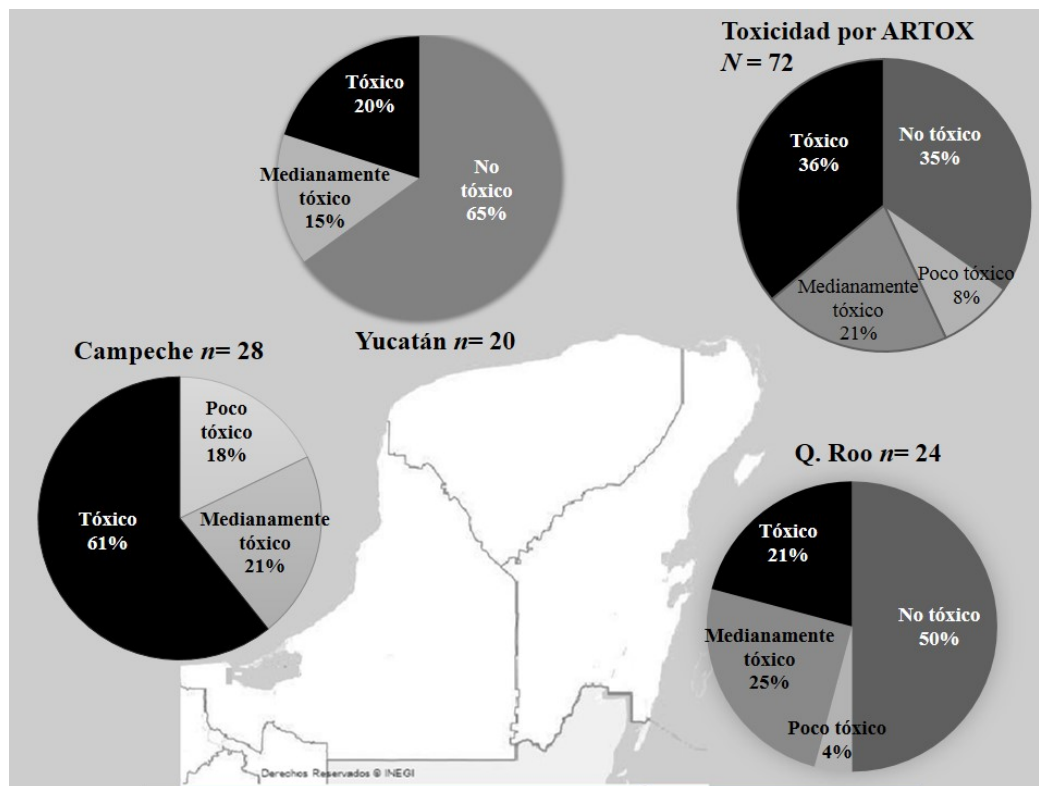


Figura 18. Toxicidad de peces carnívoros determinada por ARTOX. Se muestra la toxicidad en porcentajes para cada uno de los estados de la Península de Yucatán. La clasificación descrita de lo tóxico a lo no tóxico, pasando por lo poco y medianamente tóxico. (Mapa modificado de INEGI, 2018).

El mayor número de muestras evaluadas pertenecen a Campeche ($n= 28$), las cuales fueron consideradas las más tóxicas (Tabla VI), ya que se cuenta con toxicidades del 100% en 17 de las muestras (60.7%) las cuales corresponden casi en su totalidad a vísceras de peces carnívoros (Figs. 20-22) y tres muestras de músculo de barracudas (*S. barracuda* 3, 5, 9; Figs. 20 y 21). Toxicidades cercanas al 50% se observan en seis de las muestras (21.43%), incluyendo principalmente músculo de barracuda a excepción de una muestra de vísceras (*S.*

barracuda 4, Fig. 20). Cinco muestras (17.85%) presentaron baja toxicidad y al igual que los registros mencionados se trata de tejidos de barracuda (tres muestras de músculo y dos de vísceras; Figs. 20 y 21).

Siguiendo el orden decreciente, se evaluaron 24 muestras en este ensayo para Quintana Roo de las cuales el 50% no presento toxicidad (Fig. 18). Solo una muestra (4.17%) presentó poca toxicidad, la toxicidades intermedias fueron observadas en seis de las muestras (25%) dentro de las que se encuentra un extracto de músculo de pez león (*P. volitans*) y otros tres de vísceras, seguido de una muestra de hígado y otra de vísceras de diferentes ejemplares de barracudas (Fig. 23). Finalmente las toxicidades más altas en esta entidad, fueron observadas en cinco extractos (20.83%), de los cuales cuatro pertenecen a ejemplares de pez león (incluido una muestra de músculo y el resto correspondiente a vísceras), mientras que sólo un extracto de vísceras de barracuda del norte del estado fue detectada en este nivel toxicidad (Fig. 23).

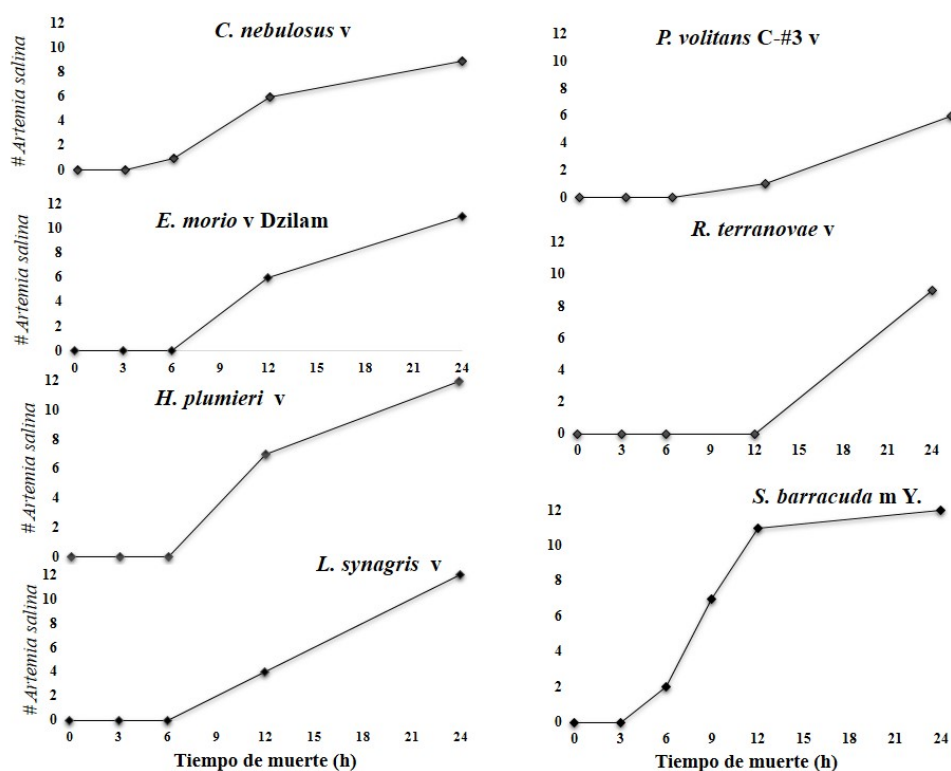


Figura 19. Mortalidad en *A. salina* (adultos) expuestos durante 24 horas (h) a extractos de ciguatoxinas provenientes de músculo (m) de barracuda (*S. barracuda*) y vísceras (v) de cazón (*R. terraenovae*), chac-chí (*H. plumierii*), corvina (*C. nebulosus*), mero (*E. morio*), pez león (*P volitans*) y rubia (*L. synagris*) de Yucatán.

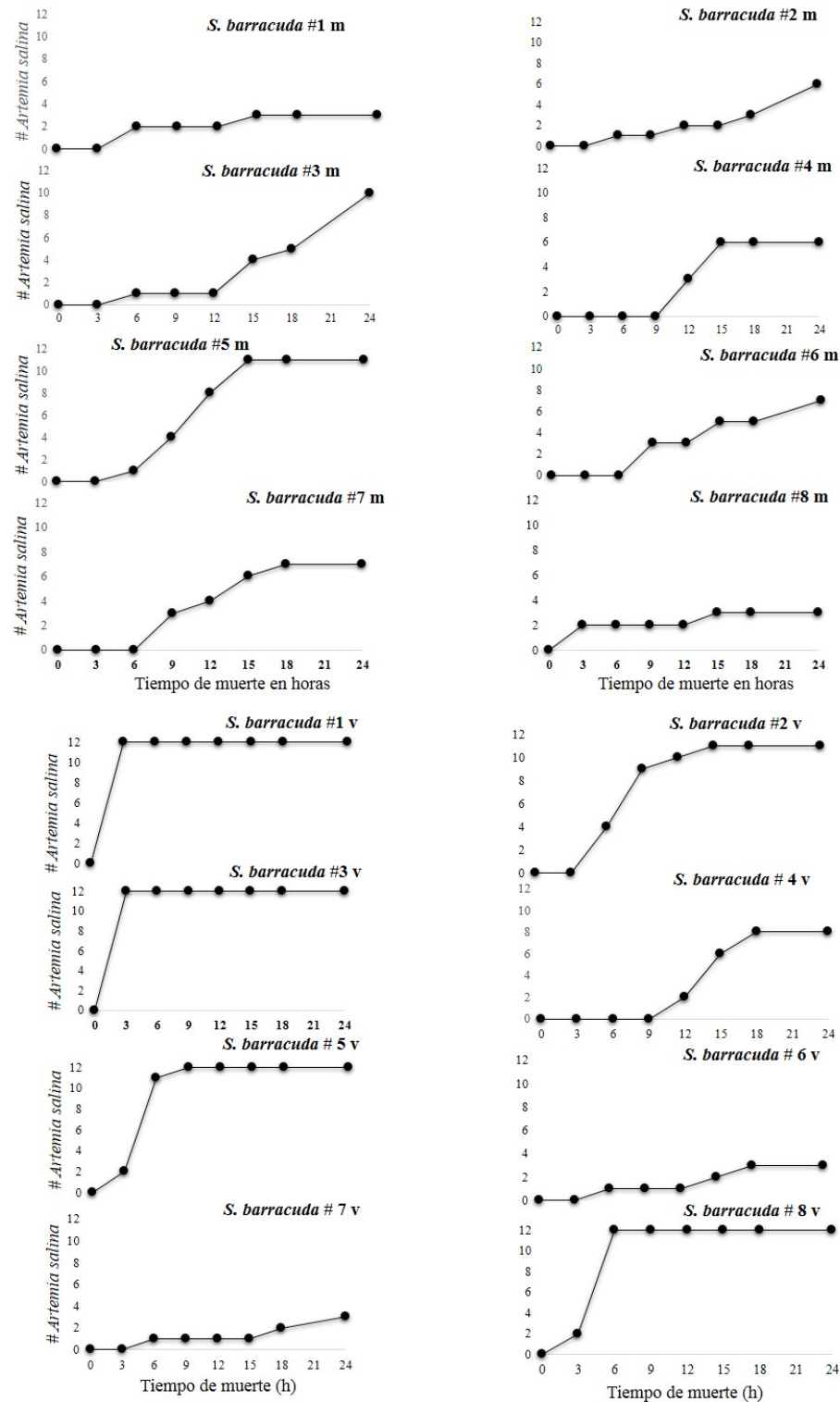


Figura 20. Mortalidad en *A. salina* (adultos) expuestos durante 24 horas (h) a extractos de ciguatoxinas provenientes de músculo (m) y vísceras (v) de barracudas (*S. barracuda*) de Campeche.

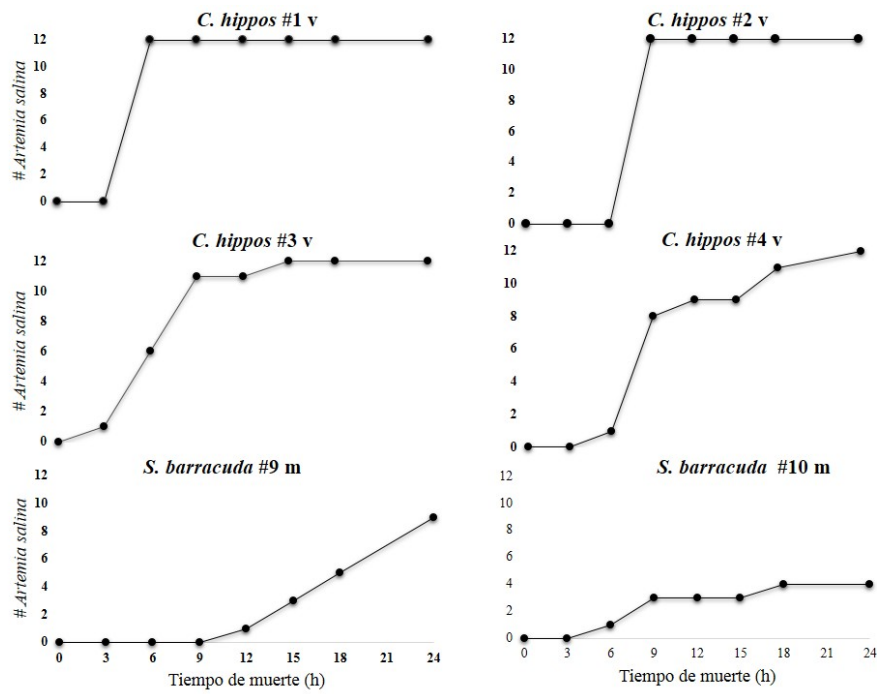


Figura 21. Mortalidad en *A. salina* (adultos) expuestos durante 24 horas (h) a extractos de ciguatoxinas provenientes de músculo (m) de barracudas (*S. barracuda*) y vísceras (v) de jureles (*C. hippos*) de Campeche.

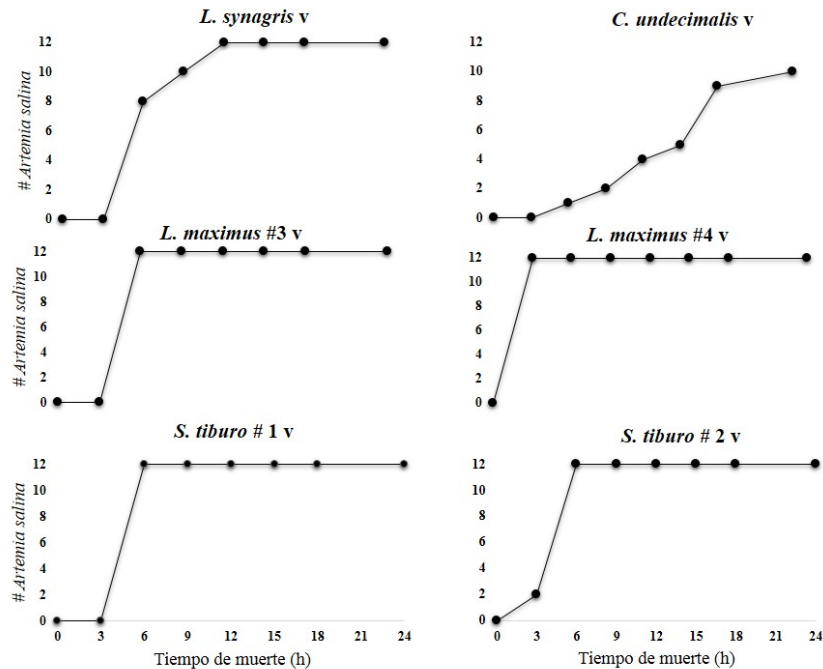


Figura 22. Mortalidad en *A. salina* (adultos) expuestos durante 24 horas (h) a extractos de ciguatoxinas provenientes de vísceras (v) de boquinete (*L. maximus*), cazón (*S. tiburo*), robalo (*C. undecimalis*) y rubia (*L. synagris*) de Campeche.

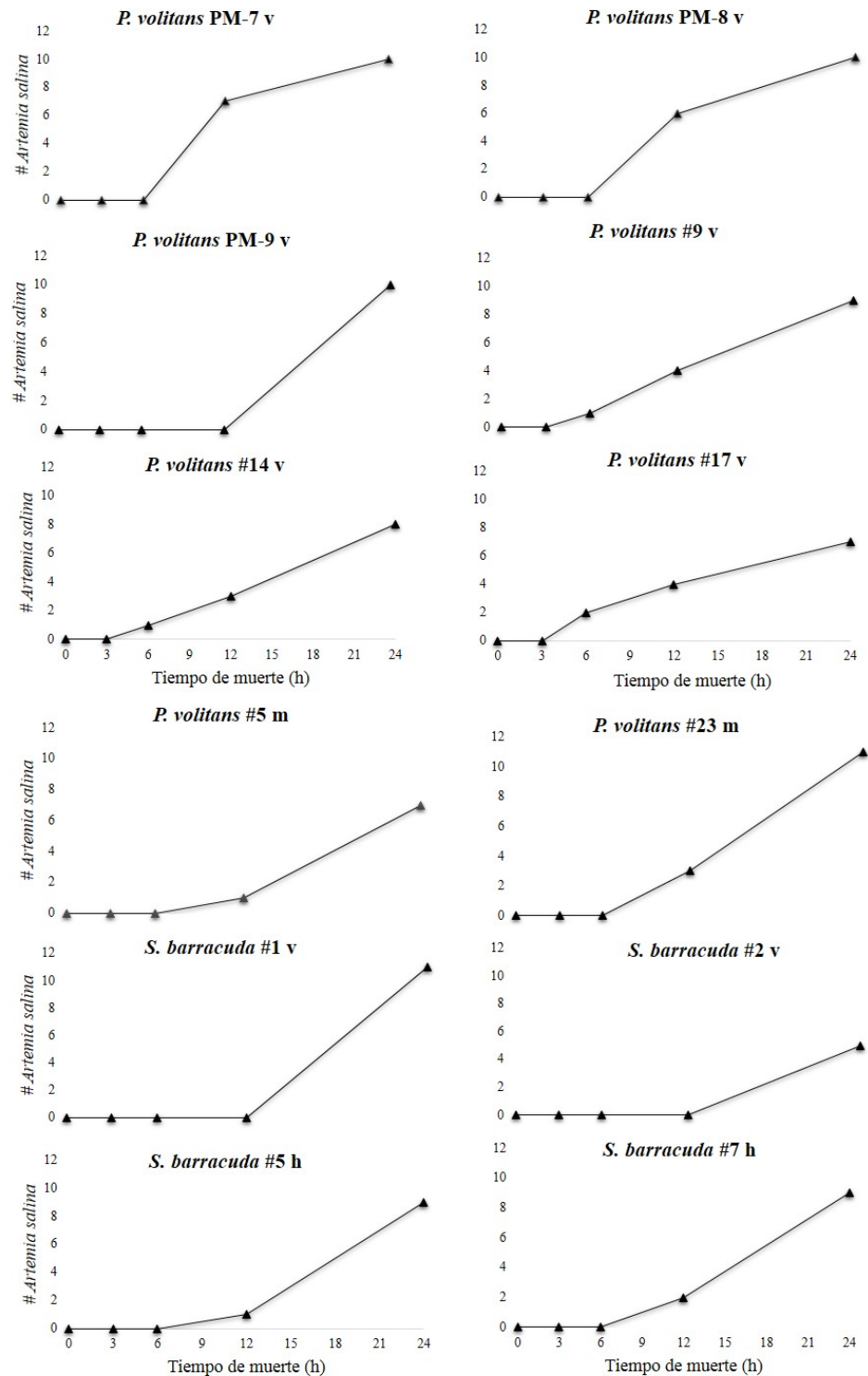


Figura 23. Mortalidad en *A. salina* (adultos) expuestos durante 24 horas (h) a extractos de ciguatoxinas provenientes de vísceras (v) de pez león (*P. volitans*) y barracudas (*S. barracuda*) -incluido hígado (h)- de Quintana Roo.

7.2.3 Evaluación de toxicidad de ciguatoxinas por medio del bioensayo *Vibrio fischeri* (Microtox®)

El ensayo luminimétrico en la bacteria *V. fischeri* es utilizado para monitorear la contaminación ambiental de diversas fuentes como toxicidad en aguas, sedimentos y productos diversos incluidas diversas toxinas acuáticas (Fig. 8).

Los métodos han sido estandarizados e incluidos como protocolos normalizados como DIN (Norma 38412 parte 34), ISO (Norma 11348 parte 1 y SCOFI (NMX-AA-112) en México, como se indica en la metodología.

La presencia de bioluminiscencia por parte de la bacteria *V. fischeri* es el principio en el que se basa esta técnica (apartado 6.3.1.4) y es medido a través de unidades de toxicidad (UT) las cuales determinan si existe o no, algún tipo de toxicidad en la muestra, estos resultados son comparados con una clasificación marcada por la CONAGUA, 2005 (Tabla VIII, Com. pers. Dra. Sandoval-Villasana, IMTA).

Tabla VIII. Clasificación de toxicidad (CONAGUA, 2005).

Unidades de Toxicidad (UT)	Clasificación	Color
$TA \geq 5$	Muy tóxica	Rojo
$1.33 < TA < 5$	Tóxica	Amarillo
$1 \leq TA \leq 1.33$	Moderadamente tóxica	Verde
$TA < 1$	Levemente tóxica	Azul

TA= Toxicidad absoluta

Los resultados que se obtuvieron por medio de esta técnica se muestran en la tabla IX en ella se describen las toxicidades por medio del Microtox® para un lote de nueve muestras evaluadas primeramente por BR, las cuales presentaban entre (<1 a 10 UR, Tablas Va y Vb) y donde se consideró como control negativo el vehículo (solución salina con Tween 60 al 1%). Con base en la clasificación de toxicidad propuesta en la tabla VIII la toxicidad en *V. fischeri* fue muy baja en este análisis y estuvo entre un intervalo de 0.0000058 a 0.000104 UT.

Según los datos registrados por esta prueba la menor toxicidad la presento el extracto de músculo de *S. barracuda* 1 procedente de Campeche, mientras que la más tóxica pertenece a vísceras de *C. nebulosus* de Yucatán.

Tabla IX. Bioensayo en la reducción de la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri* (Microtox®) para muestras de ciguatoxinas de la Península de Yucatán.

No. de muestra	Tipo de extracto	Parámetros	
		<i>Vibrio fischeri</i>	Bioensayo en ratón
		UT	UR
1	<i>S. barracuda</i> 7 hígado, Pto. Juárez/ Quintana Roo.	0.0000115	>5
2	<i>P. volitans</i> 8 vísceras, Isla de Cozumel, Quintana Roo.	0.0000375	>5
3	<i>C. nebulosus</i> vísceras, Dzilam de Bravo, Yucatán.	0.000104	1.93
4	<i>L. synagris</i> 2 vísceras, Dzilam de Bravo, Yucatán.	0.00006225	>5
5	<i>E. morio</i> vísceras San Felipe, Yucatán.	0.0000142	>5
6	<i>S. barracuda</i> #1 músculo Champotón, Campeche.	0.0000058	<1
7	<i>Sphyrna tiburo</i> 2 vísceras Champotón, Campeche.	0.000013	2.5
8	<i>C. hippos</i> 6.5 kg vísceras Campeche, Campeche.	0.000029	>10
9	<i>P. volitans</i> 23 vísceras Isla de Cozumel, Q. Roo.	---	Inocua
10	Control: vehículo (Solución Salina con Tween 60 al 1%).	Toxicidad no detectada	

UR= Unidades ratón; UT= Unidades de toxicidad.

Para el caso de la muestra de pez león 23 (*P. volitans*) procedente de la Isla de Cozumel considerada como inocua por BR, no se detectó tampoco toxicidad por este método.

Al comparar la toxicidad por medio del BR contra Microtox® estas no presentan una tendencia o una relación.

Destaca, como ejemplo la muestra más tóxica por medio de BR (>10 UR) proveniente de un jurel (*C. hippos*) colectado en Campeche, el cual presentó concentraciones de UT muy bajas al ser evaluada por el Microtox®, por lo que no se detectó una relación entre estos dos métodos.

Otro ejemplo inverso se puede observar en la muestra con mayor toxicidad (0.0000058 UT) pertenece a músculo de una barracuda de Champotón, Campeche; siendo una de las muestras con menor toxicidad por BR (<1 UR).

En síntesis se puede señalar que todos los extractos evaluados por Microtox® presentan valores de toxicidad (UT <1); sin embargo al ser comparados con los datos de clasificación de toxicidad (Tabla VIII) estos se encuentran en el intervalo de clasificación más bajo “levemente tóxicas”, tomando en cuenta los resultados obtenidos por el método de BR (método oficial en México), en la mayoría de las muestras la clasificación difiere en su toxicidad.

Al realizar un análisis de correlación entre el BR y el Microtox® (comparando los niveles de toxicidad entre ambos métodos), se obtuvo una correlación muy baja ($r^2 = 0.37$), por lo que se demostró que bajo estas condiciones no existe una relación estadísticamente significativa entre los dos métodos.

Con base en estos resultados se puede describir que en el bioensayo en la reducción de la bioluminiscencia de la bacteria *V. fischeri* (Microtox®), las muestras pueden verse afectadas por otros factores que aún requieren estandarizarse para poder ser utilizado como un método de detección de ciguatoxinas.

7.2.4.-Toxicidad de ciguatoxinas por medio del ensayo de unión a receptores específicos fluorescentes RBA_(F).

Con base a la metodología descrita en el punto 6.3.1.5 los extractos tóxicos de ciguatoxinas que resultaron del BR ($n= 23$) fueron colocados aleatoriamente en el filtro de placa para su posterior lectura en el lector de placas con detector de fluorescencia. Todas se realizaron por duplicado y representadas por una clave; en la columna número “2” se dispusieron las diluciones del estándar de PbTx (controles positivos) desde la concentración más alta a la menor (S1-S5 PbTx), así como el etanol absoluto (control negativo). El arreglo en general está representado en la figura 24.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		S1 PbTx	<i>S. barracuda</i> 2 vís. Camp.	<i>S. barracuda</i> 5 vís. QR.			<i>C. hippos</i> 4 vís. Camp.		<i>C. nebulosus</i> vís. Yuc.			
C		S2 PbTx	<i>C. hippos</i> 3 vís. Camp.	<i>S. tiburo</i> 1 vís. Camp.			<i>O. chrysurus</i> vís. Yuc.		<i>S. barracuda</i> 1 vís. Camp.			
D		S3 PbTx	<i>P. volitans</i> 8 vís QR.	<i>C. hippos</i> 1 vís. Camp.			<i>R. terraenovae</i> vís. Yuc.		<i>C. undecimalis</i> vís. Camp.			
E		S4 PbTx	<i>S. barracuda</i> 3 vís. Camp.	<i>C. hippos</i> 2 vís. Camp.			<i>S. tiburo</i> 2 vís. Camp.		<i>L. synagris</i> 2 vís. Yuc.			
F		S5 PbTx	<i>H. plumierii</i> 1 vís. Yuc.	<i>S. barracuda</i> 7 híg. QR.			<i>L. maximus</i> 2 vís Camp.		<i>H. plumierii</i> 2 vís. Yuc.			
G		Etanol	<i>L. maximus</i> 3 vís Camp.	<i>L. maximus</i> 1 vís Camp.			<i>S. barracuda</i> 7 vís. Camp.					
H												

Figura 24. Arreglo de los controles y muestras problema en la placa para el RBA_(F). S1-S5 PbTx, estándares de brevetoxinas, en diluciones descendentes (controles positivos), diversos extractos de CTX (muestras problema, por duplicado) y etanol (control negativo). híg.= hígado, vís= vísceras, Camp.= Campeche, QR.= Quintana Roo, Yuc.=Yucatán.

Es importante señalar que las cifras de lectura de la fluorescencia obtenidas fueron los promedios de ambas muestras (aplicable solo en los extractos de ciguatoxinas). Las posibles

afectaciones por parte de la fluorescencia natural de las muestras fueron evitadas mediante el calentamiento de las mismas como lo describen Hardison *et al.* (2016) (apartado 6.3.1.5.2).

Tabla X. Curva de brevetoxina (PbTx) estándar por medio de RBA_(F) en microplaca.

Dilución	Concentración (μg de PbTx)	Fluorescencia
1 x	3.6	9.69
1.10	0.9	9.99
1.100	0.1	11.02
1.1000	0.01	11.2

Para determinar la presencia de ciguatoxinas en los extractos problema primero se evaluaron las fluorescencias resultantes en los controles: negativos (etanol) y positivos como una curva estándar de PbTx (Tabla X).

En la tabla XI se puede observar que la mayor fluorescencia pertenece al control negativo (47.75), también se obtuvieron valores pequeños comparados con el control negativo, en donde se puede observar cómo van en aumento conforme la toxicidad de la muestra estándar de PbTx disminuye (Tabla X).

Estos datos fueron contrastados con las fluorescencias obtenidas en nuestros extractos, como se observa en los promedios obtenidos, la mayoría de las fluorescencias son menores a las observadas en la concentración más tóxica de PbTx (3.6 μg de PbTx), lo que concuerda con el principio de este método e indica la presencia de neurotoxinas tipo ciguatoxinas en las muestras.

Cabe señalar que sólo cinco extractos sobrepasan el valor de fluorescencia obtenido del estándar más tóxico de PbTx y se encuentran representadas con el símbolo “ \uparrow ” en la tabla XI, el resto de las muestras ($n= 18$) reportaron cifras menores a las del estándar más tóxico, lo que nos podría sugerir que incluso estos extractos con ciguatoxinas pudiesen ser más tóxicos.

Es decir, todas las muestras presentaron toxicidad por medio de este método, coincidiendo con los resultados de toxicidad en el BR.

Tabla XI. Detección de ciguatoxinas en peces carnívoros de la Península de Yucatán por medio de RBA_(F) en microplaca

No. de muestra	Localidad/ Estado	Clave	Tejido	Fluorescencia Prom. (DS)
1	Champotón/ Campeche	<i>C. hippos</i> 1	Vísceras	8.85 ± 3.30
2	Campeche/ Campeche	<i>C. hippos</i> 2	Vísceras	8.26 ± 2.63
3		<i>C. hippos</i> 3	Vísceras	9.69 ± 0.05
4		<i>C. hippos</i> 4	Vísceras	9.89 ± 2.68↑
5	Champotón/ Campeche	<i>C. undecimalis</i>	Vísceras	7.39 ± 0.42
6		<i>L. maximus</i> 1	Vísceras	7.13 ± 1.79
7		<i>L. maximus</i> 2	Vísceras	6.34 ± 0.27
8		<i>L. maximus</i> 3	Vísceras	8.49 ± 0.46
9		<i>S. barracuda</i> 1	Vísceras	9.55 ± 1.40
10		<i>S. barracuda</i> 2	Vísceras	12.33 ± 0.0↑
11		<i>S. barracuda</i> 3	Vísceras	8.74 ± 0.96
12	Seybaplaya/ Campeche	<i>S. barracuda</i> 7	Vísceras	9.33 ± 0.05
13	Champotón/ Campeche	<i>S. tiburo</i> 1	Vísceras	10.91 ± 2.41↑
14		<i>S. tiburo</i> 2	Vísceras	8.32 ± 1.12
15	Dzilam de Bravo/ Yucatán	<i>C. nebulosus</i>	Vísceras	7.36 ± 0.41
16	San Felipe/ Yucatán	<i>H. plumierii</i> 1	Vísceras	9.88 ± 0.24↑
17	Dzilam de Bravo/ Yucatán	<i>H. plumierii</i> 2	Vísceras	7.36 ± 0.02
18		<i>L. synagris</i> 2	Vísceras	7.29 ± 0.64
19	San Felipe/ Yucatán	<i>O. chrysurus</i>	Vísceras.	7.30 ± 0.36
20		<i>R. terraenovae</i>	Vísceras	8.23 ± 1.89
21	Puerto Juárez/ QR.	<i>S. barracuda</i> 5	Vísceras	11.43 ± 5.41↑
22		<i>S. barracuda</i> 7	Hígado	7.69 ± 2.75
23	Isla de Cozumel/ QR.	<i>P. volitans</i> 8	Vísceras	8.68 ± 0.09
24	Control Positivo	PbTx STD*	---	11.2
25	Control Negativo	Vehículo (EtOH)	---	47.75

Prom= Promedio. (DS= Desviación estándar). *Conc.= 0.01 µg de PbTx. EtOH: Etanol absoluto. ↑= arriba del estándar más tóxico de PbTx.

En la tabla XI se describe la presencia de una muestra de vísceras con clave “*S. barracuda* 2” proveniente de Campeche, esta muestra fue la única que fue clasificada como “concentración subletal” por medio de BR, los resultados de fluorescencia obtenidos demuestran que después de la dilución menos tóxica del estándar de PbTx (11.2) este contiene la mayor lectura de fluorescencia (12.33). Lo que también coincide con el principio de este método.

8. DISCUSIÓN

8.1 Intoxicaciones por ciguatera en el Caribe.

La ciguatera fue utilizado como termino por primera vez por Antonio de Parra en Cuba en el año de 1787, para describir la intoxicación por el consumo de peces, el cual era semejante al descrito para la “cigua” (caracol de la especie *Turbo pica*), que causaba síntomas similares. Se piensa que este término fue pasando a través de los años para designar la intoxicación por peces de arrecife. (FAO, 2005).

Esta intoxicación tiene una mayor incidencia en pequeñas islas, con brotes recurrentes en su parte noreste, abarcando la isla de Puerto Rico, las Islas Vírgenes, Antigua y las Antillas Francesas. En una zona más amplia, esta intoxicación también se encuentra presente en la parte continental de los E.U.A. (de Florida a Texas), así como la parte caribeña de las costas mexicanas en Quintana Roo, en la Península de Yucatán; teniendo una zona recurrente de casos, delimitada al norte por Florida y al sur con la Isla de Martinique (Pottier *et al.*, 2001; Pottier y Vernoux, 2002; Tester *et al.*, 2009; Tosteson, 1995; Villareal *et al.*, 2007).

En países como E.U.A. (Florida y Hawái) y algunos de sus territorios caribeños (Puerto Rico, Islas Vírgenes Americanas), así como las Antillas Francesas es donde existe un mayor número de estudios referidos a la intoxicación por ciguatera (Bourdeau y Bagnis, 1989; Cassadou y Daudens, 2013; Dickey y Plakas, 2010; Dierking y Campora, 2009; Pottier *et al.*, 2001; Tosteson, 1996; Villareal *et al.*, 2007), sin embargo, pocas investigaciones se han realizado *ex profeso* para el Caribe Mexicano y sus aguas adyacentes (Península de Yucatán) para conocer la toxicidad, distribución anatómica de las toxinas , zonas de riesgo, especies de peces implicados, entre otras; La mayoría de los casos conocidos son por intoxicaciones de turistas extranjeros que son diagnosticados con base a su historial clínico en su país de origen (de Haro, 1994; Keynan y Pottesman, 2004; Núñez-Vázquez *et al.*, 2018).

8.2 Ciguatoxinas en Quintana Roo

En Quintana Roo se contó para este estudio con solo dos especies de peces carnívoros; la barracuda (*S. barracuda*) y el pez león (*P. volitans*). Como se muestra en la tabla IV_(a) se describen un total de 41 muestras con diferentes tejidos de peces, donde destacan con concentraciones letales solo tres de ellas (Fig. 13) principalmente en vísceras (incluyen

hígado y gónadas). La barracuda suele ser uno de los principales peces implicados en la ciguatera alrededor del mundo y en el caso del pez león como especie invasora y voraz a lo largo de todo el Caribe, representan dos especies claves de estudiar como vectores de ciguatera en la zona del del Caribe Mexicano y aguas adyacentes en el Golfo de México (Lewis, 2001; Morrison y Akins, 2013; Sabido-Itzá *et al.*, 2016; Schofield, 2009; 2010; Tosteson *et al.*, 1988).

8.2.1 Toxicidad en *S. barracuda*.

En la temática de la ciguatera se ha descrito que el género *Sphyraena* spp es uno de los principales peces involucrados en estas intoxicaciones a nivel mundial (Laurent *et al.*, 2005; Lehane y Lewis, 2000; Lewis, 2001; Pottier *et al.*, 2001, 2003) y en específico dentro del Caribe la gran barracuda (*S. barracuda*) se ha documentado en algunos países como uno de los peces más tóxicos (Bourdeau y Bagnis, 1989; Martínez-Orozco y Cruz-Quintero, 2013; Matta *et al.*, 1999; Vernoux y Talha, 1989; otras referencias en Tabla VI). Los resultados obtenidos en el presente estudio son semejantes a los descritos para otras zonas del Caribe, ya que la mayoría poseen un variable grado de toxicidad (Tablas XII y XIII).

Se analizaron 14 extractos de Quintana Roo, dos de ellos presentaron concentraciones letales (14%), uno en vísceras y otra en una muestra de hígado con 1.67 UR y >5 UR respectivamente (Tabla IV_(a); Fig. 13). Otras 10 muestras presentaron concentraciones subletales (72%), cinco en vísceras, tres en músculo, una muestra de hígado y otra más de gónadas; cabe señalar que las dos últimas pertenecían al mismo organismo. Finalmente sólo dos de los extractos (14%), fueron inocuos, uno de músculo y otro de vísceras, pues no provocaron signos de intoxicación en el BR y pertenecían a diferentes ejemplares (Tabla IV_(a)).

Con el objetivo de confirmar la presencia de ciguatoxinas en este pez se procesaron vísceras (en conjunto y por separado), utilizando principalmente el hígado, ya que este órgano es el encargado de llevar a cabo los procesos de depuración de compuestos tóxicos así como la biotransformación de algunas toxinas marinas, como es el caso de las ciguatoxinas (Holmes y Lewis, 1994; Yasumoto, 1993). En este sentido Matta *et al.* (1999), encontraron una relación significativa de la toxicidad en el hígado de estos peces al relacionar la toxicidad

(concentración de ciguatoxinas) con el proceso de peroxidación de lípidos; concluyendo que este mecanismo juega un papel importante en la biotransformación de estas toxinas.

Debido a las características biológicas de las barracudas se han convertido en un ejemplo de un vector de ciguatera ya que son depredadores tope que juegan un papel importante en los sistemas arrecifales, comparándose con los tiburones (Meyer *et al.*, 2016; O'Toole *et al.*, 2010). Se alimentan de varias especies de peces a lo largo de su tiempo de vida, el cual se ha determinado en alrededor de 14 años, alcanzando tallas de hasta 2 m de longitud (Ayala-Pérez *et al.*, 2015; <http://fishbase.org/summary/Sphyraena-barracuda.html>; <http://www.flmnh.ufl.edu/fish/gallery/descript/greatbarracuda/greatbarracuda.html>), por lo que su tamaño suele ser atractivo para la dieta humana pudiendo alimentar un número grande de personas (O'Toole *et al.*, 2010; Tuz-Paredes *et al.*, 2017).

También considerando la economía y debido al poco territorio con el que cuentan algunos países insulares y ribereños como los del Caribe e islas del Pacífico sur; es importante destacar la preferencia de peces de gran tamaño y con un alto valor proteínico como es el caso de grandes carnívoros, incluida la gran barracuda ya que estos suelen ser una de las pocas formas de adquirir proteína animal (Laurent *et al.*, 2005; Tester *et al.*, 2014).

A pesar de lo anterior la barracuda no solo es utilizada como un recurso pesquero, de hecho en E.U.A. (Florida, Texas), Bahamas (O'Toole *et al.*, 2010; Villareal *et al.*, 2007), e incluso en el Caribe Mexicano (<http://www.pescandoenelcaribe.com/torneos.html>) y el Golfo de México en su parte mexicana (Ayala-Pérez *et al.*, 2015) tiene un mayor aprovechamiento como un recurso natural apreciado en la pesca deportiva.

Otro punto de interés en la investigación sobre la etiología de este síndrome es el estudio de la bioacumulación de las toxinas a través del tiempo de vida de los organismos de gran tamaño, que por tanto podrían acumular una mayor cantidad de estos compuestos haciéndolos más tóxicos, es decir se tiene la idea generalizada de que a mayor talla, mayor tiempo de vida y con ello mayor toxicidad. Sin embargo algunos autores han demostrado que no siempre existe una relación directa ya que, por ejemplo: Bottein-Dechraoui *et al.* (2005), evaluaron la toxicidad del hígado de 40 barracudas (*S. barracuda*), en relación al peso del organismo mediante ensayos en citotoxicidad (neuroblastoma N2A), encontrando que una de

las barracudas más tóxicas (aprox. 1.8 ng/g C-CTX-1) solo pesaba 2.1 kg, mientras que la barracuda de mayor peso (15 kg) no presentó toxicidad.

En Texas y Florida, Villareal *et al.* (2007), utilizaron una metodología similar, pero con la mitad del número de muestra ($N=20$); se evaluó el músculo de *S. barracuda* y encontraron la mayor toxicidad (0.14 ng/g C-CTX-1) en un espécimen de apenas 5.7 kg; mientras que una con la mayor talla (15.2 kg) presentó actividad por debajo de los niveles cuantificables. Por último, en un estudio más reciente realizado por O'Toole *et al.* (2012), evaluaron 38 organismos de *S. barracuda* de los cuales se obtuvieron diversos tejidos (hígado, músculo y sangre). Las mayores toxicidades (167.77, 98.83 y 211.74 pg/ TE -picogramos por tejido de pez-), se encontraron en organismos de diferentes tallas: 80, 84 y 94 cm respectivamente. En este estudio se destaca que los organismos de mayor (120 cm) y menor (60 cm) tamaño no presentaron registros de toxicidad por lo que se describe que la toxicidad en este estudio fue azarosa y no tiene relación con el peso.

De Sylva (1994), corrobora que una de las especies más tóxicas, además de señalar factores antropogénicos (sobrepoblación de las costas) y naturales (huracanes) como posibles causas para que las barracudas adquieran cierta toxicidad en esta zona. Aunado a esto O'Toole *et al.* (2010), reportan que puede llegar desplazarse más de 12 km en un solo día e incluso es capaz de migrar más de 100 km. Lo que sugiere que las investigaciones deben considerar también (entre otros aspectos) a los hábitos de la especie en estudio en la búsqueda de la(s) posible(s) zona(s) de adquisición de las toxinas a través de las cadenas tróficas (Gaboriau *et al.*, 2014; Ley-Martínez, 2016; Olsen *et al.*, 1984; Pottier *et al.*, 2001).

En este sentido, Villareal *et al.* (2007), estudiaron las migraciones de diferentes barracudas, a través de la captura de organismos previamente marcados los cuales fueron recuperados durante diferentes años alrededor del noreste del Golfo de México especialmente las costas de Florida y Texas, lo que les llevó a plantear nuevas hipótesis sobre la ecología y adquisición de las toxinas en estas zonas.

Tabla XII. Toxicidad de barracudas (*Sphyraena* spp) asociadas a la ciguatera en el Mar Caribe y otras regiones del mundo.

Especie	Toxicidad (UR o μg de CTX eq. por kg de tejido)	País (Localidad)	Referencia
<i>S. barracuda</i>	Músculo: 15 UR	Francia (Saint Berthélémy, Antillas Francesas)	Vernoux <i>et al.</i> (1986)
<i>S. barracuda</i>	Músculo: 0.53-1.78 UR Cabeza + víscera: 0.25-1.6 UR Hígado: 1.94 UR Vesícula biliar: 2.89 UR	Puerto Rico (sudeste)	Tosteson <i>et al.</i> (1988)
<i>S. barracuda</i>	Músculo: 1.31 UR	Francia (Saint Berthélémy)	Vernoux (1988)
<i>S. barracuda</i>	1-2 UR	Francia (Antillas Francesas)	Vernoux y Lejeune (1994)
<i>S. barracuda</i>	Hígado: ≥ 0.5 UR	Francia (Guadaloupe y Saint Berthélémy)	Pottier y Vernoux (2002)
<i>S. barracuda</i>	Músculo: 15 UR	Francia (Guadaloupe)	Pottier <i>et al.</i> (2003)
<i>S. barracuda</i>	Hígado 2.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	E.U.A. (Florida)	Bottein-Dechraoui <i>et al.</i> (2005)
<i>S. barracuda</i>	Músculo 0.14 $\mu\text{g}/\text{kg}$	E.U.A. (Texas)	Villareal <i>et al.</i> (2007)
<i>S. barracuda</i>	Músculo-crudo 2.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Músculo-cocido 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$	E.U.A. (Massachusetts)	Abraham <i>et al.</i> (2012)
<i>S. barracuda</i>	Hígado 4.96-167.77 pg/g Músculo 2.51-98.83 pg/g Sangre 3.07-211.74 pg/g	Bahamas (Cabo Eleuthera)	O'Toole <i>et al.</i> (2012)
<i>S. barracuda</i>	Hígado >5 UR Vísceras 1.67 UR	México (Q. Roo)	Ley-Martínez <i>et al.</i> (2014); este estudio

Especie	Toxicidad (UR o μg de CTX eq. por kg de tejido)	País (Localidad)	Referencia
<i>S. barracuda</i>	Hígado 1.93-1.1 UR [◇] Músculo >10-1.42 UR	México (Veracruz)	Barra-González <i>et al.</i> (2017)
<i>S. barracuda</i>	Concentraciones Subletales*	México (Isla Mujeres, Q. Roo)	Tuz-Paredes <i>et al.</i> (2017)
<i>S. jello</i>	Músculo: 0.23 UR Viscera: 1.7 UR	Australia (Queensland)	Lewis y Endean (1984)
<i>S. putnamiae</i>	Músculo 11.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Australia (Queensland)	Stewart <i>et al.</i> (2010)
<i>S. putnamiae</i>	Músculo (pez) e hígado (humano) 0.14 $\mu\text{g}/\text{kg}$	Australia (Queensland)	Hamilton <i>et al.</i> (2010)

*= Concentraciones subletales, por BR los organismos presentaron signos de toxicidad pero no murieron.

◇= Plataformas petroleras.

Con base a lo descrito en otros estudios (citados en la Tabla XII; ej. Abraham *et al.*, 2012; Hamilton *et al.*, 2010; Tosteson *et al.*, 1988), así como los resultados obtenidos en el presente trabajo es importante puntualizar que es clave evitar el consumo de vísceras de peces de esta zona; ya que solo uno de los diez extractos de vísceras de *S. barracuda* obtenidos en la entidad, no presento signos clínicos de toxicidad por medio del BR; lo que confirma que existe una mayor probabilidad de detección de ciguatoxinas en este tipo de tejidos (Tosteson *et al.*, 1988). Debido a las pocas muestras letales en el BR detectadas en este trabajo, no se pudieron correlacionar la toxicidad con el peso de los organismos si podemos concluir que las vísceras presentan un mayor grado de toxicidad que el tejido muscular (Jiang *et al.*, 2012). Puerto Rico es uno de los lugares en los que se han realizado más investigaciones en el Caribe para el estudio de la ciguatera en la zona, respecto al uno de las barracudas como organismos clave, en un primer estudio Tosteson *et al.* (1988), obtuvieron 219 organismos de *S. barracuda* que tenían pesos entre 5 y 10 kg, obtenidos durante un periodo de dos años. Los resultados obtenidos por estos autores describen que en el 29% de los organismos fueron tóxicos en el BR (Tabla XII). De este porcentaje el 60-70% corresponden a periodos que van de enero-mayo y agosto-diciembre. Un segundo estudio por Tosteson (1996), demostró que

durante el primer periodo del año (febrero-abril) hay una tendencia a que los organismos estén tóxicos, al igual que durante los meses de agosto a diciembre. Sin embargo, estos resultados difieren con los encontrados por Villareal *et al.* (2007), quienes detallan que las barracudas más tóxicas fueron detectadas en junio y julio, con un ejemplar para cada mes respectivamente, resaltando que no parece haber una estacionalidad con respecto a la toxicidad en este organismo.

Posteriormente en 1998, Tosteson *et al.* observaron la relación del aumento de la temperatura del mar y las proliferaciones de dinoflagelados bénticos como *Ostreopsis lenticularis*, así como posible efecto en la toxicidad de las barracudas; en un primer intento por determinar que los cambios en la temperatura del mar pudieran generar una mayor producción de toxinas por parte de los dinoflagelados y de ahí al resto de la red trófica como los grandes carnívoros. Sin embargo, otros parámetros oceanográficos no fueron considerados durante esta investigación. Posteriormente Tester *et al.* (2010) describieron una posible relación entre el aumento de la temperatura superficial del Mar Caribe y el Golfo de México, con el aumento en la tasa de crecimiento de seis especies de *Gambierdiscus*.

Los trabajos anteriores y algunos citados en la tabla XII (ej. Lewis y Endean, 1984; Vernoux *et al.*, 1986; Pottier *et al.*, 2003), son prueba de la toxicidad de este organismo, es por ello que algunos países como Australia (Lehane y Lewis, 2000), E.U.A. (De Sylva, 1994; Pottier *et al.*, 2003) la Isla de Reunión y la Polinesia Francesa (Laurent *et al.*, 2005), entre otros, han promulgado leyes para la prohibición del consumo de esta especie en particular, debido a la elevada incidencia de casos de ciguatera por el consumo de este pez, colocándolo como un pez ícono de esta intoxicación, sobre todo hablando de tallas de gran tamaño, donde incluso O'Toole *et al.* (2010), destacan que durante los eventos deportivos los pescadores suelen evitar su consumo.

En la Península de Yucatán y especialmente el Caribe mexicano existe un escaso estudio en el tema, aun cuando es un problema recurrente y relativamente frecuente durante todo el año, en donde la barracuda es consumida en diversos platillos, algunos incluso típicos de la región, lo que nos habla de una tradición en su consumo (Ley-Martínez *et al.*, 2014; Núñez-Vázquez *et al.*, 2018; Tuz-Paredes *et al.*, 2017).

En los últimos años la Secretaría de Salud a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en Quintana Roo, ha prohibido la comercialización de la barracuda y realiza inspecciones periódicas en los lugares de compra-venta de productos del mar, verificando que no se comercialice este tipo de peces, poniendo sanciones y retirando del mercado a la barracuda (Ley-Martínez *et al.*, 2014; Núñez-Vázquez *et al.*, 2018; Tuz-Paredes *et al.*, 2017), sin embargo su consumo se encuentra muy arraigado entre la población residente por lo que sigue existiendo un comercio ilegal en esta entidad y en otras regiones de la Península de Yucatán, en donde se han documentado casos de ciguatera (Núñez-Vázquez *et al.*, 2018).

8.2.2 Toxicidad en el pez león (*Pterois volitans*).

El pez león es nativo de los Océanos Índico y Pacífico, fue introducido en aguas del Caribe y se extendió por el Océano Atlántico (Morrison y Akins, 2013). Apareció por primera vez en 1985 cerca de las costas de Florida, E.U.A. (Morrison y Akins, 2013; Schofield, 2009; 2010). A la fecha su dispersión a lo largo de esta zona ha ido en aumento, por lo que ha sido considerada como una especie invasora, de las más dañinas en los últimos tiempos, debido al daño provocado por su impacto en las poblaciones de peces nativos de los arrecifes del Caribe. Sus primeros avistamientos en México se registraron en el 2009, en las cercanías del Parque Nacional Arrecifes Alacranes, al norte de la Península de Yucatán (Aguilar-Perera y Tuz-Sulub, 2010), y en el año 2012 otro registro cerca de las costas de Veracruz en el arrecife “Anegada de Adentro” (Santander-Monsalvo *et al.*, 2012).

Debido a sus características biológicas tales como: rápido crecimiento, maduración temprana, alimentación voraz y de variadas presas; es una especie invasora con una rápida expansión a lo largo del Océano Atlántico y Mar Caribe (Morrison y Akins, 2013; Robertson *et al.*, 2014; Soliño *et al.*, 2015). Puede consumir hasta el 4% de su peso corporal con presas que van desde invertebrados hasta pequeños peces arrecifales de variadas familias (Gobiidae, Labridae, Pomacentridae, Serranidae, entre otras; Morrison y Akins, 2013). Los alcances de su impacto permanecen inciertos y se encuentra en constante estudio (Aguilar-Perera, 2012; Diller *et al.*, 2014; Ley-Martínez *et al.*, 2014; Morris y Akins, 2013).

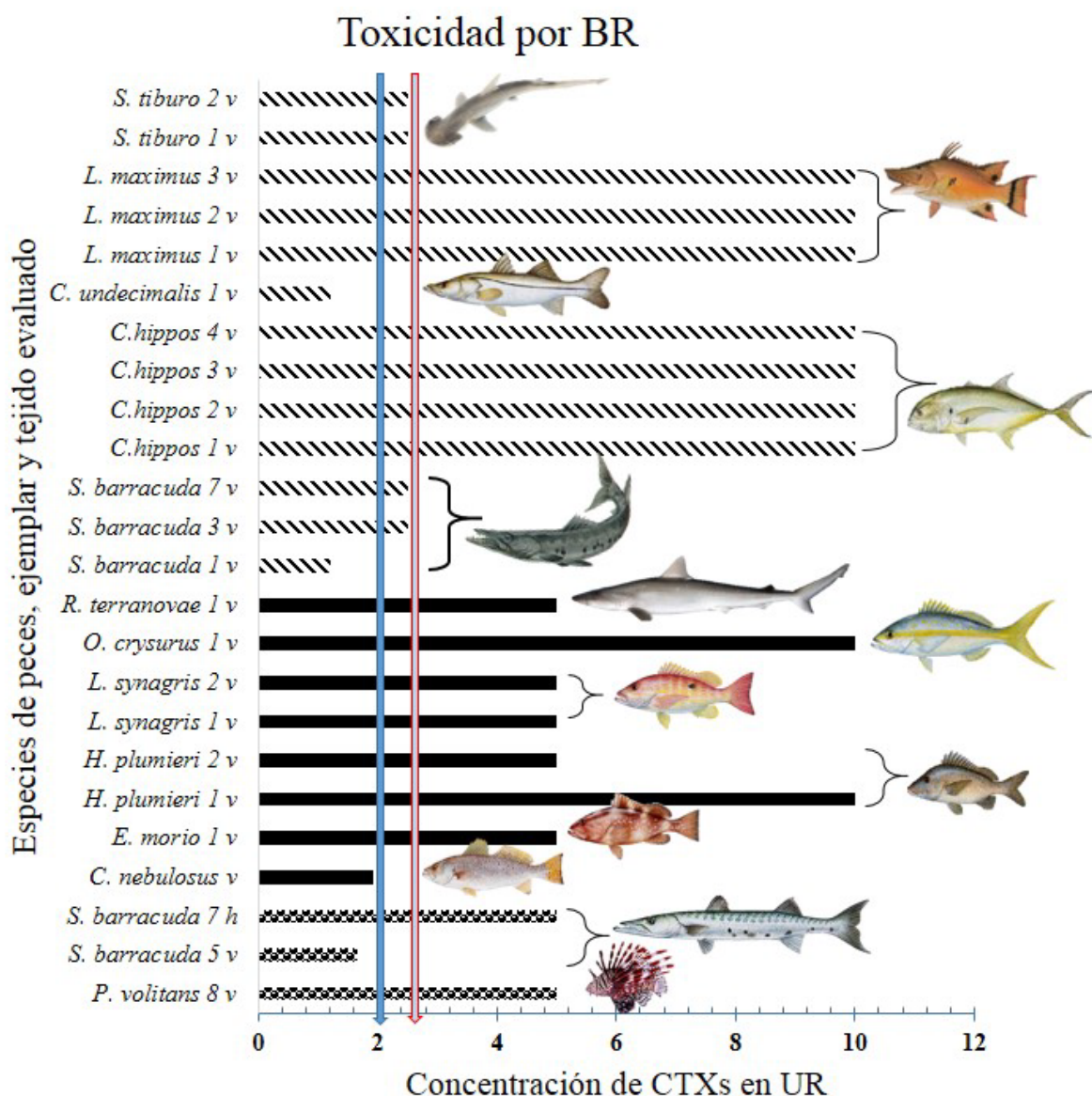


Figura 25. Concentraciones letales en bioensayo en ratón. La toxicidad esta expresada en unidades ratón (UR). Se encuentran representadas las especies que mostraron una dosis letal por este método en los tres estados de la Península: Campeche ($n=13$; barras diagonales), Quintana Roo ($n= 3$; barras con puntos negros); Yucatán ($n= 8$; barras oscuras). La flechas representan el límite máximo permisible (LMP) internacional en azul (FDA, 2011; $0.1 \mu\text{g}$ de C-CTX-1 o 2 UR/100g). Nacional en rojo (NOM242-SSA-1; 2.5 UR/100g). UR= 5 ng de CTX. h= hígado, v= vísceras.

Con base en lo anterior, se han establecido programas de manejo y control de la población para contener la invasión del pez león desde el 2010; mediante algunas de las estrategias que se han establecido para poder disminuir la amenaza, entre estas se encuentra la divulgación

y fomento de su consumo, ejemplo de ello son la Isla de Cozumel y Pto. Morelos, Quintana Roo (Aguilar-Perera, 2012; CONANP, 2012; Morris y Akins, 2013; Soliño *et al.*, 2015).

Las características biológicas descritas hacen del pez león un posible candidato para ser un vector de ciguatera en el Caribe (Ley-Martínez *et al.*, 2014; Litaker *et al.*, 2014; Robertson *et al.*, 2014).

Es por ello que en este estudio junto con un estudio previo (Ley-Martínez, 2016), se realizaron recolectas de peces león (*P. volitans*) a lo largo de la Península de Yucatán en Quintana Roo y Yucatán durante el año 2013 con un total de 40 muestras (músculo $n=19$; vísceras $n=21$).

Cabe señalar que durante la extracción de las muestras, estas fueron separadas en su totalidad en vísceras y músculo y los resultados obtenidos en este apartado fueron solo a través del BR. Las concentraciones de toxinas obtenidas para el pez león fueron en su mayoría inocuas (50%), ya que los ratones no presentaron signos clínicos de intoxicación (Tabla IV_(a)).

De los 40 extractos (de Quintana Roo y Yucatán), 19 fueron los que presentaron actividad en el BR, mostrando signos característicos producidos por ciguatoxinas (Tabla V) por periodos cortos y/o largos; sin embargo en ninguno fue letal (Tabla IV_(a)), por lo que estas muestras fueron catalogadas como concentraciones subletales (47.5%). La muestra restante perteneciente a las vísceras de un pez león de talla mayor (1130 g) proveniente de la Isla de Cozumel, Q. Roo, fue la única que presentó concentraciones letales (>5 UR; Fig. 25), los signos clínicos presentados por esta muestra se detallan en la tabla IV_(a).

De los 40 extractos de pez león, 13 pertenecen a Yucatán, en estas muestras se registraron concentraciones subletales de ciguatoxinas tanto en músculo ($n=5$) como en vísceras ($n=4$) con pesos totales de 181.6 a 1040.6 g (Tabla IV_(a)).

Los primeros estudios sobre ciguatera en el pez león del Caribe, fueron realizados por Robertson en el 2010, en el describe la presencia de ciguatoxinas en cuatro de siete organismos recolectados en las Islas Vírgenes Americanas (Lewin, 2010), sin embargo los primeros reportes donde se propone evitar el consumo esta especie fueron descritos por la asociación “St. Marteen’s Nature Foundation” (McFadden, 2011; Nature Foundation St. Marteen, 2011) en aguas de la Isla de San Martín y sus alrededores como las Islas Vírgenes Americanas y las Antillas Francesas. En un estudio donde se recolectaron 186 peces león, 74

fueron analizados, registrando niveles de toxicidad por arriba de la regulación de la FDA (0.1µg/kg equivalentes de C-CTX-1 ó 2 UR) en el 26% de las muestras (McFadden, 2011). Cabe señalar que esta área de estudio en el Caribe se ha reportado por varios autores como una zona de alta incidencia de ciguatera, donde se han reportado altos niveles de ciguatoxinas en diferentes especies de peces (Bourdeau y Bagnis, 1989; Brody, 1971; Olsen *et al.*, 1984; Pottier *et al.*, 2001).

Cabanillas y Davin (2012), midieron de manera cualitativa la toxicidad de 20 peces león en las Islas Caimán, por medio de bioensayo en *Artemia salina*, utilizaron una mezcla de tejidos (50-50 vísceras/músculo), donde encontraron actividad significativa en solo tres peces (15%; Tabla XIII).

Un estudio más detallado fue elaborado por Robertson *et al.* (2014), en las Islas Vírgenes Americanas (Brody, 1971; Olsen *et al.*, 1984; Sylvester *et al.*, 1977). Durante la investigación se analizaron 153 tejidos musculares de peces león por medio de bioensayo *in vitro* de citotoxicidad en neuroblastoma de ratón (N2A), encontrando niveles de ciguatoxinas en el 40% , de las muestras, de las cuales el 12% excedía el límite establecido por la FDA, con concentraciones máximas de 0.3 µg/kg en peces león del sur de la Isla de Santo Tomás, a los cuales se les confirmó la presencia de C-CTX-1 y C-CTX-2, por medio de métodos analíticos (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a detección por Espectrometría de Masas HPLC-MS). Siendo este el primer estudio que fortaleció la hipótesis que incluye al pez león como un potencial vector de ciguatera; sin embargo, los autores hacen énfasis en que no poseen evidencia para decretar riesgo por ciguatera en zonas de baja incidencia.

En las Antillas Francesas Soliño *et al.* (2015), utilizaron el bioensayo *in vitro* N2A para evaluar tejidos musculares de: 30 peces león de la parte norte y otros 30 de la parte sur de la Isla de Guadalupe, así como cinco más de la Isla de San Martin, ninguna de las muestras mostró toxicidad. Sumados a los anteriores, otros 55 peces fueron obtenidos de la Isla de San Barthélémy donde el 49% fueron positivos para ciguatoxinas, mostrando una toxicidad de hasta 0.3 µg/kg equivalentes de P-CTX-1(Tabla XIII); de los cuales el 40% excedía los límites máximos permisibles de P-CTX (0.01 µg/kg equivalentes de P-CTX-1), propuestos por la FDA (FDA, 2011; 2013). Al igual que el trabajo anterior la presencia de C-CTX-1 fue confirmada por medio de métodos analíticos (HPLC-MS). Los niveles de toxicidad más

elevados durante este estudio en San Barthélémy, son comparables con las zonas de alta incidencia de ciguatera, de la misma manera esta zona del Caribe ha sido estudiada y evaluada debido a reportes de peces ciguatos (Pottier y Vernoux, 2002; Vernoux, 1988; Vernoux *et al.*, 1986).

Tabla XIII. Toxicidad de pez león (*P. volitans*) asociadas a la ciguatera en el Mar Caribe y aguas adyacentes.

Especie	Toxicidad (UR o µg de CTX por kg de tejido)	País (Localidad)	Referencia
<i>P. volitans</i>	Nd*	Reino Unido (Islas Caimán)	Cabanillas y Davin (2012).
<i>P. volitans</i>	Músculo 0.3 µg/kg	E.U.A (Islas Vírgenes)	Robertson <i>et al.</i> (2014).
<i>P. volitans</i>	Vísceras >5UR	México (Isla de Cozumel, Quintana Roo)	Ley-Martínez <i>et al.</i> (2014); Ley-Martínez (2016).
<i>P. miles/ P. volitans</i>	Músculo 0.1-0.2 µg/kg	Caribe central	Litaker <i>et al.</i> (2014).
<i>Pterois</i> sp.	Músculo 0.005-0.333 µg/kg	Antillas Francesas	Soliño <i>et al.</i> (2015).
<i>P. volitans</i>	Músculo >10-1.93 UR	México (Veracruz)	Barra-González (2016).

*Nd= No determinado, análisis cualitativo en ensayo en *Artemia salina*.

Con base en los estudios anteriores, la FDA en el año 2013, incluyó al pez león en su listado de peces por riesgo de contraer ciguatera (FDA, 2013; Tester *et al.*, 2014); sin embargo, a pesar de esto, no hay reportes de ciguatera por su consumo en el Caribe. Conforme a los programas establecidos a lo largo del Caribe, países como Bermudas, Islas Caimán, Jamaica y Puerto Rico tienen libre el consumo y comercio de esta especie; hasta el momento solo la Isla de Santo Tomás (Islas Vírgenes Americanas), ha decidido prohibir el consumo de pez león debido a los altos niveles de ciguatoxinas detectados en la zona y las recomendaciones para la Isla de San Martín son de no consumirlo por sus antecedentes de ciguatoxinas con otras especies de importancia comercial (GCFINET Archives, 2012).

Por otro lado, aunado a esto, Soliño *et al.* (2015), determinan que el manejo de la especie en San Barthélémy debe de ser considerado con respecto a los estudios realizados y en el caso de San Martín no se debe subestimar la presencia de estas toxinas, debido al pequeño número de muestras que se analizaron. Estos resultados son comparables con los realizados por Litaker *et al.* (2014), en la parte central del Caribe en las que pudieron determinar que los peces de las zonas circundantes a las Islas Vírgenes y las Antillas Francesas eran los que presentaban una mayor toxicidad (Tabla XIII).

En el caso de México los primeros hallazgos de la presencia de ciguatoxinas en el pez león son descritos por Ley-Martínez *et al.* (2014), en el que se describen signos de neurotoxicidad por medio del BR y concentraciones letales en las vísceras de un ejemplar colectado en la Isla de Cozumel (Tablas IV_(a) y XIII). En otro estudio reciente, realizado por Barra-González (2016), se reportó también la presencia de ciguatoxinas en concentraciones letales (10 UR), incluso en el músculo de esta especie (Tabla XIII), en ejemplares colectados en los arrecifes de Tuxpán, Veracruz en el Golfo de México. Este caso, es de interés en salud pública para esa zona y ejemplifica la importancia de la realización de estudios toxicológicos por zona, aún más, cuando en esa entidad, (al igual que en Quintana Roo) también se ha promovido el consumo de estos peces como medida de control poblacional de esta especie invasora.

Estos resultados, además de generar información básica sobre las zonas de riesgo en nuestro país, pueden contribuir a que esta especie se pueda llegar a utilizar como una especie centinela para el monitoreo de zonas de riesgo por ciguatera en el Caribe Mexicano y aguas nacionales del Golfo de México, ya que como señalan Soliño *et al.* (2015), el pez león es un organismo que al alcanzar la madurez se mantiene a fiel a un sitio.

8.3 Ciguatoxinas en Yucatán

La mayor diversidad de peces utilizados en este estudio fueron de Yucatán, en la que se obtuvieron (Fig. 5, Tabla IV_(a)), un total de 25 extractos, en su mayoría vísceras ($n= 18$) y algunas muestras de músculo principalmente de pez león ($n= 6$), incluyendo también una de barracuda, de los cuales el mayor porcentaje corresponden a muestras con concentraciones subletales (44%), seguidas de muestras con concentraciones letales (32%) y 24% fueron inocuas (Fig. 12).

De los 25 extractos, ocho resultaron ser letales en el BR, las mayores concentraciones fueron arriba de las 10 UR, estos registros pertenecen a un chac-chí (*H. plumierii*) y un pargo canané (*O. chrysurus*) ambos procedentes de San Felipe en Yucatán. Concentraciones letales, mayores a 5 UR fueron registradas en cinco muestras: dos ejemplares de rubias (*L. synagris*), un chac-chí, un mero (*E. morio*) y las vísceras de un cazón (*R. terraenovae*), estas muestras provienen de dos localidades diferentes en Yucatán (Dzilam de Bravo y San Felipe; Tabla IV_(a)). Por último una corvina (*C. nebulosus*) de Dzilam de Bravo también presentó concentraciones letales (1.97 UR, Figs. 13 y 25). De la muestra de “cazón” se logró realizar un extracto con el hígado que presentó concentraciones subletales, del mismo modo la mayoría de las muestras de pez león tanto el músculo ($n=5$) como de vísceras ($n=4$).

Dentro de las muestras inocuas destacan peces que han sido relacionados con intoxicaciones de ciguatera, un mero y una cojinuda (*Caranx* sp.) de Dzilam de Bravo, así como vísceras ($n=3$) y un músculo de pez león del mismo sitio (Tabla IV_(a)).

Debido a que estas muestras fueron proporcionadas ya disectadas, no fue posible registrar su peso y talla para poder evaluar la relación peso contra toxicidad.

Schoelink *et al.* (2014), señalan que de las 163 especies de serranidos (cabrillas y meros), 29 son consideradas como peces “ciguatericos” en el mundo, la familia Serranidae incluido el género *Epinephelus* ha sido descrito como un vector recurrente de ciguatera, en aguas del Mar Caribe, así como Islas Vírgenes Americanas y las Antillas Francesas (Brody, 1971; Pottier *et al.*, 2001; Pottier y Vernoux, 2002).

En Asia, Chan (2014; 2015) y Mak *et al.* (2013), reportaron como tóxico a este género en China y en la República del Kiribati respectivamente; la especie *E. spilotoceps* resultó ser el segundo pez más tóxico (de un centenar de muestras analizadas) en un estudio detallado de la transferencia y bioacumulación de ciguatoxinas en la red trófica del Atolón de Marakei (situado en este país insular). Adicionalmente otras cinco especies (*E. coeruleopuntatus*, *E. fuscoguttatus*, *E. multinotatus*, *E. polyphkadion* y *E. tauvina*) también presentaron concentraciones importantes de ciguatoxinas. El perfil toxinológico de estas especies estuvo integrado con P-CTX-1, como componente principal seguido de P-CTX-2 y 3. Del mismo modo, algunos autores y autoridades sanitarias países como E.U.A. a través de la FDA han señalado sobre el riesgo de ciguatera por el consumo de peces del género *Epinephelus* así

como *Mycteroperca* en algunas regiones en donde estas toxinas se han detectado (FDA, 2013; Tester *et al.*, 2014).

En el Pacífico, múltiples países isleños como Australia, Nueva Caledonia y la Polinesia Francesa, entre otros, han restringido el consumo de peces de la familia Serranidae, e incluso prohibido el comercio de estas especies desde ya varias décadas (Laurent *et al.*, 2005; Schoelinck *et al.*, 2014).

En México, especialmente en la parte sur de la Península de Baja California otras especies de la familia Serranidae han causado ocasionalmente graves intoxicaciones humanas asociadas a la ciguatera (Núñez-Vázquez *et al.*, 2018).

Barton *et al.* (1995) y posteriormente Lechuga-Devéze y Sierra-Beltrán (1995), reportaron dos eventos de ciguatera en las tripulaciones de barcos pesqueros por el consumo de cabrillas (Serranidae), de las cuales fue confirmada la presencia de ciguatoxinas por medio de BR (Núñez-Vázquez, 2005; Núñez-Vázquez *et al.*, 2009).

En la Isla El Pardito y Punta San Evaristo, al norte de la Bahía de La Paz entre 1993 y 1997 cinco casos de intoxicación fueron registrados por el consumo de hígado de peces de las familias Serranidae y Lutjanidae. Los síntomas que presentaron los intoxicados fueron semejantes con los de la intoxicación por ciguatera. Entre las especies de peces carnívoros involucradas fueron *Epinephelus labriformis* y *Mycteroperca prionura* (Serranidae); así como *Lutjanus* sp. y *Lutjanus colorado* (Lutjanidae; Núñez-Vázquez *et al.*, 1996; 1997; 2009).

Respecto a la familia Lutjanidae, en el Caribe algunas especies han sido consideradas de suma toxicidad como *L. analis*, *L. bucanella*, *L. griseus*, *L. jocu*, *L. synagris*, entre otras (Brody, 1971; Olsen *et al.* 1984; Pottier *et al.*, 2001; Pottier y Vernoux, 2002).

Laurent *et al.* (2005) señalan a *Lutjanus bohar* como una de las especies más tóxicas vector de ciguatera, ha sido prohibida en algunos países insulares como Australia, Kiribati, Mauricio, Polinesia Francesa, entre otros, así como otras especies de la misma familia como *L. argentimaculatus*, *L. fulvus*, *L. gibbus*, *L. monostigma*, entre otros, dentro de las islas del Pacífico Sur.

La ciguatoxicidad en la familia Lutjanidae ha sido considerada en muchos de estos países en este sentido cabe señalar que *L. sebae*, fue el organismos de donde se pudieron identificar las ciguatoxinas del Índico (I-CTX-1, 2, 3, 4; Hamilton *et al.*, 2002 a; b).

Alrededor del mundo también se consumen otros grandes carnívoros como son los tiburones, debido a su alto nivel en las redes tróficas, suelen acumular una serie de diferentes compuestos que almacenan en sus tejidos, por lo que no es de extrañarse que existan registros de intoxicación por su consumo, en diversas localidades desde hace décadas (Meyer *et al.*, 2016). En este sentido, han sido catalogados como ciguatóxicos después de una intoxicación por el consumo de tiburón toro (*Carcharinus leucas*) en Madagascar (Boisier *et al.*, 1995 Habermehl *et al.*, 1994). En este caso se había especulado este caso se describió a un tipo particular de ciguatoxinas (más oxidadas) a las que se les llamó charcatoxinas, como las responsables del brote, especulado, la presencia de este tipo de toxinas. Recientemente, un estudio detallado describió y confirmó su presencia (Diogène *et al.*, 2017). En este estudio, realizado en el mismo país insular, se registraron dos nuevos análogos de la I-CTX (I-CTX-5 y 6); siendo esta la primera vez que se cuenta con un estudio detallado de las ciguatoxinas en tiburones. En este caso de la familia Carcharinidae, la misma familia de tiburones, que en el presente estudio se detectaron ciguatoxinas en ejemplares de peces de la Península de Yucatán, región en donde su consumo es común (DOF, 2010; Tabla IV_(a), Fig. 25).

Algunas de las muestras procesadas (en este estudio) se encuentran en lista de peces ciguatos capturas por parte de la Isla de Santo Tomás (Islas Vírgenes Americanas); en el registro elaborado por Olsen *et al.* (1984) compiló y clasificó la toxicidad de los peces de la siguiente forma: del pez menos al más tóxico; donde los peces *L. synagris* y *O. chrysurus* como peces raramente tóxicos; seguido de *H. plumierii* especie que aparece como poco frecuente en las intoxicaciones; mientras que *E. morio* parece ser un organismo con una frecuencia más alta, al igual que algunos peces taxonómicamente cercanos al pez león, como es el caso del pez piedra (*Scorpaena plumierii*); por último en esta lista destaca la barracuda (*S. barracuda*) y algunas especies del género *Caranx* como las especies que presentan un alto grado de toxicidad, la presencia de elasmobranquios en este estudio parece ser pobre y las dos especies registradas fueron catalogadas como raramente tóxicas.

En el párrafo anterior se describe lo que ya otros autores como Tosteson *et al.*, (1988, 1995), Dickey *et al.* (1994), Rosine *et al.* (2008), Cassadou *et al.* (2013), reportan en el Caribe por las intoxicaciones de ciguatera, las cuales se presentan principalmente por consumo de barracudas (*S. barracuda*) y jureles (*Caranx* spp.); sin embargo cabe resaltar que (en este estudio) las muestras de cojinuda (*Caranx* sp.) en el estado de Yucatán no presentaron signos de la presencia de ciguatoxinas, aunque si en el estado de Campeche (descrito más adelante); mientras que la mayoría de la muestras tóxicas pertenecen a chac-chí, pargo canané y rubia (Fig. 25).

Solo se pudo conseguir una muestra de músculo de barracuda (*S. barracuda*) en Yucatán, el cual mostro signos clínicos de ciguatoxinas en el BR, pero en concentraciones subletales (<1 UR, Tabla IV_(b)). Por lo que se sugiere el análisis de más muestras de esta especie. Ya que como se puede observar en el caso de Campeche (con un mayor número de muestras) se detectaron varias positivas (Fig. 25).

Es importante señalar que en la evaluación toxinológica de vísceras permite obtener un primer indicio de la presencia de ciguatoxinas por ser particularmente el hígado de bioacumulación y transformación de estos compuestos (Jiang *et al.*, 2012).

Como se observa en la figura 25, un número considerable de muestras en Yucatán presentaron concentraciones letales, sobrepasando el límite máximo permisible de la Norma Mexicana (NOM242-SSA-1-2009) equivalente a 2.5 UR, ($n= 7$), así como las Normas Internacionales propuestas por la FDA de 2 UR (FDA, 2011; 2013).

En Yucatán, sobresalen San Felipe y Dzilam como puertos pesqueros donde se encuentran pesquerías de especies como chac-chí (*H. plumierii*), cojínudas y jureles (*Caranx* spp), meros (*Epinephelus* spp), pargo canané (*O. chrysurus*), rubia (*L. synagris*), así como de algunos tiburones (familia Carcharinidae y Sphyrnidae) especies de importancia comercial y de amplio consumo regional y con comercio hacia otras regiones del país (DOF, 2010).

En un reciente estudio en la zona norte de la Península de Yucatán (Baron-Campis, *et al.*, 2014), principalmente en los puertos pesqueros antes mencionados así como el de Progreso, reportaron la presencia de dinoflagelados béticos asociados a la ciguatera dentro de los que destacan *Gambierdiscus* sp., *Ostreopsis* sp., *P. lima*, *P. minimum*, *P.cf. mexicanum*, *P.cf. reticulatum*. *Gambierdiscus* fue encontrado con mayor abundancia en Dzilam de Bravo,

mientras que en San Felipe se le encontró ocasionalmente en muestras de red junto con *Ostreopsis* sp.

En otros estudios recientes en la parte de Dzilam de Bravo y zonas aledañas principalmente la laguna de Chelem, cerca de Progreso, se reportaron concentraciones elevadas del género *Gambierdiscus* durante la temporada caliente y lluviosa, en este estudio, la especie más abundante del género fue *G. caribeus*, sin embargo los autores describen que el género también fue encontrado en Isla de Cozumel, Isla Mujeres y Puerto Morelos, Quintana Roo (Almazán-Becerril *et al.*, 2015; Hernández-Becerril y Almazán-Becerril, 2004; Okolodkov *et al.*, 2014).

Con la información generada se sugiere continuar con investigaciones para monitorear la toxicidad en estas especies (sobre todo en tejidos musculares) con el objetivo de documentar si existe un riesgo en salud pública debido a su consumo. Además de evaluar principalmente muestras procedentes de los principales puertos pesqueros de San Felipe y Puerto Progreso, donde los productos son exportados a otras zonas del interior de la República Mexicana.

8.4 Ciguatoxinas en Campeche

En Campeche, los estudios relacionados a la ciguatera son nulos y se han enfocado principalmente a la investigación de otras toxinas marinas tetrodotoxinas, toxinas paralizantes (saxitoxina y análogos) en peces botete (Tetraodontidae); estudios de monitoreo de brevetoxinas (PbTx), toxinas hidrofílicas y lipofílicas en ostión (*Cassostrea virginica*); palytoxinas y toxinas amnésicas en “pez torito” *Acanthostracion quadricornis* y recientemente toxinas paralizantes (PSP) en dinoflagelados (Cahuich-Sánchez *et al.*, 2017; Núñez-Vázquez *et al.*, 2011; 2016). Pero debido a la presencia del dinoflagelado *K. brevis*, el principal interés ha sido dirigido al monitoreo de PbTx, sin embargo a pesar de la presencia de esta especie en la zona, en los últimos cinco años de monitoreo mensual no se ha detectado en concentraciones de PbTx de importancia sanitaria en ostiones de Campeche (com. pers. B. M. E. J. Núñez-Vázquez, responsable del Análisis de Toxinas Marinas del CIBNOR, Junio del 2016).

En Campeche Poot-Delgado y Guzmán-Noz (2010), encontraron microalgas potencialmente nocivas, principalmente durante las temporadas de nortes y principios del periodo de secas debido a su abundancia.

En otros estudios más recientes en las aguas costeras de Champotón (Fig. 5), Poot-Delgado *et al.* (2011), identificaron la presencia de especies potencialmente nocivas como *Pyrodinium bahamense var. bahamense*, *Prorocentrum mexicanum*, *P. minimum* y *P. hoffmannianum*. Además de otros géneros presentes que no fueron identificados a nivel de especie como lo son: *Gambierdiscus*, *Gymnodinium*, *Karenia* y *Pseudo-nitzschia*. Todas consideradas especies de importancia para la salud pública por su potencial producción de toxinas marinas de como PSP por (*Pyrodinium bahamense var. bahamense*), DSP (*P. hoffmannianum*), NSP (*Karenia sp*) y CFP (*Gambierdiscus sp*);. Estos los anteriores organismos presentaron mayores abundancias abundancias en la zona de estudio fueron durante las temporadas de lluvias (junio-octubre) y nortes (noviembre-febrero), resaltando que pueden estar presentes la mayor parte del año. Del mismo modo, las investigaciones más recientes en el Estado, destacan la presencia de diferentes florecimientos algales nocivos (FAN). Donde destacan muchas de las especies mencionadas, así como diferentes géneros de cianobacterias potencialmente nocivas como: *Anabaena sp.*, *Cilindrospermopsis sp.* y *Oscillatoria sp.* en la Laguna de Términos, (Poot-Delgado *et al.*, 2016).

En el estudio realizado por Poot-Delgado *et al.* (2011) entre las comunidades pesqueras del litoral campechano se pudieron documentar intoxicaciones por el consumo de peces (cojínudas (*Caranx spp.*), pargos (*Lutjanus spp.*) y chac-chí (*H. plumierii*), lo que coincide con la toxicidad descrita en estas especies en Yucatán, de la misma manera cabe señalar la presencia del genero *Caranx sp.* en este tipo de intoxicaciones en la zona del Caribe.

Durante el presente estudio, para el caso de Campeche, se pudieron recolectar en su mayoría vísceras de *C. hippos* ($n=4$), *C. undecimalis* ($n=1$), *L. maximus* ($n=4$), *L. synagris* ($n=1$), *S. tiburo* ($n=2$), *S. barracuda* ($n=8$), además de músculo de este último ($n=10$). Como se puede observar 13 de las muestras (todas vísceras) fueron letales (43%), siendo el estado con mayor número de tejidos tóxicos (Fig. 12). En este mismo sentido, los signos clínicos de intoxicación observados en el BR fueron los más numerosos ($n= 38$), destacando los neurológicos (Fig. 14).

La muerte “rápida” observada en el BR por extractos de vísceras de peces como *H. plumierii* (cha-chí) y *O. chrysurus* (pargo canané) provenientes de Yucatán fueron semejantes a los signos detectados en las muestras de *C. hippos* (jurel) y *L. maximus* (boquinete), todos estos presentaron altos niveles de toxicidad (≥ 10 UR, Tablas IV_(a) y IV_(b), Fig. 25).

Realizando una comparación de la toxicidad obtenida en estos peces (en el presente estudio) con respecto a lista que describieron Olsen *et al.* (1984), clasificaron al boquinete como un organismo que pocas veces suele provocar intoxicaciones por ciguatera, sin embargo esto no sucede con los peces de la familia Carangidae, los cuales fueron catalogados en la escala más alta junto con las barracudas, resultados similares son descritos por Brody (1971), en la misma zona del Caribe, donde la especie *C. hippos* pertenece a los organismos más tóxicos de la región.

Los resultados de toxicidad en Campeche por medio de BR, son semejantes a los reportados por Barra-González (2016), con muestras de peces carnívoros, de Veracruz.

Barra-González (2016), describe también a *C. hippos*, *L. maximus*, *P. volitans* y *S. barracuda*, como las especies más tóxicas (≥ 10 UR). En la zona norte de Veracruz destaca una muestra de hígado de *L. maximus* con niveles mayores de 10 UR, las mismas cantidades son detectadas en el músculo de cuatro *C. hippos*, cabe resaltar que el hígado de estos mismos organismos presentaron toxicidades menores hasta el umbral de no llegar a ser detectadas por el BR y catalogadas como concentraciones subletales.

Barra-González (2016), determinó en hígado de barracuda (*S. barracuda*) toxicidades de hasta 1.93 UR, sin embargo aquí destaca la toxicidad determinada (> 10 UR) en el músculo de un ejemplar (Tabla XII), mientras que estas mismas concentraciones fueron detectadas en músculo de un pez león (*P. volitans*, Tabla XIII).

Aunque de Campeche no se obtuvieron muestras de *P. volitans*, se sugiere su evaluación toxinológica, ya que debido a sus características biológicas descritas, puede existir la presencia de estas y otras toxinas marinas en sus tejidos como es el caso de Quintana Roo (Ley-Martínez *et al.*, 2014) y Veracruz (Barra-González, 2016). Hasta el momento en Campeche no hay una iniciativa o propuesta para el manejo y mitigación de la especie, recordando que su consumo forma parte de los programas de mitigación por parte de varios países del Caribe a lo largo de las zonas invadidas. En México los efectos de mitigación son

llevados a cabo en Quintana Roo y Veracruz. Este pez ha sido capturado en la parte sur de Campeche en sus límites con el Estado de Tabasco desde mediados del año 2013 (Amador-del Ángel *et al.*, 2015; Wakida-Kusunoki y Amador-del Ángel, 2015), por lo que es necesario tener las debidas consideraciones a nivel sanitario sobre el consumo de estos organismos, añadiendo que en Yucatán los músculos de estos peces obtuvieron concentraciones subletales, las cuales podrían ser detectadas con métodos analíticos más sensibles que el BR. Sin embargo, hasta la fecha no se tienen registros en México de intoxicación de tipo ciguatera por el consumo de pez león.

Considerando el estudio de Barra-González (2016) donde se obtuvieron concentraciones de hasta 10 UR en músculos de jureles (*C. hippos*) y pez león (*P. volitans*) en Veracruz, se puede deducir que hasta ahora estas especies de peces se pueden considerar de las más tóxicas en México, con concentraciones altas en su tejido muscular, seguidos de las muestras del estado de Campeche y de Yucatán, las cuales en este estudio se comprobó la presencia de ciguatoxinas en tejido visceral por medio del BR (Tablas IV_{(a), (b)}), por lo que se deduce que existe una bioacumulación de estas toxinas a lo largo de la red trófica en aguas nacionales del Golfo de México.

Según los reportes de Olsen *et al.* (1984), Brody (1971), Pottier *et al.* (2002 a; b;), Pottier y Vernoux (2002), entre otros, los jureles suelen ser organismos tóxicos principalmente en la parte del Caribe, información sirvió de base para que se utilizará la especie *C. latus* como fuente biológica para poder elucidar e identificar la estructura química de las principales ciguatoxinas del Caribe (C-CTX, Lewis *et al.*, 1998; Vernoux y Lewis, 1997). Estos peces solo son superados en toxicidad por las barracudas, las cuales se han destacado por tener las mayores toxicidades de hasta 15 UR en tejido muscular de un solo individuo (Vernoux *et al.*, 1986; Tabla XII).

En este estudio, además de las muestras de peces ya conocidas como tóxicas en algunas zonas del Caribe, se destaca la presencia de dos nuevos registros de peces con una acumulación de toxinas en tejido visceral, ambas de importancia comercial se trata de *S. tiburo* (cazón cabeza de pala) y *C. undecimalis* (robalo blanco). Como se observa en la figura 25, ambas muestras presentaron concentraciones letales (2.5 UR y 1.2 UR, respectivamente) y pueden considerarse según las normas internacionales de la FDA en el límite máximo permisible de

consumo. Como se mencionó en el apartado 8.3, la carne de cazón tiene importancia comercial para el consumo en la PY particularmente en Campeche y Yucatán, por lo que es importante considerar la acumulación de ciguatoxinas en músculos de estas especies, del mismo modo la carne de robalo es muy apreciada en esta región, donde como se observa en la tabla IV_(b) estos peces suelen alcanzar grandes pesos.

Diferentes autores como Dickey y Plakas (2010), Lewis (2001), Laurent *et al.* (2005) y Soliño *et al.* (2015), destacan que la toxicidad en los peces se debe principalmente a la región en la que los peces habitan, es decir si es una zona propensa a la ciguatera, esto debido principalmente a las características de la zona en donde suelen encontrarse daños en el ecosistema arrecifal. Del mismo modo, se ha descrito la importancia de conocer el tipo de dieta de los organismos, que como ya se ha comprobado en años recientes las ciguatoxinas no solo pueden acumularse en peces sino también en otros invertebrados, relacionados con la parte bentónica de estos ecosistemas marinos como almejas, caracoles, cangrejos, langostas, pulpos y equinodermos (Darius *et al.*, 2018 a, b; Mak *et al.*, 2013; Roué *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2008).

En este sentido en las últimas dos décadas se han descrito un mayor número de especies que pueden bioacumular y transferir las ciguatoxinas a distintos niveles tróficos (apartado 8.5) ciertos invertebrados juegan un papel muy importante para la diversificación de estas toxinas en la red trófica, donde si bien como lo propuso Randall desde 1958, estas toxinas suelen tener un origen bentónico que con el tiempo pueden llegar a distintos niveles y rutas tróficas como lo es el sistema pelágico, esto se puede comprobar con algunas especies de peces, en nuestro caso *C. hippos* el cual es considerado un organismo de hábitos pelágicos y migratorios, en este mismo orden ecológico se encuentran algunas especies de barracudas (Claro, 1994; Dickey y Plakas, 2010; O'Toole *et al.*, 2010; Villareal *et al.*, 2007).

8.5 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del ensayo en *Artemia salina* (ARTOX)

Como se detalló en el apartado anterior, el método de bioensayo en ratón es uno de los métodos altamente difundido para la mayoría de los grupos de toxinas marinas incluyendo las ciguatoxinas, sin embargo, la sensibilidad del BR es menor a los métodos analíticos por

lo que es necesario la implementación de nuevas metodologías (Caillaud *et al.*, 2010; EFSA, 2010; Vezie *et al.*, 1996).

La sensibilidad del ARTOX es mayor hacia diferentes compuestos con actividad biológica y esta ha sido discutida desde los años 50 del siglo pasado (Dvorak *et al.*, 2012; Persoone y Wells, 1987). A pesar de ello sigue siendo utilizado como un ensayo de suma utilidad para el estudio de diferentes agentes físicos y químicos en el medio acuático (Persoone y Wells, 1987), incluidas las toxinas de tipo acuático como las de cianobacterias (Lee *et al.*, 1999; Metcalf *et al.*, 2002; Vezie *et al.*, 1996) y de dinoflagelados marinos (Ajuzie, 2007; Neves *et al.*, 2017; Rhodes y Syhre, 1995).

El principio para el método es que los organismos de *Artemia* spp. presenten una mortalidad menor del 10%. Esto es generalmente utilizado en los bioensayos agudos (con duraciones menores a 72 h) (Dvorak *et al.*, 2012), Tiempos semejantes a los utilizados en el presente estudio (Fig. 17) donde también se describen la muy baja mortalidad en los controles negativos, principalmente con agua de mar esterilizada como lo describen Lee *et al.* (1999). Debido a la falta de estándares comerciales de ciguatoxinas se utilizaron como controles positivos a otras toxinas marinas poliéter relacionadas con a estas. Los dos estándares internos utilizados fueron un extracto semipurificado con toxinas DSP (AO y DTX-1) obtenido de *P. lima* (PRL-1) y otro extracto semipurificado con brevetoxinas (PbTx-2 y PbTX-3), obtenido de *K. brevis*, (KB-3). Este último, con brevetoxinas que actúan de la misma forma que las ciguatoxinas, sobreactivando el canal de Na⁺ en el sitio 5 (Bottein-Dechraoui y Ramsdell, 2003; Faust, 1991).

En Nueva Zelanda, Rhodes y Syhre (1995), evaluaron la actividad de toxinas DSP en una cepa de *P. lima*, durante el experimento se observó la muerte de los organismos de *A. salina* por el consumo de alrededor de 200 células de dicho dinoflagelado en un tiempo aproximado de 20 h. Heredia-Tapia *et al.* (2002) y Campa-Cordova *et al.* (2009) describieron el efecto tóxico y mortalidad en el modelo de *A. salina* (utilizando adultos) por distintas concentraciones celulares de *P. lima* (PRL-1). Concentraciones de 2000 cel/mL provocaron una mortalidad del 100% en una exposición aguda. Las toxinas DSP de este dinoflagelado provocaron una mortalidad rápida entre las 2 y 3 h.

Aunque Rhodes y Syhre, (1995) no describen en su trabajo el estadio de la artemia o el comportamiento de las mismas, Ajuzie (2007), por su parte detalla también los signos presentados en nauplios de *A. salina* y comparó entre sanos e intoxicados; el comportamiento de los sanos suele ser dando “pequeños saltos” de manera activa utilizando los apéndices cefálicos, comprimiendo su segunda antena y las mandíbulas como si fueran remos. Por otro lado, todos los nauplios que ingirieron a *P. lima* perdieron el equilibrio, fracasando subsecuentemente con el “nado” y se hundieron en los pozos de la placa en donde estaban depositados, donde se “arrastraron” por un tiempo antes de morir. “Desde el fondo de los pozos, los aparentemente nauplios intoxicados hicieron repetidos pero fallidos intentos por flotar e incorporarse a la columna de agua de nuevo. Los últimos momentos de los nauplios moribundos fueron marcados por movimientos de antenas y mandíbulas, palpitaciones y contracciones de la parte abdominal las cuales resultaron en la defecación de las células enteras o en falsos pellets fecales, también conocidas como pseudo-heces” (Ajuzie, 2007). Estos últimos párrafos concuerdan a lo encontrado en nuestros resultados con los organismos controles, donde los organismos parecían liberar en el agua algo parecido a material fecal o pequeños pellets, para después permanecer en el fondo del vial sin existir una recuperación, todo lo anterior como se observa en la figura 17, fue en corto tiempo.

Neves *et al.* (2017), aseguran que la exposición a dinoflagelados tóxicos (como es el caso de *P. lima*), induce efectos de reducción en el comportamiento del nado y en la sobrevivencia de *A. salina*. Además sugieren que el modo de acción del AO y la DTX-1, pueden provocar alteraciones fisiológicas en el metabolismo de *A. salina* que se centran en la pérdida de fluidos y el control en la dinámica de los fluidos corporales por lo que se ve afectada la fisiología al nado. Garaventa *et al.* (2010), concluyen que las alteraciones en la velocidad de nado de *A. salina* son características de comportamiento válidas para detectar estrés en el organismo. De la misma manera señalan que este estrés puede provenir como parte de sustancias o compuestos subletalmente tóxicos.

Las artemias son parte del zooplancton y se consideran filtradores continuos y no selectivos, incluyen como presas a las microalgas (Ajuzie, 2007); sin embargo la alta sensibilidad de *A. salina* ante la presencia de células de dinoflagelados con respecto al de otros modelos acuáticos es atribuida al tamaño del aparato digestivo de las larvas, el cual puede consumir

del medio a dichos organismos, pudiendo así concentrar las toxinas en su interior (Faimali *et al.*, 2012). Siendo así, una de las ventajas en este método el uso de adultos, ya que a diferencia de su etapa como nauplios, pueden consumir enteramente las células de los dinoflagelados. Así las toxinas no necesitan ser extraídas y el costo y tiempo de producción es mejor aprovechado (Kelly *et al.*, 1992). En el presente estudio, el ensayo ARTOX se utilizaron adultos, lo que permitió que por su tamaño y estructura de órganos (bien formados) una observación fácil, clara y con conteos rápidos de la signología presentada (Tabla VII).

Sin embargo, son pocos los estudios detallados que se han realizado para evaluar el efecto de las ciguatoxinas en este modelo a nivel celular, bioquímico, molecular e incluso de genotoxicidad, porque este es un tópico pendiente de evaluar en las futuras investigaciones. Granade *et al.* (1976), en un estudio similar al nuestro, evaluaron la toxicidad de ciguatoxinas con extractos crudos en ensayos con *A. salina*, registraron mortalidades de entre el 50-100% durante las 24 h de duración del bioensayo, mientras que en los extractos inocuos los porcentajes de mortalidad fueron alrededor del 5%.

Los resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio (Figs. 17, 19-23). Durante el anterior experimento algunas artemias exhibieron nados erráticos y movimientos incoordinados antes de morir (Granade *et al.*, 1976), signos que se detallan en la tabla VII.

Del mismo modo trabajos realizados en Brasil, con dinoflagelados productores de ciguatoxinas (*Gambierdiscus* spp y *Fukuyoa* spp) Neves *et al.* (2017), encontraron que *A. salina* se ve afectados en tiempo corto por el dinoflagelado *G. excentricus* el cual produce maitotoxinas relacionadas con la ciguatera. Los efectos que se observan son la actividad en el nado, la posición en la columna de agua y la sobrevivencia. Después de tres horas de exposición se pueden observar las afectaciones de los organismos, con un aletargamiento o parálisis, que con el paso del tiempo puede cambiar, y algunos recuperar la movilidad.

Este mismo ejemplo se ha observado en BR con extractos con concentraciones subletales de ciguatoxinas, primero los ratones presentan hipoactividad (letargo, en ciertos casos con parálisis de los cuartos traseros e incluso delanteros) y nuevamente en el transcurso del ensayo algunos de estos se recuperan, pero conforme pasan las horas regresan a sus niveles normales de actividad (Lewis, 1995; Pottier *et al.*, 2001). Las ciguatoxinas producen también este tipo de síntomas en las personas, con depresión y decaimiento e incluso se le ha asociado

al síndrome llamado de “fatiga crónica” que algunos llegan a padecer en casos crónicos (Bagnis *et al.*, 1979; Pottier *et al.*, 2001).

En este mismo sentido, Faimali *et al.* (2012), concluyeron que el uso de *A. salina* es un método muy sensible, después de haber obtenido los niveles más altos en porcentaje de mortalidad al ser sometidos a diferentes tratamientos con el dinoflagelado *Ostreopsis ovata* (productor de palytoxinas -PTX-). Esta alta sensibilidad de *A. salina* puede ser explicada por la evidencia de que toxinas como la PTX ejercen una potente actividad biológica alterando los mecanismos de homeostasis, desequilibrando las funciones de la membrana celular con una pérdida de la regulación y alterando los procesos de osmoregulación. Uno de los ejemplos de adaptación ecológica en este crustáceo es la alta tolerancia a la salinidad. Por lo que la alteración en estos organismos se produce por alteraciones en la concentración de iones dentro de la membrana. Uno de los puntos clave para la regulación de estos iones en el organismo es la bomba de Na^+/K^+ (Faimali *et al.*, 2012). Como es bien sabido las PTX así como las CTX alteran la membrana celular, (principalmente en células excitables) permitiendo el flujo de iones en la célula lo que lleva a su desestabilización osmorregulatoria (Bottein-Dechraoui y Ramsdell, 2003; Yu *et al.*, 2005).

Las artemias saludables, son normalmente nadadores activos, por lo tanto es importante considerar que cualquier afectación en su actividad natatoria se puede asumir como afectaciones por parte de agentes externos, en este caso toxinas (Faimali *et al.*, 2012; Kelly *et al.*, 1992). Para los organismos del zooplancton la capacidad de “nadar” contribuye a su desplazamiento. El poder evadir predadores o encontrar presas, si estos coinciden a su vez con organismos nocivos (microalgas), se encontrarían vulnerables para adquirir o almacenar las toxinas en su organismo, transfiriéndolas a otros consumidores a través de las redes tróficas y en el caso de los nauplios de *Artemia* sp. esta disminución de movilidad también puede afectar sus migraciones verticales (Neves *et al.*, 2017). Esto puede ser un ejemplo de lo que puede suceder con el caso de copépodos y otros crustáceos marinos en la transferencia de ciguatoxinas en las redes tróficas marinas (Fig. 26).

Para representar la importancia de los crustáceos como vectores de ciguatoxinas Kelly *et al.* (1992) esquematizaron lo que pudiera ser un flujo más realista (al clásico modelo de Randall) de la transferencia y bioacumulación de las ciguatoxinas en las redes tróficas.

En el que esta transferencia puede tener varias vías, no (Fig. 26), solo como una de las posibles redes alrededor de los organismos del necton principalmente (1);); si no por medio de otros organismos bentónicos (2), donde una gran variedad de invertebrados consumen parte de las algas portadoras de dinoflagelados tóxicos (camarones, cangrejos, langostas, caracoles, entre otros) y/o a través del detritus, donde normalmente se encuentran los cadáveres de diversos organismos y donde los cangrejos suelen ser de los principales organismos carroñeros junto con algunos peces como lenguados que también pudiesen consumir restos de organismos portadores de toxinas, estos a su vez pueden ser consumidos por otros invertebrados y peces ligados al bentos, estos últimos pueden ser consumidos por organismos del necton entre ellos los grandes carnívoros como pargos, cabrillas y meros que suelen ser consumidos por el hombre. Otra vía puede deberse a la parte pelágica (3) de la red, donde los organismos micropastoreadores del zooplancton consumen las toxinas a través de los dinoflagelados productores, los cuales suelen estar epifitando algas, y las cuales a su vez suelen desprenderse y mantenerse en la parte superficial de la columna de agua, incluyendo sus epifitos tóxicos (Bomber *et al.*, 1988 en Kelly *et al.*, 1992). Gran parte del zooplancton suele ser parte de la dieta de pelágicos menores como anchovetas y sardinas las cuales a su vez son consumidas por organismos pelágicos mayores como los jureles, estos peces como se detalló en el apartado anterior poseen una gran acumulación de ciguatoxinas y son de importancia pesquera en todo el mundo. Aunque en la figura 26 no se muestra, cabe resaltar que muchos de los pelágicos menores forman parte de la dieta de aves marinas, también forman parte de la dieta de grandes mamíferos marinos como delfines y focas, así como filtradores (ballenas). Todo esto nos lleva a suponer que las relaciones en la red trófica de este esquema pudieran llegar hasta otros organismos y por tanto a otros niveles tróficos.

El género *Artemia* puede representar un buen modelo de estudio para evaluar como las FAN y sus toxinas repercuten en el ecosistema, una de las razones es porque como se ha discutido a lo largo del presente trabajo, es que posee una gran sensibilidad en diferentes estadios de su ciclo de vida (nauplios o adultos) (Neves *et al.*, 2017), otro de los estudios de utilidad en este sentido es el D'ors *et al.* (2014), los cuales encontraron que el efecto de toxinas marinas como la STX, el ácido domoico y el AO, suelen afectar a *A. franciscana* en sus primeras 24 h de vida. Si bien, éstas en su conjunto fueron utilizadas en un experimento donde se

evaluaron toxinas de forma mezclada; (en combinación de dos o tres toxinas); se observó que no existe un sinergismo entre ellas, si no que las toxinas de manera individual tienen un mayor efecto en los organismos.

Los resultados sugieren que estas toxinas juegan un rol importante en las redes tróficas, al mantener las poblaciones de ciertos micro-pastoreadores semejantes a las artemias y/o funciones ecológicas como la alelopatía para mantener a raya el crecimiento de otros organismos del fitoplancton, esto con base a que las toxinas pueden ser almacenadas o biomagnificadas por diferentes grupos del zooplancton (Turner y Tester, 1997).

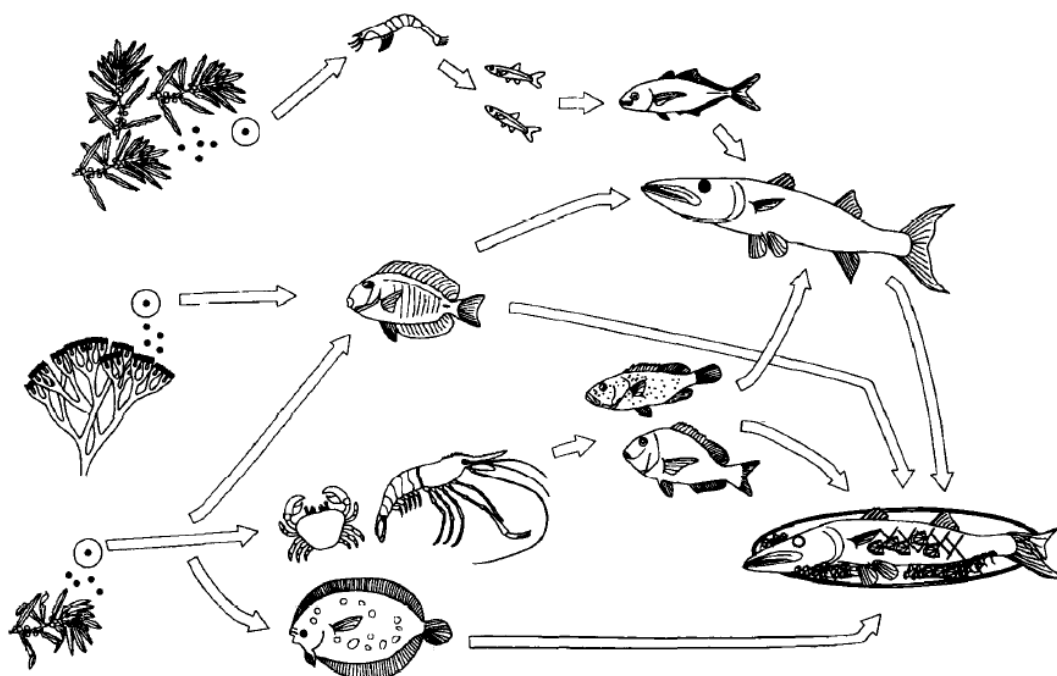


Figura 26. Diagrama que representa la distribución de las ciguatoxinas a través de la red (es) trófica (s). En la zona superior se encuentra la ruta pelágica, la zona media representa la ruta clásica y en la zona inferior se muestra la ruta bentónica. (Tomada de Kelly *et al.*, 1992).

Tomando en consideración que algunas FAN suelen darse por la presencia simultánea de dos o más microorganismos productores de toxinas, ya que este tipo de eventos suelen darse de forma natural en algunos ecosistemas sobre todo estuarinos alrededor del mundo (D'ors *et al.*, 2014; Turner y Tester, 1997).

Aunque no solo las toxinas marinas han sido estudiadas con el ensayo ARTOX, también este método se ha descrito como un buen modelo toxicológico para el estudio de toxinas producidas por cianobacterias; como las microcistinas y la anatoxina-a (Kiviranta *et al.*, 1991), con ese enfoque, se ha sido utilizado como una alternativa al bioensayo en ratón en toxinas como la cianotoxina llamada cylindrospermopsina, que en el caso del BR suele ser un ensayo de hasta cinco días de evaluación. El uso de nauplios (100 organismos L-1) y 100 μ L de alícuota problema son analizados en los pozos de una placa. De este modo Metcalf *et al.* (2002), encontraron que *A. salina* posee mayor sensibilidad en el tiempo, en cuanto a dosis respuesta y la cantidad de toxina aplicada durante el ensayo ante toxinas de este tipo. Por su parte Vezie *et al.* (1996), encontraron una buena correlación entre el BR y el ARTOX, después de analizar 15 cepas de cianobacterias con propiedades hepatotóxicas encontrando que 13 de ellas son hepatotóxicas en los dos bioensayos. De manera cualitativa se ha concretado que este bioensayo tiene un uso sensible y fiable en la búsqueda de compuestos hepatotóxicos procedentes de diferentes cepas y especies de cianobacterias.

En un estudio similar realizado por Lee *et al.* (1999), las correlaciones entre el ARTOX y el BR parecen tener los mismos resultados que los de Vezie *et al.* (1996); sin embargo, ellos concluyen que la sensibilidad del BR lo hace un método más eficaz si se toma en cuenta el tiempo de muerte de los organismos, existiendo un mayor consumo de tiempo en el ARTOX (24-48 h), a pesar de esto las ventajas que se obtienen de este último ensayo radican en un mayor número de organismos, costos de manutención y obtención de los mismos.

Incluso ha sido comparado con otros organismos marinos, por ejemplo Rhodes *et al.* (2008), consideraron al ARTOX sensible y útil al registrar un alto porcentaje de mortalidad en larvas, al ser sometidas a la presencia de un menor número de células de *O. siamensis*, estos datos fueron comparados con ensayos en caracol (*Haliothis virgínea*).

Estas consideraciones son compartidas por Faimali *et al.* (2012), tras haber obtenido los niveles más altos en porcentaje de mortalidad al ser sometidos a diferentes tratamientos con el dinoflagelado *O. ovata*. Los resultados obtenidos fueron comparados en modelos acuáticos tanto de invertebrados (*Amphibalanus amphitrite*, *Tigriopus fulvus*) como vertebrados (*Dicentrarchus labrax*); además estas concentraciones observadas en niveles tan bajos se han

discutido para considerar los riesgos de salud en Italia, uno de los países afectados por las proliferaciones de estos dinoflagelados tóxicos.

La artemia puede ser usada solo como un ensayo simple, proyectando la toxicidad y los mecanismos toxinológicos, o bien, combinarse con estudios más robustos, simultáneamente con estudios que abarquen otras especies. Es así como puede ayudar al enfoque de interpretaciones holísticas de riesgos relacionados con los ecosistemas globales, a través de la integración de respuestas variadas, para varios niveles tróficos y de organización. El ARTOX puede ser sujeto a condiciones de prueba tanto en campo como en laboratorio. La tolerancia de los especímenes de *Artemia* hace a este género adaptable a una gran variedad de pruebas en condiciones estuarinas, marinas o hipersalinas, respondiendo así a la gran demanda de pruebas estandarizadas para ecosistemas salinos (Nunes *et al.*, 2006).

Otros métodos parecidos al ARTOX, son el de mosquito y el ensayo de dípteros los cuales son bioensayos de bajo costo, de relativa infraestructura y de simple detección, que requieren bajas cantidades de muestra y que pueden ser usados para la evaluación temprana de un numerosos grupos de muestras en un corto periodo de tiempo. Sin embargo, estos ensayos no son ampliamente usados en laboratorios encargados de la evaluación de ciguatera, probablemente porque estos poseen baja especificidad o porque no parecen ser adecuados en la cuantificación de ciguatoxinas así como requieren cierto expertise en su operación (Caillaud *et al.*, 2010).

8.6 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del ensayo en la reducción de la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri* (Microtox®).

El ensayo luminimétrico llevado a cabo con el equipo Microtox® demostró toxicidad en las muestras de extractos de ciguatoxinas como se observa en la tabla IX.

Sin embargo, estas toxicidades fueron muy bajas al compararse con las obtenidas por BR no es el más adecuado y que bajo estas condiciones, no existió una relación significativa entre los dos métodos.

El método Microtox® ha sido utilizado para la evaluación de diferentes toxinas acuáticas, principalmente de cianobacterias como lo son las cianotoxinas (microcistinas) y la STX y análogos que además de cianobacterias de agua dulce y marinas también es producida por

algunos géneros de dinoflagelados marinos, en estos casos se ha podido determinar cierta toxicidad, pero como se discute más adelante, no siempre se obtuvieron buenos resultados al correlacionarse con el BR, en este último caso es considerado y correlacionado debido a que es el método más utilizado (y oficial en algunos países) para la evaluación de las toxinas antes mencionadas (Bruno *et al.*, 1990; López-Flores *et al.*, 2010; Vezie *et al.*, 1996).

Como se ha mencionado, el BR ha sido el método utilizado por excelencia para medir un sin fin de sustancias tóxicas, incluidas las toxinas de dinoflagelados y cianobacterias; sin embargo, se ha buscado desarrollar otros métodos que generen resultados a bajo costo, sean complementarios, reduzcan o sustituyan el uso de animales como métodos rutinarios de análisis (Campbell *et al.*, 1994; Kaiser, 1998). El ensayo Microtox® ha sido reconocido como un método exitoso, que permite medir de manera rápida y de primera mano la toxicidad en un ecosistema (particularmente en agua), otorgando una visión rápida de los posible presencia de compuestos tóxicos en el ambiente (Fort, 1992; Kaiser, 1998; López-Flores *et al.*, 2010). Ha sido utilizado para medir la toxicidad principalmente en aguas residuales, sedimentos pero lo más interesante en el presente estudio es que ha sido utilizado en análisis de algunas toxinas acuáticas como las de cianobacterias y de dinoflagelados (Campbell *et al.*, 1994; López-Flores *et al.*, 2010; Vezie *et al.*, 1996).

Es por ello que en este trabajo se investigó si su implementación y adecuación podría ser de utilidad como un método innovador en la detección de ciguatoxinas en extractos de tejidos de peces.

Cabe señalar que en contraste con la mayoría de los bioensayos acuáticos, en los cuales las toxicidades agudas son usualmente medidas sobre periodos de 96 h (principalmente en peces y crustáceos), en este ensayo llevado a cabo con bacterias luminiscentes, se tiene la ventaja de ser realizado en minutos (aprox. 30). Además, las concentraciones de bacteria latente (liofilizada) pueden ser mantenidas en congelación para su posterior uso (Kaiser, 1998). Como se describe en el apartado de resultados (7.2.3) hasta el momento este método permitió la obtención de algunos resultados positivos al detectarse cierta toxicidad en las muestras (Tabla VIII), las cuales han sido clasificadas como “levemente tóxicas”, pero sin relación con el grado de toxicidad obtenido por BR, sin embargo otras adecuaciones y estandarizaciones futuras en la utilización de este método deberán realizarse para su posible

aplicación como método de detección de ciguatoxinas, siendo probable la detección de este tipo de compuestos “suspendidos” en agua, es decir como toxina disponible en agua de mar y no a partir de extractos de productos marinos. Esto puede tener una aplicación en la detección de toxinas a partir de agua contenida en los cultivos de dinoflagelados tóxicos relacionados a la ciguatera.

Estudios como los de Bruno *et al.* (1990), quienes evaluaron la toxicidad de *Lingulodinium polyedra* (antes *Gonyaulax polyedra*) productor de toxinas paralizantes (PSP); a partir de diferentes extractos con el uso del método Microtox®; constataron que este método no parece ser el más adecuado para la evaluación de toxinas PSP, debido a que es necesario controlar los niveles de pH en las muestras. En el caso de la extracción de toxinas PSP se necesita tener un pH ácido (1-3) para poder obtener las toxinas. Por otro lado en el Microtox® es necesario tener niveles de pH neutros (6-8) para no perjudicar la estabilidad de la bacteria. Por lo que el llevar las muestras de PSP a pH más alcalinos disminuye la toxicidad de los extractos, afectando la toxicidad verdadera de las muestras.

En este mismo sentido, López-Flores *et al.* (2010), no encontraron una relación al evaluar extractos de *P. minimum*, -dinoflagelado conocido por causar mortandades de peces- del cual solo se realizaron extractos hidrosolubles dirigidos a detectar hepatotoxinas de los cuales se concluyó no encontrar resultados positivos en la toxicidad, esto lo asociaron a la falta de toxinas diluidas en el agua o posiblemente a una cepa no productora de toxinas; aunado a esto concluyen que este método debe de ser descartado para medir las toxicidades de especies productoras de FAN al presentar limitaciones, principalmente resaltan que las diferentes toxinas de dinoflagelados varían en la viabilidad en la que afectan a *V. fischeri*.

El uso de Microtox® para la evaluación de microcistinas ha sido realizado por Lawton *et al.* (1990), estos autores detectaron valores de concentración efectiva media (EC50: concentración con la cual se genera el 50% de la reducción de bioluminiscencia) de 20 µL/mL de microcistina (MYC-LR), partiendo de una concentración inicial de 500 µL/mL de MYC-LR de un extracto comercial puro; en el caso de las diferentes muestras a evaluadas los intervalos variaron con EC50 <0.5 mg/mL para los extractos tóxicos de *Microcystis aeruginosa* y EC50 >0.9 mg/mL para aquellos que no fueron tóxicos. Con estos resultados,

los autores que este método puede ser una herramienta útil para estudios preliminares de toxicidad enfocados principalmente en hepatotoxinas.

Sin embargo, son más los estudios que marcan diferentes resultados pautas para este ensayo, *Vezie et al.* (1996), encontraron que partir de una concentración de 125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de microcistinas los valores de EC50 se obtuvieron en 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$, un poco más del triple de los encontrados por *Lawton et al.* (1990); además de lo anterior valores de EC50 entre 5-10 mg/mL, mientras que los valores de EC50 en muestras sin hepatotoxicidad obtuvieron resultados entre 1.7-8.9 mg/mL, al existir valores muy similares entre los intervalos de muestras tóxicas y no tóxicas se concluyó que otros posibles compuestos a parte de las microcistinas pudieran estar afectando los resultados por lo que el ensayo Microtox® no debía de ser utilizado en el uso de cianotoxinas por lo que recomiendan el uso de otros bioensayos como el ARTOX o el BR.

Resultados similares observaron *Campbell et al.* (1994), en donde las muestras no tóxicas de un grupo de cepas de *M. elabens* son las que presentaron una mayor toxicidad, por lo que se concluyó que otros compuestos presentes pueden ser los que generen esta toxicidad en el ensayo luminimétrico Microtox® además proponen su uso como herramienta en el monitoreo de cianotoxinas.

Estos estudios describen que se debe de tener cuidado con el manejo de los extractos a evaluar ya que este método es demasiado sensible. Como lo describen *Dvorak et al.* (2012); en el caso del ARTOX, los resultados con estos tipos de bioensayos pueden verse afectados por diferentes factores a los que suelen ser demasiado sensibles los organismos; en este caso se debe de considerar la salinidad de las soluciones, así como los agentes químicos presentes en los extractos, sabiendo lo anterior es posible que estos factores puedan contrarrestarse con algunos otros agentes químicos o factores necesarios para poder llegar a un equilibrio que ayude a las bacterias a mantener su estado osmótico, la cual es la principal razón por la que suelen verse afectadas, sin perder de vista el pH en el que se encuentren. Recordando que durante todo el proceso de la metodología llevada en el Microtox® se lleva un control de la temperatura y las soluciones osmóticas con las que se activan y nutren a las bacterias, contrarrestando los posibles falsos positivos.

Tomando en cuenta lo anterior, el ensayo Microtox® ha sido evaluado y correlacionado con diferentes tipos de bioensayos, esto debido al gran número de datos disponibles a través de la toxicidad de diferentes compuestos, además de la simplicidad y robustez del ensayo. Por lo que es de interés establecer comparaciones de datos, de manera cualitativa y cuantitativa con otros métodos de detección, particularmente para los del tipo acuático (Kaiser, 1998).

Kaiser (1998), describe la existencia de suficientes relaciones intra-específicas entre *Vibrio* spp. y otras numerosas especies acuáticas, las cuales pueden ser utilizadas para predecir con cierta certeza la parte final del ensayo de una sustancia a evaluar. En ese sentido hay que destacar los trabajos donde se estudian los compuestos de estructura química simple, que son aquellos que poseen un solo grupo funcional. Como suele observarse en el caso de otros bioensayos; agentes químicos con una compleja estructura, como lo son aquellos con más de un grupo funcional interactuando entre ellos, con posibles cambios en su estructura y/o procesos de ionización que suelen ocurrir cerca de los valores fisiológicos del pH; resultan en una alta especificidad de efectos en un organismo en particular y/o en sus funciones bioquímicas; por lo tanto, estas características químicas hacen más difícil observar resultados en el modelo, por lo que los anteriores pueden desviarse de los promedios aparentes observados de dichos compuestos cuya toxicidad ya ha sido evaluada con anterioridad y con ello las predicciones de estas sustancias suelen tener un menor grado de confiabilidad (Kaiser, 1998).

Es de notarse los estudios en la relación de la toxicidad presentada entre bacteria contra mamífero (especialmente *Vibrio* spp. y considerando el mayor uso de bioensayos con ratones en nuestro caso particular en las toxinas marinas), que han sido de un limitado uso, esto debido a la naturaleza de los datos obtenidos en mamíferos (pocos y de suma controversia al compararlos con el Microtox®). Sin embargo, cabe destacar que esta calidad entre las relaciones *Vibrio* spp.-mamífero incrementa de forma ascendente, si se comparan los datos de la dosis letal media oral < dosis letal media intraperitoneal < dosis letal media intravenosa (Clouthier *et al.*, 1987 en Fort, 1992; Kaiser, 1998).

Otros autores, señalan que para la evaluación de este método en otras aplicaciones depende del sentido de la investigación, ya que algunos estudios como el de Giacobbe y Yang (1999), muestran que el ensayo Microtox® suele tener falsos positivos, estos autores evaluaron la

toxicidad del dinoflagelado productor de toxinas PSP *Alexandrium taylori*, encontrando resultados positivos a través de este ensayo, los cuales fueron rectificadas en la búsqueda de las toxinas implicadas; sin embargo, estas no se encontraron cuando se realizó un estudio a través de un método más sensible como el HPLC.

Resaltando en todo lo anterior, Fort (1992), sugiere al método Microtox® a manera de preselección de muestras tóxicas, las cuales pueden ser nuevamente evaluadas y confirmar la respectiva toxicidad vía BR y así evitar el uso de un mayor número de animales de experimentación. Contemplando que si no se tiene una buena estadística en los resultados proporcionados no deben ser considerados para emitir diagnósticos que influyan en hechos relacionados con la salud ambiental, animal y/o humana; según sea el caso. Sin embargo, no hay contra limitaciones en su uso con fines de experimentación académica.

Además, según Fort (1992), describe las siguientes conclusiones con el uso del método Microtox® se destaca que se debe: 1) Desarrollar métodos para trabajar con compuestos que tengan poca solubilidad en agua, 2) Es necesario comprobar la habilidad del método para detectar toxicidad en muestras problema de un lote determinado y 3) Se puedan determinar los criterios para decidir si los resultados del ensayo se han desviado lo suficiente de los resultados previos de un compuesto en particular (como lo detalla con anterioridad Kaiser, 1998), por último para garantizar la toxicidad será necesario la evaluación a partir de ensayos confirmatorios en BR.

Estos son puntos a considerar, principalmente el primero de ellos el cual resalta el uso de compuestos con poca solubilidad en agua, o dicho de otro modo hay que considerar el uso de compuestos lipofílicos como es el caso de las ciguatoxinas para este método.

Ya que como se describió se obtuvo una toxicidad muy baja y sin relación con el BR.

Por lo anterior, se señala finalmente que en el análisis de ciguatoxinas por medio de esta técnica debe tomarse en cuenta el medio en el que se encuentran los extractos. Ya que en este caso la solución salina con Tween 60 (1%), presentó en sus primeras concentraciones altos niveles de toxicidad para los organismos de *V. fischeri* (Com. pers. M. C. Pica-Granados, IMTA), por lo que se sugiere el mantenimiento de los extractos en MeOH para posteriormente evaporar el solvente y resuspenderlos en soluciones osmóticas utilizadas en el Microtox®.

Se concluye, que se obtuvieron resultados preliminares con este método que deben ser adecuados y estandarizados a mayor profundidad para poderse utilizar como método de detección de ciguatoxinas. De cualquier forma, hasta donde se consultó en la literatura especializada esta es la primera vez que se evaluó la utilización de esta técnica con estos fines por primera vez en México a través de este método.

8.7 Toxicidad de ciguatoxinas por medio del ensayo de unión a receptores específicos fluorescentes RBA_(F).

Una de los mejores metodologías para determinar la presencia de neurotoxinas como las ciguatoxinas es a través de los canales activadores del voltaje, los cuales se encuentran inmersos en la membrana celular. Para poder medir estas toxinas se han desarrollado desde los años 80's del siglo pasado, ensayos de receptores de anclaje hacia estos canales. Para lograrlo se han aislado diferentes tipos de canales iónicos (Ca^+ , K^+ , Na^+), a partir de diferentes tejidos animales, logrando así los ensayos de unión a receptores específicos (RBA: Receptor Binding Assay). Los cuales son muy sensibles y comparten un alto grado de especificidad (Caillaud *et al.*, 2010; Darius *et al.*, 2007; Hardison *et al.*, 2016).

Este tipo de ensayos han sido evaluados para toxinas de diferentes organismos tanto marinos (anemonas, corales, dinoflagelados, etc.) como terrestres (escorpiones, arañas) debido a la actividad de las toxinas hacia diferentes sitios activos dentro de estos canales, de aquí se deriva la especificidad de cada canal con su sitio activo y el modo de acción, en la que la toxina actúa a nivel celular, bloqueando o desbloqueando el paso de iones; por ejemplo: el caso de la tetrodotoxina (TTX) el cual bloquea los canales de Na^+ , mientras que las ciguatoxinas lo desbloquean (Al-Sabi *et al.*, 2006; Caillaud *et al.*, 2010).

El objetivo del RBA_(F) es medir la competición entre las toxinas marcadas radioactivamente (generalmente tritio) y las no marcadas, para poder marcarlas en este caso el ensayo se basa en ligandos fluorescentes los cuales revelan fluorescencia al competir en los sitios activos de los canales iónicos, para los cuales estos últimos se encuentran inmersos en los sinaptosomas de rata (Hardison *et al.*, 2016; Litaker *et al.*, 2014).

El ensayo por medio del RBA_(F) permite evaluar la presencia de toxinas tipo poliéter como es el caso de las PbTx y las CTX, en este caso el principio se basa en la cantidad de

fluorescencia registrada por el lector de placa (Darius *et al.*, 2007; Hardison *et al.*, 2016; Litaker *et al.*, 2014).

El principio del método señala que una mayor fluorescencia indica que los ligandos fluorescentes se aferrarán con los sinaptosomas, por lo que habrá una mayor lectura de la misma a través del lector de placa, pero por otra parte, una menor fluorescencia nos indica que el lugar de los ligandos fluorescentes lo han tomado alguna de las toxinas antes mencionadas en el sitio activo de los sinaptosomas (Hardison *et al.*, 2016; Litaker *et al.*, 2014).

Con base en este principio se tiene como control positivo las diluciones de los estándares de PbTx o la curva de calibración la cual se puede observar en la tabla X y como control negativo el etanol absoluto (Fig. 24), los cuales mostrarán datos de baja y alta fluorescencia respectivamente.

Conforme al anterior principio, en este estudio se pudo comprobar que los controles utilizados cumplieron con esta respuesta (Tablas X y XI).

Con base en este principio y la respuesta obtenida en los controles se compararon las lecturas obtenidas en el lector de placas (Tabla XI) con las muestras problema. Como se observa en la tabla X y figura 24, la mayoría de las muestras (evaluadas las por duplicado); muestran lecturas congruentes entre sí, con lecturas de fluorescencia menores a las registradas por el etanol (Tabla XI).

La cifra de lectura más alta se observa en la muestra del control negativo que contiene etanol, la cual concuerda con los principios del método al ocurrir elevada fluorescencia. Siguiendo estos parámetros, se puede observar que las lecturas de los controles positivos (que contienen diferentes diluciones de PbTx, Fig. 24 y Tabla X) presentaron valores menores comparables con los obtenidos en las muestras problema, por lo que se consideró la identificación plena de la presencia de ciguatoxinas en estas muestras.

Cabe señalar como se ha descrito en la metodología que este método utilizado no permite diferenciar entre la presencia de PbTx y las CTX sin embargo es importante también mencionar que en la zona de PY donde fue realizado el presente trabajo, la presencia de *K. brevis* es baja y no se han descrito FAN de esta especie, así como se ha detectado muy baja presencia de estas toxinas (únicamente en ostiones del litoral Campechano; ver sección de

resultados), además de que en la signología obtenida en el BR estos signos de intoxicación correspondieron a la presencia de ciguatoxinas. Por todo ello, se considera la identificación positiva de estas toxinas en la zona. Una confirmación definitiva para conocer el tipo de análogos de ciguatoxinas presentes, es la obtención de los perfiles toxinológicos de estas muestras mediante un método analítico como lo es el HPLC-MS/MS (Caillaud *et al.*, 2010; Hardison *et al.*, 2016).

La muestra clasificada como “*S. barracuda* 2 vís Camp.” fue la única muestra evaluada por RBA_(F) con nivel de toxicidad que se clasificó como “concentración subletal” por BR (Tabla IV_(b)), sin embargo, en el caso de la lectura por RBA_(F) se puede denotar la presencia de toxinas debido a los números bajos observados durante la lectura de la muestra. Los cuales fueron corroborados con la lectura del control negativo; sin embargo, al mismo tiempo estas cantidades son las más altas, si las comparamos con el resto de las muestras, que fueron clasificadas con una cierta toxicidad por BR (Fig. 25). Lo anterior, podría demostrar el hecho de que esta muestra presentó signos clínicos de toxicidad en el ratón pero no fueron letales (Tabla IV_(b)), sugiriendo que las ciguatoxinas se encontraban por debajo del límite de cuantificación en el BR, pero como lo menciona la literatura no dentro de los límites de este ensayo, que es mucho más sensible (Caillaud *et al.*, 2010; Darius *et al.*, 2007; Hardison *et al.*, 2016). Es decir, este método es mucho más sensible que el BR para la detección de estas neurotoxinas.

Con todo esto, se puede concluir que el uso del RBA_(F) es de utilidad de manera cualitativa para determinar la presencia de ciguatoxinas, y de contar con estándares disponibles también de manera cuantitativa, como se ha descrito en la reciente literatura especializada (Hardison *et al.*, 2016; Litaker *et al.*, 2014).

Un análisis complementario por medio de un método analítico como lo es el HPLC-MS/MS también es recomendable.

El RBA_(F) se perfila como uno de los mejores métodos de análisis rutinario de ciguatoxinas, con fines de regulación e investigación. Con amplias posibilidades en su uso expansivo, ya que a diferencia de su antecesor el RBA, no requiere del manejo de compuestos radiactivos, ni de la infraestructura correspondiente, así como licencias o permisos para el uso de radioisótopos, lo cual limitaba su uso e implementación. Aunque una vez montado es

rápido, cabe señalar que las muestras deben ser purificadas previamente mediante columnas cromatográficas, lo que añade tiempo e insumos unos pasos antes de su análisis.

8.8 Generalidades sobre los de detección métodos de ciguatoxinas.

Cuando se selecciona un método de detección de ciguatoxinas uno de los puntos más importantes a considerar es el principio en el que se basa este método y los objetivos del estudio. Estos pueden ser de carácter regulatorio para garantizar su inocuidad alimentaria, o bien de investigación científica o de diagnóstico médico. Teniendo esto en cuenta, es necesario pensar en los costos económicos, selectividad, especificidad, sensibilidad, entre otros, así como infraestructura y expertise. Desde el pescador que quiere garantizar su producto hasta la precisión en las mediciones de cuantificación de toxina (s). Destacando así dos grandes diferencias entre los métodos que detectan la toxicidad general y aquellos que cuantifican la toxina y determinan los análogos presentes (Caillaud *et al.*, 2010).

Los métodos utilizados para medir ciguatoxinas en este estudio se resumen en el anexo D con sus respectivas muestras positivas y negativas y aquellas que no pudieron ser evaluadas, todo esto a conforme se detalla en los objetivos.

Tomando en cuenta los puntos anteriores podemos destacar que el ARTOX es un ensayo sensible ante la presencia de compuestos tóxicos como se detalla en el apartado 8.5, de la misma manera se pueden observar algunas diferencias en sensibilidad entre este ensayo y el BR y por lo que su uso como prueba tamiz es de utilidad, sin embargo se sugiere el análisis complementario por medio de otros métodos cuantitativo como el BR, Neuro2A, RBA, RBA (F) y/o el HPLC, que reforzaran lo obtenido que en términos de investigación y/o cuestiones de diagnóstico médico. Sin embargo, hay que tener en cuenta los costos económicos, como se describen en el apartado 8.5.

Por su parte el método de Microtox® requiere nuevos ensayos para estandarizar y adecuar esta técnica al análisis de ciguatoxinas, ya que como señala Fort (1992), que en el uso de compuestos de baja solubilidad en agua, como es el caso de estas toxinas marinas, requiere adecuaciones particulares. En el apartado 8.6, se comparan algunos de los usos en este sentido. Sin embargo, es importante continuar las investigaciones que permitan innovar o

adecuar nuevos métodos prácticos para la detección de este tipo de toxinas. La adecuación de otros métodos con mayor sensibilidad, especificidad, (entre otras características) requieren su establecimiento, representan un reto y serían de gran ayuda en el monitoreo e investigación de ciguatoxinas en el país, son el caso del método que utiliza líneas celulares como el Neuro 2A, los cuales permiten la lectura de un gran número de muestras en un tiempo relativo (Caillaud *et al.*, 2010; EFSA, 2010). Algunos autores concuerdan en que el Neuro 2A es un método que se perfila para ser usado como método de referencia en materia de regulación, todo esto en consideración al punto de vista ético sobre el uso de ratones (Caillaud *et al.*, 2010; EFSA, 2010).

Por otro lado los estudios con RBA_(F) (aunque son pocos usando este principio de fluorescencia -Hardison *et al.*, 2016 y Litaker *et al.*, 2014-), han sido bien correlacionados con otros métodos como el BR y el Neuro 2A (Caillaud *et al.*, 2010; Darius *et al.*, 2007; EFSA, 2010). Este método, es relativamente práctico, muy sensible y se pueden leer un número elevado de muestras en un solo análisis, pero requiere de también de adecuaciones y estandarizaciones, que una vez establecidas será una técnica de gran utilidad que en lo futuro es posible se convierta en una de las metodologías más usadas en el monitoreo e investigación de estas neurotoxinas, pues a diferencia del RBA clásico no se requiere el uso de compuestos radioactivos e infraestructura correspondiente.

Cabe señalar que en este estudio de tesis no se utilizó este método de manera cuantitativa debido a la falta de estándares comerciales de ciguatoxinas o internos, como los autores antes mencionados; sin embargo, su uso de manera cualitativa se pudo comprobar plenamente quedando solo pendiente corroborar la naturaleza química de las toxinas presentes, es decir el tipo de análogos por medio de un método analítico (ej. HPLC-MS).

9. CONCLUSIONES

- Se corroboró la presencia de ciguatoxinas en peces carnívoros de la Península de Yucatán. Determinando la existencia de estas neurotoxinas en los estados que la conforman (Campeche, Quintana Roo y Yucatán).
- La detección de estos compuestos fue principalmente en vísceras.
- Se determinó la presencia de ciguatoxinas en la barracuda (*S. barracuda*) por BR y ARTOX. Lo que documenta a esta especie como uno de los principales recursos pesqueros que pueden ser un vector de ciguatera en el Caribe mexicano y aguas adyacentes. Su consumo representa un riesgo a la salud pública pues en algunos casos se superan el límite máximo permisible en la normatividad nacional e internacional.
- Otras especies de peces carnívoros de importancia comercial como *C. hippos*, *E. morio*, *H. plumierii*, *L. maximus*, *L. synagris*, *O. chrysurus*, *R. terraenovae* y *S. tiburo* (jurel, mero, chac-chí, boquinete, rubia, pargo canané y cazones; respectivamente) también representan un riesgo a la salud en esta región, por lo que el contenido de ciguatoxinas (además de las vísceras) se debe evaluar en futuras investigaciones en el músculo de estas especies y otras especies de peces carnívoros de consumo regional.
- La detección de ciguatoxinas en otras peces carnívoros (además de la barracuda) es de interés en salud pública e inocuidad alimentaria, porque no solo confirma la hipótesis de que otras especies de peces pueden estar involucradas en los casos de ciguatera de la región, si no también que su origen(es), transferencia y bioacumulación puede ser local.
- Se determinó por primera vez la presencia de ciguatoxinas del estado de Campeche.
- Del total de muestras analizadas por BR ($N= 96$), el 25% ($n= 24$) fueron muestras letales; 37.5% ($n= 36$) subletales y el mismo porcentaje y número de muestras inocuos.
- Del total de muestras analizadas por ARTOX ($N= 72$), el 36% ($n= 26$) fueron que muestras que produjeron hasta el 100% de mortalidad en *A. salina* (muy tóxicos), el 21% ($n= 15$) presentaron una toxicidad media, solo un 8% ($n= 6$) fueron poco tóxicas

y el 35% ($n= 25$) fueron inocuas. Lo que en conjunto representa que hasta un 65% de las muestras presentaron algún tipo de toxicidad por éste método.

- Con base en estos resultados, el ARTOX puede ser un modelo útil y práctico como “prueba de tamiz” en una evaluación preliminar de detección presuntiva de ciguatoxinas, debido a su sensibilidad y otras varias ventajas ya que no se trata de un organismo vertebrado, su biología permite un manejo óptimo debido a su tamaño pequeño y ciclo de vida corto, es ampliamente utilizado por otros bioensayos de toxicidad, en el caso de los adultos permite una buena observación de los signos clínicos presentados, además de que los costos de obtención y manutención son accesibles.
- Adicionalmente este modelo puede contribuir al estudio del (os) efecto (s) de estos compuestos en salud animal (principalmente organismos acuáticos).
- Aunque el método de Microtox® sí detecta toxicidad (de manera muy baja) en la muestras problema evaluadas con ciguatoxinas, no se pudo correlacionar con la toxicidad obtenida por BR por lo que esta técnica requiere una mayor estandarización y adecuación para su evaluación toxinológica en el organismo blanco (*V. fischeri*).
- Esta es la primera vez que se evaluó el método de Microtox® para la posible detección de ciguatoxinas.
- Se confirmó que el método de $RBA(F)$ es un método útil, muy sensible y relativamente práctico para la detección de ciguatoxinas. En este estudio se pudo comprobar su utilidad en la confirmación de la presencia de ciguatoxinas en las muestras problema (previamente evaluadas por BR), que por estar basado en el mecanismo de acción de estas toxinas lo vuelve altamente específico para la detección de toxinas que sobreactivan el canal de Na^+ , como lo son las ciguatoxinas.
- Una combinación de los 3 métodos es sugerido de manera secuencial para este tipo de estudios:
 - Primero. Evaluación por ARTOX como prueba de tamizado.
 - Segundo. Detección y cuantificación por BR (método oficial en la regulación nacional) y
 - Tercero. La confirmación de la presencia de ciguatoxinas por medio de $RBA(F)$.

10. LITERATURA CITADA

Abraham, A., E. L. E. Jester, H. R. Granade, S. M. Plakas, R. W. Dickey. 2012. Caribbean ciguatoxic profile in raw and cooked fish implicated in ciguatera. *Food Chemistry*. 131: 192-198.

Adachi, R., Y. Fukuyo. 1979. The thecal plate structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera endemic area. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 45, 67-71.

Aguilar-Perera, A., A. Tuz-Sulub. 2010. Non-native, invasive red lionfish (*Pterois volitans* [Linneaus, 1758]: Scorpaenidae), is first recorded in the southern Gulf of Mexico, off the northern Yucatan Peninsula, Mexico. *Aquatic Invasions*. 5 (Supplement 1): S9-S12.

Aguilar-Perera, A. 2012. Eating Lionfish: An Effective Solution to Control its Invasion?. *Proceedings of the 65° Gulf and Caribbean Fisheries Institute*. Santa Marta Colombia. 5-9.

Ajuzie C. C. 2007. Palatability and fatality of the dinoflagellate *Prorocentrum lima* to *Artemia salina*. *J. Appl. Phycol.* 19: 513-519.

Almazán-Becerril, A., G. Rosiles-González, S. Escobar-Morales, M. Rodríguez-Palacios, D. U. Hernández-Becerril. 2012. Dinoflagelados bentónicos del Arrecife Mesoamericano: Caribe Mexicano. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Unidad de Ciencias del Agua. Informe final SNIB-CONABIO. Proyecto No. HJ033, México, D. F.

Almazán-Becerril, A., S. Escobar-Morales, G. Rosiles-González, F. Valadez. 2015. Benthic epiphytic dinoflagellates from the northern portion of the Mesoamerican Reef System. *Botanica Marina*. 58 (2):115-128.

Al-Sabi, A., J. McArthur, V. Ostroumov, R. French. 2006. Marine toxins that target voltage-gated sodium channels. *Mar. Drugs*. 4: 157–192.

Amador-del Ángel, L. E., E. Endañú-Huerta, J. E. López-Contreras, A. T. Wakida-Kusunoki, E. Guevara-Carrió, R. Brito Pérez. 2015. Fauna exótica establecida e invasora en el Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos, Campeche: Estado actual, impactos, necesidades y perspectivas. En: Amador-del Ángel, L. E. y M. Frutos-Cortés (Eds.). *Problemas contemporáneos regionales del Sureste Mexicano. El caso del estado de Campeche*. Editorial Mariángel. Primera Edición. Puebla, Puebla. pp 234-279.

Arcila-Herrera, H., J. Mendoza-Agora, F. González-Franco, L. Montero-Cervantes, A. Castello-Navarrete. 2001. Revisión de una enfermedad poco conocida: la ciguatera. *Rev. Biomed.* 12: 27-34.

Ayala-Pérez, L. A., J. Ramos-Miranda, D. Flores-Hernández, A. Sosa-López, G. E. Martínez-Romero. 2015. Ictiofauna marina y costera de Campeche. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Primera Edición. Ciudad de México, México 520 p.

Bagnis, R. 1994. Natural versus anthropogenic disturbances to coral reefs: comparison in epidemiological patterns of ciguatera. *Memoirs of the Queensland Museum* 34 (3): 455-460.

Barón-Campis, S. A., Y. B. Okolodkov, G. V. Ríos-Lara, N. Vázquez-Gómez, V. Rubio-Sánchez, G. Arce-Rocha, W. A. González-López, E. J. Núñez-Vázquez. 2014. Dinoflagelados nocivos y ciguatoxinas en la costa norte de Yucatán: Un riesgo para el futuro desarrollo de la maricultura. En: Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar, (21°, 2014, Isla de Cozumel, Q. Roo., México). Trabajos, Isla de Cozumel, México, Secretaría de Educación Pública (SEP).

Barra-González, L. A. 2016. Prospección de toxinas tipo ciguatoxinas en *Sphyraena barracuda* y otros peces carnívoros y coralívoros de la zona de Tuxpan, Veracruz, México. Tesis (Lic. Biólogo Marino). Tuxpan, Veracruz, México. Universidad Veracruzana. 116 p.

Barra-González, L. A., E. J. Núñez-Vázquez, E. A. Zarza-Meza, R. E. Orduña-Medrano. 2017. Prospección de toxinas tipo ciguatoxinas en *Sphyraena barracuda* y otros peces carnívoros y coralívoros de la zona de Tuxpan, Veracruz, México. En: Congreso de la Sociedad Mexicana para el Estudio de los Florecimientos Algales Nocivos y Reunión Associação Latino-americana para o Estudo de Algas Nocivas, (4° y 2°, 2017, Cancún, QR., México). Memorias, Cancún, QR., México. SOMEFAN, A. C.

Barton, E. D., P. Tanner, S. G. Turchen, C. L. Tungen, A. Manoguerra, R. F. Clarck. 1995. Ciguatera fish poisoning: A Southern California epidemic. *West J. Med.* 163: 31-35.

Bauer-Gottwein, P., B. R. N. Gondwe, G. Charvet, L. E. Marín, M. Rebolledo-Vieyra, G. Merediz-Alonso. 2011. Review: The Yucatán Peninsula karst aquifer, Mexico. *Hydrogeology Journal.* 19: 507-524.

Blythe, D. G.; L. Fleming, D. R. Ayyar, D. De Sylva, D. Baden, K. Schrank. 1994. Mannitol therapy for acute and chronic ciguatera fish poisoning. *Memoirs of the Queensland Museum* 34 (3): 465-470.

Bogdanoff, A. K., J. L. Akins, J. A. Morris. 2013. GCFI Lionfish Workgroup. 2014. Invasive Lionfish in the Marketplace: Challenges and Opportunities. Proceedings of the 66th Gulf and Caribbean Fisheries Institute, Corpus Christi, Texas. USA. GCFI. (66): 140-147.

Bomber, J. W., S. L. Morton, J. A. Babinchak, D. R. Norris, J. G. Morton. 1988. Epiphytic dinoflagellates of drift algae another toxigenic community in the ciguatera food chain. *Bull. Mar. Sci.* 43: 204-214.

Boisier, P., G. Ranaivoson, N. Rasolofonirina, B. Andriamahefazafy, J. Roux, S. Chanteau, M. Satake, T. Yasumoto. 1995. Fatal mass poisoning in Madagascar following ingestion of a shark (*Carcharhinus leucas*): clinical and epidemiological aspects and isolation of toxins. *Toxicon. Off. J. Int. Soc. Toxinol.* 33 (10): 1359-1364.

Bottein-Dechraoui, M. Y., J. A. Tiedeken, R. Persad, Z. Wang, H. R. Granade, R. W. Dickey, J. S. Ramsdell. 2005. Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: Application to great barracuda from Florida Keys. *Toxicon.* 46: 261-270.

Bourdeau, P., R. Bagnis. 1989. Facteurs de risqué ciguatérique aux Antilles dans la région de Saint-Barthélémy, Saint-Martin et Anguilla. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.* 42 (3): 393-410.

Brody, R. W. 1971. Fish Poisoning in the Eastern Caribbean. In the: 24th Annual Session Gulf and Caribbean Fisheries Institute Miami, Florida. Caribbean Research Institute.

Bruno, M., P. M. B. Gucci, E. Pierdominici, A Ioppolo, L. Volterra. 1990. Presence of saxitoxin in toxic extracts from *Gonyaulax polyedra*. *Toxicon* 28: 9. 1113-1116.

Cabanillas, K., B. Davin. 2012. Possible Presence of Ciguatoxin in Red Lionfish from the Cayman Islands. Berry Collage, Mount Berry. Georgia, U.S.A. 8 pp.

Cahuich-Sanchez, Y. R, E. J. Núñez-Vázquez, C. A. Poot-Delgado, F. E. Hernández-Sandoval, J. J. Bustillos-Guzmán. Evaluación de toxinas lipofílicas e hidrofílicas en el “osti6n americano” *Crassostrea virginica* y el “pez torito” *Acanthostracion quadricornis* de las costas de Campeche. 2017. En: Congreso de la Sociedad Mexicana para el Estudio de los Florecimientos Algales Nocivos y Reunión Associaç6o Latino-americana para o Estudo de Algas Nocivas, (4^o y 2^o, 2017, Cancún, QR., México). Memorias, Cancún, QR., México. SOMEFAN, A. C.

Caillaud, A., P. de la Iglesia, H. T. Darius, S. Pauillac, K. Aligizaki, S. Fraga, M. Chinain J. Diogène. 2010. Update on Methodologies Available for Ciguatoxin Determination: Perspectives to Confront the Onset of Ciguatera Fish Poisoning in Europe [1]. *Mar. Drugs.* 8: 1838-1907. doi:10.3390/md8061838.

Campa-Córdova, A. I., E. J. Núñez-Vázquez, A. Luna-González, M. J. Romero-Geraldo, F. Ascencio. Superoxide dismutase activity in juvenile *Litopenaeus vannamei* and *Nodipecten subnodosus* exposed to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* 149: 317-322.

Campbell, D. L.; L. A. Lawton; K. A. Beattie; G. A. Codd. 1994. Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and Microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR containing) cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9: 71-77.

Cassadou, S., E. Daudens. 2013. La Ciguatera dans Les Antilles françaises. Bulletin de veille sanitaire. 3: 17

Cassadou, S., L. Ginhoux, S. Boa, S. Boucau, F. de Saint-Alary. 2013. Intoxications ciguatériques en Guadeloupe: situation inhabituelle en 2012. Dans: La Ciguatera dans Les Antilles françaises. Bulletin de veille sanitaire. 3: 17

Chan, T. Y. K. 2014. Large outbreaks of ciguatera after consumption of brown marbled grouper. Toxins. 6: 2041–2049.

Chan, T. Y. K. 2015. Emergence and Epidemiology of Ciguatera in the Coastal Cities of Southern China. Mar. Drugs 13: 1175-1184.

Claro, R. 1994. Ecología de los peces marinos de Cuba. Instituto de Oceanología. Academia de Ciencias de Cuba y Centro de Investigaciones de Quintana Roo. 525 p.

Clothier, R. H., L. M. Hulme, M. Smith, M. Balls. 1987. Comparison of the in vitro cytotoxicities and acute in vivo toxicities of 59 chemicals. Molecular Toxicity 1: 571-577.

COFEPRIS. 2003-2015. Marea Roja. Antecedentes en México. Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios. Secretaria de Salud.

Darius, H.T., D. Ponton, T. Revel, P. Cruchet, A. Ung, M. Tchou Fouc, M. Chinain. 2007. Ciguatera risk assessment in two toxic sites of French Polynesia using the receptor-binding assay. Toxicon. 50: 612-626.

Darius, H. T.; M. Roué, M. Sibat, J. Viallon, C. Gatti, M. Vandersea, P. Tester, R. Litaker, Z. Amzil, P. Hess, M. Chinain. 2018 a. *Tectus niloticus* (Tegulidae, gastropod) as a novel vector of ciguatera poisoning: Detection of Pacific ciguatoxins in toxic samples from Nuku Hiva Island (French Polynesia). Toxins. 10: 2. doi:10.3390/toxins10010002.

Darius, H. T.; M. Roué, M. Sibat, J. Viallon, C. Gatti, M. Vandersea, P. Tester, R. Litaker, Z. Amzil, P. Hess, M. Chinain. 2018 b. Toxicological Investigations on the Sea Urchin *Tripneustes gratilla* (*Toxopneustidae*, Echinoid) from Anaho Bay (Nuku Hiva, French Polynesia): Evidence for the Presence of Pacific Ciguatoxins. Mar. Drugs. 16: 122. doi:10.3390/md16040122.

De Fouw, J. C., H. P. Van Egmond, G. J. A. Speijers. 2001. Ciguatera fish poisoning: a review. RIVM Report No.388802021 (www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/388802021.html).

De Haro, L.; M. Hayek-Lanthois, F. Joossen, M-F. Affaton, J. Jouglard. 1997a. Intoxication collective ciguatérique après ingestion d'un barracuda au Mexique: deductions pronostique thérapeutique. Med Trop. 57: 55-58.

- De Haro, L.; M. Hayek-Lanthois, F. Joossen, P. Pes, L. Castanier, J. Jouglard. 1997b. Medical management in the Marseilles Poison Centre o a ciguatera poisoning collective case after a meal of one barracuda in Mexico. *Toxicon*. 35: 810.
- De Sylva, D. P. 1994. Distribution and ecology of ciguatera fish poisoning in Florida, with emphasis on the Florida Keys. *Bulletin of Marine Science* 54 (3): 944-954.
- Dickey, R. W., H. R. Granade, F. D. McClure. 1994. Evaluation of the Cigua-tect solid-phase immuno bead assay for the detection of ciguatera related biotoxins in Caribbean finfish. *Mem. Queens. Mus.* 34 (3): 481–488.
- Dickey, R. W., S. M. Plakas. 2010. Ciguatera: a public health perspective. *Toxicon* 56 (2): 123-136.
- Dierking, J., C. E. Campora. 2009. Ciguatera in the Introduced Fish *Cephalopholis argus* (Serranidae) in Hawai'i and Implications for Fishery Management. *Pacific Science*. 63 (2): 193-204.
- Diller, J. L., T. K. Frazer, C. A. Jacoby. 2014. Coping with the lionfish invasion: Evidence that naïve, native predators can learn to help. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 455: 45-49.
- Diogène, J., L. Reverté, M. Rambla-Alegre, V. del Río, P. de la Iglesia, M. Campàs, O. Palacios, C. Flores, J. Caixach, C. Ralijaona, I. Razanajatovo, A. Pirog, H. Magalon, N. Arnich, J. Turquet. 2017. Identification of ciguatoxins in a shark involved in a fatal food poisoning in the Indian Ocean. *Scientific Reports*. 7: 8240.
- DOF. 2010. Acuerdo mediante el cual se da a conocer la actualización de la Carta Nacional Pesquera. SAGARPA. Diario Oficial de la Federación, 2 de diciembre de 2010. 319 p.
- Dvorak, P., K. Benova, J. Vitek. 2012. Alternative Biotest on *Artemia franciscana*, *Ecotoxicology*. Ghousia Begum (Ed.), ISBN: 978-953-51-0027-0, InTech, Available from:<http://www.intechopen.com/books/ecotoxicology/alternative-biotest-on-artemia-franciscana>).
- D'ors, A., M. C. Bartolomé, S. Sánchez-Fortún 2014. Risk associated with toxic blooms of marine phytoplankton functional groups on *Artemia franciscana*. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2(8): 625-631.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain; Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish Emerging toxins: Ciguatoxin group. 2010. *EFSA Journal* 8 (6): 1627. 38 pp. doi:10.2903/j.efsa.2010.1627. www.efsa.europa.eu

- Faimali, M., V. Giussani, V. Piazza, F. Garaventa, C. Corrà, V. Asnaghi, D. Privitera, L. Gallus, R. Cattaneo-Vietti, L. Mangialajo, M. Chiantore. 2012. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 76: 97-107.
- FAO. 2005. Marine Biotoxins. FAO-Food and Nutrition paper 80. Organization of the United Nations: Rome, Italy. 278 p.
- Farstad, D. H., T. Chow. 2001. A brief case report and review of ciguatera poisoning. *Wilderness and Environmental Medicine.* 12: 263-269.
- Faust, M. A. 1991: Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely different sites. *Journal of phycology* 27: 642-648.
- Feldman, D. B., J. C. Seely. 1988. *Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit.* CRC Press. Florida, U.S.A.
- Fernández, M. L.; D. J. A. Richard, A. Cembella. 2003. *In vivo* assays for phycotoxins. In: Hallegraef, G. M., D. M. Anderson, A. Cembella. (eds). *Manual on Harmful Marine Microalgae.* IOC-UNESCO. pp 347-382.
- Food and Drug Administration (FDA). 2011. *Fish and Fishery Products Hazards and Control Guidance.* Fourth Edition. US Department of Health and Human Services, Food Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. United. States. 476 pp.
- Food and Drug Administration (FDA). 2013. *Guidance for Industry: Purchasing Reef Fish Species Associated with the Hazard of Ciguatera Fish Poisoning.* United States. (<http://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-foods/gen/documents/document/ucm345045.pdf>).
- Fort, F. L. 1992. Correlation of Microtox EC 50 with mouse LD 50. *In Vitro Toxicol.* 5:73-82.
- Gaboriau, M., D. Ponton, H. T. Darius, M. Chinain. 2014. Ciguatera fish poisoning in French Polynesia: size does not always matter. *Toxicon.* 84: 41-50.
- Gamboa, P. M.; D. L. Parck, J. M. Fremy. 1992. Extraction and purification of toxic fractions from barracuda (*Sphyraena barracuda*) implicated in ciguatera poisoning. In: *Proceedings of the International Conference on Ciguatera Fish Poisoning, (3^o, 1990, San Juan, Puerto Rico).* T. R. Tosteson (Ed.). Polyscience Publications, Quebec. Canada. pp: 13-24.
- Garaventa F., C. Gambardella, A. Di Fino, M. Pittore, M. Faimali. 2010. Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. *Ecotoxicology.* 19: 512-519.

GCFINET, Archives. 2012. Lionfish with the ciguatera issue in the Caribbean. Gulf and Caribbean Fisheries Institute. (<http://listserv.gcfi.org/scripts/wa-GCFI.exe?A2=gcfinet;4115c0d3.1205>).

Geller, R. J., K. R. Olson, P. E. Sendcal. 1991. Ciguatera fish poisoning in San Francisco, California, caused by imported barracuda. *West J Med.* Dec. 155: 639-642.

Giacobbe, M. G., X. Yang. 1999. The life history of *Alexandrium taylori* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 35: 331-338.

Gómez, F, D. J. Qiu, R. M. Lopes, S. J. Lin. 2015. *Fukuyoa paulensis* gen. et sp. nov., a new genus for the globular species of the dinoflagellate *Gambierdiscus* (Dinophyceae). *Plos One.* 10 (4): 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119676> PMID: 25831082

Graham, M. N., R. J. Lewis. 2006. Ciguatoxins: Cyclic Polyether Modulators of Voltage-gated Ion Channel Function. *Mar. Drugs.* 4: 82-118.

Granade, H., P. Cheng, N. Doorenbos. 1976. Ciguatera I: brine shrimp (*Artemia salina* L) larval assay for ciguatera toxins. *J. Pharm. Sci.* 65: 1414-1415.

Habermehl, G. G., H. C. Krebs, P. Rasoanaivo, A. Ramialiharisoa. 1994. Severe ciguatera poisoning in Madagascar: a case report. *Toxicon* 32 (12): 1539-1542.

Halstead, B. W. 1968. Poisonous and venomous marine animals of the world. The Darwin Press: U. S. A.

Hamilton, B. R., M. Hurbungs, J. P. Vernoux, A. Jones, R. J. Lewis. 2002 a. Isolation and characterization of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon.* 40: 685-693.

Hamilton, B., M. Hurbungs, A. Jones, R. J. Lewis. 2002 b. Multiple ciguatoxins present in Indian Ocean reef fish. *Toxicon* 40, 1347-1353.

Hamilton, B., N. Whittle, G. Shaw, G. Eaglesham, M. R. Moore, R. J. Lewis. 2010. Human fatality associated with Pacific ciguatoxin contaminated fish. *Toxicon* 56, 608-673.

Hardison, D. R., W. C. Holland, J. R. McCall, A. J. Bourdelais, D. G. Baden, H. T. Darius, M. Chinain, P. Tester, D. Shea, H. A. Flores Quintana, R. W. Litaker. 2016. Fluorescent receptor binding assay for detecting ciguatoxins in fish. *Plos ONE.* 11 (4).

Hedrich, H., G. Bullock, P. Petrusz. 2004. The Laboratory Mouse. The Handbook of Experimental Animals. Elsevier Academic Press. 600 pp.

Heimann, K, A. Capper, L. Sparrow. 2011. Ocean Surface Warming: Impact on Toxic Benthic Dinoflagellates Causing Ciguatera. eLS. John Wiley & Sons, Ltd.

- Heredia-Tapia, A., B. O. Arredondo-Vega, E. J. Núñez-Vázquez, T. Yasumoto, M. Yasuda, J. L. Ochoa. 2002. Isolation of *Prorocentrum lima* (Syn. *Exuviaella lima*) and diarrhetic shellfish poisoning (DSP) risk assessment in the Gulf of California, Mexico. *Toxicon* 40: 1121-1127.
- Hernández-Becerril, D. U., A. Almazán-Becerril. 2004. Especies de dinoflagelados del género *Gambierdiscus* (Dinophyceae) del Mar Caribe Mexicano. *Rev. Biol. Trop.*, 52 (Suppl. 1) 77-87.
- Holmes, M. J., R. J. Lewis. 1994. The origin of ciguatera. *Memoirs of the Queensland Museum* 34(3): 497-504.
- Irola-Sansores, E. D. 2016. Dinámica poblacional de los dinoflagelados bentónicos en dos géneros de macroalga *Dictyota* y *Amphiroa* en dos sistemas arrecifales del norte de Quintana Roo. Tesis (Maestría en Ciencias del Agua). Cancún, Quintana Roo. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. 122 p.
- Jiang, X-W., X. Li, P. K. S. Lam, S. H. Cheng, D. Schlenk, Y. Sadovy de Mitcheson, Y. Li, J-D. Gu, L. L. Chan. 2012. Proteomic analysis of hepatic tissue of ciguatoxin (CTX) contaminated coral reef fish *Cephalopholis argus* and moray eel *Gymnothorax undulatus*. *Harmful Algae*. 13: 65-71.
- Kaiser, K. L. E. 1998. Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environmental Health Perspectives*. 106 (2): 583-591.
- Kato, T., T. Yasumoto. 2017. Quantification of representative ciguatoxins in the Pacific using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Mar. Drugs*. 15: 309.
- Kelly A. M., C. C. Kohler., D. R. Tindall. 1992. Are crustaceans linked to the ciguatera food chain? *Environ. Biol. Fish.* 33: 275-286.
- Keynan, Y., I. Pottesman. 2004. Neurological symptoms in a traveler returning from Central America. *Journal of Internal Medicine*. 256: 174-175.
- Kholer, S. T., C. Kholer. 1992. Dead blanched coral provide new surfaces for dinoflagellates implicated in ciguatera fish poisonings. *Environ. Biol. Fish.* 35: 413-416.
- Kiviranta, J., K. Sivonen, S. I. Niemela. 1991. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6: 423-436.
- Knie, J. L. W., E. W. Lopes. 2004. Testes ecotoxicológicos, Métodos, técnicas e aplicações. *FATMA, GTZ*. 289 pp.
- Landsberg, J. H. 2002. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Reviews in Fisheries Science*. 10 (2):113-390.

- Lange, W. R., F. R. Snyder, P. J. Fudala. 1992. Travel and ciguatera fish poisoning. *Arch. Intern. Med.* 152: 2049-2052.
- Laurent, D., B. Yeeting, P. Labrosse, J-P. Gaudechaux. 2005. *Ciguatera: un guide pratique*. Institut de recherche pour le developement .Secretariat of the Pacific Community. 88 pp.
- Lawton, L. A., D. L. Campbell, K. A. Beattie, G. A. Codd. 1990. Use of a rapid bioluminescence assay for detecting cyanobacterial microcystin toxicity. *Letters in Applied Microbiology* 11: 205-207.
- Lechuga-Devéze, C., A. Sierra-Beltrán. 1995. Documented case of ciguatera on the Mexican Pacific Coast. *Natural Toxins.* 3: 415-418.
- Lee, T-H.; Y-M. Chen, H-N. Chou. 1999. Toxicity assay of cyanobacterial strains using *Artemia salina* in comparison with the mouse bioassay. *Acta Zoologica Taiwanica* 10 (1): 00-00.
- Legrand, A. M. 1998. Ciguatera toxins: origin, transfer through the food chain and toxicity to humans. In: B. Reguera, J. Blanco, L. Fernández, and T. Wyatt (eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, Spain. p. 39-43.
- Lehane, L. 1999. Ciguatera fish poisoning: a review in a risk-assessment framework. National Office of Animal and Plant Health, Agriculture, Fisheries and Forestry. Australia, Canberra.
- Lehane, L., R. J. Lewis. 2000. Review Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 91-125.
- Lewis, R. J., M. Holmes. 1993. Origin and transfer of toxins involved in Ciguatera. *Comp. Biochem Physiol.* 106 (3): 615-628.
- Lewis, R. L. 1995. Detection of ciguatoxins and related benthic dinoflagellate toxins: in vivo and in vitro methods. In: Hallegraef, G. M., D. M. Anderson, A. D. Cembella, H. O. Enevoldsen, H. (Eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO-IOC, Paris, pp.135-161.
- Lewis, R. J. 2001. The changing face of ciguatera. *Toxicon.* 39: 97-106.
- Lewis, R. L. 2003. Detection of toxins associated with ciguatera fish poisoning. In: Hallegraef, G. M., D. M. Anderson, A. Cembella. (Eds.). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC-UNESCO. pp: 267-278.

Ley-Martínez, T-C., E. J. Núñez-Vázquez, A. Almazán-Becerril, S. A. Barón-Campis, C. Ramírez-Camarena, J. A. Caballero-Vázquez, E. F. Balart-Páez. 2014. Bioprospección de toxinas tipo ciguatoxinas en peces carnívoros del Caribe Mexicano y aguas adyacentes. En: Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar, (21°, 2014, Isla de Cozumel, QR., México). Trabajos, Isla de Cozumel, México, Secretaría de Educación Pública (SEP).

Ley-Martínez, T-C. 2016. Bioprospección de toxinas tipo ciguatoxinas en peces carnívoros del Caribe Mexicano y aguas adyacentes. Tesis (Lic. Biólogo Marino). La Paz, B.C.S., México. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 94 p.

Litaker, R. W. D. R. Hardison, W. C. Holland, A. J. Bourdelais, J. R. McCall, D. G. Baden, J. A. Morris, A. K. Bogdanoff, P. A. Tester. 2014. Ciguatoxin concentrations in invasive lionfish estimated using a fluorescent receptor binding assay. 16 ICHA Proceedings. 2014: 14.

López-Flores, R., D. Boix, A. Badosa, S. Brucet, X. D. Quintana. 2010. Is Microtox® toxicity related to potentially harmful algae proliferation in Mediterranean salt marshes?. *Limnetica*. 29 (2): 257–268.

Mak, Y. L., T-C. Wai, M. B. Murphy, W-H. Chan, J. J. Wu, J. C. W. Lam, L. L. Chan, P. K. S. Lam. 2013. Pacific Ciguatoxins in Food Web Components of Coral Reef Systems in the Republic of Kiribati. *Environ. Sci. Technol.* 47: 14070–14079.

Martínez-Orozco, M. J., A. Cruz-Quintero. 2013. Revisión y Guía para Diagnóstico y Tratamiento de la Ciguatera. *Revista Ciencias Biomédicas*. 4: (1) 174-185.

Matta, J., M. Milad, R. Manger, T. Tosteson. 1999. Heavy metals, lipid peroxidation, and ciguatera toxicity in the liver of the Caribbean barracuda (*Sphyraena barracuda*). *Biological Trace Element Research*. 70: 69-79.

McFadden, D. 2011. St Maarten finds local lionfish tainted with toxin. *Associated Press*. (<http://phys.org/news/2011-11-st-maarten-local-lionfish-tainted.html#jCp>)

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

Meyer, L., A. Capper, S. Carter, C. Simpfendorfer. 2016. An investigation into ciguatoxin bioaccumulation in sharks. *Toxicon*. 119: 234-243.

Morris, J. A. Jr., J. L. Akins. 2013. El pez león invasor: guía para su control y manejo. Gulf and Caribbean Fisheries Institute Special Publication Series. No. 2, Marathon. Florida, USA. 126 pp.

Murata, M., A. M. Legrand, Y. Ishibashi, M. Fukui, T. Yasumoto. 1990. Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. J. Am. Chem. Soc. 112: 4380–4386.

Nature Foundation St Marteen, 2011. Nota periodística (<http://sxmislandtime.com/component/k2/item/16465-nature-foundation-recommends-population-not-eat-lionfish-study-shows-toxins-found-in-lionfish-caught-in-st-maarten-waters.html>)

Neves, R. A. F., T. Fernandes, L. N. dos Santos, S. M. Nascimento. 2017. Toxicity of benthic dinoflagellates on grazing, behavior and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. PLoS ONE. 12: (4).

NOM-062-200-1999. 1999. Norma Oficial Mexicana para producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. SAGARPA, México.

NOM-242-SSA1-2009. Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. DOF 10-feb-2009, 2a sección, 128 p.

Núñez-Vázquez, E. J., A. Sierra-Beltrán, J. L. Ochoa. 1996. Presencia de Biotoxinas tipo Ciguatoxinas en peces carnívoros de Baja California Sur. In: Abstracts XI International Symposium of Marine Biology. (11°, 1996, La Paz, B.C.S., México) Abstracts. La Paz, B.C.S., México, Universidad Autónoma de Baja California Sur. pp. 11.

Núñez-Vázquez, E. J., A. Sierra-Beltrán., V. A. Cruz, J. L. Ochoa. 1997. Ciguatoxins on Serranidae and Lutjanidae fish of Baja California Sur, Mexico. In: Abstracts. 12 th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins-International Society of Toxinology. (12°, 1997, Cuernavaca, Morelos, México) Abstracts. Cuernavaca, Morelos, México, International Society of Toxinology. (Toxicon). pp. 1224.

Núñez-Vázquez, E. J. 2005. Biotoxinas marinas en peces comestibles de Baja California Sur: origen, identificación y cuantificación. Tesis (Lic. Biólogo Marino). La Paz, B.C.S., Universidad Autónoma de Baja California Sur La Paz, B.C.S., México. 86 p.

Núñez-Vázquez, E.J., J. J. Bustillos-Guzmán, A. Heredia-Tapia, T. Yasumoto, A. Cruz-Villacorta, C. J. Band-Schmidt, I. Garate-Lizárraga, D. J. López-Cortés, F. E. Hernández-Sandoval, J. L. Ochoa. 2009. Múltiples toxinas marinas en el hígado de *Mycteroperca prionura*, *M. rosacea* y *Lutjanus colorado* asociados a la ciguatera en la isla El Pardito, B. C. S., México. In Resúmenes del III Taller sobre Florecimientos Algas Nocivos: Integración del conocimiento sobre eventos de FAN en México (3°, 2009, Acapulco, Guerrero, México). Resúmenes, Acapulco, Guerrero, México. Sociedad Mexicana para el Estudio de los Florecimientos Algas Nocivos, A. C: pp. 52.

Núñez-Vázquez, E. J., C. Ramírez-Camarena, C. A. Poot-Delgado, A. Almazán-Becerril, J. A. Aké-Castillo, A. Pérez-Morales, F. E. Hernández-Sandoval, L. J. Fernández-Herrera, A. Heredia-Tapia, C. J. Band-Schmidt, J. J. Bustillos-Guzmán, D. J. López-Cortés, G. Domínguez-Solís, T. Ley-Martínez, Y. R. Cauich-Sánchez, L. A. Barra-González. 2016. Toxinas marinas en el Golfo de México: orígenes e impactos. En: García-Mendoza, E., S. I. Quijano-Scheggia, A. Olivos-Ortiz, E. J. Núñez-Vázquez (eds.). Florecimientos Algales Nocivos en México. CICESE. Ensenada, México. pp 309-323.

Núñez-Vázquez, E. J., J. J. Bustillos-Guzmán, D. J. López-Cortés, A. Heredia-Tapia, C. J. Band-Schmidt, F. E. Hernández-Sandoval, I. Gárate-Lizárraga, C. A. Salinas-Zavala, A. Cordero-Tapia, A. Almazán-Becerril, J. L. Ochoa. 2018. Ciguatera in Mexico. Mar. Drugs. (En revisión).

Nunes, B. S., F. D. Carvalho, L. M. Guilhermino, G. Van Stappen 2006. Review-Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. Environmental Pollution 144: 453-462.

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

Okolodkov, Y. B., F. C. Merino-Virgilio, J. A. Herrera-Silveira, S. Espinosa-Matías, M. R. Parsons. 2009. *Gambierdiscus toxicus* in the southeastern Gulf of Mexico. Harmful Algal News. 40, 12-14.

Okolodkov, Y. B., F. C. Merino-Virgilio, J. A. Aké-Castillo, A. C. Aguilar-Trujillo, S. Espinosa-Matías, J. A. Herrera-Silveira. 2014. Seasonal changes in epiphytic dinoflagellate assemblages near the northern coast of the Yucatan Peninsula, Gulf of Mexico. Acta Botánica Mexicana. 107:121-151.

Olsen, D. A., D. W. Nellis, R. S. Wood. 1984. Ciguatera in the Eastern Caribbean. Marine Fisheries Review. 46: 13-18.

O'Toole, A. C., A. J. Danylchuk, C. D. Suski, S. J. Cooke. 2010. Consequences of catch-and-release angling on the physiological status, injury, and immediate mortality of great barracuda (*Sphyraena barracuda*) in The Bahamas. ICES Journal of Marine Science. 67: 1667–1675.

O'Toole, A. C., M. J. Decharaoui-Bottein, A. J. Danylchuk, J. S. Ramsdell, S. J. Cooke. 2012. Linking ciguatera poisoning to spatial ecology of fish: A novel approach to examining the distribution of biotoxin levels in the great barracuda by combining non-lethal blood sampling and biotelemetry. Science of the Total Environment. 427-428: 98-105.

Persoone, G., P. G. Wells. 1987. *Artemia* in Aquatic Toxicology: A Review. In: Sorgellos P.; D. A. Bengtson; W. Declair, E. Jaspers (Eds.). *Artemia* Research and its Applications. Morphology, Genetics, Strain Characterization, Toxicology. Vol. I. Universa Press, Wetteren, Belgium. pp. 259-275.

Pica-Granados, Y., G. Trujillo-Domínguez. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con la bacteria *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*). En: Ramírez-Romero, P., A. Mendoza Cantú (Eds.). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia de México. SEMARNAT-INE. México. pp. 307-319.

Poli, M., R. Lewis, R. Dickey, S. Musser, C. Buckner, L. Carpenter. 1997. Identification of Caribbean ciguatoxins as the cause of an outbreak of fish poisoning among U.S. soldiers in Haiti. *Toxicon*. 35: 733-741.

Poot-Delgado, C. A. 2016. Florecimientos algales nocivos en las costas de Campeche, Golfo de México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 68: 91-96.

Poot-Delgado, C. A., E. J. Núñez-Vázquez, J. A. Ruíz-Ibáñez. 2011. Intoxicaciones humanas por el consumo de peces botete (Tetraodontidae) en Campeche, México. En: Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar, (18°, 2011, San Carlos, Sonora, México). Trabajos, San Carlos, México, Secretaría de Educación Pública (SEP).

Poot-Delgado, C. A., P. Rosado-García. 2013. Fitoplancton marino potencialmente nocivo en las aguas costeras de Champotón, Campeche. En: Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar, (20°, 2013, Los Cabos, B.C.S., México.) Trabajos, Los Cabos, México, Secretaría de Educación Pública (SEP).

Poot-Delgado, C. A., Y. A. Guzmán-Noz. 2010. Composición y abundancia del fitoplancton marino, con énfasis en las especies potencialmente tóxicas y/o nocivas, en la Bahía de Campeche, México. En: Congreso Internacional de Investigación CIPITECH. (3°, 2010, Parral, Chihuahua, México.) Secretaría de Educación Pública (SEP).

Pottier, I.; J-P., Vernoux; R. J. Lewis. 2001. Ciguatera Fish Poisoning in the Caribbean Islands and Western Atlantic. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 168: 99-141.

Pottier, I.; J-P., Vernoux. 2002. Evaluation de la ciguatoxicité de poissons des Antilles par les bioessais souris et poussin. *Biologie Clinique. Bull. Soc. Pathol. Exot.* 96 (1): 24-28.

Pottier, I., J-P. Vernoux, A. Jones, R. J. Lewis. 2002 a. Analysis of toxin profiles in three different fish species causing ciguatera fish poisoning in Guadeloupe, French West Indies. *Food Addit. Contam.* 19 (11): 1034-1042.

- Pottier, I.; J-P. Vernoux, A. Jones, R. Lewis. 2002 b. Characterization of multiple Caribbean ciguatoxins and congeners in individual specimens of horse-eye jack (*Caranx latus*) by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Toxicon* 40: 929-939.
- Pottier, I.; B. Hamilton, A. Jones, R. J. Lewis; J-P. Vernoux. 2003. Identification of slow and fast-acting toxins in a highly ciguatoxic barracuda (*Sphyraena barracuda*) by HPLC/MS and radiolabelled ligand binding. *Toxicon*. 42: 663-672.
- Randall, J. 1958. A review of ciguatera, tropical fish poisoning, with a tentative explanation of its cause. *Bull. Mar. Sci.* 8: 236-267.
- Rhodes, L. L., M. Syhre. 1995. Okadaic acid production by a New Zealand *Prorocentrum lima* isolate. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 29: 367-370.
- Rhodes, L., R. Munday, K. Heasman, L. Briggs, P. Holland, J. Adamson. 2008. Uptake of palytoxin-related compounds by shellfish and paddlecrabs. In: Busby, P. (Ed.), *Proceedings of the Sixth International Conference of Molluscan Shellfish Safety*, 18-23 March 2007, Blenheim, New Zealand. Royal Society of New Zealand. pp. 168-176.
- Robertson, A., A. C. Garcia, H. A. Flores-Quintana, T. B. Smith, B. F. Castillo II, K. Reale-Muroe, J. A. Gulli, D. A. Olsen, D. A. J. I. Hoe-Rollman, E. L. E. Jester, B. J. Klimek, S. M. Plakas. 2014. Invasive Lionfish (*Pterois volitans*): A Potential Human Health Threat for Ciguatera Fish Poisoning in Tropical Waters. *Mar. Drugs*. 12: 88-97.
- Rosine, J., J. L. Chappert, T. Cardoso, P. Quénel. 2008. La ciguatera dans les Antilles françaises. Dans: *Premières Journées interregionales de Veille Sanitaire des Antilles Guyane, Schoelcher*, 12-13 decembre. Cire Antilles-Guyane.
- Roué, M.; H. T. Darius, S. Picot, A. Ung, J. Viallon, N. Gaertner-Mazouni, M. Sibat, Z. Amzil, M. Chinain. 2016. Evidence of the bioaccumulation of ciguatoxins in giant clams (*Tridacna maxima*) exposed to *Gambierdiscus* spp. cells. *Harmful Algae*. 57: 78-87.
- Sabido-Itzá, M. M., A. Medina-Quej, A. de Jesús-Navarrete, J. M. Gómez-Poot, M. C. García-Rivas. 2016. La estructura de tallas como evidencia del establecimiento de *Pterois volitans* (Scorpaeniformes: Scorpaenidae) en el sur del Caribe mexicano. *Revista de Biología Tropical*. 64 (1): 369-378.
- Santander-Monsalvo, J., I. López-Huerta, A. Aguilar-Perera, A. Tuz-Sulub. 2012. First record of the red lionfish (*Pterois volitans* [Linnaeus, 1758]) off the coast of Veracruz Mexico. *BioInvasion Records*. 1 (2): 121-124.
- Satake, M., M. Murata, Yasumoto. 1993. A new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *J. Am. Chem. Soc.* 115, 361-362.

- Schlauch, C., J. Hagelstein, G. Burchard, S. Schmiedel. 2012. Outbreak of Ciguatera Fish Poisoning on a Cargo Ship in the Port of Hamburg. *J. Travel. Med.* 19: 238-242.
- Schmitter-Soto, J. J., F. A. Comín, E. Escobar-Briones, J. Herrera-Silveira, J. Alcocer, E. Suárez-Morales, M. Elías-Gutiérrez, V. Díaz-Arce, L. E. Marín, B. Steinich. 2002. Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia* 467: 215–228. J. Alcocer & S. S. S. Sarma (Eds.), *Advances in Mexican Limnology: Basic and Applied Aspects*. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Schoelinck, C., D. D. Hinsinger, A. Dettai, C. Cruaud, J-L. Justine. 2014. A Phylogenetic Re-Analysis of Groupers with Applications for Ciguatera Fish Poisoning. *PLoS ONE* 9(8): e98198.
- Schofield, P. J. 2009. Geographic extent and chronology of the invasion of non-native lionfish (*Pterois volitans* [Linnaeus 1758] and *P. miles* [Bennett 1828]) in the Western North Atlantic and Caribbean Sea. *Aquatic Invasions*. 4 (3): 473-479.
- Schofield, P. J. 2010. Update on geographic spread of invasive lionfishes (*Pterois volitans* [Linnaeus, 1758] and *P. miles* [Bennett, 1828]) in the Western North Atlantic Ocean, Caribbean Sea and Gulf of Mexico. *Aquatic Invasions*. 5, (Supplement 1): S117–S122.
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. (SECOFI). 1995. Norma Mexicana NMX-AA-112- SCOFI. Análisis de agua y sedimentos. Evaluación de toxicidad aguda con *Photobacterium phosphoreum*. Método de pruebas DGN. 36 pp.
- Sérandour, A-L., A. Ledreux, B. Morin, S. Derick, E. Augier, R. Lancelleur, S. Hamlaoui, S. Moukha, C. Furger, R. Biré, S. Krysz, V. Fessard, M. Troussellier, C. Bernard. 2012. Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part I: screening strategy and pre-validation study with lipophilic marine toxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 403:1983–1993.
- Silva, M., I. Rodriguez, A. Barreiro, M. Kaufmann, A. I. Neto, M. Hassouani, B. Sabour, A. Alfonso, L. M. Botana, V. Vasconcelos. 2015. First report of ciguatoxins in two starfish species: *Ophidiaster ophidianus* and *Marthasterias glacialis*. *Toxins*. 7: 3740-3757.
- Soliño, L. S. Wigdy, A. Pautonnier, J. Turquet, C. R. Loeffler, H. Flores-Quintana, J. Diogène. 2015. Prevalence of ciguatoxins in lionfish (*Pterois* spp.) from Guadaloupe, Saint Martin and Sain Bérthelmy islands (Caribbean). *Toxicon*. 102: 62-68
- Soliño, L., P. R. Costa. 2018. Differential toxin profiles of ciguatoxins in marine organisms: Chemistry, fate and global distribution. *Toxicon*. 150: 124-143.

- Stewart, I., G. K. Eaglesham, S. Poole, G. Graham, C. Paulo, W. Wickramasinghed, R. Sadler, G. R. Shaw. 2010. Establishing a public health analytical service based on chemical methods for detecting and quantifying Pacific ciguatera in fish samples. *Toxicon*. 56 (9): 804-812.
- Sylvester, J. R., A. E. Dammann, R. A. Dewey. 1977. Ciguatera in the U.S. Virgin Islands. *Marine Fisheries Review*. 39 (8).
- Tester, P. A., R. L. Feldman, A. W. Nau, M. A. Faust, R. W. Litaker. 2009. Ciguatera fish poisoning in the Caribbean. *Smith. Contrib. Mar. Sci.* 38: 301-311.
- Tester, P., R. L. Feldman, A. W. Nau, S. R. Kibler, R. W. Litaker. 2010. Ciguatera fish poisoning and sea surface temperatures in the Caribbean Sea and the West Indies. *Toxicon*. 56: 698–710.
- Tester, P., R. W. Litaker, J. Morris. 2014. Ciguatera Fish Poisoning in the Gulf and Caribbean: What Do We Really Know? Proceedings of the 66th Gulf and Caribbean Fisheries Institute November 4 – 8. Corpus Christi, Texas USA.
- Ting, J. Y. S.; A. F. T. Brown. 2001. Ciguatera poison: a global issue with common management problems. *European Journal of Emergency Medicine*. 8: 295-300.
- Tosteson, T. R., D. L. Ballantine, H. D. Durst. 1988. Seasonal Frequency of Ciguatoxic barracuda in Southwest Puerto Rico. *Toxicon*. 26 (9): 795-801.
- Tosteson, T. R. 1995. The Diversity and Origins of Toxins in Ciguatera Fish Poisoning. *PRHSJ*. 14 (2): 117-129.
- Tosteson, T. R. 1996. Workshop Conference on seafood Intoxications: Pan American implicates of natural toxins in seafood. University of Miami. Miami, Florida. U.S.A.
- Turner, J. T., P. A. Tester. 1997. Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. *Limnol. Oceanogr.* 42: 1203-1214.
- Tuz-Paredes, V. M., E. J. Núñez-Vázquez, A. Almazán-Becerril, T-C, Ley-Martínez. 2017. Ciguatoxinas en la barracuda *Sphyrna barracuda* (Walbaum, 1792), en aguas adyacentes de Isla Mujeres, Quintana Roo. México. En: Congreso de la Sociedad Mexicana para el Estudio de los Florecimientos Algales Nocivos y Reunión Associação Latino-americana para o Estudo de Algas Nocivas, (4° y 2°, 2017, Cancún, QR., México). Memorias, Cancún, QR., México. SOMEFAN, A. C.
- Valentino-Márquez, C. A. J. del Corral-García, E. del Corral-Morales, J. A. Castañeda-Hernández, I. Mora-Pérez, L. Piñeiro-Hernández. 2011. Ciguatera. *Avances Ciencias Clínicas*. 23: (8) 29-40.

- Vernoux, J-P.; L. P. Magras, S. Abbad el Andaloussi, N. Riyeche. 1986. Évaluation des niveaux de toxicité ciguaterique des différents étages de la chaîne trophique pisciaire marine présente l'autour de l'Île de Saint Barthélémy aux Antilles Françaises. Bull. Soc. Pathol. Exot. 79: 275-283.
- Vernoux, J-P. 1988. La ciguatera dans l'Île de Saint Barthélémy: aspects épidémiologiques, toxicologiques et Préventifs. Oceanol. Acta. 11: 37-46.
- Vernoux, J-P., F. Talha. 1989. Fractionation and purification of some muscular and visceral ciguatoxins extracted from Caribbean fish. Comp Biochem Physiol. 94B. 499-504.
- Vernoux, J-P. 1994. The mouse ciguatoxin bioassay: Directions for use to control fish for consumption. Memoirs of the Queensland Museum. 34 (3): 625-629.
- Vernoux, J-P., J. Lejeune. 1994. Ciguatera in the French West Indies. Memoirs of the Queensland Museum. 34 (3): 631-638.
- Vernoux, J-P., R. J. Lewis. 1997. Isolation and characterisation of Caribbean ciguatoxins from the horse-eye jack (*Caranx latus*). Toxicon. 35: 889-900.
- Vezie, C., F. Benoufella, K. Sivonen, G. Bertru, A. La Planche. 1996. Detection of toxicity of cyanobacterial strains using *Artemia salina* and Microtox® assays compared with mouse bioassay results. Phycologia 3S (Supplement): 198-202.
- Villareal, T. A., S. Hanson, S. Qualia, E. L. E. Jester, H. R. Granade, R. W. Dickey. 2007. Petroleum production platforms as sites for the expansion of ciguatera in the northwestern Gulf of Mexico. Harmful Algae. 6: 253-259.
- Vilariño, N., M. C. Louzao, M. R. Vieytes, L. M. Botana. 2010. Biological methods for marine toxin detection. Anal. Bioanal. Chem. 397:1673-1681.
- Wakeling, E. N., A. P. Neal, W. D. Atchinson. 2012. Pyrethroids and their effects on ion channels. In Agricultural and Biological Sciences-“Pesticides Advances in Chemical and Botanical Pesticides. R. P. Soundararajan, (Ed.), InTech. DOI:10.5772/50330
- Wakida-Kusunoki, A. T., L. E. Amador-del-Ángel. 2015. First record of the red lionfish, *Pterois volitans*, on the coast of Tabasco, Mexico. Hidrobiológica 25: (2) 307-309.
- Williams, E. H. Jr., L. Bunkley-Williams, T. R. Tosteson. 2008. Hysterical symptoms of ciguatera fish poisoning: a possible explanation for some of the complex and varied symptomology. Psychosom Med. 70: (3) 384-5. doi: 10.1097/PSY.0b013e31816d8197.
- Wong, C., P. Hung, K. L. H. Lee, K. Kam. 2005. Study of an outbreak fish poisoning in Hong Kong. Toxicon. 46: 563-571.

Yasumoto, T., I. Nakajima, R. Bagnis, R. Adachi. 1977. Finding a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 43: 1021-1026.

Yu, F. H., V. Yarov-Yarovoy, G. A. Gutman, W. A. Catterall. 2005. Overview of molecular relationship in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological Reviews.* 57: 4.
https://classconnection.s3.amazonaws.com/282/flashcards/997282/png/screen_shot_2011-

[12-09 at 10.05.45 pm1323486362725.png](https://classconnection.s3.amazonaws.com/282/flashcards/997282/png/screen_shot_2011-12-09_at_10.05.45_pm1323486362725.png)

<http://www.cuentame.inegi.org.mx/default.aspx>

http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Artemia_spp/en

<http://www.fishbase.org/summary/Sphyraena-barracuda.html>

<https://www.flmnh.ufl.edu/fish/discover/species-profiles/sphyraena-barracuda/>

<http://www.flmnh.ufl.edu/fish/gallery/descript/greatbarracuda/greatbarracuda.html>

<http://www.pescandoenelcaribe.com/torneos.html>

11. ANEXOS

11.1 Anexo A. Equipo para el ensayo RBA_(F)

Este ensayo contiene el siguiente material:

- Buffer de ensayo (10x).
- Estándar de brevetoxina (3.6 µg).
- Ligandos fluorescentes.
- Placa de ensayo.
- Receptores o sinaptosomas
- (congelados a -20 °C).
- Placa de filtro.

Además de esto se necesita con el siguiente equipo y material para poder llevar a cabo el experimento:

1. Lector de placas con fluorescencia capaz de leer un rango de excitación a 490-505 nm y una emisión de 510-530 nm.
2. Pipetas multicanales (8-12 canales; 50-250 µL) y pipetas individuales (1-1000 µL) con sus respectivas puntas.
3. Viales de vidrio para las diluciones del estándar de PbTx.
4. Un sonificador o vórtex para mezclar.
5. Un Manifold.
6. Etanol.

11.2 Anexo B. Preparación de las muestras de ensayo RBA_(F) (Hardison *et al.*, 2016; Litaker *et al.*, 2014)

Para eliminar la posible fluorescencia natural de las muestras, los extractos fueron calentados a 70°C alrededor de 1 h. Una vez los extractos estuvieron a temperatura ambiente se centrifugaron a 4700 rpm para homogeneizarlos y eliminar el sobrenadante durante 30 min. Posteriormente las muestras fueron limpiadas y purificadas por medio de cromatografía en columnas de fase solida C₁₈ (SUPELCO, Discovery®), con contenido de sílice (500 mg), para lo cual se realizaron lavados por duplicado de 7 mL (90:10 metanol: agua). Después de ello, las muestras se evaporaron en una campana de extracción hasta un volumen de 2 mL,

los cuales se colocaron en viales de HPLC ámbar. Las columnas fueron activadas previamente con 10 mL de 70:30 metanol: agua.

11.3 Anexo C. Preparación de reactivos del ensayo RBA (F)

a) Dilución del buffer del ensayo (Hardison *et al.*, 2016; Litaker *et al.*, 2014)

Se contó con aproximadamente 10 mL de un buffer (10x) -el cual contenía 50 mM HEPES, 130 mM cloruro de colina, 5.4 mM KCl, 1.7 mM Mg SO₄, 5.5 mM de glucosa, 6.1 mM glicol etileno, 1 g L⁻¹ de suero bovino de albumina, de 3-4 g L⁻¹ de Trizma[®] como base (se añadió hasta alcanzar un pH de 7.4), 200 µL L⁻¹ de mezcla de proteasa inhibidora (P-8340) y dos gotas de Tween 20 como detergente (0.02%).

El buffer se diluyó en 90 mL de agua destilada para obtener una solución al 1x.

b) Resuspensión de los ligandos fluorescentes

Los ligandos fluorescentes (100x), con los cuales se llevó a cabo la reacción fueron conservados en un vial de color ámbar hasta su uso; para activarlos se necesitó resuspenderlos en 60 µL de etanol. Una vez añadido el etanol se homogenizó con un vórtex en oscuridad.

c) Dilución de los ligandos fluorescentes

La solución anterior de ligandos se encontraba en una concentración de 100x; para poder utilizarlos fue necesario diluir la muestra a una concentración 1x.

Para ello se tomaron 55 µL de solución 100x y se le añadieron 5.5 mL de la solución buffer. Finalmente la solución se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

d) Resuspensión del estándar de brevetoxina (PbTx)

Se contó con una solución estándar de PbTx de 3.6 µg, la cual fue resuspendida en 40 µL de etanol, a la cual se le llamó estándar de PbTx No.1.

e) Preparación de diluciones del estándar de PbTx

Durante este proceso fue necesario contar con viales de vidrio para poder crear las diluciones correspondientes. Se partió del estándar de PbTx No. 1, del cual se tomaron 10 µL, se traspasaron a un nuevo vial donde se le añadieron 90 µL de etanol; a este se le llamó estándar de PbTx No. 2.

Partiendo del estándar de PbTx No. 2 se tomaron 10 μ L, los cuales se transfirieron a un nuevo vial y se le añadieron nuevamente 90 μ L de etanol; a esta nueva dilución se le llamó estándar de PbTx No. 3.

Este proceso se repitió sucesivamente hasta preparar cinco estándares de PbTx, los cuales se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

11. 4 Anexo D. Detección de ciguatoxinas en tejidos de peces de la Península de Yucatán por medio de bioensayo en ratón, artemia, Microtox® y de unión a receptores específicos fluorescentes.

No.	Lugar	Clave de la Muestra	BR	ARTOX	Microtox	RBA _(F)
1	Quintana Roo	Sb-1 mús	-	-	nd	nd
2		Sb-1 vís	-	+	nd	nd
3		Sb-2 mús	-	-	nd	Nd
4		Sb-2 vís	-	-	nd	nd
5		Sb-3 mús	-	-	nd	nd
6		Sb-3 vís	-	-	nd	nd
7		Sb-4 mús	-	-	nd	nd
8		Sb-4 vís	-	-	nd	nd
9		Sb-5 gón	-	nd	nd	nd
10		Sb-5 híg	-	-	nd	nd
11		Sb-5 vís	+	+	nd	+
12		Sb-6 vís	-	+	nd	nd
13		Sb-7 híg	+	nd	+	+
14		Sb-7 vís	-	nd	nd	nd
15		PM-1 vís	-	+	nd	nd
16		PM-2 vís	-	+	nd	nd
17		PM-3 vís	-	+	nd	nd
18		PM-4 vís	-	nd	nd	nd
19		Pv-1 mús	-	-	nd	nd
20		Pv-2 mús	-	nd	nd	nd
21		Pv-3 mús	-	-	nd	nd
22		Pv-4 mús	-	nd	nd	nd
23		Pv-5 mús	-	+	nd	nd
24		Pv-5 vís	-	nd	nd	nd
25		Pv-8 mús	-	-	nd	nd
26		Pv-8 vís	+	-	+	+
27		Pv-9 mús	-	nd	nd	nd
28		Pv-9 vís	-	+	nd	nd
29		Pv-11 mús	-	nd	nd	nd

No.	Lugar	Clave de la Muestra	BR	ARTOX	Microtox	RBA _(F)
30		Pv-11 vís	-	nd	nd	nd
31		Pv-14 mús	-	nd	nd	nd
32		Pv-14 vís	-	+	nd	nd
33		Pv-17 mús	-	nd	nd	nd
34		Pv-17 vís	-	+	nd	nd
35		Pv-18 mús	-	nd	nd	nd
36		Pv-18 vís	-	nd	nd	nd
37		Pv-20 vís	-	-	nd	nd
38		Pv-22 mús	-	nd	nd	nd
39		Pv-22 vís	-	nd	nd	nd
40		Pv-23 mús	-	+	nd	nd
41		Pv-23 vís	-	nd	+	nd
42	Yucatán	C-Pv-1 mús	-	-	nd	nd
43		C-Pv-1 vís	-	-	nd	nd
44		C-Pv-2 mús	-	-	nd	nd
45		C-Pv-2 vís	-	-	nd	nd
46		C-Pv-3 mús	-	-	nd	nd
47		C-Pv-3 vís	-	+	nd	nd
48		C-Pv-4 mús	-	-	nd	nd
49		C-Pv-4 vís	-	-	nd	nd
50		OD-Pv-1 mús	-	-	nd	nd
51		OD-Pv-1 vís	-	nd	nd	nd
52		OD- Pv-2 mús	-	-	nd	nd
53		OD- Pv-2 vís	-	-	nd	nd
54		CC-Pv-25-27 vís	-	nd	nd	nd
55		Cn vís	+	-	+	+
56		C. sp vís	-	+	nd	nd
57		Em 1 vís	+	+	+	nd
58		Em 2 vís	-	-	nd	nd
59		Hp 1 vís	+	nd	nd	+
60		Hp 2 vís	+	+	nd	+
61		Ls 1 vís	+	nd	nd	nd
62		Ls 2 vís	+	+	+	+
63		Oc vís	+	nd	nd	+
64		Rt híg	-	-	nd	nd
65		Rt vís	+	+	nd	+
66		Sb-1 mús	-	+	nd	nd
67	Campeche	Ch 2.7 vís	+	+	nd	+
68		Ch 5.5 vís	+	+	nd	+
69		Ch 6.5 vís	+	+	+	+
70		Ch 8 vís	+	+	nd	+
71		Cu vís	+	+	nd	+

No.	Lugar	Clave de la Muestra	BR	ARTOX	Microtox	RBA _(F)
72		Lm 1.35 vís	+	nd	nd	+
73		Lm 1.45 vís	+	nd	nd	+
74		Lm 1.55 vís	+	+	nd	+
75		Lm 3.5 vís	-	+	nd	nd
76		Ls 3 vís	-	+	nd	nd
77		Sb-1 mús	-	+	+	nd
78		Sb-1 vís	+	+	nd	+
79		Sb-2 mús	-	+	nd	nd
80		Sb-2 vís	-	+	nd	+
81		Sb-3 mús	-	+	nd	nd
82		Sb-3 vís	+	+	nd	+
83		Sb-4 mús	-	+	nd	nd
84		Sb-4 vís	-	+	nd	nd
85		Sb-5 mús	-	+	nd	nd
86		Sb-5 vís	-	+	nd	nd
87		Sb-6 mús	-	+	nd	nd
88		Sb-6 vís	-	+	nd	nd
89		Sb-7 mús	+	+	nd	nd
90		Sb-7 vís	-	+	nd	+
91		Sb-8 mús	-	+	nd	nd
92		Sb-8 vís	-	+	nd	nd
93		Sb-9 mús	-	+	nd	nd
94		Sb-10 mús	-	+	nd	nd
95		St-1 vís	+	+	nd	+
96		St-2 vís	+	+	+	+
Total			N= 96	n= 72	n= 9	n= 23

(+) Incluye muestras letales evaluadas por medio de BR y aquellas con porcentaje de $\geq 50\%$ de toxicidad por ARTOX.
 (-) Incluye muestras inocuas evaluadas por medio de BR y aquellas con porcentaje de $< 50\%$ de toxicidad por ARTOX.
 Nd= No determinado. Ch= *C. hippos*; Cn= *C. nebulosus*; C. sp= *Caranx* sp; Cu= *C. undecimalis*; Em= *E. morio*;
 híg= hígado; Hp= *H. plumierii*; gón= gónadas; Lm= *L. maximus*; Ls= *L. synagris*; mús= músculo; Pv= *P. volitans*;
 Sb= *S. barracuda*; St= *S. tiburo*; vís= vísceras.