

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CHETUMAL



TEMA:

CIGUATOXINA EN BARRACUDA *Sphyraena barracuda* (Walbaum, 1792), EN AGUAS ADYACENTES DE ISLA MUJERES, QUINTANA ROO. MÉXICO.

INFORME DE GRADO DE:

MAESTRA EN MANEJO DE ZONA COSTERA

PRESENTA:

BIÓL. VIELKA MARIELA TUZ PAREDES

DIRECTOR:

M.C. HÉCTOR JAVIER ORTIZ LEÓN

CO-DIRECTOR:

DR. ANTONIO ALMAZÁN BECERRIL

CHETUMAL, QUINTANA ROO, MÉXICO, JUNIO 2017



"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

DEPENDENCIA: DIRECCIÓN
SECCIÓN: División de Estudios de Posgrado
OFICIO No. W-102/2017

Chetumal, Quintana Roo a 20 de junio de 2017.

Asunto: Autorización de impresión de Tesis

C. BIÓL. VIELKA MARIELA TUZ PAREDEZ
PRESENTE.

De acuerdo a los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado de el Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que el Comité Tutorial de la Maestría en Manejo de Zona Costera le hizo con respecto a su Trabajo Profesional de Informe de Grado:

"CIGUATOXINA EN BARRACUDA *Sphyraena barracuda* (Walbaum, 1792), EN AGUAS ADYACENTES DE ISLA MUJERES, QUINTANA ROO, MÉXICO"

La División a mi cargo, le concede la autorización para que proceda a la impresión de la misma.

ATENTAMENTE

DRA. ALICIA CARRILLO BASTOS
ENCARGADA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE CHETUMAL
DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.c.p. Departamento de Servicios Escolares
C.c.p. Minutario
JMCP/Gaby





"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

DEPENDENCIA: DIRECCIÓN
SECCIÓN: División de Estudios de Posgrado
OFICIO No. W-103/2017

Chetumal, Quintana Roo a 20 de junio de 2017

ASUNTO: NOMBRAMIENTO DE JURADO

C. INTEGRANTES DEL JURADO

PRESIDENTE	M en C. HÉCTOR JAVIER ORTIZ LEÓN CÉDULA DE GRADO 7499959
SECRETARIO	M en C. ALEJANDRO MEDINA QUEJ CÉDULA DE GRADO 7228466
VOCAL	M en C. JOSÉ MANUEL CASTRO PÉREZ CÉDULA DE GRADO 7228487
VOCAL SUPLENTE	DRA. CARMEN AMELIA VILLEGAS SÁNCHEZ CÉDULA DE GRADO 08802457

Por este medio, les informo que el Examen de Grado, del (a) **C. VIELKA MARIELA TUZ PAREDES**, con Número de control: **M00390538**, egresado del Instituto Tecnológico de Chetumal, del Programa de la **MAESTRÍA EN MANEJO DE ZONA COSTERA**, se realizará el día **VIERNES 23 DE JUNIO** de 2017 a las **12:00 hrs.**, en la Sala de Titulación de este Instituto Tecnológico, por lo que se pide su puntual asistencia.

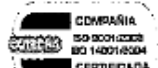
ATENTAMENTE


DRA. ALICIA CARRIZLO BASTOS
ENCARGADA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



C.c.p. Departamento de Servicios Escolares.
C.c.p. Departamento Académico.
C.c.p. Departamento de Recursos Financieros.
C.c.p. Alumno.
C.c.p. Coordinación.
C.c.p. Minutario.
ACB/gaby

**SECRETARIA DE
EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE CHETUMAL
DIVISION DE ESTUDIOS
E POSGRADO E INVESTIGACION**



DEDICATORIA

A Dios

A mi esposo Luis Gustavo

A mi hijo Axel Gustavo

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Almazán Becerril; Codirector externo de tesis, investigador titular en la Unidad de Ciencias del agua del Centro de investigación Científica de Yucatán, Unidad Cancún, Q.Roo, es un honor para mí que me haya brindado la oportunidad de trabajar en la elaboración de esta tesis, por tener siempre la disposición para aclarar mis dudas a pesar de sus múltiples ocupaciones, por su paciencia y sobretodo confianza en mí, motivos que sin duda alguna me ayudaron para concluir esta meta. Muchas gracias.

Al M. en C. Héctor Ortiz León; Coordinador de la Maestría en Manejo de Zona Costera y director de esta tesis, le agradezco el apoyo, confianza e interés en este tema que he realizado y apoyarme en el complicado camino de su elaboración debido a la novedad del tema, sus observaciones siempre tan oportunas fortaleciendo mi trabajo de investigación. Gracias por su confianza y amistad.

Al comité tutorial al M en C José Manuel Castro y al M en C. Alejandro Medina Quej, excelentes catedráticos! les agradezco las observaciones realizadas al trabajo de tesis y sus valiosas sugerencias. Muchas gracias por su enseñanza y confianza.

Al Biol. Mar. Erick Julián Núñez Vázquez; responsable del Análisis de Toxinas Marinas en el Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos en el Centro de Investigaciones Biológicas del noroeste (CIBNOR), en la Paz, B.C.S. le agradezco que me haya compartido su experiencia en la temática de las toxinas marinas y en el análisis del bioensayo en ratón, por su hospitalidad brindada durante mi estancia en la Paz. Muchas gracias.

Al Centro de Investigación para la Conservación y el Desarrollo, A.C. (INCODE) La Paz B.C.S. 23080, Mexico.

A la M.S.P. Teresa Martín Escobar Nava por brindarme la oportunidad de realizar el análisis de las muestras en el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) y brindarme todas las facilidades para su ejecución, haciendo

posible el desarrollo de este trabajo de tesis, gracias por sus sabios consejos y su apoyo durante el tiempo de su liderazgo en el laboratorio. Se le extraña.

*A la **Biol. Maricruz Moreno García** y al personal del área de fisicoquímicos **Q.F.B. Lourdes, Ing. Aníbal, Ing. Raúl**, muchísimas gracias por su capacitación en la técnica de extracción de ciguatoxina, por su apoyo brindado y por esos gratos momentos que compartieron conmigo haciendo ameno la convivencia.*

*A mis amigos de la Maestría: **Nancy, Alicia, Margely, Mateo, Carlos, Francisco Duran, Francisco Lopez, Gilmer, Gregorio y Aldo** por los excelentes momentos de convivencia.*

*A los pescadores de Isla Mujeres: **Don Ramón, Don Valdemar, Don José y Don Manuel**, por apoyarme en la colecta de las barracudas, estaré eternamente agradecida con Uds. Muchas gracias por compartir su experiencia y conocimientos empíricos, para asegurar la captura de mis peces.*

A las instituciones:

*Al **Instituto Tecnológico de Chetumal** mi alma mater por permitirme realizar mis estudios de maestría en sus instalaciones y a su cuerpo docente por compartirme sus conocimientos.*

*Al **Centro de investigación Científica de Yucatán**, unidad Cancún, Q.Roo, por darme la oportunidad del uso de su laboratorio y equipos.*

*Al **Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)**; en la ciudad de La Paz, Baja California Sur, por su apoyo brindado durante este trabajo de*

tesis, ya que en la parte experimental del bioensayo en ratón se desarrolló en el Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos de la SULSA CIBNOR.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT); por su apoyo financiero y patrocinio para la realización de este proyecto de tesis.

A la Red Temática sobre Florecimientos Algales Nocivos del CONACYT (RedFAN) y a todo su comité que lo conforma, sin duda alguna el conocimiento científico que brindan sobre los FAN es de gran relevancia. Además de brindarme el apoyo financiero para el transporte y alimentación durante mi estancia en la Paz, B. C. S. y hacerme participe en el curso de Introducción al Estudio de los Florecimientos Algales Nocivos que me ayudó a entender más sobre el tema de las toxinas marinas.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	9
	2.1 Estudios sobre CTX en peces del género <i>Sphyraena</i> a nivel internacional.....	9
3	JUSTIFICACIÓN	14
4	OBJETIVOS	15
	4.1 Objetivo General.....	15
	4.2 Objetivos Específicos.....	15
5	HIPÓTESIS	16
6	ÁREA DE ESTUDIO	17
7	MATERIALES Y MÉTODOS	19
	7.1 Trabajo de Campo.....	19
	7.1.1 Captura de ejemplares de barracuda (<i>S. barracuda</i>).....	19
	7.2 Trabajo de laboratorio.....	21
	7.2.1 Extracción de Ciguatoxinas (CTX).....	21
	7.2.2 Detección de CTX por medio del modelo de bioensayo en ratón (BR) y calculo de toxicidad.....	25
	7.3 Trabajo de gabinete.....	28
	7.3.1 Cálculo de la toxicidad.....	28
	7.3.2 Análisis estadísticos.....	29
8	RESULTADOS	31
	8.1 Colecta de las barracudas capturadas.....	31
	8.2 Cálculo de la toxicidad CTX por medio del modelo de bioensayo en ratón.....	33

8.3	Toxicidad por distribución anatómica (músculo y vísceras).....	41
8.4	Relación entre el peso y la toxicidad en la barracuda según la prueba no paramétrica de Sperman.....	42
8.4.1	Talla y la toxicidad en la barracuda.....	42
9	DISCUSIÓN	44
9.1	Concentración de CTX y el nivel de concentración <i>Sphyraena barracuda</i>	45
9.2	Distribución anatómica de la toxicidad en la barracuda <i>S. barracuda</i>	46
9.3	Relación peso y talla con la toxicidad en la barracuda.....	49
10	CONCLUSIONES	52
11	RECOMENDACIONES	53
12	BIBLIOGRAFÍA	54
13	ANEXOS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Principales estructuras químicas de las CTX's.....	2
Figura 2: <i>Gambierdiscus toxicus</i> Adachi et Focuyo 1978.....	3
Figura 3: Bioacumulación de CTX en la cadena trófica.....	4
Figura 4: Área de estudio, Isla Mujeres.....	18
Figura 5: Técnicas de pesca realizadas en el presente estudio	19
Figura 6: Colecta de muestras	20
Figura 7: Diagrama del proceso de extracción de las CTX.....	23
Figura 8: Relación entre talla y peso de la <i>S. barracuda</i>	32
Figura 9: Nivel de concentración de CTX en tejidos de la barracuda en aguas adyacentes a Isla Mujeres.....	34
Figura 10: Curva de toxicidad y el tiempo de muerte del ratón.....	35
Figura 11: Frecuencia de los signos clínicos observados en los ratones durante el bioensayo	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Incidencia de casos de Ciguatera en el Caribe.....	13
Tabla 2: Relación de equipos	24
Tabla 3: Materiales usados en las extracciones	24
Tabla 4: Reactivos usados en las extracciones.....	25
Tabla 5: Signos clínicos en el modelo en ratón para CTX	27
Tabla 6: Registro de peso y talla de las barracudas	31
Tabla 7: Frecuencia de talla juvenil-adulto de la barracuda.....	32
Tabla 8: Signos clínicos y toxicidad de extractos de barracuda (<i>S. barracuda</i>) de Isla Mujeres.....	36
Tabla 9: Tabla de contingencia de las variables tejido y toxicidad.....	40
Tabla 10: Tabla de contingencia de las variables talla y toxicidad.....	42
Tabla 11: Concentraciones de CTX del Caribe y Golfo de México y este estudio.	48

RESUMEN

La ciguatera es una intoxicación humana provocada por la ingesta de peces arrecifales que habitan zonas tropicales y subtropicales, los cuales a través de la cadena trófica acumulan toxinas marinas liposolubles de tipo polieter llamadas ciguatoxinas (CTX). Esta intoxicación puede derivarse del consumo de peces herbívoros, carnívoros así como posiblemente algunos invertebrados como moluscos y crustáceos. El hombre se intoxica generalmente por consumir los peces portadores de CTX causándole grave daño a la salud a nivel gastrointestinal, cardiovascular y neurológico. Estas toxinas son producidas por especies de dinoflagelados bénticos del género *Gambierdiscus*. Los estudios realizados en México son escasos a pesar de ser un problema de salud muy añejo. Quintana Roo, por su ubicación geográfica, es el único estado de la República Mexicana que se encuentra influenciado por el Mar Caribe y que alberga parte de la segunda barrera arrecifal más importante del mundo. La fauna ictiológica de la región se caracteriza por presentar una alta diversidad de especies de escama, incluyendo a la barracuda (*Sphyraena barracuda*). Es bien sabido que la barracuda es uno de los principales peces vectores de la ciguatera en el Caribe, a pesar de ello, su consumo es apreciado debido a su abundancia, tamaño, palatividad, usos y costumbres como recurso alimenticio y fuente de proteína de la población costera. En el presente trabajo se realizó un estudio prospectivo sobre la toxicidad de esta especie para lo cual se analizaron 19 ejemplares de barracuda por medio del modelo del bioensayo en ratón (método oficial en México para el análisis de este tipo de toxinas), colectados en los meses de mayo y julio del 2016 en aguas adyacentes de la zona noroccidental de Isla Mujeres, a los cuales se le tomaron datos merísticos y se les diseccionó para la obtención de los tejidos: músculo y vísceras (hígado, intestinos, bazo y estómago), a partir de los cuales se obtuvieron un total de 36 extractos. Los extractos fueron inyectados intraperitonealmente en ratones albinos, certificados (cepa CD-1 de un peso entre 18-20 g) y los signos clínicos fueron observados en un lapso de aproximadamente 24 horas. Un total de 23 signos clínicos fueron detectados en donde el 38.9% (14) tuvieron concentraciones subletales de CTX; mientras que, el restante 61.1% (22) no presentó signos de intoxicación, considerándose estas muestras como negativas (inocuas). Ninguna muestra presentó concentraciones letales. Los resultados del presente estudio corroboran la presencia de las CTX en la barracuda en esta zona del litoral de Quintana Roo con concentraciones subletales para la temporada de este estudio. Este trabajo sienta las bases para futuras investigaciones toxinológicas, epidemiológicas y ecológicas sobre la ciguatera en el Caribe mexicano. Es importante considerar la implementación de un mayor número de estudios y divulgación de la temática, lo cual puede auxiliar a la población a evitar riesgos en la salud y pérdidas en la economía de los recursos pesqueros de la región.

Palabras clave: Ciguatera, Ciguatoxinas, *Sphyraena barracuda*, bioensayo en ratón, Isla Mujeres, Quintana Roo.

1. INTRODUCCIÓN

La ciguatera, también conocida por su acrónimo en inglés como “CFP” (de Ciguatera Fish Poisoning) es una intoxicación provocada por la ingesta de algunas especies de peces que contienen toxinas marinas llamadas ciguatoxinas (CTX), capaces de provocar graves daños a la salud humana. El cuadro clínico comprende desordenes a nivel gastrointestinal, neurológico y cardiovascular, y en este orden, es la aparición y severidad de los signos y síntomas, que; incluso pueden llevar a la parálisis y con ello el fallo respiratorio y la muerte (Lehane y Lewis, 2000; Vetter *et al.*, 2012).

Esta intoxicación es común en la zona intertropical entre los paralelos 35° Norte y 35° Sur, principalmente en el Océanos Pacífico, Índico y las regiones tropicales del Caribe debido a la presencia de los ambientes arrecifales (Barton *et al.*, 1995; Legrand, 1998).

El término “ciguatera” que se usa para distinguir la intoxicación a nivel internacional, tuvo su origen en La Habana, Cuba, cuando el naturista Portugués Don Antonio Parra, en el año 1787, describió en detalle este síndrome, que su familia y el mismo la padecieron por el consumo de pescado en la isla (De Fouw *et al.*, 2001; FAO, 2005).

El grupo de toxinas marinas involucradas en la intoxicación es conocido como ciguatoxinas (CTX), que son compuestos no proteícos de tipo polieter en forma de escalera, de afinidad lipofílica, formadas por 13-14 anillos unidos por enlaces éter (figura 1), fórmula molecular (C_{53}, H_{77}, O_{24}) y de bajo peso molecular (941 a 1111,7 Daltons). Debido a su naturaleza química, son termoestables, es decir, se degradan muy poco después de someterse a bajas o altas temperaturas y a condiciones ácidas y básicas suaves (Lehane y Lewis, 2000; FAO, 2005).

Actualmente se han descritos más de 20 tipos de CTX. En el Pacífico, las principales son identificados como P-CTX-1, P-CTX-2 y P-CTX-3 (Lehane y Lewis, 2000); en el Caribe C-CTX-1 y C-CTX-2 (Lewis *et al.*, 1998). La toxina tipo CTX-1 es la más potente en ambas regiones, encontrándose en peces carnívoros y representa un riesgo para los seres humanos a niveles superiores a 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pescado (De Fouw *et al.*, 2001).

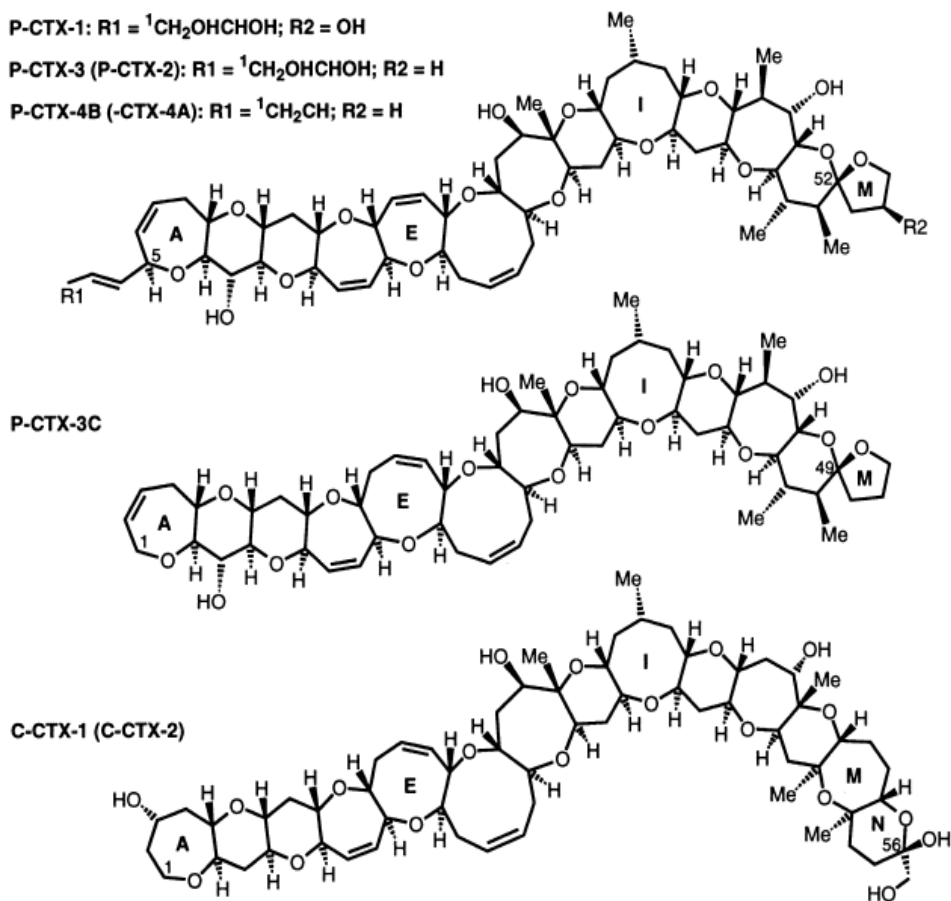


Figura 1. Principales estructuras de las ciguatoxinas (CTX). Las del Océano Pacífico, precedidas por la letra "P": P-CTX-1 (Murata *et al.*, 1990), P-CTX-3 (Lewis *et al.*, 1991, 1993), P-CTX-4B (Murata *et al.*, 1990), P-CTX-3C (Satake *et al.*, 1993) y las del Mar Caribe, precedidas por la letra "C": C-CTX-1 (Lewis *et al.*, 1998). Para el Océano Índico existe otra familia de estas toxinas, sin embargo aun no se cuenta con especificación de las estructuras químicas (Hamilton *et al.*, 2002). Cada una de ellas presentan estructuras químicas similares, pero varían principalmente por los radicales que tienen en sus extremos, cambiando su estructura y su actividad.

Las microalgas que producen las CTX pertenecen al grupo de los dinoflagelados bentónicos, del género *Gambierdiscus* cuya principal especie implicada hasta unos años solo era *G. toxicus* (Yasumoto y Satake, 1996; figura 2) descubriéndose posteriormente 13 especies más de este género (*G. toxicus*, Adachi y Fukuyo, 1979; *G. belizeanus*, Faust, 1995; *G. pacificus*, *G. australes* y *G. polynesiensis*, Chinain *et al.*, 1999; *G. caribaeus*, *G. carolinianus*, y *G. carpenteri*, Litaker *et al.*, 2009; *G. excentricus*, Fraga *et al.*, 2011; *G. scabrosus*, Nishimura *et al.*, 2014; *G. silvae*, Fraga y Rodríguez, 2014; *G. balechii*, Fraga *et al.*, 2016 y *G. cheloniae* Smith *et al.*, 2016), de las cuales cinco de ellas se ha

corroborado su toxicidad. Las CTX resultan de la biotransformación en los peces de sus precursoras, las gambiertoxinas (Lehane y Lewis, 2000).

La variabilidad de las poblaciones de estos dinoflagelados es afectada por factores físicos como la temperatura, salinidad y la irradiancia aunque no es claro si estos factores también afectan la producción de las toxinas (Chinain *et al.*, 2010a; Kibler *et al.*, 2012).

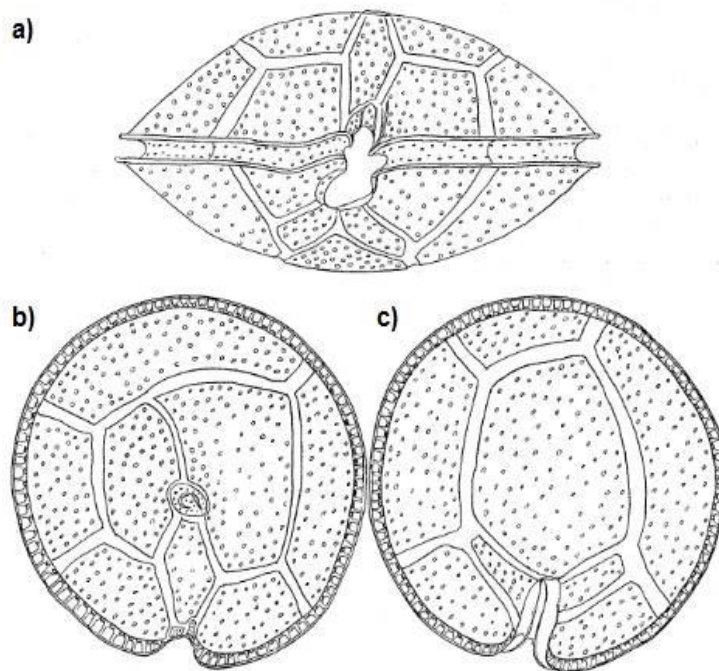


Figura 2. *Gambierdiscus toxicus* Adachi & Fucuyo 1978. a) vista ventral, b) epiteca c) hipoteca. Tomado de Adachi y Fucuyo (1978).

Al transferirse por herbivoría y depredación a través de la cadena trófica, las toxinas también se bioacumulan llegando a su mayor concentración en los depredadores tope (figura 3).

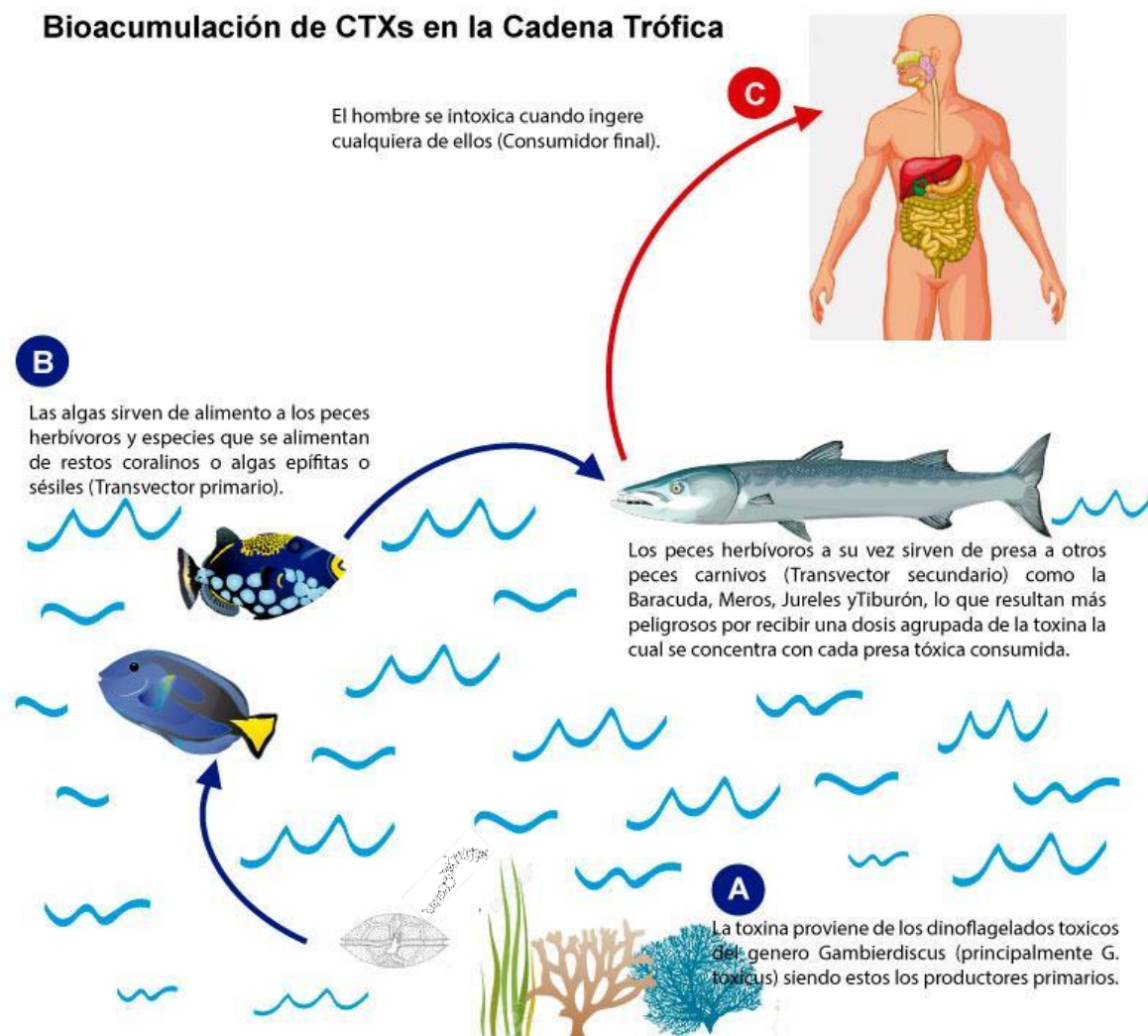


Figura 3. Bioacumulación de CTX en la cadena trófica. La toxina proviene de los dinoflagelados tóxicos del género *Gambierdiscus* (principalmente *G. toxicus*) siendo estos los productores primarios que alimentan a los peces herbívoros y especies que se alimentan de restos coralinos o algas epífitas o sésiles (Transvector primario), y que estos a su vez sirven de presa a otros peces carnívoros (Transvector secundario) como la Baracuda, Meros, Jureles y Tiburón, lo que resultan más peligrosos por recibir una dosis agrupada de la toxina la cual se concentra con cada presa tóxica consumida. El hombre se intoxica cuando ingiere cualquiera de ellos (Consumidor final). Imagen compuesta y elaborada a partir de imágenes parciales de la web.

Las CTX se pueden encontrar en el músculo, vísceras, sangre, cerebro e incluso, en algunas especies de peces herbívoros y carnívoros, en los huesos, pero alcanza una concentración de hasta nueve veces más en el hígado (Jiang *et al.*, 2012).

Se ha descrito que el mecanismo de acción de las CTX ocurre en la membrana celular de las células del sistema nervioso. La afinidad de las toxinas para unirse al sitio 5 del canal de sodio provoca que la membrana se despolarice y permita un flujo descontrolado de iones Na⁺ dentro de las células y al no haber un balance en el potencial de acción celular, el ambiente interno se altera, causando hinchamiento celular y la aparición de “ampollas” (Lehane y Lewis, 2000 y De Fouw *et al.*, 2001).

Esta intoxicación tiene un impacto en la salud pública porque los pescadores o consumidores no pueden descartar peces contaminados con la simple revisión externa ya que el pez muestra un aspecto sano; solamente se puede confirmar la toxicidad una vez analizada la muestra en un laboratorio a través de métodos específicos (Laurent *et al.*, 2005); como son los de tipo biológico (bioensayos en modelos animales y ensayos celulares), analíticos (físico-químicos como la cromatografía) y bioquímicos. Destaca entre estos, por su relativa simplicidad el bioensayo en modelo en ratón. Estudios en ratones han demostrado una signología característica siendo entre otros los signos clínicos de neurotoxicidad acompañados con diarrea así como la hipotermia una respuesta característica de las ciguatoxinas (Legrand, 1998; Nicholson y Lewis, 2006). Este método permite diagnosticar la intoxicación administrando una dosis del extracto purificado o crudo al ratón por vía oral o inyección intraperitoneal. Dicho extracto es obtenido previamente mediante un proceso de extracciones, y evaporaciones con distintos solventes orgánicos en el laboratorio. Inmediatamente después de la inoculación se evalúan minuciosamente los signos clínicos en el ratón durante las primeras dos horas, luego, se hacen observaciones recurrentemente hasta finalizar la prueba en 24 h; los resultados de letalidad se representan en unidades ratón (UR) y/o en microgramos (µg) equivalentes de toxinas con base a los tiempos de muerte (Blythe *et al.*, 1994; Lewis, 1995). Este modelo es confiable, además, de ser usado como

método de referencia en laboratorios certificados por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y en centros de investigación científica.

Los signos clínicos manifestados en pacientes con esta intoxicación son diversos (se han descrito alrededor de 170), resumiéndose en afectaciones a nivel gastrointestinal, neurológico y cardiovascular (Lehane y Lewis, 2000; Pottier *et al.*, 2001 y Dikey y Plakas, 2010).

Algunos reportes muestran que este padecimiento, puede durar largos periodos y puede ser recurrente al reactivarse por el consumo de peces y/o mariscos, algún alérgeno, factores de estrés y bebidas alcohólicas así como por disminución de peso. Existe riesgo de contagio de madre a hijo a través de la lactancia (Bagnis y Legrand, 1987) o vía trasplacentaria (Pearn *et al.*, 1982) y en parejas mediante relaciones sexuales causando un coito doloroso (Ruff y Lewis, 1994).

Cabe mencionar que la variabilidad de los síntomas, dependerá de la cantidad y tipo de toxinas, de la genética del individuo, edad, peso, estado de salud y sexo (Bagnis *et al.*, 1979; Lehane, 1999; Maya-Entenza *et al.*, 2007 y Senthilkumaran *et al.*, 2010). La ciguatera se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial, afectando entre 10,000 y 50,000 personas cada año (Lewis, 2001; Friedman *et al.*, 2008). Debido al poco conocimiento popular y médico, se puede confundir la intoxicación con otras enfermedades afectando los registros de casos.

No obstante, la FDA (Food Drug Administración de los E.U.A) encargada de regular el consumo, exportación e importación de peces en muchos países del Caribe establece que el límite máximo permisible de toxina es de 0.1 μg de C-CTX-1 o 2 UR/100g (FDA, 2011). En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009 establece un límite máximo permisible de 2.5 UR/100g de pescado. Sin embargo, tan solo se requieren 5 nanogramos (ng) de CTX por gramo de músculo de pez para que pueda ocurrir la intoxicación en humanos (Legrand, 1998).

Más de 400 especies de peces herbívoros y carnívoros son consideradas como vectores potenciales de las CTX a nivel mundial; destacando la barracuda

Sphyraena barracuda Walbaum, 1792, por ser un gran depredador de peces. Lo cual debido a su característico sabor, tamaño, usos y costumbres como recurso alimenticio esta especie es ampliamente explotada a pesar de los numerosos casos de intoxicación por ciguatoxinas (Olsen *et al.*, 1984).

El estado de Quintana Roo, por su ubicación geográfica, es el unico estado de la República Mexicana que se encuentra influenciado por el Mar Caribe, caracterizándolo como una entidad rica en ecosistemas naturales marinos; forma parte de la segunda barrera de coral más grande del mundo, albergando una gran riqueza de peces (Carriquiriborde-Harispe, 1994). La fauna ictiológica de la región se caracteriza por presentar una alta diversidad de especies de escama, entre los que destacan la sierra (*Scomberomorus maculatus* y *S. regalis*), la chihua (*Eugerres plumieri*), el pargo gris (*Lutjanus griseus*), el sábalo (*Megalops atlanticus*), el jurel (*Caranx hippos*), el macabí (*Albula vulpes*), la palometa (*Trachinotus falcatus*), el robalo (*Centropomus undecimalis*) y la barracuda (*Sphyraena barracuda*) (Carriquiriborde-Harispe, 1994).

La barracuda *Sphyraena barracuda* ha sido descrita como uno de los principales vectores de este síndrome (Tosteson, 1988). Algunos autores incluso han descrito que hasta un 90% de los casos reportados por el sector salud a nivel mundial han ocurrido por consumir este pez (Bourdeau y Bagnis, 1989; Vernoux y Talha, 1989; Matta *et al.*, 1999; Martínez-Orozco y Cruz-Quintero, 2013). No obstante, la barracuda ocupa el tercer lugar en pesca de escama en el sur de Quintana Roo, mientras que en el norte su comercialización esta prohibida por los casos de ciguatera reportados por la Secretaria de Salud del estado.

Sin embargo, sigue siendo objeto de consumo popular debido al apreciado sabor de su carne, ya que de un ejemplar de buen tamaño pueden comer varias personas, a su captura en la pesca deportiva, a los usos y costumbres arraigadas de la población local, así como por ser fuente de proteínas. Muchos evitan comerlo durante los meses de mayo a agosto, debido a que durante este periodo se ha registrado la mayor incidencia en los casos de intoxicación por ciguatera según la base de datos de la Secretaría de Salud del Estado de Quintana Roo (SESA-QR)

que ha reportado casos de ciguatera entre los años 2010-2014 en Cancún, Playa del Carmen e Isla Mujeres observándose los mayores picos en los meses referidos. Por ello, el objetivo de este trabajo, es determinar la presencia así como la concentración de CTX en especímenes de barracuda, colectados entre los meses de mayo y julio en aguas adyacentes de la zona noroccidental de Isla Mujeres, Quintana Roo.

2. ANTECEDENTES

La ciguatera es una enfermedad con impacto a nivel internacional, si bien, es muy común en regiones tropicales y subtropicales entre 35 °N y 35 °S de latitud, por albergar las condiciones ecológicas adecuadas para el establecimiento de los dinoflagelados bénticos del género *Gambierdiscus* (temperatura cálida del agua, presencia de sistemas arrecifales, entre otros). Resultan interesantes los reportes de casos de esta enfermedad en otros países ajenos a los hábitat donde existen estos organismos. Esto implica que el esparcimiento de las intoxicaciones se debe al aumento del flujo turístico y a la exportación de productos pesqueros que contienen las toxinas (Legrand, 1998; Lehane y Lewis, 2000; FAO, 2005) que no son fácilmente detectadas por sus características inodoras e incoloras; además de que el origen del pescado en el momento de la venta o ingestión es a menudo desconocido (Lewis, 1986). Sin embargo, las investigaciones realizadas a nivel internacional sobre la presencia de CTX en peces aún son escasas y en algunas regiones incipientes, particularmente en la barracuda.

Entre los principales países en América que se han visto afectados por la ciguatera en el Océano Atlántico se encuentra los Estados Unidos (Texas, Luisiana y Florida), así como Las Antillas Francesas, Colombia, Cuba, Dominica, Haití, Islas Vírgenes Americanas y Británicas, Jamaica, México (Península de Yucatán), Montserrat, Puerto Rico, St. Martin y Venezuela (Farstad y Chow, 2001; Pottier *et al.*, 2001; Tosteson, 1996, tabla 1).

2.1. Estudios sobre CTX en peces del género *Sphyraena* a nivel internacional

Tosteson *et al.*, (1988) realizó un estudio de la variación estacional de la ciguatoxicidad en la barracuda (*Sphyraena barracuda*) en Puerto Rico entre marzo de 1985 y mayo de 1987, encontrando que las barracudas durante los meses de junio, julio y diciembre son menos tóxicas, mientras que los periodos de enero-mayo y agosto-noviembre son más tóxicas, habiendo mayor toxicidad en la cabeza y

vísceras, por lo que concluyeron que las barracudas tienen la capacidad de depurar las ciguatoxinas.

Tosteson, (1996) demostró que los periodos con mayor rango de barracudas tóxicas en Puerto Rico fueron febrero-abril y agosto-diciembre.

Gamboa *et al.* (1992), realizaron estudios de extracción y purificación de la toxinas a partir de tejidos de barracuda en Puerto Rico. Para su purificación por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y el bioensayo en ratón (BR). Este último actualmente es utilizado como método operativo y de monitoreo en la regulación sanitaria por varios países incluyendo México, que a pesar de no tener una alta especificidad permite reconocer la toxicidad total de una muestra. Este se ha convertido en el protocolo de referencia por la comunidad científica por ser su relativa facilidad, aunque el proceso de extracción exige largas jornadas (entre 3 a 5 días) así como su evaluación por 24 h.

Bottein-Dechraoui *et al.* (2002), en su investigación realizada en los Cayos de Florida (EE.UU), confirmaron la presencia de CTX en el hígado de ejemplares de barracuda que pesaron entre 4.8 a 15.5 kg utilizando método de ensayo de citotoxicidad en la línea de neuroblastoma N2A (cuyo ensayo permite detectar y cuantificar ciguatoxinas), el 60% de las muestras indicaron la presencia de CTX, el 30% presentó concentraciones por encima del límite de detección (0.25ppb), los cuales son de riesgo a la salud pública si se consumiera este tejido. La barracuda más tóxica pesó 2.1 kg con aproximadamente 1.8 ng/g C-CTX-1, mientras que la barracuda de mayor peso (15 kg) no presentó actividad, lo que se contrapone a la hipótesis generalizada de que los peces más grandes son los más tóxicos.

Pottier *et al.* (2003) utilizaron las técnicas del BR y el HPLC para analizar una muestra de barracuda que produjo una intoxicación y que se mantuvo en congelación (-20°C) desde julio de 1998, perteneciente a las Antillas Francesas, ambos métodos mostraron la participación de C-CTX-1, además confirmaron que es un inhibidor competitivo igual que las brevetoxinas, y que su potencia es dos veces menor que la ciguatoxina-1 del Pacífico (P-CTX-1).

Oshiro *et al.* (2010) en un estudio realizado en Okinawa, Japón, revisaron un total de 612 especímenes de peces mediante el BR y HPLC-MS, de los cuales 108 fueron tóxicos (*L. bohar*, *L. monostigma*, *V. loutiy* *E. fuscoguttatus*), encontrando en este caso que la toxicidad de los peces analizados en este estudio sí estaba relacionada con su tamaño. Por lo que en estos autores describen que las ciguatoxinas se acumulan en los peces a través de la cadena trófica, siendo los peces más grandes los más tóxicos .

O'Toole *et al.* (2012) realizaron un estudio en la costa del Cabo Eleuthera de las Bahamas, en donde evaluaron diversos tejidos (hígado, músculo y sangre) utilizando el ensayo N2A en 38 especímenes de barracuda. Las tallas medianas de 80, 84 y 94 cm resultaron las de mayor toxicidad con 167.77, 98.83 y 211.74 pg/TE (picogramos por tejido de pez) respectivamente, mientras que las barracudas de menor (60 cm) y mayor (120 cm) talla no presentaron registros de toxicidad, determinando que las concentraciones de toxinas no se correlacionan con la longitud total de los peces.

Gaboriau *et al.* (2014) en su estudio realizado en la Polinesia Francesa con 45 especies de peces capturadas para analizar la relación entre la concentración de CTX y el tamaño de pez, observaron que 35 especies no mostraron relación significativa, sugiriendo que la toxicidad de los peces no está relacionada a su peso, siendo entonces realmente azaroso la regulación de este tipo de toxinas con base en el peso de los peces.

En el caso del Caribe Mexicano, Arcila-Herrera *et al.* (2001) y Nuñez-Vazquez *et al.* (2000); Nuñez-Vazquez 2005; 2014 describen que la ciguatera es un problema añejo y poco estudiado. No obstante, que desde esos años los casos de ciguatera han ido en aumento en la Península de Yucatán.

Villareal *et al.* (2007) describieron la presencia de CTX en las muestras de barracuda capturadas de las plataformas petroleras para el Golfo de México (territorio estadounidense), siendo los meses de junio y julio cuando se encontraron los organismos más tóxicos.

Núñez-Vázquez *et al.* (2008 y 2014), reportaron un total de 14 eventos de ciguatera en el Caribe Mexicano (específicamente en Quintana Roo) y Golfo de México (Península de Yucatán) con un total de 172 casos, todos provocados por la ingesta de barracuda. En Quintana Roo, 61 casos ocurrieron en Isla Mujeres, 20 en Cozumel, 14 en Cancún, 5 en Puerto Aventuras y 29 en Playa del Carmen, En el estado de Yucatán 26 casos ocurrieron en Mérida, 11 en Progreso y 6 en Kanasín.

Baron-Campis *et al.* (2014) confirmaron la presencia de CTX en peces de consumo local como el “canané”, “rubia” y “chacchi” en el norte de la Península de Yucatán en los meses de mayo a octubre, encontraron algunos extractos con concentraciones mayores al límite permisible para el consumo humano, sin embargo, la barracuda no se incluyó en este trabajo.

Martin *et al.* (2014) reportó 12 casos de ciguatera que fueron diagnosticados con el método de bioensayo en ratón en el Laboratorio estatal de salud pública del estado de Quintana Roo durante un brote ocurrido en el año 2009 en Isla Mujeres.

Núñez-Vázquez *et al.* (2016) reportó una morbilidad de 464 casos durante 25 eventos en el periodo de 1984-2013: 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. Sin embargo, es probable que los casos en Quintana Roo estén subestimados debido a la falta de diagnósticos adecuados. En aguas del Océano Pacífico los peces involucrados fueron los pagos (*Lutjanus* spp.) y meros (*Epinephelus* spp. y *Mycteroperca* spp.), mientras que para la región del Atlántico (Golfo de México y mar Caribe) fueron la barracuda (*Sphyraena barracuda*) y el pargo (*Lutjanus* sp.).

Ley-Martínez *et al.* (2014) en un estudio de bioprospección de ciguatoxinas en peces carnívoros del Caribe Mexicano y aguas adyacentes, confirmaron la presencia de CTX en barracudas capturadas en Puerto Morelos, Quintana Roo.

Finalmente, Barra-Gonzalez (2016) realizó un estudio de ciguatoxinas en barracuda (29 cm - 1.45 m y 500 g a 9.1 kg de peso) y otros peces carnívoros y coralívoros en Tuxpan Veracruz, México, reportando 7 ejemplares de barracuda con

concentraciones letales en sus tejidos (1.1 a 10 UR de CTX) para los meses agosto, septiembre y octubre, superando el límite máximo permisible (LMP) en la Norma Oficial Mexicana y la Norma de la FDA de los EU.

Tabla 1. Incidencia de casos de Ciguatera en el Caribe.

<i>País</i>	<i>Incidencia/ 100 hab/año</i>	<i>Año</i>	<i>Autor</i>
<i>Antigua</i>	6	1973- 1983	Bagnis (1981),
<i>Cuba</i>	0.33		
<i>Dominica</i>	1.2		
<i>Guadalupe</i>	1.5		
<i>Haití</i>	0.4		
<i>Islas Virgenes Britanicas</i>	40		
<i>Islas Virgenes E.U.A.</i>	23		
<i>Jamaica</i>	1.8		
<i>Martinica</i>	0.92		
<i>Puerto Rico</i>	0.18		
<i>San Kitss y Nevis</i>	5.5		
<i>San Martín</i>	100		
<i>Trinidad y Tobago</i>	0		
<i>E.U.A.</i>	5	1996	Tosteson (1996)
<i>México (Quintana Roo)</i>	0.1	1998- 2013	Núñez-Vázquez <i>et al.</i> , (2016)

3. JUSTIFICACIÓN

La ciguatera constituye un problema de salud pública a nivel internacional, siendo las especies de barracuda, entre las que se encuentra la “gran barracuda” *Sphyraena barracuda* el principal vector de esta enfermedad en el Caribe Mexicano. Mas del 90% de los casos reportados en el sector salud han ocurrido por consumir este pez. Dichos registros pertenecen principalmente a la zona norte del estado de Quintana Roo: Tulum, Puerto Aventuras, Playa del Carmén, Puerto Morelos, Cancun, Cozumel e Isla Mujeres, aun cuando la pesca de este pez actualmente esta prohibido por la COFEPRIS. Ahora bien, en la Isla Mujeres, (sitio de interes en este estudio), los casos de ciguatera han sido recurrentes y es una de las zonas del Caribe Mexicano que presentan el mayor número de casos. Es posible que esto se deba (entre otros factores) a que es un sitio que presenta una afluencia masiva y continua de turismo nacional y extranjero cuya economía se debe pricipalmente el turismo y la pesca deportiva. Además su gastronomía incluye los platillos tipicos como el *Tikinchi* y el ceviche a base de pescado, exponiendose a adquirir esta enfermedad. Debido al desconocimiento de la gravedad de la ciguatera, ésta puede volverse crónica si tiende a acumularse en el organismo por la constante exposición a lo largo del tiempo. Además, las actividades recreativas y el crecimiento poblacional acelerado conlleva a la modificación de los recursos naturales como los sistemas de arrecife, favoreciendo la proliferación de dinoflagelados del género *Gambierdiscus*.

Por lo tanto, a pesar de la importancia en la salud pública y ecológica, existen pocos datos de estudios toxicológicos en la barracuda en el estado y particularmente en la Isla Mujeres, por lo que este estudio tuvo como objetivo evaluar la toxicidad y la distribución anatómica (tejidos) de las CTX de esta especie para determinar que tejidos presentan mayor riesgo al consumidor, y sí esta toxicidad tiene una relación con el peso. Este trabajo pretende sentar las bases a futuras investigaciones epidemiológicas, ecológicas y toxicológicas, siendo de utilidad a las autoridades pesqueras, sanitarias e indirectamente al sector turístico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Detectar la presencia de ciguatoxinas en la barracuda (*Sphyraena barracuda*) en la zona de Isla Mujeres, Quintana Roo, México durante el periodo de mayo y julio del año 2016.

4.2. Objetivos Específicos

- Extraer las ciguatoxinas en la barracuda (*Sphyraena barracuda*) en aguas adyacentes de Isla Mujeres.
- Determinar la concentración de CTX y el nivel de concentración de la barracuda (*S. barracuda*) en aguas adyacentes de Isla Mujeres.
- Evaluar si existe una relación entre el peso y la toxicidad en la barracuda (*S. barracuda*).
- Determinar la toxicidad por distribución anatómica (músculo y vísceras) en la barracuda.

5. HIPÓTESIS

- Existe la presencia de toxinas tipo CTX en las barracudas (*S. barracuda*) durante el período de mayo y julio en las aguas adyacentes de Isla Mujeres.
- Existe una relación proporcional entre el peso y el nivel de toxicidad en la barracuda

6. ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se realizó en la ínsula de Isla Mujeres se localiza al norte del estado de Quintana Roo, México, está rodeada por aguas del Mar Caribe y pertenece al municipio el cual lleva el mismo nombre (21°15´ Norte; 21° 12´ Sur; 86° 45´ Este y 86° 42´ Oeste) (figura 4). Colinda al norte con el canal de Yucatán, al sur con el Municipio de Benito Juárez, al este con el Mar Caribe, al oeste con el Municipio de Lázaro Cárdenas. Es una región plana y cuenta con algunas elevaciones de 20 m de altura aproximadamente, distribuidos a lo largo de ella. La superficie total es de 402.71 ha, de las cuales 22.84 son lagunas interiores y 379.88 de tierra aprovechable. La Isla tiene cuerpos de agua salada interiores (Salinas grande y chica) además de la Laguna Macax. Cuenta con un ecosistema arrecifal que forma parte del “Gran Cinturón de Arrecifes del Atlántico Occidental” considerado como la segunda barrera arrecifal más grande del mundo (PDU, 2009).

El clima es cálido subhúmedo. Presenta una temperatura promedio anual de 26°C con una oscilación térmica de 5 a 7°C; registrándose el periodo más caliente entre junio y agosto, con lluvias en verano con una precipitación anual menor a 1,100 mm.

Presenta vientos predominantes del este y sureste. Durante el verano la zona puede verse afectada por tormentas tropicales y ciclones, comenzando a mediados de junio, siendo agosto y septiembre los meses más afectados.

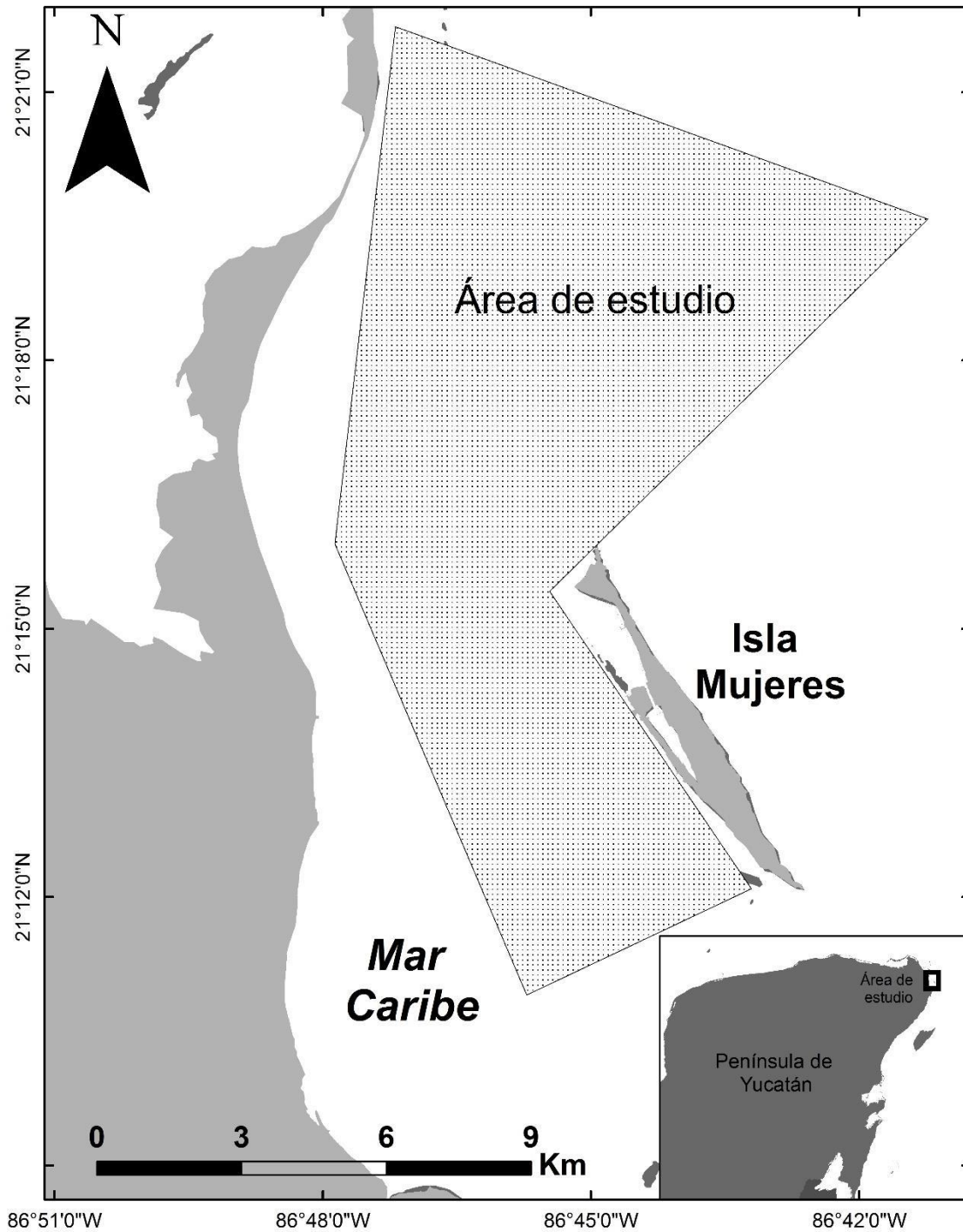


Figura 4.- Área de estudio. El polígono representa la zona de colecta de peces capturados mediante la técnica de curricano y arpón. Elaborado por Sabido Itzá, 2016.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Trabajo de Campo

7.1.1. Captura de ejemplares de barracuda (*S. barracuda*)

Se realizaron tres salidas durante los meses de mayo y julio para colectar los peces en la zona aledaña a Isla Mujeres, incluyendo su Bahía y su zona noroccidental, en donde existen varios arrecifes que presentan abundancia de barracudas durante todo el año.

Para asegurarnos de colectar los ejemplares de barracuda fue necesario contar con el apoyo de pescadores de la Isla, quienes conocen las zonas de agregación y manejan con efectividad los artes de pesca con los que se capturó a los ejemplares. Las salidas se realizaron en una embarcación con motores fuera de borda (60 hp), aplicando tres artes de pesca: línea, caña y arpón, obteniendo de esta manera diferentes tallas (figura 5).

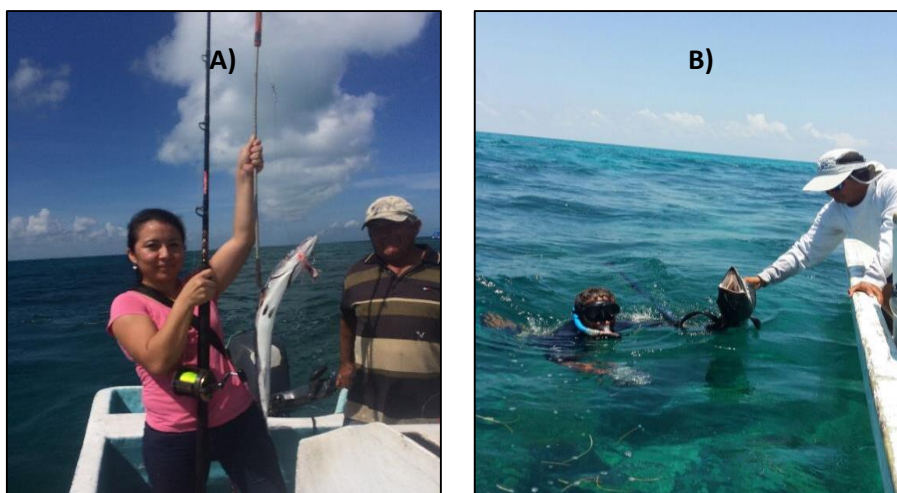


Figura 5. Técnicas de pesca realizadas en el presente estudio. Pesca con línea. A) Pesca con Caña. B) Pesca con arpón, las cuales fueron implementadas en el área de muestreo.

Se colectaron un total de 23 ejemplares y a cada uno se les tomaron datos de longitud total (Lt) y longitud Furcal (LF) en mm con un ictiómetro. También fueron pesados con una balanza romana y finalmente fueron fotografiados. Después de la obtención de los datos merísticos, los organismos se diseccionaron para obtener tejido de músculo, cabeza y visceras (higado, bazo e, intestinos). Los tejidos se colocaron y sellaron en bolsas tipo “Ziploc” previamente etiquetadas para asegurar la identificación para su posterior manejo. Para su transporte al Laboratorio Estatal de Salud Pública del estado de Quintana Roo (LESP) donde se llevó a cabo la extracción de CTX, los ejemplares se congelaron previamente a -70°C en el laboratorio del CICY-Unidad de Ciencias del Agua, tras lo cual, se transfirieron a un congelador horizontal a -20°C (figura 6). Cabe mencionar que se tomaron en cuenta las recomendaciones de la NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009 (Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba para asegurar una buena extracción de las toxinas y minimizar la contaminación del producto). Una vez en el Laboratorio Estatal de Salud Pública, a cada muestra se le asignó una clave de registro para poder llevarse a cabo el proceso extracción.

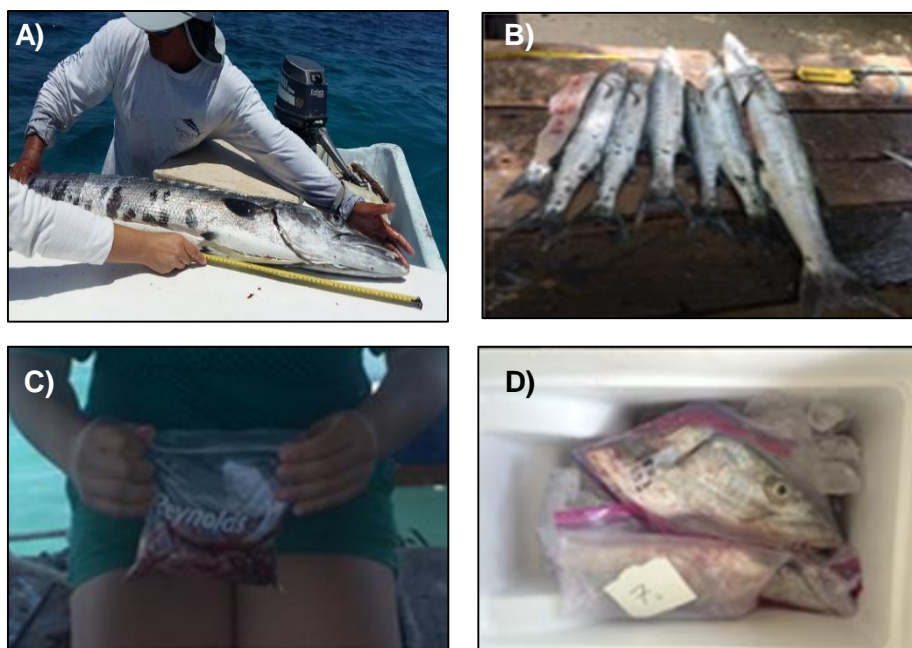


Figura 6. Colecta de muestras. A y B) Toma de datos merísticos (peso, longitud furcal y longitud total). C) Colecta de los tejidos en bolsas tipo Ziploc. D) Transporte de los tejidos en una nevera con hielo al Laboratorio para su congelación.

7.2 Trabajo de laboratorio

7.2.1 Extracción de Ciguatoxinas (CTX)

Para detectar la presencia de las CTX, se aplicó el método de extracción, basado en la técnica de Gamboa *et al.*, (1992) y Lewis *et al.*, (1995, 2003), con algunas modificaciones realizadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública; laboratorio avalado por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Durante todo este proceso fue un requisito el uso de guantes para un mejor manejo de las muestras, equipos de protección de seguridad así como materiales esteriles y equipos verificados y calibrados.

Antes de comenzar el proceso de extracción, las muestras fueron descongeladas hasta alcanzar la temperatura ambiente para poder procesarlas por separado durante su tratamiento.

Este proceso consistió en licuar el tejido de 1 a 2 min, a fin de tener una muestra homogénea. Se pesaron 100g de masa muscular o víscera en una balanza granataria (Denver), que fueron transferidos a en un frasco de Nalgene al cual se le agregaron 100 ml de acetona grado analítico; el tejido y el solvente se homogeneizaron (es importante mantener la relación peso-volumen 1:1) para incubarlo durante 24 a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se filtró todo el contenido en un embudo Buchner de porcelana con ayuda de papel Whatman (No. 40), un sistema de filtración Millipore con vacío realizado mediante una bomba manual. Pasando este tiempo se realizó una segunda extracción de la misma con otros 100 ml de acetona, obteniendo un volumen final de 200 ml de extracto acetónico el cual fue recuperado en un matraz bola para realizar la destilación en el rotaevaporador (Yamato Scientific) a una temperatura de 60°C.

El residuo obtenido se resuspendió con 80 ml de éter dietílico grado analítico y 20 ml de agua desionizada. Se colocó en un embudo de separación para obtener las dos fracciones: orgánica y acuosa, siendo la fracción orgánica el objetivo a recuperar en este paso. Para ello, durante este proceso de separación a la fracción acuosa, se realizaron tres lavados con éter dietílico al 80%, recuperando un total de tres fracciones orgánicas en un vaso de precipitado, que a su vez fueron

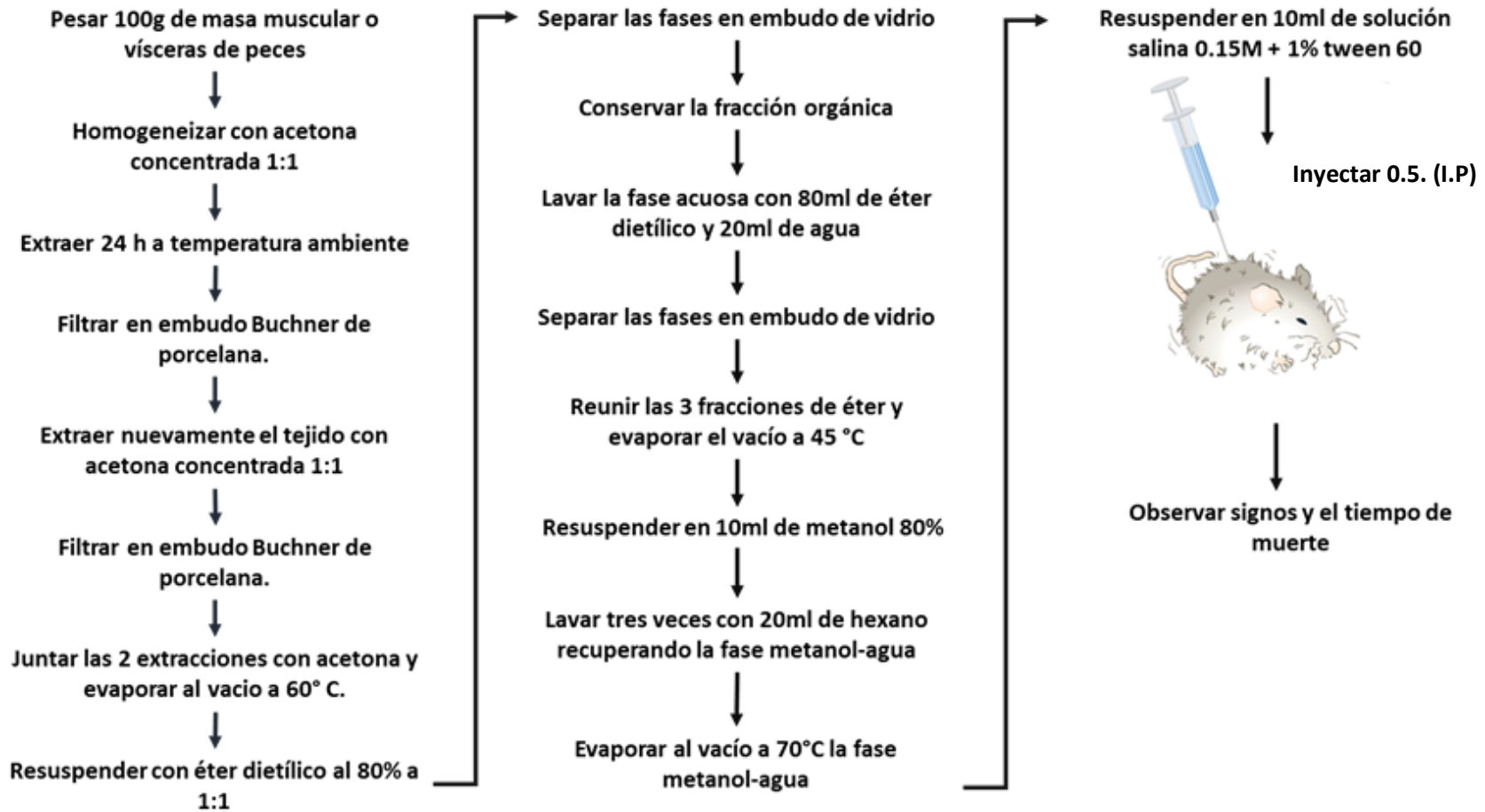
depositadas en un matraz bola para llevarlo al rotoevaporador y eliminar residuos de eter dietilico a una temperatura de 45°C.

El residuo obtenido fue resuspendido en 10 ml de metanol al 80% y se realizaron tres lavados con 20 ml de hexano grado analitico en un embudo de separación, recuperando la fase metanol-agua, el extracto obtenido fue secado en el rotaevaporador con vacío a una temperatura de 70°C.

Por último, el residuo oleoso contenido en el matraz de evaporación fue resuspendido con 10 ml de solución salina (NaCl) estéril inyectable libre de pirógenos (PISA)+ 1% de Tween 60.

El extracto obtenido de cada muestra fue depositado en viales tipo serológico de vidrio de color ambar, sellados con tapón de rosca de aluminio con empaques de teflón, una vez sellados los contenedores, adicionalmente fueron cubiertos con papel parafilm. Cada frasco fue rotulado y llevado a congelacion a -20°C en un congelador "REVCO" (Mod. M-U275030A18) hasta su evaluación de toxicidad por medio del modelo de bioensayo en ratón (figura 7).

Figura 7. Diagrama del proceso de extracción de las CTX y evaluación por medio del modelo de bioensayo en ratón). Elaborado a partir de una imagen de la web.



En esta técnica es necesario (debido a las propias toxinas que pueden estar presentes en la muestras así como por el mismo uso de solventes que pueden ser cancerígenos al contacto con la piel o al inhalar los gases que emiten) utilizar equipos de protección de seguridad adecuados como campanas de extracción de gases, guantes de nitrilo y mascarillas con filtro. En el Anexo 1 se observan algunos de los equipos utilizados en el sistema de extracción y fotografías del trabajo en laboratorio. En las siguientes tablas se especifica la relación de aparatos e instrumentos (tabla 2) y medios (tabla 3) y reactivos usados (tabla 4) para llevar a cabo las extracciones descritas.

Tabla 2. Relación de equipos.

Equipos	Casa comercial
Balanza analítica con sensibilidad de 0.1mg, calibrada y/o verificada.	Denver
Bomba para vacío	Millipore
Rotaevaporador/ baño de agua	Yamato Scientific
Licuada	Oster

Tabla 3. Materiales usados en las extracciones.

Materiales	Casa comercial
Embudo Buchner de porcelana	Kimax
Papel Whatman No. 40	Whatman
Matraz Kitasato 500 ml	Kimax
Embudos de separación de 250 ml.	Kimax
Matraces Erlenmeyer de 250 ml	Kimax
Matraz volumétrico de 100 ml de vidrio clase "A"	Kimax
Guantes de látex y nitrilo	Ambiderm
Frascos de plástico de 250 ml	Nalgene
Probetas de 100 ml	Kimax
Pipeta volumétrica de 1 ml de vidrio clase "A", verificada.	---
Jeringas de insulina 30 g x 13 mm	BD
Tubos para el extracto	Abbot
Papel 40 lbs - 24" x 900'	Kraft
Papel aluminio	Azteca

Tabla 4 Reactivos usados en las extracciones.

Reactivos	Casa comercial	Pureza
Acetona grado analítico	Acetona Q.P.	98.8 %
Éter dietílico grado analítico	High Purity	98.0%
Metanol grado analítico	J.T. Baker	99.90%
Hexano grado analítico	High Purity	98.5%
Disolución salina (0.15 m)	Pisa	NA
Disolución de tween 60 al 1%	---	---
Ratones albinos (machos)	Cepa Webster Suiza (18-20 g)	Libre de patógenos principales
Agua destilada	---	NA
Agua purificada	---	NA
Jabon detergente	---	NA
Alimento para ratones	<i>Pellets</i> alimenticios (Zeigleir)	NA

- NA (No aplica)

Tabla 4. Relación de reactivos y materiales usados para las extracciones y su evaluación en modelo en ratón.

7.2.2 Detección de CTX por medio del modelo de bioensayo en ratón (BR) y calculo de toxicidad.

Para evaluar la presencia de las ciguatoxinas en los extractos obtenidos, se utilizó el modelo de bioensayo en ratón (BR), el cual es un método utilizado en diversos países como método regulatorio (FAO, 2005).

El análisis de toxicidad por medio del modelo de BR se realizó bajo los estándares del Laboratorio de Toxinas Marinas y Aminoácidos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) en la ciudad de La Paz, Baja California Sur. Laboratorio que ha sido autorizado por la COFEPRIS de la Secretaría de Salud para el análisis de toxinas marinas y realiza investigaciones científicas sobre el análisis, extracción y efecto de distintas toxinas de origen acuático. El laboratorio es apoyado por el bioterio del CIBNOR el cual también cuenta con la certificación por parte de la SAGARPA (permiso No. B000.02.03.02.01.1155/08), basandose en las

especificaciones técnicas descritas por la NOM-062-ZOO-1999 de la SAGARPA, referente a la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y en los protocolos descritos para eutanasia, realización de las disecciones y análisis de la necropsia (Feldman y Seelly 1988; Hedrich *et al.*, 2004).

Un total de 100 ratones machos, albinos CD-1 (ICR, libres de patógenos principales) de 18 a 20 g fueron adquiridos a HARLAN de México (actualmente ENVIGO S.A. de C.V., con sede en la UNAM, Ciudad de México, los cuales fueron transportados vía aérea al CIBNOR en cajas desechables de transporte (con filtros EPA) de animales de experimentación (modelo en ratón), con suministro de agua en hidrogel, lecho de cama estéril y alimento pelletizado (Anexo 2). Se anexa el certificado (Anexo 4)

Una vez ubicados en el área de bioensayos del laboratorio de toxinas marinas y aminoácidos (el cual contiene estándares de confort de 20 °C y 60% como máximo de humedad regulado mediante un “minisplit” Mitsusbihi y un deshumificador), los ratones fueron transferidos a jaulas convencionales de mantenimiento de ratones de experimentación, las cuales previamente habían sido esterilizadas, y contaban con el suministro de lecho de cama ASPEN Shavings de NEPCO y pellets alimenticios formulados estériles (Zeigleir) así como agua acidificada estéril *ad libitum*. Todos los animales se mantuvieron en adaptación al menos 24 horas. Se tuvo el cuidado de mantener limpias las jaulas durante el procedimiento.

Antes de comenzar con la inoculación, fue necesario pesar y marcar a cada ratón en la base de la cola. El bioensayo consistió en aplicar una inyección intraperitoneal (i.p.) al ratón por duplicado esto es, dos ratones por cada extracto), aplicando 0.5 ml, respectivamente. Un grupo control fue inyectado i.p. solo con el vehículo (Solución salina con 1% de Tween 60) (Anexo 3).

Posteriormente, los animales fueron observados durante 24 h y se registraron los signos clínicos presentados (tabla 5); se midió el tiempo de muerte (que se manifiesta como el último jadeo del animal), para realizar el cálculo de las unidades ratón (UR es la cantidad o concentración suficiente de toxinas para provocar la muerte de un ratón macho de un peso promedio de 20 g en 24 h y que en el caso

de las CTX aproximadamente es equivalente a 5 ng CTX-1) en las muestras positivas. En el caso de que algún extracto causara la muerte en pocos minutos se realizan diluciones con el vehículo (solución salina con Tween 60) e inyectan a nuevos ratones i.p. hasta obtener la toxicidad respectiva en por lo menos 40 minutos como tiempo de muerte (Anexo 3).

Tabla 5. Signos clínicos en el modelo en ratón para CTX descritos en la literatura científica y su definición respectiva (con base en lo descrito por Lewis, 1995; Pottier *et al.*, 2001; Landsberg, 2002).

Signo clínico	Descripción del signo*
Ataxia	Pérdida de la capacidad para ejecutar movimientos de manera voluntaria, ordenada y suavemente. Puede afectar al tronco, extremidades, faringe, laringe, otros. Se debe a la afectación de algunas estructuras del sistema nervioso.
Cianosis	Coloración azulada de la piel y mucosas, causado por elevada concentración de hemoglobina en la sangre, por deficiencia de oxigenación.
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.
Diarrea	Anormalidad en la función del aparatodigestivo que se caracteriza por las frecuentes evacuaciones y por la consistencialíquida de las mismas:
Disnea	Dificultadpara respirar, sensación de ahogo.
Hipersalivación	Puede producirse a partir de una estimulación parasimpática excesiva; sin embargo, se considera un signo orientativo de una enfermedad del tracto gastrointestinal superior.
Hipoactividad	Actividad del cuerpo o de sus órganos con bajo rendimiento.
Hipotermia	Pérdida de la temperatura corporal, por debajo de los límitesnormales.
Lagrimeo	Llorar, expulsarlágrimasfácilmente o con frecuencia.
Parálisis de los cuartos traseros	Privación o disminución del movimiento de los cuartos traseros.
Paro respiratorio	Suspensión definitiva de la respiración al no poder entrar oxígeno al organismo.
Piloerección	Erección de los pelos por acción de los músculos del folículo piloso; también se conoce por piel de gallina.
Problemas de locomoción	Dificultad de moverse de un lugar a otro.
Saltos	Elevación a determinadaaltura o lanzamientodesdeella.

(*definiciones de <https://es.wikipedia.org>)

Todo el material de laboratorio de cristalería que estuvo en contacto con las muestras durante el proceso de extracción, se descontaminó utilizando una solución

de hipoclorito de sodio (NaCl) al 2.5% y/o hidróxido de sodio (NaOH) al 0.25% para la eliminación de las toxinas.

7.3 Trabajo de gabinete

7.3.1 Calculo de la toxicidad

Inmediatamente después de ser inoculados los ratones se observaron y anotaron los signos de la intoxicación por CTX. La muerte de los animales puede presentarse durante las primeras 5 horas. Sin embargo con base a la signología presentada en los ratones se clasificaron las muestras de acuerdo a los niveles de concentración:

1. **Concentración inocua:** para aquellas muestras que no ocasionaron ningún signo de intoxicación o muy leves, mostrando un comportamiento normal.
2. **Concentración subletal:** aquellas muestras que afectaron tanto al sistema nervioso, gastrointestinal (principalmente) y cardiovascular, con al menos uno o más signos de intoxicación. Por lo que la concentración está por debajo del límite de cuantificación de este método de bioensayo, permitiendo que los ratones se recuperen después de las 24 h.
3. **Concentración letal:** aquellas muestras que causan varios signos clínicos muy severos o causan la muerte de los ratones en tan solo pocos minutos u horas. La patofisiología de los ratones fue la misma. Por lo que es necesario realizar diluciones para poder obtener la toxicidad respectiva mediante el uso de más animales de experimentación. Aunque no todos los extractos utilizados resultaron con concentraciones subletales o positivas, los ratones fueron sacrificados, por considerarse como material biológico, su disposición final fue usando bolsas rojas de residuos toxicológicos para ser incinerados.

7.3.2 Análisis estadísticos

Para calcular la concentración de CTX se utiliza el promedio del tiempo de muerte de los ratones evaluados cuya relación fue establecida y calculada por Lewis *et al.*, (1984, 1995) y en el caso típico de peces carnívoros esta relación esta dada por la siguiente ecuación: **$\log UR=2.3 \log (1+T^{-1})$**

dónde:

UR= número de las unidades ratón de ciguatoxina inyectada, y

T= tiempo de muerte en horas.

Para determinar la relación peso-toxicidad de cada uno de los tejidos de la especie de barracuda, se realizó una correlación de Pearson.

- Relación longitud-peso (RLP).

Para determinar cual es una regresión potencial que relaciona una medida lineal (talla) con una de volumen (peso) se aplicó la ecuación: $WT = a LT^b$

Donde:

WT = Peso en g

LT = Talla en cm

a = constante de regresión

b = coeficiente de regresión

Es importante esta parametrización porque es posible aun cuando los peces presentan una relación entre sus variables de este tipo, es posible que valores bajos del coeficiente de determinación indiquen la presencia de diferentes poblaciones de barracudas, lo cual puede verse reflejado en los resultados de toxicidad

- Toxicidad entre diferentes tejidos (músculo y vísceras) y tallas.

Para validar la independencia de las variables predictoras se realizó la prueba de Chi Cuadrado (X^2), considerada como una prueba no paramétrica que se utiliza para

probar la independencia de dos variables entre sí, mediante la presentación de los datos en tablas de contingencia.

Ho= La variable toxicidad y tejidos son independientes

Hi= La variable toxicidad y tejidos no son independientes

- El mismo criterio se aplicó para la toxicidad entre las diferentes tallas.

Ho= La variable toxicidad y tallas son independientes

Hi= La variable toxicidad y tallas no son independientes

8. RESULTADOS

8.1. Colecta de las barracudas capturadas

En el presente estudio se obtuvieron un total de 19 ejemplares de *S. barracuda* durante dos meses de muestreo (mayo y julio de 2016) en aguas adyacentes a Isla Mujeres (Tabla 5). Los peces presentaron un intervalo de tallas de 54 y 130 cm de longitud total y un peso que estuvo entre los 900 - 10,400g. Los peces en estado juvenil presentan tallas de 54-71 y los adultos 83-130, siendo mayor en número de individuos las tallas juveniles (tabla 6 y 7).

Tabla 6. Registro de peso y talla de las barracudas capturadas en los meses de mayo y julio del año 2016 en Isla Mujeres, Quintana Roo.

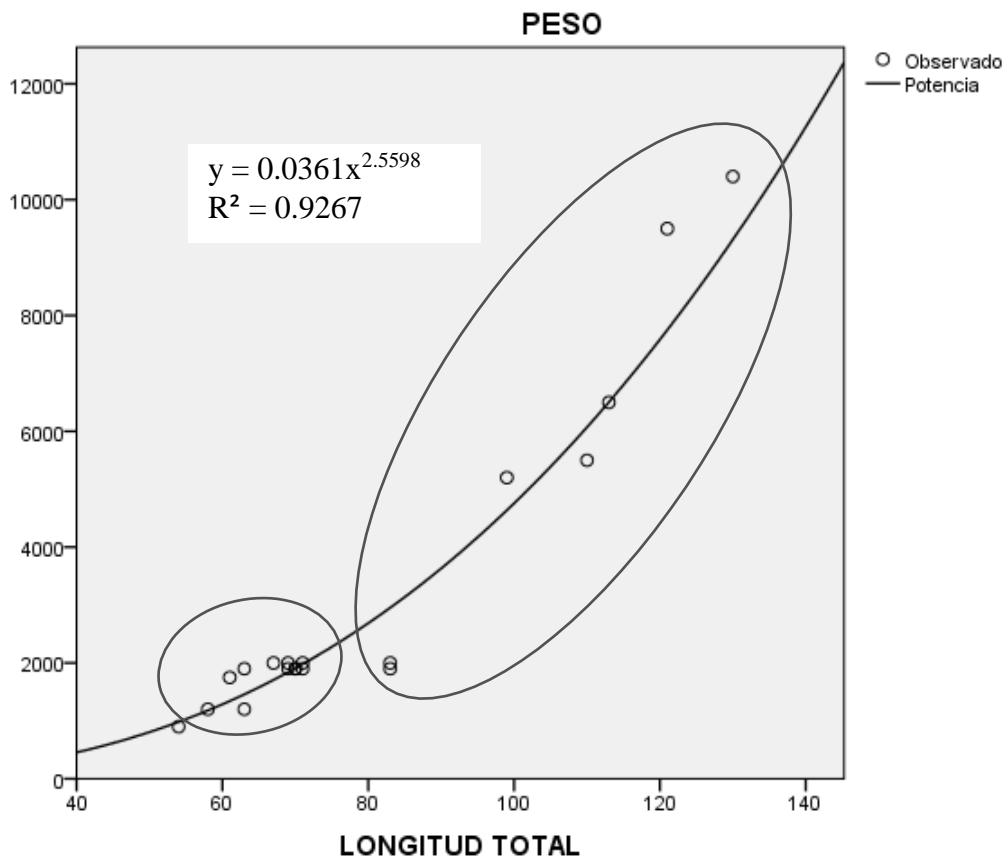
No. de ejemplar	Fecha de colecta (dd/mes/año)	Longitud Furcal (cm)	Longitud total (cm)	Peso (g)	FASE
1	20 de mayo del 2016	45.52	54	900	JUVENIL
2		49.25	58	1200	JUVENIL
3		53.91	63	1900	JUVENIL
4		59.5	69	2000	JUVENIL
5		60.43	70	1900	JUVENIL
6		61.36	71	2000	JUVENIL
7		87.46	99	5200	ADULTO
8	21 de mayo del 2016	52.04	61	1750	JUVENIL
9		53.91	63	1200	JUVENIL
10		57.64	67	2000	JUVENIL
11		59.5	69	1900	JUVENIL
12		60.43	70	1900	JUVENIL
13		61.36	71	1900	JUVENIL
14	01 de Julio del 2016	72.55	83	2000	ADULTO
15		72.55	83	1900	ADULTO
16		97.71	110	5500	ADULTO
17		100.5	113	6500	ADULTO
18		107.96	121	9500	ADULTO
19		116.35	130	10400	ADULTO

Tabla 7. Frecuencia de talla juvenil-adulto de los peces colectados de la barracuda.

		TALLA			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	ADULTO	7	36.8	36.8	36.8
	JUVENIL	12	63.2	63.2	100.0
	Total	19	100.0	100.0	

Mediante el análisis de regresión lineal simple de longitud total-peso se obtuvo el índice de determinación de $r^2=0.93$, potencial $0.0361 (L_t) x^{2.560}$ (Figura 8).

Figura 8. Relación entre talla y peso de la *S. barracuda* de los peces colectados.



8.2. Cálculo de la toxicidad CTX por medio del modelo de bioensayo en ratón

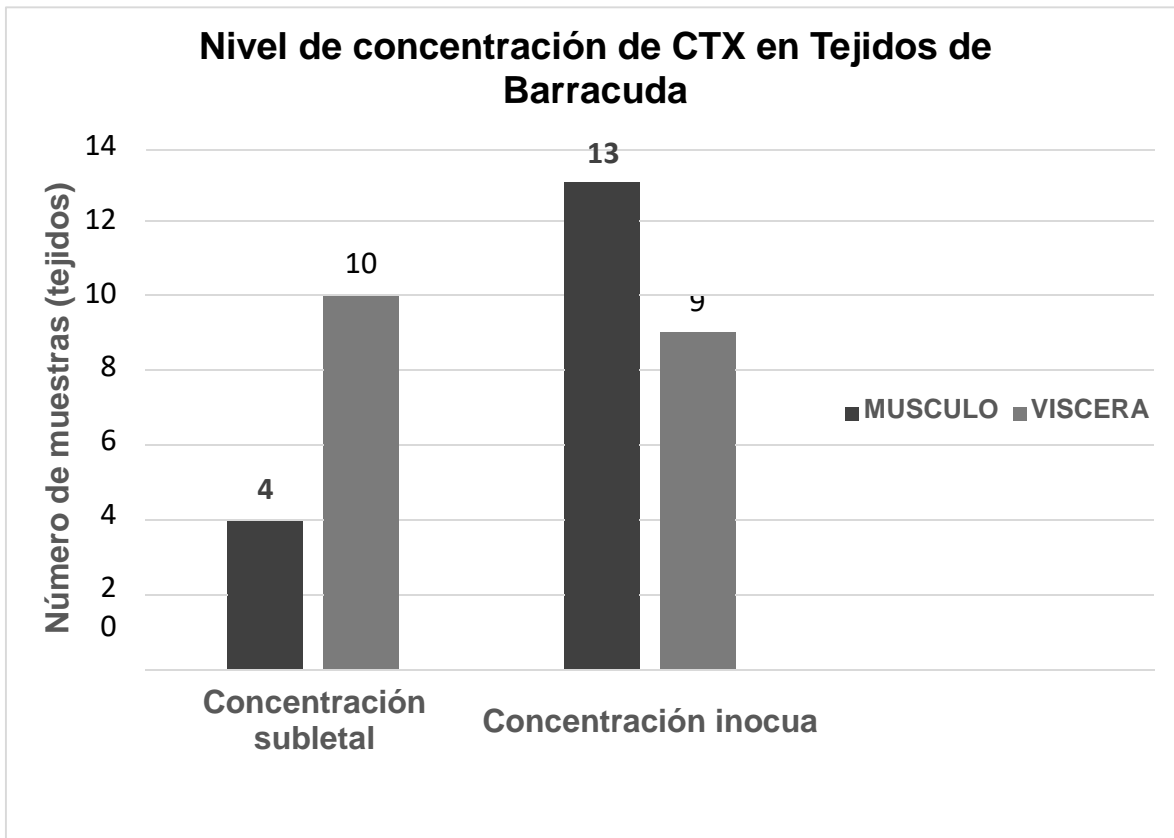
De los 19 ejemplares de barracuda, se obtuvieron 38 tejidos: 19 fueron a partir de vísceras y 17 de músculo; dos de ellos (clave *4487 y *4517) fueron descartados por problemas durante el proceso de extracción, obteniendo así un total de 36 extractos.

Los extractos obtenidos de vísceras y músculo de la barracuda causaron en los ratones un total de 23 signos clínicos que son descritos en la literatura especializada para CTX (Yasumoto *et al*, 1977, Lewis *et al*, 1995, 2003, Fernández *et al.*, 2002). Estos signos clínicos fueron desde leves (diarrea, espasmos, letargo, poliuria, respiración agitada), hasta muy severos (parálisis de los cuartos traseros, disnea, problemas respiratorios, estereotipias, temblor, saltos, vasodilatación de las orejas, problemas de locomoción, ataxia, hiperactividad, y otros muy peculiares como el rascado con las patas traseras), los cuales variaron en frecuencia (tabla 8, figura 11). Sin embargo no provocaron la muerte en el BR logrando sobrevivir y recuperarse después de las 24 h que duró el análisis.

Ninguna de las muestras provocó concentraciones letales, por lo que no fue posible determinar en ningún caso el nivel de toxicidad por medio de este método, en el que es requerido el tiempo de muerte, para el cálculo de su toxicidad, sin embargo la signología de tipo digestivo y neurotóxico característica de las CTX que fue observada en los animales permitió claramente su distinción (en algunos casos severa y en el límite de su sobrevivencia) permitiendo detectarlas de manera cualitativa, pero por debajo de su límite de cuantificación y permitiendo su recuperación después de las 24 h por lo que son considerados como extractos que contenían concentraciones subletales. Mientras los que no presentaron ningún signo de intoxicación fueron considerados como inocuos. Con base a esto las muestras fueron clasificadas como: Concentraciones subletales y sin signos de intoxicación (tabla 8).

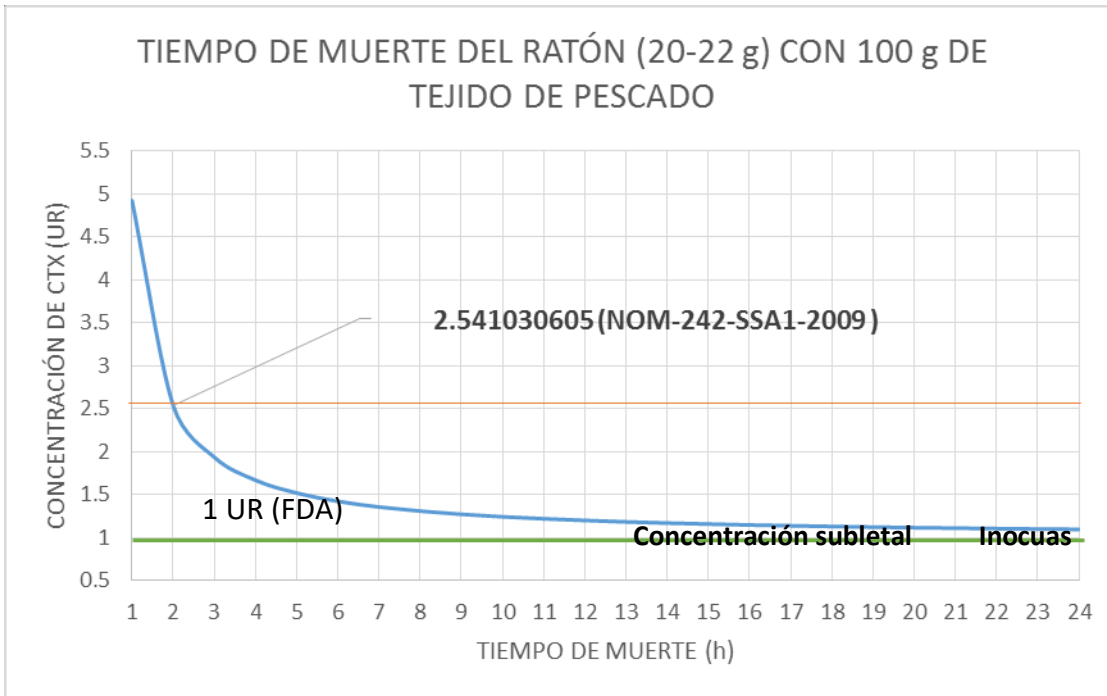
Del total de muestras analizadas (n=36) mediante el BR, el 14 (38.9%) fueron positivas tuvieron concentraciones subletales, (4 de músculo y 10 vísceras); 22, (61.1%) no presentaron signos de CTX, considerándose como negativas (figura 9).

Figura 9. Nivel de concentración de CTX en tejidos de la barracuda en aguas adyacentes a Isla Mujeres, Quintana Roo, México.



Las muestras positivas mostraron concentraciones subletales, por lo que no sobrepasan el límite máximo permisible de la Norma Mexicana (NOM242-SSA-1-2009) equivalentes a 2.5 UR (figura 10).

Figura 10. Curva de toxicidad (UR) y el tiempo de muerte del ratón (h). Las muestras con concentraciones subletal u inocuas bajo el Límite máximo permisible (LMP) según la NOM-242-SSA-1 (2.5 UR/100g). UR= 5 ng de CTX. Sb (barracuda: *S. barracuda*). La FDA (2 UR/100g o .1µgdeC-CTX-1).



Con base en lo anterior no fue posible hacer las correlaciones respectivas entre el peso total y la toxicidad, ni tampoco la comparación de toxicidad entre grupos de talla y tipos de tejido.

Tabla 8. Signos clínicos y toxicidad de extractos de barracuda (*S. barracuda*) de Isla Mujeres por medio del modelo de bioensayo en ratón.

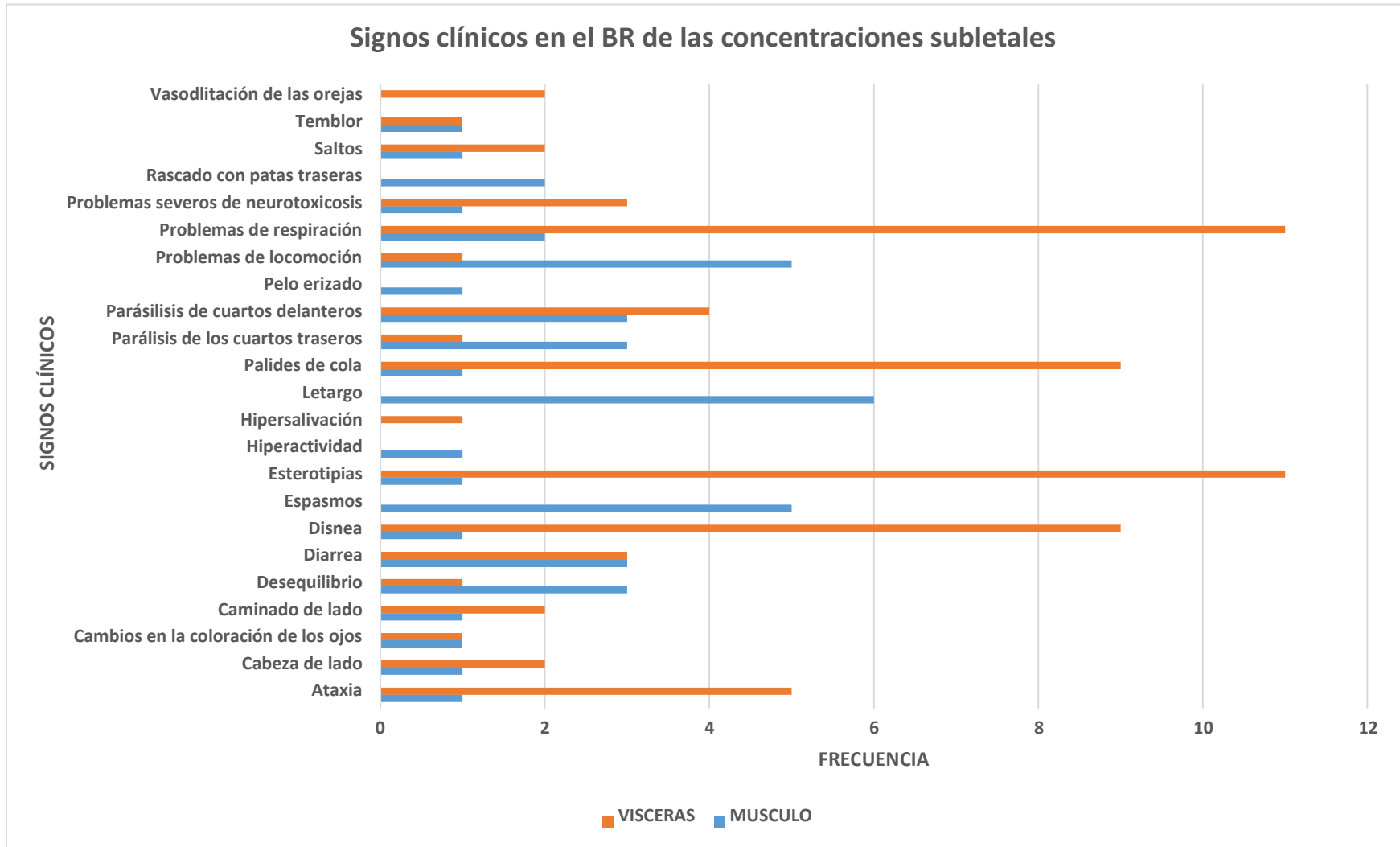
Lugar y fecha de colecta	Ejemplar	Tipo de tejido	Peso (g)	Signos clínicos	Toxicidad (UR)
Aguas aledañas a Isla Mujeres 20,21 de mayo 2016	1	Músculo	1200	Sin signos de intoxicación (2/2)	Negativo
		Vísceras		Ataxia (1/2), caminado de lado (1/2), diarrea (1/2), espasmos (1/2), letargo (1/2), parálisis de cuartos traseros (2/2), problemas de locomoción (2/2).	Concentración subletal
	2	Músculo	1200	Sin signos de intoxicación (2/2)	Negativo
		Vísceras		Diarrea (2/2).	Negativo
	3	Músculo	1750	Ataxia (2/2), cambios en la coloración de los ojos (2/2), caminado de lado (2/2), desequilibrio (2/2), diarrea (1/2), disnea (2/2), espasmos (1/2), parálisis de cuartos traseros (2/2), parálisis de cuartos delanteros (2/2), problemas de locomoción (1/2), problemas de respiración (2/2), problemas severas de neurotoxicosis (2/2), Saltos (2/2).	Concentración subletal
		Vísceras		Diarrea (1/2), letargo (2/2).	Negativo
	4	Músculo	1900	Letargo (2/2), problemas de locomoción (2/2).	Negativo

	Vísceras		Hiperactividad (1/2), diarrea (1/2), letargo (1/2).	Concentración subletal
5	Músculo	1900	Problemas durante el proceso de extracción	Perdida
	Vísceras		Camina de lado (2/2), espasmos (2/2), parálisis de cuartos traseros (1/2), problemas de locomoción (2/2).	Concentración subletal
6	Músculo	1900	Sin signos de intoxicación (2/2)	Negativo
	Vísceras		Espasmos (1/2).	Negativo
7	Músculo	1900	Sin signos de intoxicación (2/2)	Negativo
	Vísceras		Ataxia (1/2), cabeza de lado (1/2), diarrea (1/2), espasmos (1/2), problemas de locomoción (2/2), problemas de respiración (1/2), saltos (1/2).	Concentración subletal
8	Músculo	1900	Sin signos de intoxicación (2/2)	Negativo
	Vísceras		Letargo (1/2).	Negativo
9	Músculo	2000	Cabeza de lado (2/2), desequilibrio (1/2), diarrea (1,2), espasmos (2/2), esterotipias (1/2), hiperactividad (1/2), palidez de cola (1/2), problemas de cuartos traseros (1/2), problemas cuartos delanteros (2/2), problemas de locomoción (1/2), problemas de respiración (1/2), temblor (1/2).	Concentración subletal

		Vísceras		Desequilibrio (2/2), diarrea (2/2), letargo (2/2), problemas de locomoción (2/2), rascado con patas traseras (2/2).	Concentración subletal
10	Músculo		2000	Desequilibrio (2/2), espasmos (1/2), letargo (2/2), parálisis de cuartos traseros (2/2), parálisis de cuartos delanteros (1/2), problemas de locomoción (2/2), rascado con patas traseras (2/2).	Concentración subletal
		Vísceras		Ataxia (2/2), desequilibrio (1/2), convulsiones (1/2), espasmos (2/2), parálisis de cuartos traseros (1/2), problemas de locomoción (2/2), temblor (1/2).	Concentración subletal
11	Músculo		2000	Sin signos de intoxicación (2/2)	Negativo
		Vísceras		Espasmos (1/2), letargo (1/2).	Negativo
12	Músculo		5200	Sin signos de intoxicación (2/2)	Negativo
		Vísceras		Ataxia (1/2), desequilibrio (1/2), diarrea (1/2), espasmos (1/2), letargo (2/2), problemas de locomoción (1/2).	Concentración subletal
13	Músculo		900	Letargo (2/2)	Negativo
		Vísceras		Cabeza de lado (2/2), espasmos (1/2), palides de cola (1/2), parálisis de cuartos traseros (1/2), problemas de locomoción (2/2), problemas de respiración (1/2), temblor (1/2), vasolidatación de las orejas (1/2).	Concentración subletal
Aguas aledañas a	14	Músculo	1900	Problemas durante el proceso de extracción	Perdida

Isla Mujeres. 1 de Jul 16				
	Vísceras		Espasmos (2/2), letargo (2/2), problemas de locomoción (2/2).	Concentración subletal
15	Músculo	2000	Diarrea (1/2), espasmos (2/2), letargo (2/2), pelo erizado (1/2).	Concentración subletal
	Vísceras		Diarrea (1/2), pelo erizado (1/2).	Negativo
16	Músculo	5500	Sin signos de intoxicación (2/2)	Negativo
	Vísceras		Diarrea	Negativo
17	Músculo	6500	Espasmos (1/2), rascado con patas traseras (1/2).	Negativo
	Vísceras		Rascado con patastreras (2/2).	Negativo
18	Músculo	9500	Sin signos de intoxicación (2/2)	Negativo
	Vísceras		Espasmos (1/2), problemas de locomoción (1/2).	Negativo
19	Músculo	10400	Letargo (2/2), problemas de locomoción (2/2).	Negativo
	Vísceras		Ataxia (1/2), cambios en la coloración de los ojos (1/2), espasmos (1/2), problemas de locomoción (2/2), problemas de respiración (2/2).	Concentración subletal

Figura 11. Frecuencia de los signos clínicos observados en los ratones durante el bioensayo.



8.3. Toxicidad por distribución anatómica (músculo y vísceras).

Al analizar la toxicidad en vísceras y músculo, se observó que el 38.9% fueron positivos y el 61.1% negativos, para observar si hubo diferencias significativas se realizó una χ^2 (1, n = 36) = 18.19, $p > 0,05$ (tabla 9), se concluye que no hubo diferencias significativas entre ambas variables estudiadas, resultando ser independientes.

Tabla 9. Tabla de contingencia de las variables tejido y toxicidad.

		TOXICIDAD			
		NEGATIVO	POSITIVO	TOTAL	
TEJIDO	MÚSCULO	Recuento	13	4	17
		% del total	36.1%	11.1%	47.2%
	VÍSCERAS	Recuento	9	10	19
		% del total	25.0%	27.8%	52.8%
	TOTAL	Recuento	22	14	36
		% del total	61.1%	38.9%	100.0%

8.4. Relación entre el peso y la toxicidad en la barracuda según la prueba no paramétrica de Person.

Cabe mencionar que al no contar con muestras letales de la barracuda no se pudo hacer un análisis de correlación entre las variables concentración y peso corporal, para conocer si los peces más pesados son más tóxicos que los ejemplares pequeños.

Para determinar las posibles diferencias de toxicidad entre la talla y la toxicidad se se realizó la prueba chi cuadrada.

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3.197 ^a	1	.074		
Corrección de continuidad	2.090	1	.148		
Razón de verosimilitud	3.277	1	.070		
Prueba exacta de Fisher				.097	.073
N de casos válidos	36				

8.4.1 Talla y la toxicidad en la barracuda.

Al analizar la toxicidad en tallas (7 adultos, 12 juveniles), se observó que el 57.9 % fueron positivos (adultos 21.1%, juveniles 36.8%) y el 42.1% corresponde a los negativos (adultos 15.8%, juveniles 26.3%), para observar si hubo diferencias significativas se realizó una χ^2 (1, n = 19, $p > 0,05$ (tabla 10), se concluye que no hubo diferencias significativas entre ambas variables estudiadas, indicando que no hay diferencias significativas de toxicidad entre tallas.

Tabla 10. Tabla de contingencia de las variables talla y toxicidad.

		TOXICIDAD			
		CON CTX	SIN CTX	TOTAL	
TALLA	ADULTO	Recuento	4	3	7
		% del total	21.1%	15.8%	36.8%
	JUVENIL	Recuento	7	5	12
		% del total	36.8%	26.3%	63.2%
	TOTAL	Recuento	11	8	19
		% del total	57.9%	42.1%	100.0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	.003 ^a	1	.960		
Corrección de continuidad ^b	.000	1	1.000		
Razón de verosimilitud	.003	1	.960		
Prueba exacta de Fisher				1.000	.663
N de casos válidos	19				

9. DISCUSIÓN

De acuerdo con algunos autores, la ciguatera representa una gran amenaza en las áreas tropicales y subtropicales del mundo, siendo el mar Caribe, una de las áreas con mayor incidencia de casos de intoxicación con ciguatera (Tosteson (1996); Núñez -Vázquez *et al.*, 2016. Ver tabla 1). Sin embargo, son pocos los países de esta región que cuentan con investigaciones, siendo el sureste de los EE.UU., Puerto Rico y las Antillas francesas, los países con el mayor número de estudios sobre el tema (Tosteson, 1996; Lehane y Lewis, 2000; Porttier *et al.*, 2001; Dickey y Plakas, 2010) y en menor grado en Cuba, México y recientemente en Colombia (Alcolado *et al.*, 2000; Ley-Martínez *et al.*, 2014; Celis y Mancera, 2015; Ley- Martínez, 2016), sin embargo son muy escasos los estudios y en algunos países nulos de esta zona, principalmente desde el enfoque toxicológico; esto es estudios *ex profeso* para conocer la toxicidad en los peces y en los dinoflagelados, que especies de peces son los de mayor riesgo en su consumo, cual es la distribución anatómica de la toxicidad, si existe una temporalidad, regiones de mayor riesgo, los tipos de CTX en las microalgas y en los peces, estudios de biotransformación en los peces (metabolismo y excreción); así como estudios sobre ecotoxicológicos (agentes naturales y antrópicos que favorecen su incremento e impacto).

Otro aspecto importante que ha sido todavía menos estudiado es el potencial impacto de estas toxinas en el ecosistema, ya que se ha demostrado en condiciones experimentales que estos metabolitos tienen un efecto deletéreo en varias especies de peces (Durant-Clement *et al.*, 1987; Davin *et al.*, 1986; 1988; Capra, 1988; Kohlet *et al.*, 1989; Magnelia *et al.*, 1992; Kelley *et al.*, 1992; Lewis, 1992; Galarza *et al.*, 1993; Kohler y Kohler 1994; González *et al.*, 1994), las cuales pueden estar relacionadas a mortandades de peces de arrecife (Ladsberg, 1995) y crustáceos (Kelley *et al.*, 1992). Recientemente fue demostrada su presencia e impacto en la salud animal de focas monje (*Monachus schauinslandi*) en poblaciones de Hawai que se encuentran en estado crítico (Bottein *et al.*, 2011, en Nuñez-Vazquez, 2014). Otras toxinas marinas de origen béntico de tipo polieter

también se han descrito como potenciales reguladores de poblaciones de peces y otros organismos al tener un efecto negativo (mortalidad, tasa de eclosión, malformaciones) sobre todo en estadios de vida tempranos como embriones, larvas y juveniles de peces y otros organismos (Escoffier *et al.*, 2007; Ajuzie, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2010; Le Du *et al.*, 2016) en los que estos compuestos también pueden estar inmiscuidos.

9.1. Concentración de CTX y el nivel de concentración *Sphyaena barracuda*

La barracuda es una de las principales especies de peces causantes de la ciguatera a nivel mundial (Lehane y Lewis, 2000; Pottier *et al.*, 2001, 2003), especialmente para el Caribe, en donde es conocida como uno de los peces más tóxicos (Bourdeau y Bagnis, 1989; Martínez-Orozco y Cruz-Quintero, 2013).

Después del análisis toxicológico de los 36 extractos de tejidos de vísceras y músculo evaluados en el presente estudio, se pudo corroborar que ambos tejidos estuvieron por debajo de límite de cuantificación (3.6 LD50 o 0.25 - 4 µg/kg de la C-CTX-1) por medio del BR, sin embargo se detectaron 14 (38.9%) muestras positivas, ya que se presentaron signos clínicos de moderados a severos característicos descritos en la literatura especializada que indican la presencia de estos compuestos en concentraciones subletales. Aunque estas concentraciones se encuentran por debajo del límite máximo permisible por la regulación nacional (2.5 UR; 5ng) según la NOM-242-SSA-1) y de la FDA de los EE.UU. (2 UR; 0.1µg) existen otras regulaciones más estrictas como la Europea que solo la presencia de signos clínicos es suficiente para no permitir su comercialización (FAO, 2005).

Adicionalmente también es importante tomar en cuenta el potencial efecto por exposición crónica a CTX, sobre todo cuando el consumo de este tipo de peces es muy continuo. Es probable que la detección solo de bajas concentraciones de CTX en este estudio también esté relacionada a la época de colecta de los presentes ejemplares así como muy probablemente a la zona de colecta de las isla, pues existe un conocimiento popular de que los ejemplares de esta zona son inocuos o muy pocos tóxicos y que las peces más tóxicos se concentran en la parte posterior

(noreste) de la isla (Comun. Pers.). Estos resultados parecen corroborar este conocimiento popular, sin embargo se requieren hacer otros estudios con mayor número de ejemplares, de distintas épocas del año y de diversas zonas de la isla, lo que permitirá corroborar o descartar esta hipótesis. La cual es importante evaluar porque existe la posibilidad de que las barracudas de la parte posterior (noreste) sea otra población y por tanto ser otro el origen de las toxinas en la zona, en este sentido es importante señalar que este especie puede ser residente o presentar migraciones importantes (Tosteson, 1988).

La evaluación de estos compuestos por medio de otros métodos de detección (con un menor límite cuantificación; esto es que detectan concentraciones más bajas de CTX) como lo son los ensayos en líneas celulares como el Neuro 2A, bioquímicos y analíticos (Park, 1994) permitirá no solo conocer su naturaleza química si no su concentración. Actualmente se han desarrollado una variedad de técnicas para detectar y cuantificar a las CTX empleándolas a la par o complementarias con el BR (Lewis y Sellin, 1993), en donde se ha corroborado que en las barracudas procedentes de las regiones endémicas de ciguatera, su toxicidad se le atribuye a una mezcla de congéneres de CTX con características propias, donde la C-CTX-1 resulta ser la más potente en el Caribe y con mayor afinidad a los canales de sodio (Pottier *et al.*, 2003 y Bottein-Dechraoui *et al.*, 2005).

9.2. Distribución anatómica de la toxicidad en la barracuda *S. barracuda*.

De los 36 extractos analizados de barracuda, 14 de ellos presentaron concentraciones subletales (38.9%), 4 correspondieron al músculo y 10 a vísceras, 22 fueron inocuos (61.1%) y ninguno presentó concentraciones letales.

Ley-Martínez *et al.* (2015) y Ley-Martínez (2016) realizaron un estudio semejante al presente trabajo con ejemplares de peces carnívoros de algunas regiones del Caribe Mexicano y aguas adyacentes (Cancún, Puerto Juárez, Puerto Morelos, Isla Mujeres, Isla de Cozumel, en Quinta Roo y San Felipe, Dzilam de Bravo, y Celestum en Yucatán), en el cual se reportó 3 extractos con concentraciones subletales para las muestras provenientes de Isla Mujeres, y a diferencia de este estudio, estos

autores reportaron dosis letales en barracuda obtenidas en Puerto Juárez y Cozumel para los meses de agosto y septiembre del 2013. Puerto Juárez se ubica en la zona continental de Quintana Roo y está a una distancia de 10 km de Isla Mujeres, por lo que los pescadores de ambos lugares tienen zonas de pesca común. Lo anterior significa que las posibilidades de hallar peces tóxicos en Puerto Juárez o Isla Mujeres no dependen de la región geográfica como si lo puede ser para Cozumel. La diferencia más importante entre ese estudio y el presente es la época del año en la que se obtuvieron las muestras. Como ya se mencionó, en este estudio las muestras fueron obtenidas en los meses de mayo y julio, mientras que Ley-Martínez *et al.*, 2015 colectaron durante agosto y septiembre. Otro estudio realizado en barracuda fue el de Villareal *et al.* (2007) en el Golfo de México, quienes analizaron a 20 ejemplares de barracuda muestreados en los meses de mayo a septiembre, de los cuales 18 presentaron “rastros” de niveles de toxicidad y solamente dos con concentraciones de 0.06 y 0.14 ng g⁻¹ equivalentes a C-CTX-1 (para junio y julio), sin embargo, estos investigadores usaron el ensayo estandarizado de citotoxicidad N2A, el cual se ha comprobado que tiene mayor sensibilidad a las ciguatoxinas (Dickey *et al.*, 1999). Los meses con mayor toxicidad, aún son inciertos, según Gaboriau *et al.*, (2014) es posible que las concentraciones de las CTX en los tejidos de los peces dependa de factores ambientales como lo es el aumento de dos o tres grados en la temperatura ambiental aportando como respuesta marcados como cambios en la respiración, en su actividad depredadora en una variedad de peces, la eficiencia de asimilación, la velocidad de depuración y la tasa de crecimiento de los peces. Es posible que todos estos factores y otros más de tipo ecológico, como la capacidad migratoria de las barracudas o puedan estar influenciando la acumulación de las toxinas.

Aunque las muestras extraídas de barracuda durante este estudio mostraron concentraciones bajas para intoxicar a humanos (0.01 ppb, C-CTX-1) la especie sigue siendo un riesgo potencial de intoxicación por ciguatera en Isla Mujeres, sobre todo por ser una comunidad dependiente de la pesca como fuente de obtención de proteínas. Por otro parte, Tosteson (1996) menciona que los meses con mayor frecuencia de encontrar barracudas tóxicas es durante los meses de febrero, marzo,

abril y agosto hasta diciembre en un estudio realizado en Puerto Rico, debido al aumento de temperatura del mar, favoreciendo a las proliferaciones de otros dinoflagelados bénticos como *Ostreopsis* que también pudieran estar involucrados en la producción de toxinas y posterior transferencia a las barracudas.

Los resultados de este reporte muestran que la mayor toxicidad proviene de las vísceras (10/19) concordando con Ley Martínez (2016) (1.67UR) y otro estudio realizado por Barra González, (2016) en barracuda para el Golfo de México (Tuxpan, Veracruz) en donde reportó 7 extractos con dosis letales, 5 de vísceras (1.1 UR, 1.31 UR, 1.52 UR, 1.93 UR y 1.93 UR) y 2 de músculo (1.42 UR y 10 UR). Por lo que se puede concluir que las vísceras presentan un mayor grado de toxicidad que el tejido muscular (Jiang *et al.*, 2012), debido a que incluye el hígado, órgano encargado de llevar a cabo los procesos de depuración de compuestos tóxicos, así como la biotransformación de compuestos como los son las toxinas tipo CTX's (Yasumoto, 1993; Holmes y Lewis, 1994). Esto, lo comprueba Matta *et al.*, (1999) al encontrar una relación significativa de la toxicidad (CTX) con el proceso de peroxidación de lípidos.

En la siguiente tabla 11 se muestran las concentraciones de CTX obtenidas en barracudas de algunas regiones del Caribe y Golfo de México y este estudio.

Especie	Toxicidad por kg de tejido	País	Referencia
<i>S. barracuda</i>	Músculo: 0.53-1.78 UR Cabeza + víscera: 0.25-1.6 UR Hígado: 1.94 UR Vesículabiliar: 2.89 UR	Puerto Rico (sudeste)	Tosteson <i>et al.</i> ,(1988)
<i>S. barracuda</i>	Músculo: 0.14 µg/kg	E.U.A. (Texas)	Villareal <i>et al.</i> ,(2007)
<i>S. barracuda</i>	Hígado: <.93 UR. Músculo: >10 UR	Veracruz (Tuxpan)	Barra-Gonzalez (2016)

<i>S. barracuda</i>	Hígado >1.67UR	México (Q. Roo)	Ley-Martínez (2016)
<i>S. barracuda</i>	Vísceras: <1 UR	Isla Mujeres	Este estudio

9.3. Relación peso y talla con la toxicidad en la barracuda

La barracuda por ser un pez “tope” en la cadena alimentaria (Sylva, 1968; Tosteson, 1988), se cree que su toxicidad está en relacionada con el peso, debido a que mientras más hayan vivido mayor será su peso y por lo tanto habrán estado más expuestos a la acumulación de las toxinas en sus tejidos a través de este proceso. En este estudio, las barracudas capturadas tuvieron tamaño entre 54 y 130 cm de longitud y un peso de 900 a 10,400 g, con una relación entre ambas variables ($r^2=0.93$). A pesar de contar con diferentes pesos, debido a que no se pudo cuantificar la toxicidad, (ya que el método del bioensayo en ratón tiene un límite de detección de >1 UR) no fue posible evaluar esta relación. Sin embargo, al realizar un ejercicio utilizando las tallas que presentaron los tejidos tóxicos (mediante el estadístico de Chi cuadrada) se pudo corroborar que no hay diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) que permitan inferir que la toxicidad está relacionado con el peso. Lo que coincide con algunos estudios como el de Bottein-Dechraoui *et al* (2002), donde la barracuda más toxica tan solo pesaba 2.1 kg, mientras que la más grande (15 kg) no presentó toxicidad. Es posible que para hallar patrones de toxicidad y saber si existen relaciones con el peso de los organismos sea necesario obtener grandes lotes de datos obtenidos con peces muestreados durante todo el año. Otros trabajos recientes que también han descrito que no existe una relación positiva entre el peso vs toxicidad son por ejemplo, el de Villareal *et al.*, (2007) en el que reportaron un espécimen de 5.7 kg con toxicidad letal mientras la barracuda más grande se registró con dosis subletales. Por otra parte, O’Toole *et al.*, (2012) evaluaron 38 organismos de barracuda, encontrando que los peces cercanos a la mediana en cada lote de datos fueron los que presentaron toxicidad, siendo azaroso definir la toxicidad con base al peso de los peces (Gaboriau *et al.*, 2014). Todo lo anterior apunta a la necesidad de datos más precisos sobre la condición fisiológica, estado reproductivo, edad, presencia de los dinoflagelados precursores en la zona, tipo de alimentación (presas) y presencia de CTXs en ambos casos, patrones de migración y otros estudios que permitan tener un mejor conocimiento ecotoxicológico de estos peces en la zona y crecimiento de los individuos analizados. Si bien, estos estudios no aplicaron el

estadístico, permiten ver que la toxicidad no está relacionada con la talla del pez. Rechazando, hasta ahora, parte de la hipótesis planteada, donde se esperaba que hubiera una mayor concentración en tallas grandes que pequeñas como menciona Oshiro *et al.* (2010) quienes examinaron 612 especímenes de 7 especies de peces en Okinawa, Japón donde se observa un aumento paralelo de la toxicidad y el peso corporal. Sin embargo los estudios realizados por estos investigadores no incluyeron a la barracuda.

Que a diferencia de las especies estudiadas en el trabajo de Oshiro *et al.* (2010) la barracuda tiene la capacidad de realizar migraciones, lo cual es una variable más que puede ser importante al tratar de abordar lo que Anderson y Lobel (1987) han considerado como el continuo enigma de la ciguatera.

La acumulación de las toxinas en los peces puede deberse a que estos se encuentran en algunas zonas con una elevada concentración de toxinas (Soliño *et al.*, 2015), o bien debido a los hábitos migratorios de este pez, ya que algunos reportes indican que puede llegar a desplazarse más de 12 km en un solo día e incluso es capaz de migrar más de 100 km (O'Toole *et al.*, 2010).

Las barracudas utilizadas en el presente estudio fueron capturadas a largo en la bahía de la isla, caracterizado por aguas someras con presencia de manchones arrecifes, mientras que de O'Toole *et al.* (2012) capturaron a estos organismos en aguas profundas. Los resultados, (como ya se señaló anteriormente) parecen coincidir con la idea popular de los residentes de la Isla, de que los barracudas de esta zona son muy poco tóxicas o incluso nulas en toxicidad y que las barracudas de la parte Norte de la Isla (en donde existen áreas más profundas) si lo pueden ser, por lo que se sugiere más estudios en esa zona de la isla, para comprobar o rechazar esta hipótesis. Sin embargo, cabe mencionar que los resultados obtenidos en este trabajo están sujetos a las condiciones ambientales y de temporalidad prevalecientes durante el periodo que se realizó este estudio, sin descartar la posibilidad de coleccionar peces con dosis letales en otros meses, ya que tanto los factores naturales como las actividades humanas, y otras de diferente naturaleza tales como la temperatura superficial del océano, presencia de huracanes, blanqueamiento de los corales, construcción de diques, derrame de aguas residuales, etc. favorecen su crecimiento, por cambiar la dinámica de las especies benthicas causando la proliferación de los *Gambierdiscus*. Por lo anterior, prevenir los brotes de la ciguatera implica desarrollar pruebas de rutina para identificar a los peces contaminados. Este estudio sienta las bases para futuras investigaciones con enfoque toxicológico, epidemiológico y ecológico en la

zona norte del estado de Quintana Roo el cual es un problema multifactorial y por lo tanto complejo. A pesar del innegable esfuerzo de varios grupos de investigación en todo el mundo, el nivel de conocimientos—alcanzado en la actualidad no alcanza a resolver el enigma de la ciguatera, frase mencionada desde hace casi 30 años por Anderson y Lobel (1987) al referirse al poco conocimiento sobre los diferentes aspectos en los que se debería avanzar para comprender mejor este fenómeno. Desde entonces se mencionaba la necesidad de conocer las especies causantes, su distribución geográfica, sus características de crecimiento y su producción de toxinas; de igual forma se esperaba avanzar en las capacidades analíticas para la detección y cuantificación de estas toxinas, en varios de estos puntos se tienen importantes avances a nivel internacional (Lehane y Lewis, 2000; Lewis 20001; Friedman *et al.*, 2008; Dickey y Plakas, 2010;), sin embargo en el caso de, México estas investigaciones aún están en proceso. Desde esta perspectiva, el presente trabajo puede constituir la base para un mejor entendimiento de este tópico, su origen e impactos en la salud pública en esta isla del Caribe Mexicano.

10. CONCLUSIONES

- ❖ Se corroboró la presencia de ciguatoxinas en la “gran barracuda” (*S. barracuda*) en la parte sur de la Isla Mujeres-Quintana Roo.
- ❖ De un total de 36 muestras analizadas en este estudio mediante el bioensayo en ratón 14 (38.9%) presentaron concentraciones subletales de CTX y el resto, 22 muestras (61.1%) no presentaron signos de CTX, considerándose estas últimas como negativas o inocuas.
- ❖ Debido a que no se tuvieron muestras que provocaran la mortalidad en el modelo de bioensayo en ratón, no se obtuvo las concentraciones respectivas en los extractos analizados por medio de este método, por lo que no fue posible evaluar la relación entre el peso total de la barracuda y su toxicidad.
- ❖ Con base a la intensidad de la signología por CTX presentada en el modelo en ratón y la agrupación por tallas de la barracuda se pudo comprobar por medio del método estadístico no paramétrico de Chi cuadrada, que no hay una relación entre estos dos parámetros ($p>0.05$), al menos bajo las condiciones de este estudio.
- ❖ Esta es la primera vez que se realiza un estudio toxinológico (de CTX) *ex profeso* y exclusivamente en la especie *Sphyraena barracuda* (“gran barracuda”) en la isla Mujeres, Quinta Roo, localidad en donde se han presentado diversos y continuos casos de intoxicaciones humanas por Ciguatera en el Caribe Mexicano por el consumo de esta especie.
- ❖ Por lo que este trabajo pretende contribuir la base para futuros estudios que permitan tener un mejor entendimiento, manejo y prevención de la ciguatera así como conocer su origen e impactos en la salud pública en esta isla del Caribe Mexicano.

11. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio es recomendable la realización de los siguientes estudios:

1. Aumentar el número de ejemplares analizados de esta especie en esta zona de estudio, así como el análisis toxinológico de ejemplares obtenidos durante varias épocas del año, de ser posible en un ciclo anual o al menos estacional para confirmar si existen variaciones en la toxicidad respecto al tiempo.
2. Evaluar la posible presencia de las CTXs (su distribución anatómica) en otras especies de peces carnívoros, herbívoros y coralívoros en la isla con la finalidad de determinar que especies pueden ser de riesgo en su consumo y que tejidos así como el flujo de estas toxinas en la cadena trófica.
3. Es necesario realizar un estudio de prospección de CTXs en ejemplares de barracuda de la parte norte de la Isla, al igual que la realización de un estudio anual para conocer si hay variaciones de la toxicidad respecto al tiempo.
4. De igual forma es recomendable la confirmación de los perfiles de CTXs por otros métodos complementarios (analíticos y en líneas celulares) presentes en peces capturados en ambos lados de Isla Mujeres, con lo que se podrá conocer con mayor precisión las concentraciones y los tipos de CTXs presentes en ambos sitios, permitiendo conocer sí el origen de estas toxinas es distinto entre una u otra zona de la Isla.

Además de esto es importante considerar la necesidad de implementar un mayor número de estudios y divulgación de la temática que puede auxiliar mejor a la población en general para evitar riesgos en la salud y pérdidas en la economía de los recursos pesqueros de la región.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, R., & Fukuyo, Y. (1979). The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* (Japan). 45, 67–71.
- Ajuzie, C. C. (2008). Toxic *Prorocentrum lima* induces abnormal behavior in juvenile sea bass. *Journal of Applied Phycology* 20 (1) 19-27.
- Arcila-Herrera, H., Mendoza-Ayora, J., González-Franco, M. F., Montero-Cervantes, L., & Castelo-Navarrete, A. (2001). Revisión de una enfermedad poco conocida: la ciguatera. *Rev Biomed*, 12, 27-34.
- Bagnis, R., Kuberski, T., & Laugier, S. (1979). Clinical observations on 3,009 cases of ciguatera (fish poisoning) in the South Pacific. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 28(6), 1067-1073.
- Baron-Campis, S. A., Okolodkov, Y. B., Ríos-Lara, G. V., Vázquez-Gómez, N., Rubio-Sánchez, V., Arce-Rocha, G., Gonzales-López, W. A. y Nuñez-Vazquez, E. J. (2014). Dinoflagelados nocivos y ciguatoxinas en la Costa Norte de Yucatán: un riesgo para el future desarrollo de la maricultura. Memorias en extenso del XXI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar. DGECyTM-SEP Isla de Cozumel, Quintana Roo, México del 8 al 11 de octubre del 2014.
- Barra-Gonzalez, L.A. (2016). Prospección de toxinas tipo ciguatoxinas en *Sphyræna barracuda* y otros peces carnívoros y coralívoros de la zona de Tuxpan Veracruz, México. Tesis de Licenciatura para recibir el título de Biólogo Marino. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Zona Poza Rica. Tuxpan. Veracruz. 133 pp.

- Barton, E. D., Tanner, P., Turchen, S. G., Tunget, C. L., Manoguerra, A., & Clark, R. F. (1995). Ciguatera fish poisoning. A southern California epidemic. *Western journal of medicine*, 163(1), 31.
- Blythe, D. G., Fleming, L. E., Ram Ayyar, D., De Sylva, D., Baden, D., & Schrank, K. (1994). Mannitol therapy for acute and chronic ciguatera fish poisoning. *Memoirs of the Queensland Museum. Brisbane*, 34(3), 465-470.
- Bottein-Dechraoui, M. Y.; Tiedeken, J. A.; Persad, R.; Wang, Z.; Granade, H. R.; Dickey, R. W.; Ramsdell, J. S. (2005). Use of two detection methods to discriminate ciguatoxins from brevetoxins: Application to great barracuda from Florida Keys. *Toxicon*. 46, 261-270.
- Bourdeau, P., & Bagnis, R. (1989). Facteurs de risque ciguaterique aux Antilles dans la region de Saint-Barthelemy, Saint-Martin et Anguilla. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*.
- Carriquiriborde-Harispe, L. (1994). Principales especies de importancia económica en la bahía de Chetumal y zonas adyacentes. En: *E. Suárez-Morales (comp.), Estudio integral de la frontera México-Belice. CIQRO, Chetumal*, 177-196 pp.
- Celis, J. S., Pineda, M., & Ernesto, J. (2015). Análisis histórico de la incidencia de ciguatera en las islas del Caribe durante 31 años: 1980–2010.
- Chinain, M., Darius, H.T., Ung, A., Cruchet, P., Wang, Z., Ponton, D., Laurent, D., Pauillac, S., 2010a. Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon* 56 (5), 739–750.
- Chinain, M., Faust, M. A., & Pauillac, S. (1999). Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov. *Journal of Phycology*, 35(6), 1282-1296.

- De Fouw, J. C., van Egmond, H. P., & Speijers, G. J. A. (2001). Ciguatera fish poisoning: a review. *RIVM Rapport 388802021*.
- De Haro, L., Hayek-Lanthois, M., Joossen, F., Affaton, M. F., & Jouglard, J. (1997). Intoxication collective ciguaterique apres ingestion d'un barracuda au Mexique: deductions pronostique et therapeutique. *Médecine tropicale*, 57(1), 55-58.
- De Sylva, D. P. (1963). Systematics and life history of the great barracuda, *Sphyraena barracuda* (Walbaum). *University of Miami Press, Coral Gables, FL*. 179 pp
- Dickey, R. W., & Plakas, S. M. (2010). Ciguatera: a public health perspective. *Toxicon*, 56(2), 123-136.
- Durand-Clement M., Amade P. and Puiseux-Dao S. (1987) Induction of toxicity in fishes fed with cultures of the ciguateric. Dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. In: Stadler, T., Karamanos, Y., Verdu, M.C., Mollion, J., and Christiaen, D. (Es). 4 th Meeting Soc. Algol. Appl. Villeneuve d'Ascq, France. 19p.
- Escoffier, N., Gaudin, J., Mezhoud, K., Huet, H., Chateau-Joubert, S., Turquet, J., Edery, M. (2007). Toxicity to medaka fish embryo development of okadaic acid and crude extracts of *Prorocentrum* dinoflagellates. *Toxicon* 49 (8): 1182-1192.
- FAO. 2005. Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition paper 80. Organization of the United Nations: Rome, Italy. 278 pp.
- Farstad, D. J., & Chow, T. (2001). A brief case report and review of ciguatera poisoning. *Wilderness & environmental medicine*, 12(4), 263-269.
- Faust, M. A. (1995). Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *Journal of Phycology*, 31(6), 996-1003.

- Feldman, D. B.; Seely, J. C.(1988). Necropsy Guide: Rodents and the Rabbit. *CRC Press*. Florida, U.S.A.
- Fernández, M. L., Richard, D. J., & Cembella, A. (2003). In vivo assays for phycotoxins. *Manual on harmful marine microalgae/ed. by GM Hallegraeff G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. Paris: UNESCO., p. 347-380.(Monographs on Oceanographic Methodology; 11)*.
- Fraga, S., & Rodríguez, F. (2014). Genus *Gambierdiscus* *Gambierdiscus* in the Canary Islands (NE Atlantic Ocean) with description of *Gambierdiscussilva* sp. nov., a new potentially toxic epiphytic benthic dinoflagellate. *Protist*, 165(6), 839-853.
- Fraga, S., Rodríguez, F., Caillaud, A., Diogène, J., Raho, N., & Zapata, M. (2011). *Gambierdiscus excentricus* sp. nov. (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae*, 11, 10-22.
- Fraga, S., Rodríguez, F., Riobó, P., & Bravo, I. (2016). *Gambierdiscus balechii* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic dinoflagellate from the Celebes Sea (SW Pacific Ocean). *Harmful Algae*, 58, 93-105.
- Friedman, M.A., Fleming, L.E., Fernandez, M., Bienfang, P., Schrank, K., Dickey, R., Bottein, M.-Y., Backer, L., Ayyar, R., Weisman, R., Watkins, S., Granade, R., Reich, A., (2008). Ciguatera fish poisoning: treatment, prevention and management. *Marine drugs*, 6(3), 456-479.
- Gaboriau, M., Ponton, D., Darius, H. T., & Chinain, M. (2014). Ciguatera fish toxicity in French Polynesia: Size does not always matter. *Toxicon*, 84, 41-50.
- Gamboa, P. M., Park, D. L., & Fremy, J. M. (1992). Extraction and purification of toxic fractions from barracuda (*Sphyraena barracuda*) implicated in ciguatera poisoning. In *Proceedings of the Third International Conference on Ciguatera*, TR Tosteson, ed. Polyscience Publications, Laval, Quebec, 13-24pp.

- Geller, R. J., Olson, K. R., & Senécal, P. E. (1991). Ciguatera fish poisoning in San Francisco, California, caused by imported barracuda. *Western journal of medicine*, 155(6), 639.
- Hamilton, B., Hurbungs, M., Vernoux, J. P., Jones, A., & Lewis, R. J. (2002). Isolation and characterisation of Indian Ocean ciguatoxin. *Toxicon*, 40(6), 685-693.
- Hedrich, H., & Bullock, G. (2004). The Laboratory mouse: Handbook of experimental animals. *London: Elsevier Limited.*. 600 pp.
- Holmes, M. J. (1998). *Gambierdiscus yasumotoi* sp. nov. (Dinophyceae), a toxic benthic dinoflagellate from southeastern Asia. *Journal of Phycology*. 34(4), 661-668.
- Holmes, M. J., & Lewis, R. J. (1994). The origin of ciguatera. *Memoirs of the Queensland Museum. Brisbane*, 34(3), 497-504.
- Jiang, X-W.; Li, X.; Lam, P. K. S.; Cheng, S. H.; Schlenk, D.; Sadovy de Mitcheson, Y.; Li, Y.; Gu, J-D.; Chan, L. L. (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.
- Kelley, A. M., C. C. Kohler, and D. R. Tindall. 1992. Are crustaceans linked to the ciguatera food chain. *Environmental Biology of Fishes* 33: 275–286.
- Kohler S.T.; Kohler, C. 1992. Dead blanched coral provide new surfaces for dinoflagellates implicated in ciguatera fish poisonings. *Environmental Biology of Fishes*. 35: 413-416.
- Kibler, S. R., Litaker, R. W., Holland, W. C., Vandersea, M. W., & Tester, P. A. (2012). Growth of eight *Gambierdiscus* (Dinophyceae) species: Effects of temperature, salinity and irradiance. *Harmful Algae*, 19, 1-14.
- Landsberg, J. H. (2002). The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science*, 10(2), 113-390.

- Landsberg, J. H. 1995. Tropical reef-fish disease outbreaks and mass mortalities in Florida, U.S.A.: what is the role of dietary biological toxins. *Diseases of Aquatic Organisms* **22**: 83–100.
- Le Du, J., Tovar-Ramírez, D., and Nuñez-Vazquez, E. J. (2017). Effect of an okadaic acid exposure on the embryonic development of *Seriolarivolina*. *Aquaculture review* (sometido).
- Legrand, A. M. (1998). Ciguatera toxins: origin, transfer through the food chain and toxicity to humans. In. B. Reguera, J. Blanco, L. Fernandez, and T. Wyatt (eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, Spain. 39-43 pp.
- Lehane, L. (1999). Ciguatera fish poisoning: a review in a risk-assessment framework. National Office of Animal and Plant Health. *Agriculture, Fisheries and Forestry. Canberra, Australia*.
- Lehane, L., y Lewis, R. J. (2000). Ciguatera: recent advances but the risk remains. *International Journal of Food Microbiology*, 61(2), 91-125.
- Lewis, N. D. (1986). Disease and development: ciguatera fish poisoning. *Social Science & Medicine*, 23(10), 983-993.
- Lewis, R. J. (1995). Detection of ciguatoxins and related benthic dinoflagellate toxins: in vivo and in vitro methods. *Manual on Harmful Marine Microalgae*, 923, 135-161. Lewis, R. J. (2001). The changing face of ciguatera. *Toxicon*, 39(1), 97-106.
- Lewis, R. J., & Endean, R. (1984). Ciguatoxin from the flesh and viscera of the barracuda, *Sphyraenajello*. *Toxicon*, 22(5), 805-810.

Lewis, R. J., & Holmes, M. J. (1993). Origin and transfer of toxins involved in ciguatera. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 106(3), 615-628.

Lewis, R. J., Sellin, M., Poli, M. A., Norton, R. S., MacLeod, J. K., & Sheil, M. M. (1991). Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). *Toxicon*, 29(9), 1115-1127.

Lewis, R. J., Vernoux, J. P., & Brereton, I. M. (1998). Structure of Caribbean ciguatoxin isolated from *Caranx latus*. *Journal of the American Chemical Society*, 120(24), 5914-5920.

Lewis, R. L. (2003). Detection of toxins associated with ciguatera fish poisoning. In: Hallegraef, G. M., Anderson, D. M., Cembella, A. (Eds). Manual on Harmful Marine Microalgae. *IOCUNESCO*. 267-278 pp.

Lewis, R.J., Sellin, M., 1993. Recovery of ciguatoxin from fish flesh. *Toxicon* 31 (10), 1333–1336.

Ley-Martínez, T. (2016). Bioprospección de toxinas tipo ciguatoxinas en peces carnívoros del Caribe Mexicano y Aguas Adyacentes. Tesis de Licenciatura para recibir el título de Biólogo Marino. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 77 pp.

Ley-Martínez, T., Núñez-Vázquez, E. J., Almazán-Becerril, A., Baron-Campis, S., Ramírez-Camarena, C., Caballero-Vázquez, J. A. y Balart, F. E. (2014). Bioprospección de toxinas tipo ciguatoxinas en peces carnívoros del caribe Mexicano y Aguas adyacentes. Memorias en extenso del XXI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología del Mar. DGECyTM-SEP Isla de Cozumel, Quintana Roo, México del 8 al 11 de octubre del 2014.

Litaker, R. W., Vandersea, M. W., Faust, M. A., Kibler, S. R., Chinain, M., Holmes, M. J., ... & Tester, P. A. (2009). Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus* *Gambierdiscus caribaeus*,

Gambierdiscus carolinianus, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia*, 48(5), 344-390.

Magnelia, S. J. , C. C. Kohler , and D. R. Tindall . 1992. Acanthurids do not avoid consuming cultured toxic dinoflagellates yet do not become ciguatoxic. *Transactions of the American Fisheries Society* 121: 737–745.

Martinez-Orozco, M. J., & Cruz-Quintero, Á. (2013). Revisión y guía para diagnóstico y tratamiento de ciguatera. *Revista Ciencias Biomédicas*, 4(1). 174-185 pp.

Matta, J., Milad, M., Manger, R., & Tosteson, T. (1999). Heavy metals, lipid peroxidation, and ciguatera toxicity in the liver of the Caribbean barracuda (*Sphyraena barracuda*). *Biological trace element research*, 70(1), 69-79.

Maya Entenza, C. M., Martín Labrador, M., & Monteagudo Torres, M. (2007). Intoxicación por ciguatera: Estudio de 227 pacientes durante el periodo 1999 al 2005. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 45(2), 0-0.

Murata, M., Legrand, A. M., Ishibashi, Y., Fukui, M., & Yasumoto, T. (1990). Structures and configurations of ciguatoxin from the moray eel *Gymnothorax javanicus* and its likely precursor from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Journal of the American Chemical Society*, 112(11), 4380-4386.

Nicholson, G. M., & Lewis, R. J. (2006). Ciguatoxins: Cyclic polyether modulators of voltage-gated ion channel function. *Marine Drugs*, 4(3), 82-118.

Nishimura, T., Sato, S., Tawong, W., Sakanari, H., Yamaguchi, H., & Adachi, M. (2014). Morphology of *Gambierdiscus cabrosus* sp. nov. (Gonyaulacales): a new epiphytic toxic dinoflagellate from coastal areas of Japan. *Journal of phycology*, 50(3), 506-514.

NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

Nuñez-Vazquez, E. J. (2005). Biotoxinas Marinas en peces comestibles de Baja California Sur, México. Área Interdisciplinaria de Ciencias del Mar, Depto. de Biología Marina. *Universidad Autónoma de Baja California Sur*, México, 78 pp.

Nuñez-Vazquez, E. J. (2014). La Ciguatera en México. Informar Nueva época DG CYTM-SEP. Pp: 7-8. (http://www.dgcytm.sep.gob/es/dgcytm/Revista_Informar).

Nuñez-Vazquez, E. J., Almazán-Becerril, A., Heredia-Tapia, A., Hernández-Becerril, D. U., Troccoli-Ghinaglia, L., Arredondo-Vega, B. O., Vázquez-Castellanos, J. A. y Ochoa, J. L. (2000). Incidencia del envenenamiento por Ciguatera en México. En: Resúmenes de la 4ª Reunión de expertos en envenenamientos por animales ponzoñosos. Inst. de Biotecnología de la UNAM, Inst. Bioclon, Lab. Silanes. 30-31 de marzo, Cuernavaca, Morelos, México.

Nuñez-Vazquez, E. J., Bustillos-Guzmán, J., López-Cortés, D. J., Heredia-Tapia, A., Band-Schmidt, C. J., Hernández-Sandoval, F. E., Gárate-Lizárraga, I., Salinas-Zavala, C. A., Cordero-Tapia, A., Almazán-Becerril, A. (2016). *Marine Drugs (en revisión)*.

Nuñez-Vazquez, E. J., Ochoa, J. L., Band-Schmidt, C. J., Gárate-Lizárraga, I., Heredia-Tapia, A., López-Cortés, D. J., Hernández-Sandoval, F. E., Bustillos-Guzmán, J. (2008). Ciguatera in Mexico. In: Abstracts of the 13th International Conference on Harmful Algae: Hong Kong, China, 3-7 November 2008; p. 98.

Okolodko V, Y. B., Merino-Virgilio, F. D. C., Herrera-Silveira, J. A., Espinosa-Matías, S., & Parsons, M. L. (2009). *Gambierdiscus toxicus* in the southeastern Gulf of Mexico. *Harmful Algae News*, (40), 12-14.

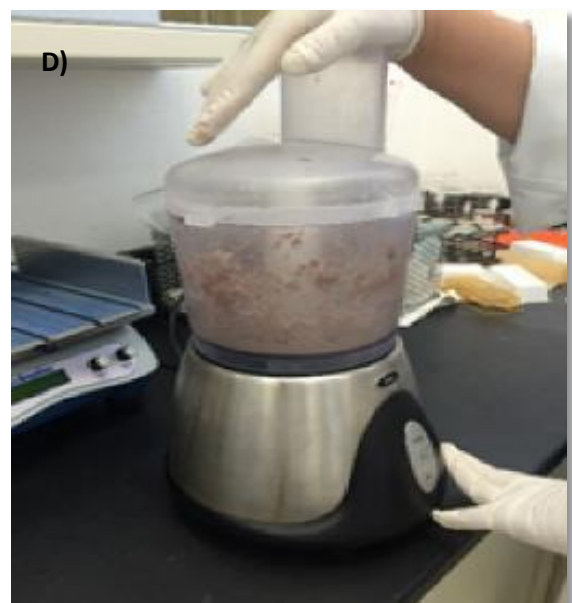
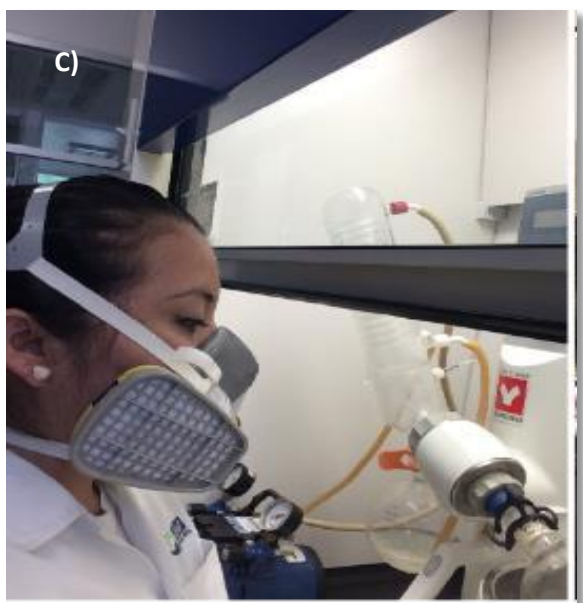
- Olsen, D. A., Nellis, D. W., & Wood, R. S. (1984). Ciguatera in the eastern Caribbean. *Mar. Fish. Rev*, 46(1), 13-18.
- Oshiro, N., Yogi, K., Asato, S., Sasaki, T., Tamanaha, K., HIRAMA, M., & Inafuku, Y. (2010). Ciguatera incidence and fish toxicity in Okinawa, Japan. *Toxicon*, 56(5), 656-661.
- O'Toole, A. C., Bottein, M. Y. D., Danylchuk, A. J., Ramsdell, J. S., & Cooke, S. J. (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, 98-105.
- O'Toole, A. C., Danylchuk, A. J., Suski, C. D., & Cooke, S. J. (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: Journal du Conseil*.
- O'Toole, A. C., Danylchuk, A. J., Suski, C. D., & Cooke, S. J. (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: Journal du Conseil*, fsq090, 67,1667–1675.
- PDU. 2009. Programa de Desarrollo Urbano Zona Insular del municipio Isla Mujeres, Quintana Roo.
- Pottier, I., Hamilton, B., Jones, A., Lewis, R. J., & Vernoux, J. P. (2003). Identification of slow and fast-acting toxins in a highly ciguatoxic barracuda (*Sphyraena barracuda*) by HPLC/MS and radiolabelled ligand binding. *Toxicon*, 42(6), 663-672.

- Pottier, I., Vernoux, J. P., & Lewis, R. J. (2001). Ciguatera fish poisoning in the Caribbean islands and Western Atlantic. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 99-141). Springer New York.
- Satake, M., Murata, M., & Yasumoto, T. (1993). Gambierol: a new toxic polyether compound isolated from the marine dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Journal of the American Chemical Society*, 115(1), 361-362.
- Senthilkumaran, S., Balamurgan, N., Suresh, P., & Thirumalaikolundusubramanian, P. (2010). Painful ejaculation. Something fishy. *Saudi medical journal*, 31(4), 451-452.
- Soliño, L., Widgy, S., Pautonnier, A., Turquet, J., Loeffler, C. R., Quintana, H. A. F., & Diogène, J. (2015). Prevalence of ciguatoxins in lionfish (*Pterois* spp.) from Guadeloupe, Saint Martin, and Saint Barthélemy Islands (Caribbean). *Toxicon* 102, 62-68.
- 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.
- Tosteson, T. R., Ballantine, D. L., & Durst, H. D. (1988). Seasonal frequency of ciguatoxic barracuda in southwest Puerto Rico. *Toxicon*, 26(9), 795-801.
- U.S. 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. 476 pp.
- Vasconcelos, V., Acevedo, J., Silva, M., and Ramos, V. (2010). Effects of marine toxins on the reproduction and early stages development of aquatic organisms. *Marine Drugs* 8 (1): 59-79.

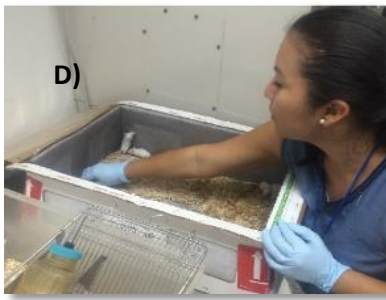
- Vernoux, J. P., & Talha, F. (1989). Fractionation and purification of some muscular and visceral ciguatoxins extracted from Caribbean fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 94(3), 499-504.
- Vetter, I., Touska, F., Hess, A., Hinsbey, R., Sattler, S., Lampert, A., ...& Engel, M. (2012). Ciguatoxins activate specific cold pain pathways to elicit burning pain from cooling. *The EMBO journal*, 31(19), 3795-3808.
- Villareal, T. A., Hanson, S., Qualia, S., Jester, E. L. E., Granade, H. R., & Dickey, R. W. (2007). Petroleum production platforms as sites for the expansion of ciguatera in the northwestern Gulf of Mexico. *Harmful Algae*, 6(2), 253-259.
- Yasumoto, T., & Satake, M. (1996). Chemistry, etiology and determination methods of ciguatera toxins. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 15(2), 91-107.
- Yasumoto, T.; Nakajima, I.; Bagnis, R.; Adachi, R. 1977. Finding a dinoflagellate as a likely culprit of ciguatera. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 43,1021-1026.

13. ANEXOS

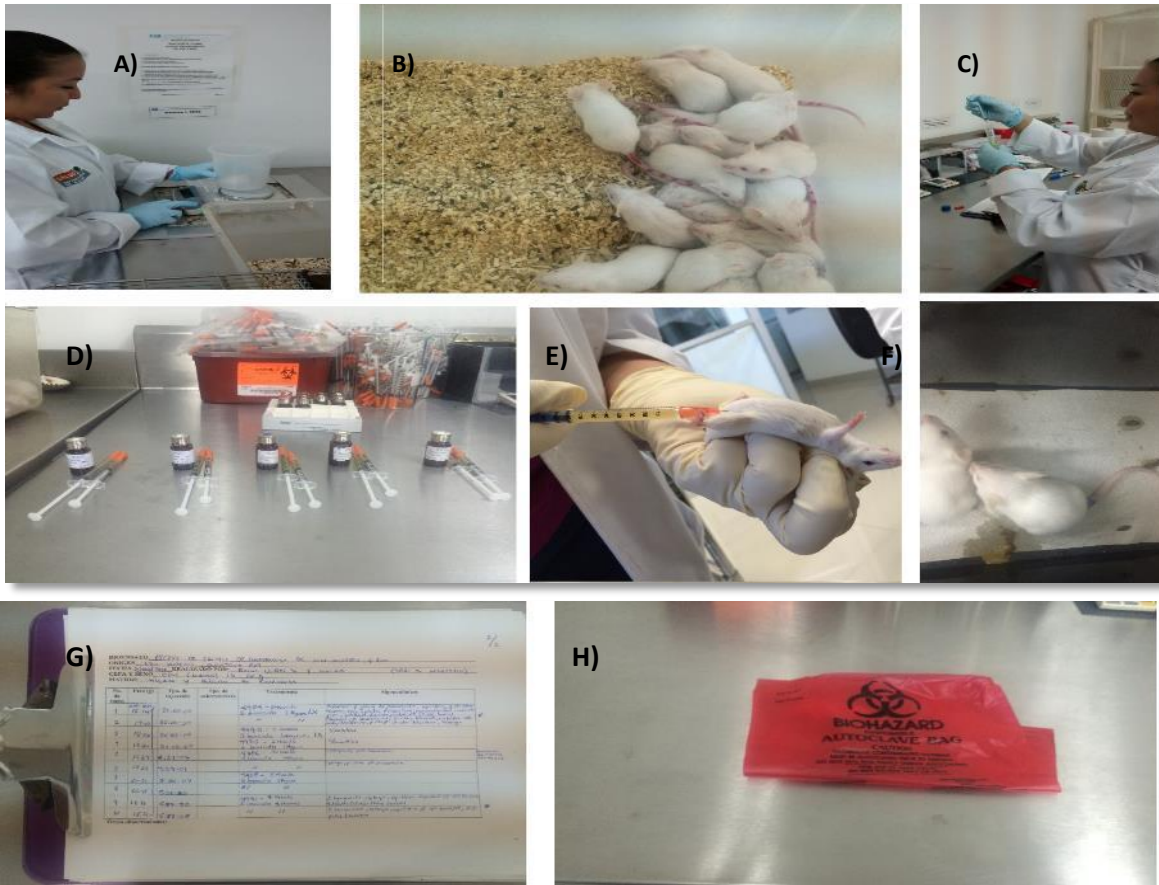
ANEXO 1. Equipos utilizados para la extracción. A y B: rotoevaporadores y bomba de vacío empleadas para la evaporación de los extractos. C y D: proceso de evaporación de los solventes utilizando equipo de protección personal y licuadora para homogeneizar los tejidos de barracuda



ANEXO 2. Recepción de los ratones en el CIBNOR y verificación de las condiciones de los ratones. A) se observa el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste donde se realizó los análisis toxicológicos por medio del BR. B, C y D) la recepción de los ratones en cajas hermeticas de transporte con suministro de agua en forma de hidrogel para hidratar a los ratones. E) Verificación del peso de los ratones para su posterior análisis toxicológico. F) Jaulas de mantenimiento con alimento, lecho estéril y biberones con agua acidificada estéril. G) Anaqueles controlados para el bioensayo en ratón, colocando las jaulas de mantenimiento para su aclimatación.



ANEXO 3. Bioensayo en ratón. A, B, C y D) Pesaje, marcaje, y la preparación de las jeringas por cada extracto. E) La inyección intraperitoneal en el ratón. F) una imagen de un ratón con diarrea como respuesta a la presencia de la CTX. G) Formato de registro para los signos clínicos. H) Disposición final del ratón al terminar el bioensayo.



ANEXO 4. Se denotan las generalidades de la cepa CD-1 o ICR, de ratón suizo blanco; utilizado en diversos estudios en la rama de toxicología y ciencias médicas, en nuestro caso la evaluación de toxinas marinas (CTX's) conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM242-SSA-1



CERTIFICADO DE CALIDAD

En cumplimiento de la normatividad vigente, por este conducto certifico que los animales amparados por la **Factura E929** de Envigo RMS, SA de CV., con número de expediente 7759 en la notificación de aviso de funcionamiento, se encontraron sanos, libres de enfermedades infectocontagiosas y de ectoparásitos.

Estos animales fueron producidos y mantenidos en el "Centro UNAM-Envigo de Producción de Animales de Laboratorio", un sistema de barrera que brinda las condiciones técnica y científicamente óptimas, para la crianza de animales de laboratorio con un perfil microbiológico definido.

El estado de salud de todos los animales y la autenticidad genética de las cepas endogámicas producidas en la Barrera Envigo No. 650 de la Ciudad de México (Centro UNAM-Envigo), se evalúan periódicamente y los resultados se publican trimestralmente en www.envigo.com (se adjunta certificado de Salud). Además, a solicitud del cliente, se anexan al presente certificado, el cual se expide en la Ciudad de México a **23 días del mes de Agosto de 2016.**

Especie	Cantidad	Cepa	Edad/Peso	Sexo
Ratón	100	Hsd: ICR	16-18 g	Machos

Marisol Rivera Huerta
Médico Veterinario Zootecnista
Cédula Profesional No. 3183986
Médico Veterinario Responsable

Health Monitoring Report

Latest Monthly Update: 29 July 2016



Location: Mexico City, Mexico	Barrier: 650		Species: Mouse		
VIRUSES	Strep. Positiv	Strep. Positiv	Test Frequency		
	Test Date	Positive	Test Method		
Ectromelia Virus	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	MPI
Hantaan Virus	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	MPI
K Virus	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	MPI
Lactic Dehydrogenase Elevating Virus (LDEV)	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	PCR
Lymphocyte Choriomeningitis Virus (LCM)	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	MPI
Mouse Virus of Mice (MVM)	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	MPI
Mouse Adenovirus type 1 (FL)(MAD-1)	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	MPI
Mouse Adenovirus type 2 (K87)(MAD-2)	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	MPI
Mouse Cytomegalovirus (MCMV)	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	MPI
Mouse Hepatitis Virus (MHV)	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	MPI
Mouse Parvovirus (MPV)	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	MPI
Mouse Polyoma Virus	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	MPI
Mouse Rotavirus (EDM)	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	MPI
Mouse Thymic Virus (MTV)	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	IFA
Mouse Neurovirus (MNV)	25-May-16	0 / 24	0 / 125	Quarterly	MPI
Pharosoma Virus of Mice (PVM)	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	MPI
Respiratory Enteric Virus II (REO 2)	25-May-16	0 / 24	0 / 125	Quarterly	MPI
Sarshi Virus	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	MPI
Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV, G07)	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	MPI
BACTERIA - Mycobacterium spp. Group					
Bordetella bronchiseptica	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	Culture
Campylobacter	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	MPI
Citrobacter rodentium	25-May-16	0 / 24	0 / 125	Quarterly	Culture
Clostridium piliforme	25-May-16	0 / 24	0 / 125	Quarterly	MPI
Corynebacterium kutscheri	25-May-16	0 / 24	0 / 125	Quarterly	Culture
Dermatophytes	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	Culture
Helicobacter spp.	25-May-16	0 / 36	0 / 137	Quarterly	PCR
Helicobacter hepaticus	25-May-16	0 / 36	0 / 137	Quarterly	PCR
Helicobacter spp.	25-May-16	0 / 36	0 / 137	Quarterly	PCR
Klebsiella oxytoca	25-May-16	0 / 24	3 / 125	Quarterly	Culture
Klebsiella pneumoniae	25-May-16	0 / 24	0 / 125	Quarterly	Culture
Mycoplasma pulmonis	25-May-16	0 / 24	0 / 125	Quarterly	MPI
Pasteurella multocida	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	Culture
Pasteurella pneumotropica	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	Culture
Pneumocystis muris	25-May-16	0 / 18	0 / 107	Quarterly	PCR
Pseudomonas aeruginosa	25-May-16	0 / 24	0 / 125	Quarterly	Culture
Salmonella spp.	25-May-16	0 / 24	0 / 125	Quarterly	Culture
Staphylococcus aureus	25-May-16	3 / 24	15 / 125	Quarterly	Culture
Streptococcus mordax	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	PCR
Streptococcus pneumoniae	25-May-16	0 / 24	0 / 125	Quarterly	Culture
Streptococcus spp. Group B beta	25-May-16	0 / 24	0 / 125	Quarterly	Culture
PARASITES					
Ectoparasites	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	Microscopy
Endoparasites	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	Microscopy
Enteric Protozoan	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	Microscopy
Encephalitozoon cuniculi	25-May-16	0 / 6	0 / 18	Semi-Annually	MPI
ANTHROPALIC PARASITES					
Crass Echin	25-May-16	0 / 36	0 / 215	Monthly	Pathology

Testing Laboratory: IDEXX BioResearch
 Report Released: 29 July 2016
 Date Barrier Populated: 2011
 Species Within Barrier: Mouse, Rat

Inbred
 C57BL/6J

Outbred
 PWD/CRJ (CD-1)[®]

Inbred
 BALB/cJ (Hsd)
 C57BL/6J

Report Notes:
 0 Data are expressed as number animals positive/number tested.
 0 Testing intervals are reported per route; however, barriers with multiple rooms have more frequent testing intervals.
 0 Historical results include 18 months of cumulative data.

William Parter, D.V.M.

William Parter, DVM, DACLAM
 Director, Laboratory Animal Medicine - North America

Envigo + 8520 Allison Pointe Boulevard + Suite 400 + Indianapolis, IN 46250 + envigo.com