

CIGUATERA, DE ENFERMEDAD EXÓTICA A ENDÉMICA EN CANARIAS

Dr. Félix Acosta Arbelo
Profesor Titular de Universidad, Área de Sanidad Animal
Responsable de la Unidad de Sanidad Animal en Acuicultura
Instituto Universitario de Investigación en Acuicultura Sostenible y Ecosistemas Marinos (IU-
***ECOAQUA*)**
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

RESUMEN

La ciguatera, es una enfermedad transmitida por los alimentos, y es causada por comer pescado de arrecife cuya carne está contaminada con ciertas toxinas. Es la enfermedad causada por toxinas no bacterianas más frecuentemente reportada en el mundo. Provoca impactos sustanciales en la salud humana, social y económica. El origen de esta intoxicación lo encontramos en dinoflagelados bentónicos de los géneros *Gambierdiscus* y *Fukuyoa* que producen ciguatoxinas (CTX) solubles en lípidos. Son moléculas relativamente termoestables que permanecen tóxicas después de enfrentarlas a la congelación o al cocinado y exponerse a condiciones ácidas y básicas suaves, se bioacumulan en la cadena trófica cuando los peces herbívoros consumen dinoflagelados tóxicos adheridos a superficies, por ejemplo, macroalgas, que luego son depredados por peces carnívoros. Desde 2004, se detectan focos de ciguatera en el archipiélago de Canario, los estudios realizados en especies comerciales (obtenidas de la pesca profesional y recreativa) han servido para determinar la presencia de ciguatoxina y los resultados muestran que cada vez encontramos más especies portadoras de toxinas y con tamaño más pequeño, además de encontrar poblaciones de dinoflagelados residentes en nuestras costas, por lo que concluimos que el cambio climático que provoca calentamiento del agua ha ayudado al asentamiento de estos microorganismos y a que la enfermedad que antes aparecía de manera esporádica ahora esté de manera permanente aunque controlada por los programas de vigilancia establecidos, pero con el riesgo aún sin resolver en el caso del autoconsumo de pescado muy extendido en Canarias.

LA ENFERMEDAD

La ciguatera, es una enfermedad transmitida a través de los alimentos, y es causada por comer pescado de arrecife cuya carne está contaminada con ciertas toxinas. Es la enfermedad causada por toxinas no bacterianas más frecuentemente reportada en el mundo. Provoca impactos sustanciales en la salud humana, social y económica (Friedman *et al.*, 2017).

Haciendo un poco de historia nos encontramos con referencias sobre el pescado tóxico; por ejemplo se hace mención en la Odisea de Homero (800 A.C.). En el año 600 antes de Jesucristo fue descrita esta epidemia de ciguatoxina en la China; y en la época de Alejandro el Grande (356-323 A.C.) se les prohibió a los soldados ingerir pescado para evitar indisposiciones y enfermedades durante las conquistas. En el 1555 fue reportada por Peter Martyr en las Indias Occidentales (Ricourt, 2000).

En el 1774 fue reportada la primera descripción detallada de esta enfermedad por el Capitán de navío James Cook en el Pacífico Sur (Cook, 1777), mientras navegaban frente a la costa de Vanuatu, varios miembros de su tripulación se enfermaron después de comer pescados recién capturados, que parecían ser el *Sparus pagrus* o *Sparus erithrynus* (pargo o besugo). Cook, Forster (naturalista) y Anderson (el cirujano del barco) registraron los síntomas de la tripulación afectada, detallando alteración gastrointestinal y algunos signos neurológicos y cardiovasculares, clásicos síntomas de intoxicación por ciguatera (Achaibar *et al.*, 2007).

El nombre de Ciguatera proviene del siglo XVIII, el término se lo asignó Antonio Parra en 1787 en Cuba para describir la enfermedad relacionada con la ingestión de la carne de una especie de caracol, el Turbo-pica, cuyo nombre común es Cigua.

El impacto general es difícil de cuantificar ya que se estima que apenas el 10% de los casos se reportan a servicios de salud en zonas endémicas (Juranovic y Park, 1991). En total, ciento ocho países se ven afectados por este fenómeno, que representa alrededor de 850 millones de personas que viven en torno a 100 km de un arrecife y se benefician directa o indirectamente de sus recursos; entre ellos, 275 millones de personas viven a menos de 30 km del arrecife y están particularmente expuestos.

El origen de esta intoxicación lo encontramos en dinoflagelados bentónicos de los generos Gambierdiscus y Fukuyoa que producen ciguatoxinas (CTX) solubles en lípidos y maitotoxinas (MTX) solubles en agua (las maitotoxinas no tienen un papel comprobado en la ciguatera) (Chinain *et al.*, 2010; Lewis *et al.*, 2016). El género Gambierdiscus fue establecido por primera vez por Adachi y Fukuyo (1979) con *G. Tóxicus* como la especie tipo. Fue un género monoespecífico durante una década; sin embargo, otra especie, , fue identificada como *G. belizeanus* siendo la segunda especie (Faust, 1995). Posteriormente, se han descrito más de 10 especies (Chinain *et al.*, 1999; Litaker *et al.*, 2009; Fraga *et al.*, 2011). Con base en análisis moleculares, las especies que tienen formas globulares fueron expulsadas del género Gambierdiscus y transferidas al género recientemente establecido, Fukuyoa (Gómez *et al.*, 2015). Gambierdiscus actualmente comprende 20 especies que tienen una morfología comprimida antero posteriormente (Guiry y Guiry, 2018). Estos dinoflagelados han sido caracterizados por su toxicidad, de esta forma tenemos desde los menos tóxicos como es *G. australes* a los más tóxicos como *G. exentricus* (Figura 1) (Pisapia *et al.*, 2017).

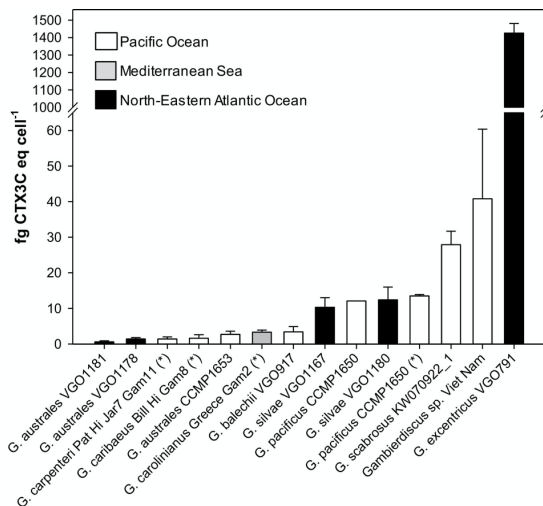


Figura 1.- Dinoflagelados caracterizados por su toxicidad, Fuente: Pisapia *et al.*, 2017.

Estos dinoflagelados producen toxinas, las ciguatoxinas son compuestos de poliéter solubles en lípidos que constan de 13 a 14 anillos fusionados por enlaces de éter en una estructura en forma de escalera muy rígida (Figura 2).

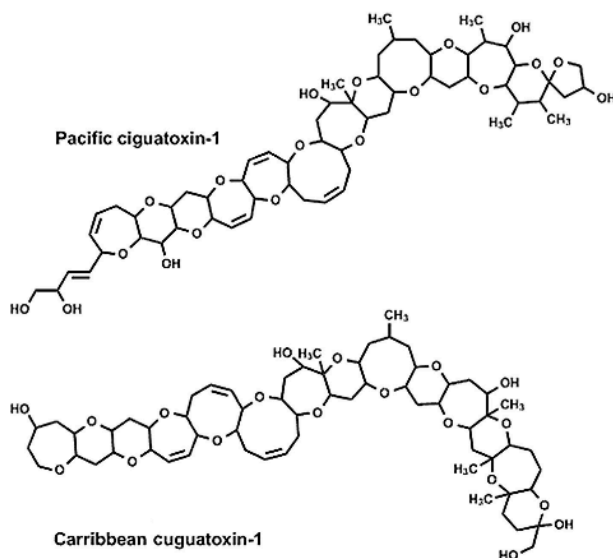


Figura 2.- Estructura de la molécula de ciguatoxina del Pacífico y del Caribe, Fuente: Mandell *et al* 2015

Son moléculas relativamente termoestables que permanecen tóxicas después de enfrentarlas a la congelación o al cocinado y exponerse a condiciones ácidas y básicas suaves. Las ciguatoxinas surgen de la biotransformación en los peces de las gambiertoxinas precursoras (Lehane y Lewis, 2000; Lehane, 2000).

En áreas del Pacífico, la ciguatoxina principal y más potente es la ciguatoxina 1 del Pacífico (P-CTX-1, peso molecular 1112). Su probable precursor es la gambiertoxina-4B (GTX-4B). Las principales ciguatoxinas del Pacífico, P-CTX-1, P-CTX-2 y P-CTX-3, están presentes en los peces en diferentes cantidades relativas (Lehane y Lewis, 2000; Lehane, 2000). Se aclararon las estructuras de más de 20 congéneres de esta ciguatoxina

siendo la toxina de referencia la P-CTX 1 con valores de patogenicidad para el humano por encima de 0,01 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de pescado. Las ciguatoxinas del Caribe (y del Océano Índico) difieren de las ciguatoxinas del Pacífico. Caribbean CTX-1 (C-CTX-1) es menos polar que P-CTX-1. Las estructuras de dos ciguatoxinas del Caribe (C-CTX-1 y C-CTX-2) se aclararon en 1998. Se describieron múltiples formas de ciguatoxina con diferencias moleculares y patogenicidad menores. CTX-1 es la principal toxina que se encuentra en los peces carnívoros y representa un riesgo para la salud humana a niveles superiores a 0,1 $\mu\text{g} / \text{kg}$ de pescado (de Fouw *et al.*, 2001).

Los CTX son toxinas extremadamente potentes con una LD₅₀ en ratones (ip) equivalente a 0,25, 2,3 y 0,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -1 para P-CTX-1, P-CTX-2 y P-CTX-3, respectivamente, lo que conduce a la observación de que el grado de oxidación se correlaciona positivamente con la potencia (Lewis *et al.*, 1991). Existen también CTXs del Índico (I-CTX) con diferentes isotipos (Figura 3).

Name	Alternative name	Molecular ion [M + H] ⁺	Source
Pacific ciguatoxins			
P-CTX-1	CTX1B	1111.6	Carnivorous fish
P-CTX-2	CTX2A2; 52-epi-54-deoxyCTX	1095.5	Carnivorous fish
P-CTX-3	CTX2B2; 54-deoxyCTX	1095.5	Carnivorous fish
49-epi-CTX-3C	CTX-3B	1023.6	<i>G. toxicus</i>
M-seco-CTX-3C		1041.6	<i>G. toxicus</i>
CTX-3C		1023.6	<i>G. toxicus</i>
2,3-dihydroxyCTX-3C	CTX-2A1	1057.6	Carnivorous fish/ <i>G. toxicus</i>
51-hydroxyCTX-3C	CTX-2C1	1039.5	Carnivorous fish
CTX-4B	GT-4B	1061.6	<i>G. toxicus</i> Herbivorous fish
52-epi-ciguatoxin-4B	CTX-4A; GT-4A	1061.6	<i>G. toxicus</i>
Caribbean ciguatoxins			
C-CTX-1		1141.6	Carnivorous fish
C-CTX-2	56-epi-C-CTX-1	1141.6	Carnivorous fish
C-CTX-1127		1127.6	Carnivorous fish
C-CTX-1143		1143.6	Carnivorous fish
C-CTX-1157		1157.6	Carnivorous fish
C-CTX-1159		1159.6	Carnivorous fish
Indian ciguatoxins			
I-CTX-1		1141.6	Carnivorous fish
I-CTX-2		1141.6	Carnivorous fish
I-CTX-3		1157.6	Carnivorous fish
I-CTX-4		1157.6	Carnivorous fish

Figura 3.- Tipos de Ciguatoxina y origen. Fuente Caillaud *et al.*, 2010.

La ciguatoxina se une y activa los canales de sodio dependientes de voltaje en neuronas y nervios ciáticos que resultan en una entrada excesiva de iones de sodio que conduce a la despolarización celular, la activación nerviosa espontánea y edema de células de Schwann y axones (Benoit *et al.*, 1996; Mattei *et al.*, 1999; Hogg *et al.*, 2002; Inserra *et al.*, 2017).

Estas toxinas se bioacumulan en la cadena trófica cuando los peces herbívoros consumen dinoflagelados tóxicos adheridos a superficies, por ejemplo, macroalgas, que luego son depredados por peces carnívoros (Darius *et al.*, 2013). Debido a los requisitos de Gambierdiscus de luz y sustrato, la producción de CTX se produce en hábitats costeros poco profundos (por ejemplo, arrecifes, atolones) (Friedman *et al.*, 2017). La

transferencia de CTX hacia arriba en la cadena alimentaria da como resultado su metabolismo y acumulación en los tejidos de los peces, incluidas las especies comestibles, lo que puede causar la ciguatera en humanos (Bravo et al., 2019). Se sabe que más de 400 especies de peces son vectores de ciguatera, se ha descrito que los principales depredadores como la morena (*Muraena* spp.), el mero (*Epinephelus* spp.), el pargo (*Lutjanus* spp.) y la barracuda (*Sphyraena* spp.) son las especies de alto riesgo para la intoxicación por ciguatoxina (Mak et al., 2013, Friedman et al., 2017).

En el CUADRO CLÍNICO se han reportado más de 175 síntomas, que se agrupan en tres categorías fundamentales: gastrointestinales, neurológicos y cardiovasculares. La duración y severidad varían considerablemente en cada paciente según la cantidad y porción de pescado ingerido (cefálico-caudal). En el 90% de casos, el inicio de los síntomas agudos está dentro de 12 horas de ingerir el pescado tóxico, aunque en casos severos puede aparecer el primer síntoma dentro de los 30 minutos y en casos leves ser retrasado hasta 48 horas (Gillespie et al., 1986; Bagnis et al., 1979).

- Síntomas gastrointestinales: Náuseas, vómitos, diarreas y dolor abdominal.
- Síntomas neurológicos: Disestesias; parestesias, que son típicas en la región perioral, lengua y partes distales de las extremidades, sobre todo en las palmas de las manos y las plantas de los pies. La disestesia habitual es la sensación de quemazón en las extremidades o boca cuando se toma una bebida fría o a la inversa.
- Síntomas cardiovasculares. Hipotensión arterial, bradicardia, bloqueo A-V, shock.
- Se ha descrito también ataxia, prurito, disminución de la fuerza muscular en los miembros inferiores y sensación de pérdida de los dientes.

Las manifestaciones neurológicas se prolongan semanas o meses y se presentan remisiones y reagudizaciones, a veces cuando se ingieren mariscos o bebidas alcohólicas, nueces y semillas. Se han reportado recaídas tras la ingestión de carne de pollo, huevo y pescado enlatado (Friedman et al., 2017).

Entre otros síntomas se incluyen: exacerbación del acné, hipo, sialorrea, fofobia, sabor metálico en la boca, oftalmoplejía, agitación, delirio, parálisis de los músculos faciales, espasticidad muscular, hiporreflexia, lesiones cutáneas, ceguera temporal, caída del pelo y uñas y descamación de la piel.

Por lo general, la ciguatera tiene una baja tasa de mortalidad (<0.1%). Los casos mortales raros ocurren dentro de varias horas o días después del envenenamiento y generalmente se deben a un fallo cardiovascular que empeorada por una deshidratación severa causada por diarrea y vómitos. En la forma crónica de la ciguatera no se observaron casos fatales (Chinain et al., 2019).

Incluso si esta enfermedad puede ser muy debilitante durante un período prolongado, hasta varias décadas, en la mayoría de los casos, los síntomas desaparecen espontáneamente. Además, incluso sabiendo que la ciguatera no es "contagiosa", tiene, por algunas características, que le confieren una naturaleza "transmisible" por contacto sexual (lo que podría explicar la aparición de prurito vulvar en mujeres durante el coito con una pareja que padece ciguatera), dolores en los hombres durante la eyaculación (Lange et al., 1989).

Aunque la intoxicación por ciguatera suele tener un pronóstico benigno, se han notificado casos letales en todas las regiones endémicas (Friedman, et al., 2017). La tasa de letalidad por intoxicación por ciguatera se ha estimado en <0,5% (Allsop et al.,

1986), pero en algunos contextos puede superar el 10 por ciento (Rabenjarison et al., 2016). La muerte debido a la exposición a CTX a menudo sigue a complicaciones cardiovasculares y/o del sistema nervioso central tras el consumo de cabezas de pescado, hígado y vísceras.

El **DIAGNÓSTICO** a menudo es difícil, ya que los médicos no reconocen los síntomas y dudan en informar. En la actualidad, el diagnóstico de ciguatera se basa únicamente en la historia de la intoxicación, la naturaleza del pescado consumido y los síntomas. Hasta la fecha, no existe una prueba biológica debidamente validada que permita el diagnóstico de ciguatera en pacientes. De hecho, algunos síntomas como las parestesias (picaazón, ardor, entumecimiento) en las extremidades (manos, pies ...), la cara, la boca y el dolor al contacto con líquidos u objetos fríos pueden considerarse características de la ciguatera, pero la ciguatera tiene síntomas similares a otras enfermedades y puede confundirse con toxicidad por organofosforados, botulismo, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré y una amplia gama de otras intoxicaciones alimentarias (Traylor y Singhal, 2020; Traylor y Mathew, 2020). Se estima que entre 10.000 y 50.000 personas al año que viven o visitan áreas tropicales y subtropicales se intoxican por ciguatera (Oehler y Bouchut, 2014). Pero la verdadera incidencia de CFP es difícil de determinar debido a la falta de notificación. Se cree que solo el 2-10% de los casos de ciguatera se notifican a las autoridades sanitarias (Lehane y Lewis, 2000). La subnotificación se debe en parte a que las personas con ciguatera a menudo no buscan atención médica, particularmente en lugares donde los residentes locales conocen bien la enfermedad. Sin embargo, incluso si buscan atención médica, es posible que los profesionales de la salud no reconozcan la enfermedad o no la informen a las autoridades sanitarias.

Las ciguatoxinas son inodoras, insípidas y generalmente indetectables con cualquier prueba simple. Se han usado muchas pruebas populares para determinar la toxicidad de los peces, incluida la decoloración de las monedas de plata o el alambre de cobre, o la repulsión de moscas y hormigas, pero todas han sido rechazadas. Por lo tanto, los bioensayos se han utilizado tradicionalmente para diagnosticar los peces sospechosos. El bioensayo en ratón requiere la purificación de extractos de pescado ya que el ratón no es muy sensible a la ciguatoxina (Park, 1994).

A falta de un estándar certificado hoy día la detección de ciguatoxina se realiza por una gran variedad de técnicas biológicas, químicas e inmunológicas, siendo la técnica más utilizada el bioensayo en neuroblastomas de ratón (Caillaud *et al.*, 2010).

El **TRATAMIENTO** de la intoxicación por ciguatera generalmente es sintomático: analgesia para los síntomas musculoesqueléticos, antihistamínicos para el prurito y antieméticos. En casos más graves, el control de equilibrio de líquidos y electrolitos, ventilatorio, la monitorización y el apoyo cardíacos pueden ser vitales (Stommel 2003). En la presentación aguda, la administración intravenosa (IV) de manitol es la terapia más estudiada para la ciguatera y la única terapia evaluada mediante ensayos clínicos aleatorios ciegos (Schnorf *et al.*, 2002). El manitol intravenoso se administra de 0,5 a 1,0 g/kg peso corporal durante un período de 30 a 45 minutos. Se sugiere que se administre dentro de las 48-72 horas posteriores a la ingestión de pescado tóxico, aunque se han observado efectos beneficiosos incluso hasta varias semanas después de la intoxicación (Blythe, 1994). Se ha descrito el uso del manitol provoca la reducción osmótica del edema neuronal (Pearn, 2001).

En la **DISTRIBUCIÓN** de la enfermedad grandes brotes de ciguatera y peces ciguatóxicos se describían principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del Océano Pacífico, Océano Índico y Mar Caribe, entre las latitudes 35°N y 35°S (Chang, 2016). El cambio climático aumenta las temperaturas de la superficie del mar en algunas áreas y ha hecho que la distribución varíe hasta latitudes 40°N y 40°S, lo que podría permitir que las algas marinas dañinas se vuelvan más prolíficas en un territorio más amplio (Kiblera *et al.*, 2015). Con el tiempo, la ciguatera se ha convertido en un peligro para los consumidores en regiones no endémicas debido al turismo y a la expansión del comercio internacional de productos del mar de las pesquerías tropicales. En 2007, la Unión Europea y los Estados Unidos importaron más del 80% de sus productos pesqueros para satisfacer la demanda de los consumidores desde estas áreas (Dickey y Plakas, 2010).

En **CANARIAS**, en 2004, se detecta el primer foco de ciguatera en el archipiélago, 5 individuos fueron intoxicados por un ingestión de medregal negro (*Seriola rivoliana*) de 26 Kg capturada por pesca deportiva (Pérez-Arellano *et al.*, 2005) En el mismo año, *Gambierdiscus* spp. se encontró en las aguas de estas islas (Aligizaki *et al.*, 2008). En 2008, se diagnóstica el segundo brote que se produjo en Tenerife (Isla Oeste de este archipiélago) afectando a 25 personas que compraron un medregal de 37 Kg en un mercado local y en 2009, se documentó otro brote en el archipiélago afectando a 9 individuos de Tenerife y Gran Canaria que consumieron un medregal (*Seriola dumerili*) capturados por pesca deportiva y con confirmación de la presencia del Caribe CTX tipo I (Boada *et al.*, 2010).

Tras la primera identificación de CTX en *S. rivoliana* en el Canarias, el Gobierno de Canarias decidió tomar acciones preventivas ante una posible aparición de ciguatera en ese zona. Dichas acciones consistieron en el cribado de la presencia de compuestos similares a CTX en muestras de peces con un peso superior a 15 kg y que fueron capturados en la división 34.1.2 según la Zona de pesca de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Nations-FAO) (anteriormente asociado a episodios CFP). Las muestras fueros evaluadas utilizando el kit de inmunoensayo Cigua-Check® (Oceanit, Honolulu, HI, EE. UU.). Sin embargo, esta prueba fue objeto de una controversia analítica considerable e inaceptables tasas de falsos positivos y falsos negativos, y su fabricación se detuvo (Darius *et al.*, 2013).

Tras la desaparición del kit, La Consejería de Pesca del Gobierno de Canarias crea el Programa Oficial de control de ciguatera, para el cual se detallan unas tallas mínimas por encima de las cuales los peces capturados deberán ser analizados para determinar la presencia de ciguatoxina y poder cribar aquellos pescados positivos para que no lleguen al consumidor (Figura 4).

Medregales	“<i>Seriola spp</i>”:	> 15 Kg.
Peto	“<i>Acanthoocybium solandri</i>”	> 30 Kg.
Pejerrey	“<i>Pomatomus saltatrix</i>”	> 12 Kg.
Abade	“<i>Mycteroperca fusca</i>”	> 12 Kg.
Mero	“<i>Epinephelus spp</i>”	> 29 Kg.
Picudo	“<i>Makaira nigricans</i>”	> 150 Kg.
Sierra	“<i>Sarda sarda</i>”	> 10 Kg.
Pez espada	“<i>Xiphias gladius</i> ”	> 150 Kg.

Figura 4.- Programa Oficial de control de ciguatera 2010

En el periodo comprendido entre 2010 y 2015 se analizaron un total de 711 peces. Las muestras de pescado pertenecían a la especie medregal (*Seriola dumerilli* y *Seriola rivoliana*) (n = 557), aguja azul (*Makaira nigricans*) (n = 31), mero (*Epinephelus marginatus*) (n = 85), peto (*Acanthocybium solandri*) (n = 32), pejerrey (*Pomatomus saltatrix*) (n = 2) y pez espada (*Xiphias gladius*) (n = 4). Para todas las muestras, se registró información sobre diferentes variables, los factores fueron la zona, el tipo de actividad, la especie de peces, meses dependiendo de la temperatura, el peso y la presencia o no de ciguatoxina.

La **METODOLOGÍA** utilizada fue la siguiente:

Purificación de la toxina

100 grs carne de pescado se extrajo y se envió al laboratorio y purificó de la siguiente manera, 10 g de la carne de pescado se cocinó a 70 °C durante 10 min y se mezcló durante 5 min en 30 ml de acetona (Ultraturax, 17500xg). El extracto soluble en acetona fue recuperado después de 5 min de centrifugación a 600xg a 4 ° C y filtrado utilizando filtros de nailon de 0,45 µm. La extracción con acetona fue repetido dos veces y ambos extractos solubles en acetona se combinaron y secado en un evaporador rotatorio (Lewis, 2003). El extracto seco fue purificado aún más usando partición líquido / líquido para eliminar ácidos grasos excesivos que pueden interferir con la detección de CTX.

Para ello, el extracto seco se disolvió en 5 ml de metanol: agua (9: 1) y se repartió dos veces con 5 ml de n-hexano (1: 1, v / v). Las fracciones de n-hexano se descartaron y la fracción metanol: agua se secó para una purificación adicional. El extracto seco fue disuelto en 5 ml de etanol: agua (1: 3) y dividido dos veces con 5 ml de éter dietílico (1: 1, v / v). La fracción etanol: agua fue se descartaron y las fracciones de éter dietílico se combinaron, se secaron y se luego se disuelve en 4 ml de metanol y se mantiene a -20 °C hasta el análisis.

Mantenimiento celular del neuroblastoma (neuro-2a) y ensayo de citotoxicidad

Las células de ratón Neuro-2a (ATCC, CCL-131) se cultivaron de forma rutinaria en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) y piruvato de sodio 1 mM a 37 ° C en un 5% de CO₂ humidificado atmósfera (Cañete y Diógene 2008). Para los experimentos, las células se sembraron en un microplaca en medio FBS RPMI 1640 al 5% a una densidad de 35.000 células por pocillo. Las células se incubaron en el mismo condiciones de temperatura y atmósfera como se describe para la celda mantenimiento. Después de 24 h de incubación de las células neuro-2a y solo antes de la exposición a extractos de pescado y solución estándar CTX para prueba, la mitad de la microplaca recibió ouabaína 0,1 mM y Veratridina 0,01 mM que permite una reducción del 20% en la viabilidad celular. Una cantidad equivalente de extracto de pescado o estándar P-CTX-1B

La solución a ensayar se evapora primero hasta sequedad bajo un flujo de N₂ a 40 °C para eliminar completamente el metanol. Los extractos secos son disueltos en medio con RPMI 1640 al 5 % de FBS, diluido en serie en el mismo medio y se añaden directamente 10 µl de cada concentración en el pozo de ambas mitades de la microplaca (con y sin tratamiento O / V) para comparar la respuesta celular en presencia y ausencia de tratamiento O / V. Un volumen igual en cada pozo fue corregido con solución tampón de fosfato. Todas las dosis así como todos los experimentos se realizaron por

triplicado. La sensibilidad del células neuro-2a a la presencia de CTX se calibró cada día de el experimento con una solución estándar de P-CTX-1B a 20 ng / ml.

El contenido similar a CTX en las muestras analizadas se cuantificó después análisis de la viabilidad celular, después de 24 h de exposición de las células neuro-2a a extractos de pescado y material estándar P-CTX-1B, la viabilidad celular se utilizó como un criterio de valoración para la medición de efectos citotóxicos. Viabilidad celular se evaluó incubando las células con una solución de MTT de 5 mg / ml [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio].

Los valores de absorbancia se leyeron a 492 nm utilizando un espectrofotómetro de barrido de pozos múltiples y los resultados fueron más analizados utilizando el software Prism4. La viabilidad de las células fue expresado en relación a la viabilidad de la celda correspondiente control (con o sin tratamiento O / V) y el 50% de los efectos (ICO / V + 50) se calculó según la curva dosis-respuesta obtenido usando una curva de regresión sigmoidea con una variable Hill-Slope.

Tras los análisis de este periodo observamos que en función de las variables estudiadas, eran los medregales y meros los peces que de forma más común presentaban ciguatoxina en porcentajes variables del 47% con pesca deportiva frente al 8% en pesca comercial para medregal, y 33% con pesca deportiva frente al 7% en pesca comercial para el Mero.

Centrándonos en el peso de las muestras recibidas, pudimos ver que había un 19% de *Seriolas* positivas con un peso superior a los 35 kilos frente al 8% en peces menores de 35Kg, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Se detectan más medregales positivos en las islas orientales y más positivos en las occidentales. Por tanto, es un factor de riesgo más probable capturar una medregal con ciguatoxina en las islas orientales y un mero con ciguatoxina en las islas occidentales. Esto podría explicarse porque las Islas Canarias están ubicadas en la zona de transición entre las aguas frías del afloramiento costero africano y las aguas oceánicas más cálidas del oeste y las aguas se están tropicalizando.

En relación a pesos inferiores, encontramos datos relevantes para el pejerrey que apareció un ejemplar de 11 Kg positivos, meros de 17 Kg positivos y medregales de 16kgs , lo que llevó a un replanteamiento de las tallas del Programa de Control rebajando las tallas de medregal a 14Kg, del Mero a 15 Kg y del Pejerrey a 9kg (Figura 5).

Medregales	<i>"Seriolaspp"</i> :	> 14 Kg.
Peto	<i>"Acanthoocybiu solandri"</i>	> 30 Kg.
Pejerrey	<i>"Pomatomussaltatrix"</i>	> 9 Kg.
Abade	<i>"Mycteroperca fusca"</i>	> 12 Kg.
Mero	<i>"Epinepheluspp"</i>	> 15 Kg.
Picudo	<i>"Makairanigricans"</i>	> 150 Kg.
Sierra	<i>"Sarda sarda"</i>	> 10 Kg.
Pez espada	<i>"Xiphiasgladius "</i>	> 150 Kg.

Figura 5.- Programa Oficial de control de ciguatera 2016

Tras este periodo no se sucedieron más brotes de enfermedad de pescado proveniente de puntos legales de primera venta, pero si se siguieron produciendo casos de enfermedad asociados a la pesca deportiva y a la venta furtiva de pescado a establecimientos de alimentación (Tabla 1), así que los casos hasta 2016 fueron los siguientes:

Tabla 1.- Casos de enfermedad asociados a la pesca deportiva y a la venta furtiva de pescado. Fuente: Dirección General de Salud Pública (Gobierno de Canarias).

Brote	Año	Mes	Isla de detección del brote	Casos	Especie	Peso Pescado	Confirmación presencia toxinas
1	2008	Nov	Tenerife	25	<i>Seriola fasciata</i>	37 kg	Sí
2	2009	Enero	Tenerife	4	<i>Seriola dumerilli</i>	67 kg	Sí
3		Sept	Gran Canaria	3	<i>Seriola spp</i>	-	ND**
4	2010	Nov	Tenerife	2	<i>Seriola spp</i>	1,5 kg	ND
5		Abril	Tenerife	4	<i>Seriola spp</i>	80kg	ND
6	2011	Junio	Gran Canaria	5	<i>Seriola rivoliana</i>	24kg	Sí
7	2012	Enero	Lanzarote	10	<i>Seriola spp</i>	<15 kg	ND
8		Abril	Lanzarote	9	<i>Seriola spp</i>	26kg	ND
9		Mayo	Tenerife	4	<i>Seriola spp</i>	-	ND
10		Dic	Tenerife	12	<i>Epinephelus spp</i>	18kg	Sí
11	2013	Dic	Lanzarote	16	<i>Epinephelus spp</i>	>29kg	Sí
12	2015	Feb	Tenerife	3	<i>Mycteroperca fusca</i>	3 kg	ND
13		Marzo	Lanzarote	2	<i>Pomatomus saltatrix</i>	10kg	Sí
14		Abril	Tenerife	3	<i>Mycteroperca fusca</i>	3,5kg	ND
15	2016	Nov	Tenerife	2	<i>Epinephelus spp</i>	7 Kg	Sí
16		Dic	Tenerife	3	<i>Seriola spp</i>	12 kg	Sí

Nuestros resultados mostraban que seguía habiendo peces positivos en Canarias que podían llegar a la cadena alimentaria, paralelamente se continuaban haciendo prospecciones en busca de gambierdiscus por parte del IEO y además en 2016 participamos en un proyecto MAC (Proyecto MIMAR) en el que íbamos a realizar estudios de peces de tallas menores y no sólo depredadores, para poder ver que peces de la cadena trófica están involucrados en el mantenimiento y distribución de la ciguatoxina. En ese año ocurre un evento en la isla de El Hierro con un Bloom de *Gambierdiscus caribaeus* (Soler et al., 2016) y además se describe en 2017 la presencia en las islas Canarias de gambierdiscus de diferentes especies como son: *G. Caribaeus*, *G. australes*, *G. carolinianus*, *G. Silvae* y *G. excentricus* (Rodríguez et al., 2017).

Nos centramos en realizar un seguimiento de la Reserva Marina de La Restinga con muestreos anuales de diferentes especies de peces con o sin interés comercial cubriendo los herbívoros, omnívoros y carnívoros. Con estos peces seguimos la misma metodología utilizada en el Programa de Control de la Ciguatera.

Desde 2016 hasta 2018 en nuestro seguimiento de la Reserva Marina de La Restinga hemos detectado 14 especies positivas para ciguatoxina (Tabla 2) de las 35 estudiadas, las especies positivas fueron:

Tabla 2.- Especies positivas para ciguatoxina en la Reserva Marina de la Restinga

Nombre Común	Nombre científico
Salema	<i>Sarpa salpa</i>
Pejeverde	<i>Thalassoma pavo</i>
Tamboril	<i>Sphoeroides marmoratus</i>
Gallinita	<i>Canthigaster capistrata</i>
Vieja	<i>Sparisoma cretense</i>
Pez Trompeta	<i>Aulostomus maculatus</i>
Seifía	<i>Diplodus vulgaris</i>
Bocinegro	<i>Pagrus pagrus</i>
Cabrilla	<i>Serranus atricauda</i>
Morena	<i>Gymnothorax unicolor</i>
Abade	<i>Mycteroperca fusca</i>
Lagarto	<i>Synodus saurus</i>
Pejepeine	<i>Xyrichtys novacula</i>

Con estos datos hemos ido rellenando la cadena trófica en esta zona, que se corresponde en muchas especies con las descritas por diferentes autores en otras regiones del planeta (Copeland *et al.*, 2014; Gaboriau *et al.*, 2014; Reis Costa *et al.*, 2018).

De los extractos obtenidos hemos realizado algunos análisis preliminares para ver que tipología de toxinas tenemos en nuestros peces y los resultados se inclinan por la presencia de ciguatoxinas del grupo Caribe coincidiendo con otros hallazgos en Canarias (Boada *et al.*, 2010), a diferencia de ellos nosotros encontramos fundamentalmente C-CTX4, aunque aún de forma preliminar parece que encontramos algún otro tipo que debe ser contrastado aún.

CONCLUSIONES

El mero, medregal y pejerrey como especies comerciales son las involucradas en las intoxicaciones más comunes, deben permanecer bajo el Programa de control de la Ciguatera, y modificando las tallas en función de lo positivos obtenidos.

Las perspectivas son las de encontrar cada vez más peces positivos y con menor talla.

A día de hoy en base a los hallazgos que tenemos, Canarias es ya oficialmente considerada un área endémica de Ciguatera.

Mantener la monitorización de las especies para adelantarnos a la evolución de la enfermedad.

RECOMENDACIONES

CONSUMIDOR

- ✓ **ORIGEN** de las especies de pescado que se han relacionado con intoxicación por ciguatoxina: medregal, mero y pejerrey.
- ✓ **EVITAR** los pescados de mayor tamaño (cuanto más arriba estén en la cadena alimentaria mayor concentración de ciguatoxina) si no conocemos exactamente el origen del mismo.
- ✓ **NO COMER** las partes del pescado donde más se acumula la toxina (cabeza y órganos internos).
- ✓ **EVITAR** los pescados procedentes de zonas endémicas (y no consumirlos cuando se viaje a esas áreas).

LEGISLADOR

- ✓ **PROHIBICIÓN** de la pesca del mero
- ✓ **REDUCIR** a 10 kg la talla de comercialización del medregal
- ✓ **MANTENER** la investigación en especies silvestres

PESCADOR RECREATIVO

- ✓ **EVITAR** capturar las especies de pescado que se han relacionado con intoxicación por ciguatoxina: medregal, mero y pejerrey.
- ✓ **EVITAR** los pescados de mayor tamaño: cuanto más arriba estén en la cadena alimentaria mayor concentración de ciguatoxina, **RESPETANDO LAS TALLAS MÍNIMAS OFICIALES.**
- ✓ **ANALIZAR** peces en tallas grandes si no se pueden liberar

REFERENCIAS

- Achaibar KC, Moore S, Bain PG. Ciguatera poisoning. *Pract Neurol.* 2007. 7(5):316-22.
- Adachi R, Fukuyo Y. The thecal structure of a marine toxic dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* gen. et sp. nov. collected in a ciguatera-endemic area. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 1979 45, 67–71.
- Aligizaki K, Nikolaidis G, Fraga S. Harmful Algae News. *Int Ocean Comm UNESCO.* 2008 36: 6-7.
- Allsop JL, Martini L, Lebris H, Pollard J, Walsh J & Hodgkinson S. Neurologic manifestations of ciguatera. 3 cases with a neurophysiologic study and examination of one nerve biopsy. *Revue Neurologique (Paris).* 1986 142: 590–597.

- Bagnis R, Kuberski T, Laugier S. Clinical observations on 3.009 cases of ciguatera fish poisoning in the South Pacific. *Am J Trop Med Hyg* 1979 28:1067–73.
- Benoit E, Juzans P, Legrand AM, Molgo J. Nodal swelling produced by ciguatoxin-induced selective activation of sodium channels in myelinated nerve fibers. *Neuroscience*. 1996 71(4):1121–1131.
- Blythe DG, Fleming LE, Ayyar RA, de Sylva DP, Baden DG, Shrank K. Mannitol Therapy for acute and chronic ciguatera fish poisoning. *Memoirs of the Queensland Museum* 1994, 34.
- Boada LD, Zumbado M, Luzardo OP, Almeida-González M, Plakas SM, *et al.* Ciguatera fish poisoning on the West Africa Coast: an emerging risk in the Canary Islands (Spain). *Toxicon*. 2010 56(8): 1516- 1519.
- Bravo I, Rodríguez F, Ramilo I, Rial P, Fraga S. Ciguatera-Causing Dinoflagellate *Gambierdiscus* spp. (Dinophyceae) in a Subtropical Region of North Atlantic Ocean (Canary Islands): Morphological Characterization and Biogeography. *Toxins* (Basel). 2019 Jul 19;11(7):423.
- Cañete E, Diogéne J. Comparative study of the use of neuroblastoma cells (neuro-2a) and neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins. *Toxicon*. 2008 52(4): 541-550.
- Chan TY. Characteristic Features and Contributory Factors in Fatal Ciguatera Fish Poisoning--Implications for Prevention and Public Education. *Am J Trop Med Hyg*. 2016. 94(4):704-709.
- Chinain M, Faust MA, Pauillac S. Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (Dinophyceae): *G. pacificus*, *sp. nov.*, *G. australes*, *sp. nov.*, and *G. polynesiensis*, *sp. nov.* *J. Phycol.* 1999 35, 1282–1296.
- Chinain M, Darius HT, Ung A, Cruchet P, Wang Z, Ponton D, Laurent D, Pauillac S. Growth and toxin production in the ciguatera-causing dinoflagellate *Gambierdiscus polynesiensis* (Dinophyceae) in culture. *Toxicon*. 2010 56, 739–750.
- Chinain M, Gatti CM, Roué M, Darius HT. Ciguatera poisoning in French Polynesia: insights into the novel trends of an ancient disease. *New Microbes New Infect.* 2019 7;31:100565.
- Cook JA. A voyage towards the South Pole and round the world. London, England. Staham & Cardell 1977 39-40: 112-113.
- Copeland NK, Palmer WR, Bienfang PK. Ciguatera fish poisoning in Hawai'i and the Pacific. *Hawaii J Med Public Health*. 2014 73(11 Suppl 2):24-7.
- Costa PR, Estevez P, Castro D, Soliño L, Gouveia N, Santos C, Rodrigues SM, Leao JM, Gago-Martínez A. New Insights into the Occurrence and Toxin Profile of Ciguatoxins in Selvagens Islands (Madeira, Portugal). *Toxins* (Basel). 2018 7;10(12):524.
- Darius HT, Drescher O, Ponton D, Pawlowicz R, Laurent D, *et al.* Use of folk tests to detect ciguateric fish: a scientific evaluation of their effectiveness in Raivavae Island (Australes, French Polynesia). *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2013 30(3): 550- 566.
- Dickey RW, Plakas SM. Ciguatera: a public health perspective. *Toxicon* 56(2):123–136 (2010).
- Faust MA. Observation of sand-dwelling toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from widely differing sites, including two new species. *J. Phycol.* 1995 31, 996–1003.
- Fraga S, Rodríguez F, Caillaud A, Diogéne J, Raho N, Zapata M. *Gambierdiscus excentricus* *sp. nov.* (Dinophyceae), a benthic toxic dinoflagellate from the Canary Islands (NE Atlantic Ocean). *Harmful Algae* 2011 11, 10–22.

- Friedman MA, Fernandez M, Backer LC, Dickey RW, Bernstein J, Schrank K, Kibler S, Stephan W, Gribble MO, Bienfang P, Bowen RE, Degrasse S, Flores Quintana HA, Loeffler CR, Weisman R, Blythe D, Berdalet E, Ayyar R, Clarkson-Townsend D, Swajian K, Benner R, Brewer T, Fleming LE. "An Updated Review of Ciguatera Fish Poisoning: Clinical, Epidemiological, Environmental, and Public Health Management". *Marine Drugs*. 2017 15 (3): 72.
- Gaboriau M, Ponton D, Darius HT, Chinain M. Ciguatera fish toxicity in French Polynesia: size does not always matter. *Toxicon*. 2014 Jun;84:41-50. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.03.006.
- Gillespie NC, Lewis RJ, Pearn JH, *et al*. Ciguatera in Australia. Occurrence, clinical features, pathophysiology and management. *Med J Aust* 1986 145:584–90.
- Gómez F, Qiu D, Lopes RM, Lin S. *Fukuyoa paulensis* gen. et sp. nov., a new genus for the globular species of the dinoflagellate *Gambierdiscus* (Dinophyceae). *PLoS One*. 2015 1;10(4):e0119676.
- Graham MN and Lewis RJ. Ciguatoxins: Cyclic Polyether Modulators of Voltage-gated Ion Channel Function *Mar. Drugs* 2006, 4, 82-118.
- Guiry MD, Guiry GM, 2018. *AlgaeBase*. World-Wide Electronic Publication. National University of Ireland, Galway searched on 29 July 2018. <http://www.algaebase.org>.
- Hogg RC, Lewis RJ, Adams DJ () Ciguatoxin-induced oscillations in membrane potential and action potential firing in rat parasympathetic neurons. *Eur J Neurosci* 2002 16(2):242–248.
- Holland WC, Tester PA. Taxonomy of *Gambierdiscus* including four new species, *Gambierdiscus caribaeus*, *Gambierdiscus carolinianus*, *Gambierdiscus carpenteri* and *Gambierdiscus ruetzleri* (Gonyaulacales, Dinophyceae). *Phycologia* 2009 48, 344–390.
- Inserra MC, Israel MR, Caldwell A, Castro J, Deus JR, Harrington AM, Keramidas A, Garcia-Caraballo S. Multiple sodium channel isoforms mediate the pathological effects of Pacific ciguatoxin-1. *Sci Rep*. 2017 7:42810.
- Juranovic LR, Park DL. Foodborne toxins of marine origin: ciguatera. *Rev Environ Contam Toxicol* 1991;117:51-94.
- Kibler SR, Tester PA, Kunkel KE, Moore SK, Litaker RW. Effects of ocean warming on growth and distribution of dinoflagellates associated with ciguatera fish poisoning in the Caribbean. *Ecological Modelling*. 2015 316:194–210.
- Lange WR, Lipkin KM, Yang GC. Can ciguatera be a sexually transmitted disease? *J Toxicol Clin Toxicol*. 1989;27(3):193-7.
- Lehane L, Lewis RJ. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol*. 2000 61, 91-125.
- Lewis RJ, Sellin M, Poli MA, Norton RS; MacLeod JK, Sheil MM. Purification and characterization of ciguatoxins from moray eel (*Lycodontis javanicus*, Muraenidae). *Toxicon* 1991 29: 1115–1127.
- Lewis RJ. The changing face of ciguatera. *Toxicon* 2001 39:97–106.
- Lewis RJ. Detection of toxins associated with ciguatera fish poisoning. Manual on harmful marine algae. In: Hallegraeff *et al.* (Eds.), UNESCO Publishing, France. 2003 267-277.
- Lewis RJ, Inserra M, Vetter I, Holland WC, Hardison DR, Tester PA, Litaker RW. Rapid extraction and identification of maitotoxin and ciguatoxin-like toxins from Caribbean and Pacific *Gambierdiscus* using a new functional bioassay. *PLoS ONE* 2016 11, e0160006.

- Litaker RW, Vandersea MW, Faust MA, Kibler SR, Nau AW, Holland WC, Chinain M, Holmes MJ, Tester PA. Global distribution of ciguatera causing dinoflagellates in the genus *Gambierdiscus*. *Toxicon*. 2010 56(5):711-30.
- Mak YL, Wu JJ, Chan WH, Murphy MB, Lam JC, et al. Simultaneous quantification of Pacific ciguatoxins in fish blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2013 405(10): 3331-3340.
- Mandell and Bennett's. Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition) Volume 1, 2015, 1283-1296.
- Mattei C, Dechraoui MY, Molgo J, Meunier FA, Legrand AM, Benoit E. Neurotoxins targetting receptor site 5 of voltage-dependent sodium channels increase the nodal volume of myelinated axons. *J Neurosci Res*. 1999 55(6):666-673.
- Oehler E, Bouchut J. La ciguatera [Ciguatera fish poisoning]. *Presse Med*. 2014. Sep;43(9):902-11.
- Park DL. Evaluation of methods for assessing ciguatera toxins in fish. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 1994 136: 1-20.
- Pearn J. Neurology of ciguatera. *J. Neurol., Neurosurg. & Psych*. 2001, 70, 4-8.
- Pérez-Arellano JL, Luzardo OP, Pérez Brito A, Hernández Cabrera M, Zumbado M, et al. Ciguatera fish poisoning, Canary Islands. *Emerg Infect Dis*. 2005 11: 1981-1982.
- Pisapia F, Holland WC, Hardison DR, Litaker RW, Fraga S, Nishimura T, Adachi M, Nguyen-Ngoc L, Séchet V, Amzil Z, Herrenknecht C, Hess P. Toxicity screening of 13 *Gambierdiscus* strains using neuro-2a and erythrocyte lysis bioassays. *Harmful Algae*. 2017 63:173-183.
- Rabenjarison F, Ramarolahy ARN, Velomora A, Rhajaniaina MP, Raveloson NE. Intoxication à la ciguatoxine après consommation de requin à Fenerive-Est: profil épidémiologique-clinique et résultats de laboratoire. *Revue d'Anesthésie-Réanimation, Médecine d'Urgence et Toxicologie*. 2016 9: 9-12.
- Ricourt Regús, R. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (2000).
- Rodríguez F, Fraga S, Ramilo I, Rial P, Figueroa RI, Riobó P, Bravo I. "Canary Islands (NE Atlantic) as a biodiversity 'hotspot' of *Gambierdiscus*: Implications for future trends of ciguatera in the area". *Harmful Algae*. 2017 67:131-143.
- Schnorf H, Taurarii M, Cundy T. Ciguatera fish poisoning: a double-blind randomized trial of mannitol therapy. *Neurology* 2002 58, 873-880.
- Soler-Onís E, Fernández-Zabala J, Ojeda-Rodríguez A, Amorim A. Bloom of *Gambierdiscus caribaeus* in the temperate-subtropical waters of El Hierro, Canary Islands (North East Atlantic). *Harmful Algae News*. 2016 14-1.
- Stommel E. Marine toxins. *American Academy of Neurology* 2003;5BS:003-66.
- Traylor J, Mathew D. StatPearls. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Jun 27, 2020. Histamine (Scombroid Toxicity, Mahi-Mahi Flush) Toxicity.
- Traylor J, Singhal M. StatPearls. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): Jul 3, 2020. Ciguatera Toxicity.