

**FLORACIONES DE ALGAS NOCIVAS**  
Mareas Rojas y Toxinas Marinas.

Dr. Benjamín Suárez Isla  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

Dr. Leonardo Guzmán Méndez  
Instituto de Fomento Pesquero

**Prólogo.**

El campo de estudio de la biología marina del fitoplancton tóxico está muy bien representado por las publicaciones especializadas de distinguidos biólogos, ecólogos marinos, químicos y oceanógrafos a cuyos esfuerzos se debe el nivel de comprensión y conocimientos actuales sobre la incidencia y distribución de las floraciones de algas nocivas (FAN) y sobre los factores limitantes y reguladores que a escala oceánica inciden sobre el inicio y término de las llamadas “mareas rojas”. Por ello el énfasis de esta publicación recae en la discusión a nivel introductorio pero riguroso, de aspectos no siempre considerados en los libros de texto, tratados y trabajos científicos del área. Luego de entregar una visión de conjunto de la biología y la ecología del fitoplancton en general y de las especies tóxicas, nos detendremos en aspectos químicos, fisiológicos y biomédicos de las toxinas marinas y de los organismos causantes. En la introducción el lector encontrará una visión actualizada del estado del problema a escala mundial y lo iniciará en algunos de los conceptos fundamentales. En los capítulos siguientes se discuten con más detalle los tópicos esbozados en la introducción, con apoyo de citas bibliográficas de importancia y se describen los avances mundiales y los logrados en nuestro país para la prevención y el control de la intoxicaciones humanas por toxinas marinas. El objetivo central de esta publicación es aclarar los alcances e impactos del problema mundial de las mareas rojas y su incidencia en nuestro país, en el convencimiento que toda intoxicación alimentaria es esencialmente evitable si estimulamos la actuación informada de los ciudadanos.

Nota: Las palabras en *itálicas* cuyo significado no es entregado en el texto, se encuentran en el Glosario de Términos Científicos.

## **Introducción.**

### **Una historia real(\*).**

*“Con fecha 17 de noviembre de 1991, distintos buques de nuestra Armada se encontraban en ejercicio en un área aislada de la costa austral. A las 14 horas fue llevado a la enfermería del buque principal un marinero afectado de una parálisis respiratoria, intensamente cianótico, comprometido de conciencia y prácticamente en apnea (sin poder respirar, N.A.). El sujeto había estado en buenas condiciones de salud hasta hace sólo unos pocos minutos antes. Se procedió a intubarlo y conectarlo en la máquina de anestesia del pabellón quirúrgico con flujo de oxígeno al 1.0. Le fueron instaladas vías venosas, comenzándose a infundir solución Ringer a chorro, se le instalaron sondas nasogástricas y uretrovesical y se conectó a monitor portátil de electrocardiograma de registro continuo. El procedimiento fue expedito y el paciente pronto estuvo estabilizado, sin cianosis, bien perfundido y con buenos signos vitales. Sin embargo, pronto comenzó a presentar bradicardias (disminución de la frecuencia del pulso cardíaco; N.A.), con bloqueo aurículo ventricular de 2º grado variable y luego varios paros cardíacos en asistolia que finalmente se hicieron irreversibles a pesar de dos horas de masaje cardíaco externo, apoyo de drogas vasoactivas y ventilación asistida permanente. Se supo que el sujeto había ingerido cholgas, marisco sobre el cual existía una advertencia del Ministerio de Salud por la existencia de Marea Roja en el área”.*

Este sobrecogedor relato expresado con la objetividad y sobriedad propia del médico tratante, Dr. Rodrigo Huidobro (\*), corresponde al caso de una intoxicación paralizante masiva que sufrieron 125 miembros del personal de buques de la Armada que se encontraban en ejercicios rutinarios cerca

de Punta Arenas. La oportuna reacción del personal médico y paramédico de a bordo y de los hospitales de Punta Arenas evitó la muerte de otros tripulantes, logrando que en una situación de extrema gravedad se tuviera que lamentar la muerte de dos marinos. Los otros pacientes se recuperaron sin secuelas fuera del natural impacto emocional de estar muy cerca de la muerte y de ver fallecer a sus dos compañeros. Los síntomas descritos corresponden a una persona que ingirió un dosis muy elevada de Veneno Paralizante de los Mariscos. Estas toxinas paralizantes son tan potentes que medio milígramo de ellas puede matar a una persona de 70 kg de peso en pocos minutos. Esta cantidad puede ser fácilmente acumulada en una ración de mariscos de 100 gramos. Las observaciones acumuladas ese 17 de noviembre de 1991 demostraron que los 123 tripulantes sobrevivientes y los dos fallecidos habían sido víctimas de la temida “marea roja”.

(\*) Revista de Sanidad de la Defensa Nacional, 9, 133-138 (1992)

Pocos fenómenos naturales marinos han despertado a tal grado la curiosidad, el asombro y el temor de los observadores en toda la historia registrada, como los dramáticos cambios de color en el mar y la fosforescencia nocturna. Estos eventos se encuentran asociados a masivas floraciones de microalgas que, en ocasiones pueden ser altamente tóxicos. Los habitantes originarios del noroeste de los Estados Unidos y Canadá asociaron la fosforescencia de las aguas costeras a la toxicidad de los organismos marinos que constituían su ingesta habitual (Dale & Yentsch, 1988). Es así que los habitantes del litoral de diversos áreas del planeta han acuñado términos que identifican claramente a estos fenómenos, “aguaje” (en Perú), “purga do mar” (en Galicia, España), “eau rouges” (en Francia), “l’acqua rossa” (en Italia), “akashiwo” (en Japón), “red tides” o “red waters” (países angloparlantes), “tingui” o “aguji” (en Cuba) “turbio” (en Venezuela), “huirihue” o “virigue” (en el norte de Chile). Los registros de intoxicaciones de seres humanos por consumo de peces y mariscos o por contacto accidental con organismos marinos datan de la antigüedad (Halstead, 1978). Se ha sostenido que probablemente el registro más antiguo de los efectos tóxicos de microalgas aparece en el Antiguo Testamento (Exodo 7: 19-21; 1491 A.C.) donde las aguas de Egipto se transformaron en “sangre” produciendo la muerte masiva de peces y su descomposición. Se cree que una ley mosaica habría estado dirigida a eliminar a los peces venenosos de la dieta de los israelíes: *“No comerás todo lo que hay en las aguas. Todo lo que tenga aletas y espinas lo comerás. Y todo lo que no tenga aletas y espinas no lo comerás”* (Deuteronomio 14: 9-10; ca. 1451 A.C.). Como lo advierte Halstead (1978), las tropas norteamericanas que ocuparon islas de la Polinesia durante la segunda guerra mundial recibieron instrucciones muy semejantes dos milenios más tarde. Ahora sabemos que esa antigua ley mosaica descansaba en la observación que los peces sin aletas como las anguilas y morenas se encuentran entre los más venenosos.

La explicación científica de estos fenómenos tuvo que esperar uno de los desarrollos técnicos

más importantes del milenio que termina: el microscopio óptico de Anthony van Leewenhoek con el cual describe (entre otros hallazgos señeros) a los microorganismos marinos en 1676. Deben pasar más de 200 años de estudios descriptivos hasta que Alexander von Humboldt llama la atención sobre los trabajos de C.G. Ehrenberg quien había descubierto que las rocas de origen marino como yesos y diatomitas estaban compuestas por cantidades astronómicas de restos esqueléticos diminutos que en ese momento se asociaron a organismos prehistóricos en miniatura. El naturalista Joseph Cooker en su expedición a la Antártica en 1847, examinó aguas verdosas y residuos barrosos depositados sobre masas de hielo y descubrió a las diatomeas, especulando que por su inmensa cantidad, *"ellas probablemente mantienen en los océanos polares, el balance entre los reinos animal y vegetal que prevalecen sobre el planeta"*. En 1847 el naturalista danés A.S. Oersted confirma el anterior hallazgo y pronto se hace evidente la presencia de microorganismos marinos en todos los cuerpos de aguas, incluidos los de agua dulce, y su capacidad de proliferar en inmensas cantidades en condiciones ambientales favorables. Sólo en 1887 Victor Hensen define el concepto *"plancton"* como *"todo aquello que se mueve en el agua, arriba o abajo, muerto o vivo"*. Más tarde el término fue restringido a los organismos marinos de pequeño tamaño, animales o vegetales, que viven en el agua y que por lo limitado de sus mecanismos natatorios son acarreados por las mareas y corrientes.

Las algas planctónicas que configuran el componente vegetal del plancton, el fitoplancton, son responsables de la producción de más del 90% de las sustancias orgánicas marinas y representan una amplia diversidad de formas. Estos organismos se alimentan por fotosíntesis, un proceso complejo compartido con las macroalgas y las plantas superiores, en el que la materia orgánica se produce a partir de sustancias inorgánicas simples como el agua y el dióxido de carbono, empleando para ello la energía solar y generando oxígeno. Por ello constituyen la base alimentaria de la cadena trófica marina y proveen el oxígeno esencial a toda la vida en el mar. En los inicios de la vida orgánica sobre nuestro planeta se supone fundadamente que el fitoplancton microscópico generó el oxígeno que fue vital para el desarrollo de las especies terrestres y de los seres humanos (van den Hoek y cols., 1995)

El fitoplancton microscópico está distribuido en todo el planeta, particularmente la fracción de la columna de agua que recibe luz y siendo más abundante en las zonas costeras que en las oceánicas abiertas. Su abundancia relativa es mayor en las más altas latitudes que en las zonas tropicales, aunque la diversidad de especies es mayor en los mares cálidos subtropicales que en las frías aguas más cercanas a los polos. Las marcadas variaciones temporales de la abundancia de microalgas en un lugar específico son procesos naturales y reflejan cambios estacionales en la iluminación y disponibilidad de nutrientes (llamados *factores primarios* o limitantes) y de la salinidad, temperatura y consumo por el zooplancton herbívoro, entre otros, (llamados *factores secundarios* o reguladores). De manera general se puede señalar que las zonas tropicales muestran una abundancia fitoplanctónica relativamente homogénea a lo largo de todo el año, en tanto que en las zonas templadas, es posible apreciar un período de mayor abundancia durante primavera y otro, menos importante, durante el otoño. Finalmente, en las zonas de alta latitud se aprecia un largo período de producción, muy marcado durante la prolongada estación estival. Por lo general las

variaciones en abundancia no se reflejan en una sola especie sino que los cambios se suceden afectando de manera secuencialmente conservada a conjuntos sucesivos de especies bien definidas. En algunos casos especiales, se produce la proliferación masiva de una especie en particular a expensas de otras. Si la especie involucrada es rica en pigmentos, se podrá observar un notable cambio en la coloración del agua, la que su vez puede ser causada por organismos inocuos o nocivos, distinguiéndose entre estos últimos, a organismos tóxicos propiamente tales y aquellos que son perjudiciales por otras razones, como es la presencia de espinas, setas o incluso su forma. De las casi 4.000 especies marinas del fitoplancton microscópico viviente estimadas (Sournia, 1991; Thomas, 1996), unas 300 especies pueden proliferar en tan alto número que alcanzan densidades de millones de células por litro de agua, siendo tóxicas alrededor de 60. La alta densidad de microalgas puede modificar la coloración del agua y provocar, en la mayoría de los casos, eventos luminiscentes claramente observables durante la noche. En efecto, la bioluminiscencia acompaña a una fracción significativa de las floraciones de algas en general y es un fenómeno común en el caso de floraciones tóxicas. Sin embargo, ello a menudo no es documentado (Loeblich & Loeblich, 1968).

Los eventos de discoloración del agua han sido descritos históricamente por diferentes términos, entre los que se encuentra el de "mareas rojas", por la particular coloración rojiza que produce la proliferación masiva de algunas especies. Es importante recordar que estas proliferaciones o "floraciones" son acontecimientos naturales en la dinámica de los ecosistemas marinos. En la mayoría de los casos, estos fenómenos que llamaremos más propiamente "floraciones de algas", son beneficiosas para la acuicultura y la producción de los recursos marinos que se alimentan de estos organismos. En los últimos años son numerosos los ejemplos del cultivo a escala industrial de algunas de estas microalgas, precisamente como alimento de peces, moluscos y crustáceos o como materia prima para el aislamiento y la purificación de compuestos químicos naturales de uso



farmacéutico.

## Capítulo 1. Mareas rojas y bioluminiscencia.

### 1.1 Aspectos históricos.

Los fenómenos de discoloración del agua y de bioluminiscencia han despertado la imaginación poética de autores como Walter Scott (en "Señor de las Islas", I, 21, 1815) o de narradores como C.W. Thompson (Voyage of the Challenger, 2:85, 1877). Este último describe la expedición a bordo de la Challenger en 1877 cuando navegaba por las costas de las islas de Cabo Verde de la siguiente manera:

*"En la noche del día 14 nos encontramos en una gloriosa fosforescencia nunca vista en nuestra experiencia. Soplabla una brisa fresca y cada ola a la que alcanzara la vista alrededor del barco destellaba al romperse mientras una débil luminosidad blanca parecía suspendida sobre el horizonte. En la popa del barco donde la quilla corta el agua brillaba una ancha banda azul esmeralda desde la que se desprendían hacia la superficie miríadas de chispas amarillas que se perfilaban sobre la nube de luz formada en el agua para después mezclarse y desaparecer en la estela. (...) Era como si la Vía Láctea, vista a través de un telescopio, hubiera caído al océano y fuéramos navegando por ella."*

La así llamada "fosforescencia" del mar es debida en gran medida a la bioluminiscencia de los dinoflagelados que se encuentran en todos los océanos. Quizás la mitad de las especies de dinoflagelados son luminiscentes (Sweeney, 1963; Hastings, 1975) y varios de los que forman mareas rojas tóxicas muestran esta característica. Charles Darwin se refiere varias veces a estos fenómenos en su libro "Los viajes de un naturalista" (ver edición preparada de su paso por Chile; 1996) donde dice:

*En la costa de Chile, a algunas leguas al norte de Concepción, el Beagle atravesó cierto día grandes fajas de agua fangosa... al sur de Valparaíso, tuvimos ocasión de ver la*

*misma coloración en un espacio aún más extenso. Esa agua, puesta en un vaso, ofrecía un color rojizo pálido; examinada al microscopio, rebullía de pequeños animalículos... En los mares que rodean a la Tierra del Fuego, a poca distancia de la costa, he visto espacios donde el agua presenta un color rojo brillante...”*

Las microalgas son el alimento natural de moluscos bivalvos filtradores (ostras, ostiones, choritos, cholgas, huepos, almejas, entre otros), de peces herbívoros y de larvas de diferentes organismos marinos, tales como moluscos y crustáceos, que a su vez son alimento marino esencial para los seres humanos.

Sin embargo, son numerosos los casos de floraciones de algas que han sido asociadas a severas intoxicaciones y muerte de seres humanos, de mamíferos marinos, aves y peces. El primer caso de intoxicación humana por consumo de mariscos tóxicos que está registrado se produjo el 15 de junio de 1793 en la costa oeste de los Estados Unidos y es descrito por el capitán George Vancouver en “*A Voyage of Discovery to the North Pacific Ocean, and Round the World*”, publicado en 1798. Durante los dos siglos posteriores en esa zona, incluyendo Alaska, se han registrado numerosos casos de envenenamiento que causan la muerte por parálisis respiratoria. El 17 de octubre de 1885 ocurrió otra intoxicación masiva en el puerto de Wilhelmshaven en el norte de Alemania, lo que alertó al mundo médico de la severidad del fenómeno. El fundador de la patología celular, Rudolf Virchow, dedicó en 1885 y 1886, dos extensos artículos a este fenómeno, sosteniendo erróneamente que los mariscos intoxicados presentarían signos externos que los diferenciarían de los no tóxicos. A pesar de ello, su gran autoridad impulsó a otros a investigar en el tema. En julio de 1927 se produjo una intoxicación masiva en San Francisco que causó la muerte con severos síntomas paralizantes de varias personas. Esto estimuló el inicio de los primeros estudios sistemáticos

dirigidos por Karl Friedrich Meyer y Hermann Sommer, investigadores de la Universidad de California. Los trabajos de Sommer y sus asociados mostraron una relación directa entre la toxicidad de los mariscos y la densidad de una microalga denominada *Gonyaulax catenella* (hoy se le conoce como *Alexandrium catenella*)(Figura 1 y Figura 2c).

Estas floraciones de algas nocivas (que abreviaremos como FAN) son causadas por un grupo poco numeroso de especies de microalgas. En estos FAN se ha observado la participación de tan solo unas 60 especies de alrededor de las 4.000 conocidas. Entre los principales organismos causantes se encuentran dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias. Estas especies producen en su metabolismo compuestos químicos de muy alta toxicidad que llamaremos **toxinas marinas** (Yasumoto y Murata, 1993; Figura 3). Estas sustancias, en su mayoría resistentes al calor de la cocción habitual, pueden interferir, en muy bajas concentraciones, con procesos fisiológicos normales como la conducción de los impulsos nerviosos, la absorción de agua y de alimentos en el intestino o el procesamiento de la memoria. De acuerdo a sus efectos tóxicos estos compuestos se han clasificado como toxinas marinas paralizantes, neurotóxicas, amnésicas, diarreicas y ciguatéricas. Los aspectos químicos y fisiológicos de las toxinas marinas se discuten en el capítulo 4 y se resumen en la Tabla III del capítulo 7.

Las floraciones de algas nocivas ocurren con frecuencia creciente y con compromiso cada vez mayor de extensas áreas costeras del planeta, incluyendo Chile, informándose cada año de más de 2000 casos de intoxicaciones en humanos con un 15 por ciento de mortalidad asociada, lo que es un índice de mucha gravedad. Los impactos económicos negativos se generan por reducción de la extracción de recursos marinos, ausencia laboral, menor consumo interno y menor exportación por pérdida de confianza en los productos alimenticios.

En Chile los FAN han estado asociados a intoxicaciones humanas de tipo paralizante y diarreica (Tabla I; modificada de Marambio y cols. 1996). La primera intoxicación paralizante es detectada por primera vez en Bahía Bell, región de Magallanes en 1972 y la primera intoxicación diarreica registrada ocurre en el Seno de Reloncaví, en noviembre de 1970, X región. En el país se han informado a marzo de 1998, 326 casos de intoxicaciones paralizantes con 26 fallecimientos, los últimos acaecidos durante marzo de 1998 en Aysén, ocasión en la que fallecieron dos pescadores y un niño de corta edad. La mayor parte de los casos fatales ha ocurrido en la región de Magallanes (21 casos).

**Tabla I. Casos humanos intoxicados con veneno paralizante de los mariscos registrados en la XI y XII Regiones (1972-1998) (actualizado de Marambio y cols., 1996)**

| caso | año      | mes | número de intoxicados | número de muertes | lugar              | recurso     |
|------|----------|-----|-----------------------|-------------------|--------------------|-------------|
| 1    | 1972     | 10  | 3                     | 3                 | Bahía Bell         | cholga      |
| 2    | 1981     | 2   | 26                    | 2                 | Seno Unión         | cholga      |
| 3    | 1989     | 4   | 8                     | 0                 | Estero Núñez       | cholga      |
| 4    | 1991     | 3   | 95                    | 2                 | Bahía Nash         | chorito     |
| 5    | 1991     | 11  | 125                   | 2                 | Seno Unión ?       | cholga      |
| 6    | 1991     | 12  | 2                     | 1                 | Seno Nevado        | cholga      |
|      | Subtotal |     | 259                   | 10                |                    |             |
| 7    | 1992     | 1   | 14                    | 6                 | Bahía Woodsworth   | chorito     |
| 8    | 1992     | 1   | 5                     | 0                 | Estero Asia        | chorito     |
| 9    | 1992     | 2   | 3                     | 0                 | Km 49 Sur          | chorito     |
| 10   | 1992     | 3   | 1                     | 1                 | Caleta La Olla     | sin muestra |
| 11   | 1992     | 5   | 3                     | 0                 | Paso Nuevo         | cholga      |
| 12   | 1992     | 7   | 1                     | 0                 | Isla Vancouver     | cholga      |
| 13   | 1992     | 7   | 3                     | 1                 | Paso Schoal        | cholga      |
| 14   | 1992     | 12  | 6                     | 0                 | Puerto Williams    | chorito     |
|      | Subtotal |     | 36                    | 8                 |                    |             |
| 15   | 1994     | 1   | 8                     | 0                 | San Juan           | chorito     |
| 16   | 1994     | 1   | 1                     | 0                 | Los Ñires          | chorito     |
| 17   | 1994     | 1   | 2                     | 1                 | Punta Arenas       | chorito     |
| 18   | 1994     | 1   | 1                     | 0                 | Punta Arenas       | chorito     |
| 19   | 1994     | 2   | 1                     | 0                 | Punta Arenas       | chorito     |
| 20   | 1994     | 4   | 1                     | 0                 | Bahía Gente Grande | cholga      |
| 21   | 1994     | 6   | 1                     | 1                 | Seno Ringove       | cholga      |
|      | Subtotal |     | 15                    | 2                 |                    |             |
| 22   | 1995     | 1   | 4                     | 0                 | Chabunco           | chorito     |
| 23   | 1995     | 2   | 1                     | 0                 | Seno Profundo      | cholga      |
| 24   | 1995     | 5   | 13                    | 1                 | Isla Toto, Aysén   | cholga      |
|      | Subtotal |     | 18                    | 1                 |                    |             |
| 25   | 1996     |     | 0                     | 0                 |                    |             |
| 26   | 1997     |     | 0                     | 0                 |                    |             |
| 27   | 1998     | 2   | 9                     | 1                 | Aysén              | cholga      |
| 28   | 1998     | 3   | 10                    | 1                 | Aysén              | cholga      |
| 29   | 1998     | 4   | 1                     | 0                 | Aysén              | cholga      |
|      | Subtotal |     | 20                    | 2                 |                    |             |
|      | TOTAL    |     | 348                   | 23                |                    |             |

## 1.2 La expresión “marea roja”.

Se ha popularizado la expresión "marea roja" como sinónimo de floración de alga tóxica, aunque se presentan eventos de mariscos tóxicos que no están asociados a una floración visible. Para el oceanógrafo el concepto de floración significa escuetamente “*concentraciones de microorganismos planctónicos que cambian el color del agua o incremento en la abundancia numérica de algún microorganismo fitoplanctónico pudiendo estar asociado a una discoloración del agua*”. Para una persona no especialista la expresión está más asociada a los *efectos adversos observados*, como varazones de peces, ballenas, lobos marinos y muerte de aves, seres humanos con irritaciones de sus vías respiratorias y con intoxicaciones que presentan síntomas diarreicos o neurológicos pasajeros. Los casos más graves corresponden a personas que sufren la pérdida de la memoria o la muerte por parálisis. La expresión “marea roja”, a pesar de su poder evocativo, no tiene la precisión necesaria ya que, ni todos las floraciones de algas son tóxicas ni todos los eventos de toxicidad están asociados siempre a cambios evidentes en la coloración del agua. Por ejemplo, en las regiones de Aysén y Magallanes con amplias zonas cerradas a la extracción de mariscos, desde 1991 hasta la fecha (Paralelo 44 al sur), es raro observar cambios de color en el agua producidos por los dinoflagelados tóxicos causantes. Por esas razones, hemos preferido emplear aquí la expresión Floración de Alga Nociva (o FAN). No obstante, es importante precisar que en los fiordos y canales australes se han observado discoloraciones del agua de mar, producidas por un protozoo microscópico, que es inofensivo para otros organismos acuáticos y el hombre o una “marea café” producida por una pequeña microalga que en 1988 ocasionó graves trastornos a la salmonicultura.

## **Capítulo 2. El fitoplancton nocivo.**

Ya hemos destacado que las floraciones de algas son normalmente inocuas, corresponden a fenómenos naturales y permanentes del ecosistema marino de todo el planeta, y que una fracción menor de ellas puede tener consecuencias deletéreas para los organismos marinos, aves y seres humanos. Es importante distinguir varios factores que son consecuencia de la acción humana moderna que se superponen desde hace pocos decenios a los ciclos climáticos globales y que pueden estar causando un aumento significativo en la frecuencia, intensidad y extensión geográfica de los florecimientos algales. Estas acciones han **a)** modificado las condiciones bio-oceanográficas en los ecosistemas costeros y, **b)** ampliado el número de especies de microalgas cuyas floraciones naturales e inocuas han pasado a ser dañinas. En el primer caso la entrega de nutrientes exógenos a las aguas costeras provenientes de residuos arrojados al mar, ha alterado de maneras específicas y diferentes las condiciones de crecimiento de las microalgas y otros componentes del plancton (eutroficación). En el segundo caso el desarrollo de técnicas de cultivo intensivo de peces en espacios confinados (jaulas) ha causado que floraciones de especies no tóxicas puedan llegar a ser altamente nocivas y hasta letales por acumularse en lugares desde los cuales los peces cultivados no pueden escapar. Especies inocuas del fitoplancton, al estar en gran número, pueden disminuir el contenido de oxígeno disuelto en el agua o dañar mecánicamente las branquias de los peces confinados. Esto significa que no sólo las especies tóxicas del fitoplancton pueden ser nocivas sino que otras especies perfectamente inocuas en el medio natural pueden transformarse en inocuas y letales competidores por nutrientes vitales. No está claramente demostrado en todos los casos el carácter de la influencia de los nutrientes que se entregan a los peces en cultivo sobre el fitoplancton original de los sitios de piscicultura y esto debiera ser materia de monitoreo e investigación permanentes.



## 2.1 Dinoflagelados y diatomeas.

Los dinoflagelados en conjunto con las diatomeas son los principales componentes del fitoplancton microscópico. Los dinoflagelados marinos constituyen un grupo exitoso de microorganismos adaptados a habitats *pelágicos* y *bentónicos*, con muchas especies cosmopolitas identificables en todos los mares. Los dinoflagelados tóxicos, unas 60 especies de un total de 4000 especies extantes (o “que existen”; Sournia, 1991), de las cuales cerca de 2000 son dinoflagelados, comparten con sus congéneres no tóxicos características tales como: 1) ser fotosintéticos, 2) ser principalmente *estuarinos* o *neríticos*, 3) pasar durante su ciclo de vida por etapas móviles y en reposo que se depositan en el fondo marino, 4) producir en su mayoría floraciones monoespecíficas a expensas de otras especies, lo que sugiere ventajas competitivas. La diferencia más importante con sus congéneres no tóxicos es la de producir en su metabolismo compuestos bioactivos hidro- o liposolubles que pueden presentar efectos hemolíticos, neurotóxicos o enterotóxicos dependiendo de su estructura, estado de conversión, dosis y susceptibilidad del consumidor, sea este humano o animal.

Los dinoflagelados son principalmente organismos unicelulares móviles propulsados por flagelos (Dodge, 1984). Aproximadamente la mitad de ellos poseen cloroplastos (como las plantas), organelos con los que pueden desarrollar fotosíntesis y ser autotróficos. El resto de los dinoflagelados que no tiene cloroplastos incorporan materia orgánica en suspensión o fagocitan bacterias u otros flagelados (son claramente *fagotróficos* o *saprotróficos*). No es sorprendente entonces que algunos autores los hayan clasificado como plantas y otros como animales. Su taxonomía es aún más compleja porque muchos dinoflagelados entran en una fase de vida inmóvil (formando *quistes*), morfológicamente diferentes y muy resistentes. Estos quistes pueden permanecer

viabiles por períodos muy prolongados en el fondo marino. Muchos de esos quistes han sido observados en los registros fósiles que datan del período Triásico (hace unos 200 millones de años) y han sido estudiados en detalle por geólogos y micropaleontólogos. Los géneros asociados a eventos tóxicos en Chile están indicados en la Tabla II.

Los dinoflagelados en general viven como células aisladas, tienen forma esférica y su diámetro mayor varía desde 5 milésimas de milímetro (o 5 micrómetros) hasta 2 mm. Poseen un flagelo que nace en una hendidura transversal (*cingulum*) que corresponde a su “cintura” y otro longitudinal que se aloja en una hendidura longitudinal (*sulcus*). (Figura 1) El batido coordinado de estos flagelos les otorga un movimiento natatorio en espiral característico.

Desde el punto de vista evolutivo, estos organismos descienden de los más antiguos ancestros de los animales y plantas, las llamadas algas azul verdosas o cianófitas y que se remontan a más de 3.300 millones de años (!).

A diferencia de los dinoflagelados, de las 1400-1800 especies de diatomeas marinas (Sournia et al., 1991) que son las formas más abundantes y variadas del fitoplancton, solamente 3 han sido relacionadas con intoxicaciones humanas por consumo de mariscos y con muerte de aves. Estas intoxicaciones, detectadas por primera vez en Canadá en 1987, son de extrema gravedad, pues la ingesta de las toxinas producidas por estos organismos destruyen las neuronas de regiones del cerebro que controlan los procesos de memoria. Estas especies están presentes en las costas chilenas y deben ser monitoreadas con regularidad y permanentemente. Las diatomeas tóxicas tienen formas alargadas (se les denomina *diatomeas pennadas*), son muy pequeñas y para su identificación taxonómica debe usarse el microscopio electrónico de barrido, aunque ciertos rasgos característicos pueden ser apreciados con un buen microscopio de campo luminoso dotado de contraste de fase. Existen otros géneros de diatomeas (*Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Leptocylindrus*) que han cobrado

relevancia con el aumento de la piscicultura, técnica con la que se crían peces en espacios confinados en el medio marino. Estas diatomeas de formas aguzadas, al proliferar en un espacio limitado, dañan las branquias de los peces en cultivo, causándoles hemorragias, infecciones y eventualmente la muerte.

### Capítulo 3. Floraciones de algas nocivas en Chile.

Los fenómenos de marea roja han sido observados en Chile desde el siglo pasado, reportándose casos en aguas oceánicas y costeras. En 1827 (ver Avaria, 1992 y Uribe, 1992) se informaron discoloraciones del agua frente a las costas de Valdivia (Poëppig) y en 1835 Charles Darwin (The Voyages...) describió vívidamente dos eventos, uno frente a Concepción y otro frente a Valparaíso. El primero había ocurrido pocos días después que un violento terremoto asolara la ciudad de Concepción en 1835. Estudios posteriores han informado acerca de un centenar de eventos de discoloración del agua en las costas de Valparaíso, Antofagasta, Chiloé insular y continental y Magallanes. La mayoría de ellos han sido inocuos, pero desde 1972 a la fecha se han sucedido con frecuencia y extensión mayores, aumentos de la presencia de dinoflagelados tóxicos en las regiones de Llanquihue, Aysén y Magallanes, no siempre asociados a discoloraciones. Una pequeña microalga (*Raphidophyceae*) llamada *Heterosigma akashiwo* produjo en 1988 una mortandad masiva de salmones de cultivo en el área de Puerto Montt y Chiloé que implicó una pérdida de varios millones de dólares a la industria local.

En Chile hay por lo menos dos especies tóxicas de importancia que pertenecen a los géneros *Alexandrium* y *Dinophysis* (Figura 2). Una se denomina *Alexandrium catenella* y, como su nombre lo indica, forma cadenas de hasta 70 células en su medio natural. (Figura 1) Su metabolismo produce toxinas muy potentes denominadas *saxitoxinas* que bloquean los impulsos nerviosos, causan parálisis en los intoxicados y pueden ser letales. La otra especie se llama *Dinophysis acuta* (Figura 2.f), es unicelular y produce toxinas que en muy baja concentración alteran la permeabilidad del tracto digestivo y producen severas diarreas. Las intoxicaciones humanas se producen por consumo de moluscos bivalvos filtradores que han acumulado estas microalgas como parte de su dieta habitual.

Debe tenerse presente asimismo que crustáceos filtradores como los picorocos, pueden ocasionar intoxicaciones y otros moluscos gasterópodos carnívoros como el loco, también pueden contener niveles de toxinas de riesgo para el consumo humano. En el caso del loco las toxinas se incorporan como consecuencia de que en su alimentación pueden incluir de moluscos bivalvos tóxicos.

En la Tabla II modificada de Avaria (1992) se indican las especies dañinas o potencialmente nocivas del fitoplancton marino de las costas chilenas.

**Tabla II. Especies demostradamente nocivas del fitoplancton marino de Chile.**

- *Heterosigma akashiwo* (para la salmonicultura).
- *Alexandrium catenella* (especie productora de toxinas paralizantes; afecta a moluscos bivalvos y gasterópodos).
- *Dinophysis acuta* (especie productora de toxinas diarreicas; afecta a moluscos bivalvos).

**Especies potencialmente nocivas del fitoplancton marino de Chile.** (según Avaria, 1992; no se ha demostrado toxicidad asociada en nuestro país pero sí en otras partes del mundo ni tampoco efectos mecánicos deletéreos).

- (para la salmonicultura) *Chaetoceros convolutus*, *Cerataulina pelagica*, *Leptocylindrus minimus*, *Skeletonema costatum*,
- (para vertebrados superiores) *Alexandrium ostenfeldii*, *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis fortii*, *Dinophysis rotundata*, *Dinophysis tripos*, *Gonyaulax polyhedra*, *Gymnodinium catenatum*, *Gymnodinium splendens*, *Prorocentrum micans*, *Prorocentrum gracile*, *Ceratium tripos*, *Ceratium furca*, *Scrippsiella trochoidea*, *Noctiluca scintillans*.

Son de especial preocupación algunas diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* que son productoras de ácido domoico, sustancia causante de la intoxicación amnésica de los mariscos.

### **3.1 Factores que contribuyen a la formación de un FAN.**

La mayoría de los dinoflagelados, incluyendo a las especies tóxicas, pueden reproducirse por división simple (asexuada) con relativa lentitud (desde dos veces por día hasta una vez cada cinco días). Esto permite que de unas pocas células en el medio natural se llegue a producir una floración masiva al cabo de pocos días. La concentración de células que genera un cambio de color en la columna de agua es cercana al millón de células por litro. Esto se alcanza por dos mecanismos generales: a) el incremento del crecimiento biológico que es estimulado por regímenes apropiados de nutrientes, luz, temperatura y salinidad y, b) mecanismos físicos que favorecen la concentración de las células en parches de agua definidos, como vientos suaves o ausentes, lluvias y *estratificación* de la columna del agua. Es así como la literatura indica que en varios lugares del planeta las áreas afectadas por floraciones de algas nocivas corresponden a zonas o *frentes* que delimitan espacios de *surgencias* y espacios donde se producen fenómenos de acumulación pasiva. Estos frentes son a su vez generados por diferencias marcadas en la densidad del agua, por la presencia de corrientes o por una combinación de estos factores. La situación que se observa en los fiordos y canales chilenos no se ajusta a este modelo, no obstante que es posible apreciar con frecuencia una columna de agua muy estratificada como consecuencia de la incorporación de aguas de lluvia, ríos y fusión de hielos. Es necesario hacer notar que el medio marino no es homogéneo y pueden encontrarse grandes volúmenes de aguas más o menos densas, de mayor o menor salinidad y con marcadas diferencias de temperatura y salinidad a medida que aumenta la profundidad.

## Capítulo 4. Las toxinas marinas y sus efectos fisiológicos.

La comprensión de los efectos tóxicos de las ficotoxinas requiere revisar algunos aspectos básicos de la estructura y componentes de la célula.

### 4.1 Receptores y canales iónicos.

Todas las células de los organismos *eucariontes*, entre los que se encuentra el ser humano y otros mamíferos y aves que pueden ser consumidores de transvectores de toxinas marinas, poseen una membrana externa que envuelve como en una pequeña bolsa microscópica al citoplasma que contiene al núcleo (que lleva la información genética) y a otros organelos que cumplen funciones especializadas. Las células del organismo humano tienen variadas formas y existen tipos diversos y numerosos que cumplen funciones altamente especializadas. Entre esas funciones encontramos la contracción muscular en los músculos esqueléticos y cardíaco, la secreción de hormonas en las glándulas endo- y exocrinas, el transporte de solutos para su asimilación en el intestino o para su eliminación en el tejido renal, o la percepción de la luz y el sonido y la transmisión de los impulsos nerviosos (Albers y cols., 1996).

En esta gran diversidad de formas celulares se distinguen componentes estructurales proteicos de la membrana celular que son comunes a todas las células. Estos componentes son proteínas de alto peso molecular que están alojados en la membrana externa.. Estas proteínas ponen en contacto el exterior de la célula con su interior. Entre ellos se encuentran los **receptores** y los **canales iónicos**.

Los receptores, como su nombre lo sugiere, son proteínas capaces de distinguir y unir a su estructura a compuestos químicos específicos (**ligandos**) que circulan naturalmente en el medio externo celular. Entre ellos se encuentran hormonas como la *insulina* o la *adrenalina* y

neurotransmisores como la *acetilcolina* y el *ácido glutámico*.

Esta interacción, en la que el ligando reconoce un sitio de unión como una llave puede “reconocer” su cerradura, produce en la proteína receptora minúsculos cambios estructurales (denominados *cambios conformacionales*) que se pueden reflejar en otros cambios importantes en las propiedades de las células, como la activación de una reacción química interna o la apertura de un poro o canal microscópico que deja pasar iones, agua o nutrientes.

Las toxinas marinas afectan principalmente dos propiedades esenciales para las células y los seres vivos. En primer lugar alteran la *permeabilidad* de las membranas celulares, esto es, la propiedad fisiológica de dejar pasar selectivamente a los iones de importancia (sodio, potasio, calcio o cloruro), a ciertos nutrientes y al agua. En segundo lugar, afectan la *intercomunicación* entre las células en vertebrados al unirse con alta afinidad a los sitios receptores presentes en proteínas de membrana (receptores y canales iónicos) o a enzimas del citosol, alterando en todos los casos su funcionamiento normal.

#### **4.2 Toxinas del canal de sodio.**

Las toxinas paralizantes, neurotóxicas y ciguatéricas alteran específicamente el transporte del ión sodio, pues son capaces de unirse fuertemente a la proteína de membrana denominada **canal de sodio** que está presente, con pequeñas variaciones estructurales, en casi todas las células de mamíferos, aves, peces y anfibios y también en invertebrados como los moluscos bivalvos (Hille, 1992). Son numerosas las toxinas capaces de unirse al canal de sodio y afectar su funcionamiento. Estas toxinas se dividen en **toxinas bloqueadoras** del canal que impiden el paso de iones sodio (Figura 3, panel superior), entre las que se encuentran saxitoxinas, tetrodotoxina y toxinas de caracoles marino, y en **toxinas activadoras**, que favorecen el paso de iones sodio a niveles



superiores a los que ocurren en estado fisiológico normal (brevetoxinas, ciguatoxina, toxinas de anémonas y de sapos venenosos).

El bloqueo del canal de sodio acarrea consecuencias gravísimas para el funcionamiento celular, siendo el principal la inhibición de los *potenciales de acción* que son las señales eléctricas que mantienen en funcionamiento toda nuestra actividad nerviosa superior y vegetativa y la comunicación sináptica. En ausencia de apoyo respiratorio intensivo, la muerte ocurre por parálisis respiratoria, compromiso cardíaco y del sistema nervioso central.

Los efectos de las **toxinas activadoras** del canal de sodio no son letales pero pueden discapacitar a un paciente grave. La activación del canal de sodio produce el efecto contrario al de su bloqueo. A saber, se genera una hiperexcitabilidad nerviosa que se expresa (fuera de problemas gástricos bastante frecuentes), como síntomas de hormigueo, *parestesias*, alteraciones del equilibrio y contracturas. Esto es producido en parte por un aumento de la actividad sináptica en los puntos de contacto entre nervios y músculos. La más severa de las intoxicaciones es la producida por la **ciguatoxina** (felizmente no observada en nuestro país, incluyendo Isla de Pascua), que es un conjunto de compuestos sintetizados por un pequeño dinoflagelado desnudo (*Gambierdiscus toxicus*) que se deposita sobre las algas marinas (es un organismo *epibéntico*, “sobre el bentos”). Estas algas son el alimento habitual de peces hervíboros como jureles, sierras y barracudas (los peces más deliciosos de los mares tropicales) que acumulan la ciguatoxina en músculos e hígado, sin sufrir problemas aparentes. El consumo de un pez *ciguato* (en la terminología vigente en el Golfo de México y Cuba) produce graves desórdenes intestinales a las pocas horas y el desarrollo de complejos síntomas neurológicos entre los que se destaca singularmente la reversión de la sensación de temperatura: un objeto metálico frío como un bolígrafo, es percibido con sensación de quemadura.

La gravedad de la *ciguatera* estriba en que los síntomas se hacen sentir de por vida de manera recurrente. Sólo existe un tratamiento paliativo descubierto por el Dr. Neil Palafox de las Islas Marshall de la Polinesia, que consiste en la administración de manitol, un carbohidrato, que parece mitigar las descargas sinápticas. Síntomas parecidos pero sin los efectos de larga duración de la *ciguatera* son producidos por las brevetoxinas producidas por dinoflagelados muy comunes en las costas de la península de Florida (*Gymnodinium breve*) y que constituyen un grave problema para la industria turística local.

#### **4.3 Toxinas diarreicas.**

El efecto diarreigénico de estas toxinas que son derivados del ácido okadaico (Figura 3; panel central), es consecuencia de la inhibición que causan en la fosforilación de proteínas esenciales para el control de la permeabilidad del epitelio intestinal. En condiciones fisiológicas normales esas proteínas y enzimas deben mantenerse fosforiladas y así la absorción de nutrientes y las secreciones intestinales se mantienen balanceadas. En el caso de una enteritis bacteriana o en el cólera, la permeabilidad del intestino grueso a la salida de agua y electrolitos aumenta varios órdenes de magnitud y el organismo se defiende de la infección activando la eliminación energética de las deposiciones con gran pérdida de fluidos. Si no se le restituyen al paciente el agua y los electrolitos puede sobrevenir su muerte por deshidratación. En el caso del cólera la administración oportuna de antibióticos y de electrolitos permite la recuperación de la gran mayoría de los enfermos. Si esa atención no se presta a tiempo, el cólera puede causar la muerte de hasta el 40% de los afectados. Las toxinas diarreígenas reproducen algunos de los efectos de las intoxicaciones entéricas comunes y por ello sus síntomas no son fácilmente distinguibles si no hay una detallada historia clínica del paciente que incluya el tipo de alimentos que se hayan consumido en horas recientes. Los cuidados requeridos

son similares.

Las toxinas diarreas principales son potentes inhibidores de las serina/treonina proteína fosfatasa PP-1 y PP-2A. Estas importantes enzimas tienen por función disminuir el grado de fosforilación de proteínas y otras enzimas, lo que incide directamente con su funcionamiento en condiciones fisiológicas. Esto ocurre en concierto con otras importantes enzimas, las proteína kinasas que hacen lo contrario, es decir fosforilan. Los procesos de fosforilación y desfosforilación constituyen, por lo tanto, eventos pivotaes en la regulación celular. Entre las toxinas diarreas se encuentran, fuera del ácido okadaico, sus derivados dinophysistoxina 1 y 2 (DTX-1, DTX-2) y varios más y otros compuestos como nodularinas y caliculina A, que provienen de bacterias tóxicas de aguas dulces. Estos compuestos químicos poseen estructuras disímiles, pero se unen de manera reversible al mismo *sitio activo* de la subunidad catalítica de las proteína fosfatasa (las microcistinas lo hacen de manera covalente al mismo sitio). El ácido okadaico y sus derivados han sido asociados a la intoxicación diarrea de los mariscos, pero a pesar de la gravedad de esta intoxicación, su mecanismo de acción no se ha estudiado en profundidad. Estudios muy recientes realizados en células intestinales en cultivo indican que, a diferencia de otros agentes diarreígenos, el ácido okadaico y la dinophysistoxina-1 no estimulan la secreción de cloruro sino que incrementan la permeabilidad paracelular sin signos agudos de citotoxicidad. Una consecuencia de estos estudios es que la comprensión de la acción fisiológica de toxinas marinas y la mitigación de sus efectos requiere conocer a nivel celular y molecular cuáles son sus sitios receptores y sus propiedades.

#### **4.4 Toxina amnésica.**

Los primeros efectos registrados de la **toxina amnésica** ocurrieron en 1988 en Prince

Edward Island en el este de Canadá, cuando un centenar de visitantes del lugar sufrieron los primeros síntomas de una nueva intoxicación por consumo de moluscos bivalvos. Los problemas neurológicos asociados y el dramático estado de estupor y amnesia que presentaron los pacientes más graves, llevó a la rápida acción conjunta de expertos de universidades y del sistema de salud canadiense que logró dilucidar en sólo seis meses la naturaleza de este nuevo agente tóxico. Se descubrió que el principio tóxico era el ácido domoico (Figura 3; panel inferior), un compuesto de estructura parecida a la del ácido kaínico, un neurotransmisor natural del sistema nervioso central. Como este último, el ácido domoico se une con alta afinidad a **receptores de glutamato** (tipo kainato) que están presentes en alta proporción en neuronas del hipocampo y que son responsables del procesamiento de la memoria. El ácido domoico activa estos receptores, abriendo un canal iónico que deja pasar al interior de la neurona altas concentraciones del ión calcio, el que sobre ciertos niveles es muy tóxico para todo tipo de células. La entrada de calcio a las neuronas del hipocampo produce su destrucción y la pérdida de la memoria de corta duración en los sujetos intoxicados. Esta neurodegeneración puede ser irreversible lo que causa que los pacientes más graves queden discapacitados de por vida. Esta es quizás la intoxicación más dramática observada.

#### **4.5 Efectos fisiológicos de toxinas marinas sobre los moluscos transvectores.**

Una pregunta aún no respondida completamente en estudios de laboratorio, es aparentemente muy obvia: si las microalgas tóxicas y las toxinas acumuladas en moluscos transvectores pueden impactar de manera tan severa a seres humanos, otros vertebrados marinos y aves, ¿Cómo se explica que los moluscos no revelen efectos tóxicos aparentes?. Los estudios sobre los efectos fisiológicos de toxinas marinas son escasos y los de mayor interés fueron realizados por la fisióloga norteamericana Betty M.Twarog entre 1967 y 1975 (Twarog y cols.,

1972 y Twarog y Yamaguchi, 1974). En estas investigaciones se descubrió que los nervios de choritos (*Mytilus edulis*) y ostiones (*Placopecten magallanicus*) eran insensibles a la aplicación de altas concentraciones de saxitoxina y tetrodotoxina (0,1 mg/mL), las que en vertebrados superiores habrían causado el total bloqueo de los impulsos nerviosos. Por el contrario, otra especie de bivalvo, la ostra *Crassostrea virginica*, mostró una sensibilidad muy alta y los impulsos nerviosos fueron bloqueados por saxitoxina, mientras que la almeja *Mya arenaria* tuvo una sensibilidad intermedia. La explicación *todavía parcial* de estas observaciones tuvo que esperar unos 15 años cuando se descubre que existen canales de sodio de muy diferente afinidad por saxitoxinas y tetrodotoxina y que en moluscos la excitabilidad de nervios y músculos depende de flujos de calcio a través de canales de calcio que son insensibles a las toxinas paralizantes.

## **Capítulo 5. Métodos de detección de toxinas marinas.**

La intoxicación por toxinas marinas se produce en los seres humanos por la ingesta de moluscos o peces que han acumulado las sustancias tóxicas en sus tejidos. Los casos de efectos nocivos por exposición accidental a las microalgas tóxicas o a las toxinas disueltas en el agua son menos frecuentes y de menor severidad, aunque pueden ser muy molestos para pescadores o bañistas. Por ello, las principales metodologías disponibles analizan la presencia de toxinas en extractos de los tejidos de mariscos o peces transvectores. Las toxinas marinas a las que nos referimos, son moléculas de pequeño tamaño y se encuentran normalmente en muy bajas concentraciones. Esto conspira con la posibilidad de detectarlas de manera precisa con métodos simples y confiables y son un desafío técnico para los analistas químicos. Es una regla común que los métodos que permiten detectar cantidades muy pequeñas de una sustancia son, por lo general, de alta complejidad. Además cuando una técnica analítica debe ser muy específica para distinguir una pequeña molécula tóxica de muchas otras que están presentes y que son inocuas, puede dejar de detectar otros compuestos químicos de diferente estructura que también pueden ser tóxicos. Luego, una alta sensibilidad de un método se consigue, en general, con una alta complejidad técnica. Una alta especificidad de una técnica puede “dejar pasar” compuestos diferentes también tóxicos.

Entre los métodos conocidos a la fecha se pueden distinguir: ensayos biológicos o bioensayos, ensayos bioquímicos y técnicas analíticas cuantitativas. Hemos preferido ilustrar estas técnicas refiriéndonos a métodos establecidos para los tipos de toxinas encontradas en nuestras costas.

### **5.1 Toxinas paralizantes y diarreicas.**

Las intoxicaciones masivas ocurridas en julio de 1927 en la ciudad de San Francisco (E.U.A.), causó la muerte con severos síntomas paralizantes de varias personas. Esto estimuló el inicio de los primeros estudios sistemáticos dirigidos por Karl Friedrich Meyer y Hermann Sommer de la Universidad de California. Estos trabajos demostraron la relación entre la toxicidad de los mariscos y la densidad de la microalga *Alexandrium catenella*. Para la evaluación de la toxicidad estos investigadores utilizaron un ensayo biológico con animales vivos, relacionando la toxicidad de las muestras de mariscos con el tiempo de muerte de ratones después de la inyección intraperitoneal de un pequeño volumen de un extracto acuoso del tejido de los moluscos sospechosos. Estos estudios contribuyeron al desarrollo en los años 50 de un bioensayo que fue adoptado hasta hoy por la mayoría de los servicios de salud del planeta.

## **5.2 El bioensayo ratón.**

Este ensayo validado internacionalmente (AOAC, 1990), está normado en Chile, es obligatorio como herramienta de certificación y es empleado masivamente en los laboratorios de los servicios de salud de las regiones X, XI y XII y en los laboratorios acreditados de la Universidad de Magallanes y de la Universidad de Chile. A pesar de su relativa complejidad y baja sensibilidad, la experiencia ha demostrado que es una herramienta robusta y confiable para garantizar la inocuidad de los potenciales tranvectores de toxinas marinas.

**5.2.1 Detección de Veneno Paralizante de los Mariscos (VPM).** El método aprovecha que las toxinas paralizantes son solubles en agua. De manera resumida, se separan 100 gramos del tejido de los mariscos, se tritura a homogeneidad en una juguera en un volumen de agua acidulada con una pequeña cantidad de ácido clorhídrico; se hierve la suspensión por cinco minutos, se deja decantar los residuos sólidos y enfriar la solución. Se inyecta 1 mililitro de la solución al

peritoneo a cada uno de 3 ratones de 20 gramos. Estos ratones son producidos por el Instituto de Salud Pública de Chile y corresponden a una cepa especial denominada CF-1 que presenta propiedades biológicas homogéneas y constantes en el tiempo. Después de la inyección se anota el tiempo en el cual se produce la muerte eventual de los ratones, observando hasta un período de una hora. El tiempo de muerte se relaciona inversamente con la toxicidad del extracto. La toxicidad se establece inyectando a otros ratones cantidades conocidas de saxitoxina, la sustancia química más tóxica de este grupo de compuestos, de acuerdo a una tabla de relación dosis-tiempo de muerte establecida por Sommer en 1950 (AOAC, 1990). Este compuesto es enviado de manera gratuita por el Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos exclusivamente a los laboratorios acreditados. La norma establece que una muestra es inocua si la estimación de toxicidad no supera los 80 microgramos de saxitoxina equivalente por cada 100 gramos de carne de marisco. En el sur de Chile se han encontrado mariscos (cholgas y choritos) con más de 10.000 microgramos de saxitoxina equivalente. El consumo de una sola de esas cholgas podría matar a una persona de 70 kg en pocos minutos.

**5.2.2 Detección de Veneno Diarreico de los Mariscos (VDM).** El método aprovecha la propiedad de las toxinas diarreicas de ser solubles en aceites y solventes orgánicos. En este caso se separa el aparato digestivo de mariscos llamado hepatopáncreas, se trituran 20 gramos y se extraen las toxinas con solventes orgánicos como acetona. La solución de extracción se evapora hasta casi sequedad y el residuo se disuelve en un pequeño volumen de una solución acuosa que contiene un detergente. Se inyecta 1 ml al peritoneo de 3 ratones CF-1 de 20 gramos y se les mantiene en observación por 24 horas. La norma aceptada en nuestro país indica que una muestra es tóxica si se mueren dos de tres ratones dentro de las 24 horas.



### 5.3 Detección de toxinas paralizantes, diarreicas y amnésicas por cromatografía líquida de alto rendimiento (técnica HPLC). Principios generales.

Uno de los procedimientos de mayor sensibilidad y poder de resolución es la técnica HPLC y se utiliza para la identificación y cuantificación de toxinas paralizantes, diarreicas y amnésicas, entre otras. Su principio de funcionamiento se basa en dos viejas observaciones, probablemente realizada muchas veces por el mismo lector. Una de ellas es la capacidad de ciertos materiales (sustratos) de absorber paulatinamente por capilaridad un solvente. Si el lector coloca el extremo de una mecha de una lámpara en el aceite, observará que el solvente comenzará a humedecer el material hasta llegar al otro extremo. La otra observación es la capacidad del solvente de **separar** otras sustancia a medida que avanza en el sustrato. Si el lector coloca una gota de tinta cerca del extremo de la mecha, *antes de sumergirla en el aceite*, observará que el aceite al embeber la mecha, desplazará a la mancha coloreada y, probablemente, la separará en algunos componentes. Esto puede hacerse también colocando el borde de una cinta de papel secante en un pocillo que contenga jugo de zanahoria. A medida que el agua humedezca el papel, se observará que varias manchas coloreadas avanzarán y quedarán repartidas a distintas distancias. Esta separación de colores o *cromatografía* es el nombre clásico del fenómeno descrito y es el fundamento de las modernas técnicas HPLC. En este caso, los sustratos son columnas metálicas de diámetro variable (de pocos milímetros hasta varios centímetros) que contienen de manera compactada un polvo muy fino. El instrumento permite hacer circular solventes a lo largo de la columna de manera muy controlada y reproducible. El método aprovecha la propiedad de todas las sustancias químicas de migrar a lo largo de un sustrato como el descrito con distinta facilidad, mostrando distintos tiempos para recorrer un segmento de la

columna cromatográfica. Estos diferentes *tiempos de retención* en la columna, es lo que se aprovecha ingeniosamente para detectar en el extremo de salida de la columna, las sustancias que vayan saliendo primero. Es así como puede añadirse un pequeño volumen de muestra al comienzo de la columna (por ejemplo, 10 microlitros o millonésimas de litro; una gota de agua corresponde a cerca de 20 microlitros), detectándose sus componentes a la salida por métodos ópticos. La identidad y cantidad de cada componente en una muestra desconocida se determina realizando controles en los que se agregan a la columna HPLC, concentraciones conocidas de sustancias de referencia (o estándares) puros.

La técnica HPLC para venenos paralizantes y diarreicos fue desarrollada con gran perfección en el Japón por los Dres. Takeshi Yasumoto y Yasukatsu Oshima. Ellos pudieron identificar más de 22 saxitoxinas de estructura muy relacionada en el Veneno Paralizante pero con grandes diferencias en la toxicidad de cada una de ellas.

Esto es análogo a lo encontrado en Veneno Diarreico que también contiene varios derivados del ácido okadaico. Es importante destacar que los Venenos Paralizantes y Diarreicos (como la mayoría de los venenos naturales), son mezclas complejas de varios componentes cuyas proporciones varían para cada especie de microalga tóxica y dentro de cada especie en dependencia de las condiciones ambientales. El problema adquiere más complejidad cuando se advierte que cada especie de marisco, a su vez, puede modificar la mezcla original de componentes tóxicos, generando un nuevo “cóctel” que puede ser aún más tóxico que la mezcla originalmente filtrada por el molusco. En el caso del Veneno Amnésico, la metodología HPLC involucrada es relativamente más simple y tiene un nivel de detección suficiente para cumplir las normas sanitarias (<0.2 microgramos de ácido domoico por gramo de tejido). El nivel regulatorio

es de 20 microgramos/gramo.

#### **5.4 Radioensayo para la detección de toxinas paralizantes.**

Esta técnica se basa en la unión de muy alta afinidad de las toxinas paralizantes (saxitoxinas) a la molécula canal de sodio. Esta afinidad se produce por la fuerte interacción de tipo “llave y cerradura” que se produce entre el ligando saxitoxina y una región pequeña (sitio de unión) del canal de sodio. Esta fuerte interacción es duradera y cierra el poro o canal, impidiendo el paso de los iones sodio desde el exterior al interior de las células. Este bloqueo inhibe la generación y la conducción de los impulsos nerviosos.

En este método los canales de sodio se “marcan” primero con una saxitoxina radioactiva. Si el extracto de la muestra de mariscos contiene saxitoxinas naturales, estas moléculas van a competir y desplazar a su análogo radioactivo ligados al canal de sodio, por estar en mayor cantidad. En ese caso, los canales de sodio van a perder la marca radioactiva y la radioactividad detectable será muy baja. Si el extracto no contiene saxitoxinas, el canal de sodio se mantendrá marcado y su radioactividad será relativamente elevada. Las emisiones radioactivas se miden en un “contador de centelleo”, equipamiento habitual en hospitales y clínicas donde es usado en radioinmunoensayos hormonales, por ejemplo. Esta técnica es mil veces más sensible que el bioensayo ratón y puede aplicarse a decenas de muestras simultáneas. Se ha empleado sistemáticamente en el Laboratorio de Toxinas Marinas, desde agosto de 1995 para monitorear niveles de saxitoxinas en todo el litoral chileno.

#### **5.5 Ensayo colorimétrico para toxinas diarreicas.**

Esta técnica está basada en la propiedad de las toxinas diarreicas ácido okadaico y algunos de sus derivados, de inhibir a muy bajas concentraciones la actividad de enzimas

denominadas *serina-treonina proteina fosfatasas*. Estas fosfatasa cumplen la importante función de eliminar grupos fosfato de otras proteínas y enzimas, actuando de conjunto con otras enzimas, las *fosfokinasas*, que hacen lo contrario, esto es, adicionan grupos fosfato. El grado de fosforilación de proteínas, enzimas y canales iónicos, es un aspecto esencial en el balance de la actividad metabólica celular.

En esta método se utiliza una proteína fosfatasa pura obtenida por técnicas recombinantes. Si esta enzima se deja actuar frente a un sustrato que está fosforilado en ausencia de inhibidores, va a eliminar todos los grupos fosfatos existentes en el sustrato. Estos aniones fosfato liberados dan una reacción química coloreada fácilmente visible. Si la enzima es inhibida por las toxinas diarreicas, se producirán menos aniones fosfato libres y habrá menor desarrollo del color. Luego, una muestra muy tóxica dará un producto de reacción incoloro, mientras que una muestra inocua generará un producto de reacción coloreado. De esa manera se pueden cuantificar niveles de toxinas diarreicas que están hasta 1000 veces por debajo del límite regulatorio de 0.2 microgramos por gramo de tejido.

## **Capítulo 6. La sanidad de los alimentos marinos y las regulaciones nacionales e internacionales.**

El aumento de las exportaciones de productos del mar ha mostrado aumentos sostenidos en los últimos años. En ese período, el aumento en la incidencia de las floraciones de algas nocivas y la mayor sensibilidad de la población ante los riesgos ecológicos, a las amenazas a la calidad del ambiente y de la vida en general, han impulsado el desarrollo e implementación de normativas y de leyes para regular la explotación del mar y garantizar la calidad e inocuidad de los productos alimenticios de origen marino. Nuestro país no ha estado al margen de ese proceso que ocurre a escala planetaria.

### **6.1 Regulaciones para el consumo nacional.**

El Ministerio de Salud y los Servicios de Salud Regionales son depositarios de la potestad jurídica para fiscalizar la extracción, comercialización y consumo local de alimentos marinos. En el caso de mariscos transvectores, los Servicios de Salud tienen atribuciones para establecer zonas de veda a la extracción y comercialización de mariscos, decomisar y denaturalizar partidas sospechosas, clausurar locales de venta e iniciar los sumarios sanitarios correspondientes. La veda más extensa y duradera fue establecida por el Servicio Regional de Aysén en abril de 1992 y abarca desde el paralelo 44 sur (desde las Islas Guaitecas por el norte), continuándose con una resolución análoga emitida por el Servicio de Salud Magallanes en marzo de 1992. Estos cierres que protegen a la salud de las personas, afectan negativamente a todo el circuito comercial, desde los pescadores artesanales que obtienen de la extracción de mariscos una parte muy importante de su sustento, hasta los industriales procesadores y exportadores, pasando por restaurantes y sitios de atracción turística. Las resoluciones de veda mencionadas establecen un número

limitado de sitios desde los cuales es aún posible la extracción y están fundamentadas por extensos y arriesgados monitoreos de la toxicidad de transvectores que se realizan en decenas de puntos remotos de las regiones XI y XII durante todo el año. Esta costosa acción del Estado explica en gran parte la ausencia en los últimos 10 años de intoxicaciones masivas que lamentar.

## **6.2 La regulación de la exportación de alimentos de origen marino.**

En el período mencionado, aumentaron considerablemente las regulaciones internacionales a las que deben someterse los países exportadores. Las más rigurosas provienen de las normas específicas del Tratado constitutivo de la Comunidad Europea (CE), en las que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de productos pesqueros. El 25 de noviembre de 1996 la CE adoptó dos importantes decisiones. La Decisión 96/674 en la que “se adoptan las condiciones particulares de importación de productos de pesca originarios de Chile” y la Decisión 96/675 en la que “se fijan las condiciones especiales de importación de moluscos bivalvos, equinodermos, tunicados y gasterópodos marinos originarios de Chile”. Con ambas Directivas se establece que el Servicio Nacional de Pesca (Sernapesca) de Chile será “la autoridad competente de comprobar y certificar la conformidad de los mariscos, de los productos pesqueros y de acuicultura”. En el caso de los mariscos congelados o transformados (en conserva) destinados al consumo humano, éstos deberán proceder de zonas de producción pre-establecidas y autorizadas por Sernapesca. Con estas históricas Directivas la CE ha delegado en un servicio del Estado chileno la facultad de garantizar la calidad e inocuidad de todos los productos de origen marino destinados al consumo humano. Para lograr esa meta, Sernapesca ha establecido programas obligatorios de control de calidad en las empresas, iniciado el proceso de certificación de sitios de acuicultura y piscicultura y un programa nacional de

Sanidad de Moluscos Bivalvos que incluye análisis bacteriológico y de toxinas paralizante, diarreica y amnésica.

## **Capítulo 7. Aspectos epidemiológicos y de salud pública.**

La epidemiología es el estudio de la distribución y de los agentes determinantes de la frecuencia de enfermedades en poblaciones humanas y animales. En el ámbito de las toxinas marinas no existen estudios epidemiológicos propiamente tales y lo reportado en la literatura internacional corresponde a descripciones de eventos tóxicos y de casos. Eso no es diferente en nuestro país, donde los Servicios de Salud regionales, especialmente en las Regiones X, XI y XII han tenido un éxito notable en proteger la salud de la población, aplicando bioensayos a miles de muestras obtenidas en su mayoría desde lugares remotos de difícil acceso, controlando la distribución y comercialización a través de la exigencia de certificados de origen y la instalación de barreras sanitarias.

Como consecuencia de esas políticas y en comparación con las extensísimas zonas vedadas por presencia de mariscos altamente tóxicos, podemos sostener fundadamente que Chile es uno de los países más seguros para garantizar la inocuidad de todos sus alimentos de origen marino y, en particular, de moluscos bivalvos transvectores.

Estas políticas nacionales y los mecanismos de control y fiscalización han sido apropiados para evitar las intoxicaciones agudas, pero la falta de estudios epidemiológicos impide obtener una evaluación, por ejemplo, de los efectos a largo plazo de la exposición a dosis subtóxicas de las toxinas de origen marino en nuestro país. Las consideraciones que exponemos a continuación están restringidas a las intoxicaciones de origen marino demostradas clínicamente en el país. Ellas son la Intoxicación Paralizante (VPM) y la Intoxicación Diarreica de los Mariscos (VDM). Por ser una potencial amenaza incluimos a la Intoxicación Amnésica de los Mariscos (VAM) ya que en nuestras costas existen las especies de diatomeas potencialmente tóxicas y por haberse determinado la presencia de ácido domoico en algunas muestras de mariscos.



La investigación epidemiológica descansa en la observación y obtención de datos más que en la experimentación. Una etapa fundamental para establecer la causa de una epidemiología es determinar un *marcador biológico específico* de la enfermedad y/o de la exposición al agente patógeno. Por ejemplo, una persona que haya sufrido una hepatitis tipo B mostrará en su sangre anticuerpos detectables durante toda su vida. Son conocidos los casos de pacientes que acarrean el virus VIH y que no muestran síntomas. En general, un buen biomarcador debiera ser cuantificable en los flúidos del paciente por métodos accesibles. Para las toxinas marinas no existen (o no se conocen) biomarcadores similares. La única manera a la fecha de estudiar las intoxicaciones por toxinas marinas ha sido su identificación por su presentación clínica (ver Tabla III) y en los últimos 30 años por aplicación de tests de laboratorio a los alimentos ingeridos. Por lo menos tres factores conspiran para no poder investigar hasta ahora su real incidencia en la población humana: a) no existe un diagnóstico específico para las intoxicaciones que requieren atención clínica, b) hay intoxicaciones como la diarreica cuyos síntomas se asemejan al de diarreas producidas por otros agentes y c) no se conocen biomarcadores en pacientes asintomáticos que han estado expuestos a las toxinas. Este es el caso de los habitantes de centros poblados remotos de las regiones X y XI, especialmente, que por razones de supervivencia, deciden consumir mariscos desde zonas contaminadas.

En general, para que un agente patógeno sea declarado causa epidemiológica de alguna enfermedad se requiere que se cumplan varias condiciones:

- La secuencia temporal de eventos debe ser adecuada, esto es, la enfermedad debe suceder a la exposición al agente tóxico.
- Debe existir una relación entre dosis y respuesta; un aumento de la dosis tóxica debe reflejarse en un incremento en la severidad de los síntomas.
- La frecuencia de la enfermedad debe aumentar con el incremento de las exposiciones al agente tóxico.
- Debe haber coincidencia con estudios bioquímicos y farmacológicos.

El estudio epidemiológico debe además **identificar a la población que está en mayor riesgo** de sufrir exposición al agente tóxico (por ejemplo, pescadores artesanales y sus dependientes), definir lo que es un **caso de intoxicación** (descripción de síntomas y otros factores) y medir objetivamente las **exposiciones** al agente tóxico.

Los datos provenientes de la medición de las exposiciones y de los casos tóxicos permiten definir el **programa de vigilancia** que se extiende durante períodos prolongados (años) y que debe incluir por lo menos, la determinación regular de la toxicidad de moluscos en bancos naturales de puntos importantes para la extracción industrial y artesanal y para el consumo local, y el registro detallado de casos sintomáticos leves y de gravedad. Estos últimos datos permiten calcular la *incidencia* de las intoxicaciones (definida como el número de nuevos casos en una población en un período determinado), detectar localidades donde esa incidencia varíe significativamente con respecto al registro histórico y modificar el programa de vigilancia de acuerdo a las tendencias.

Los Servicios de Salud regionales de las regiones X, XI y XII mantienen programas de vigilancia muy extensos desde hace varios años y han acumulado una experiencia valiosísima. Se trata ahora de estudiar si existen consecuencias a largo plazo en poblaciones expuestas a

concentraciones subtóxicas de toxinas marinas. Esto es un problema pendiente para la comunidad biomédica nacional. La Tabla III adjunta resume los aspectos más relevantes de los síndromes de intoxicación por ficotoxinas presentes en alimentos de origen marino.

Tabla III, cerca de este punto.



Tabla III. Síndromes de intoxicaciones causadas por toxinas marinas (actualizado de Fleming y cols., IOC Manual 1995, cap. 24)

|   |  |  |   |   |  |
|---|--|--|---|---|--|
| <b>¡Error!<br/>Marcador no<br/>definido.</b> Intoxicación | Veneno Paralizante de los Mariscos (VPM)   | Veneno Diarreico de los Mariscos (VDM)                   | Veneno Amnésico de los Mariscos (VAM)   | Veneno Neurotóxico de los Mariscos (VNM)                      | ciguatera  |
| organismo causante ( <i>en Chile</i> )                    | dinoflagelados pelágicos ( <i>A. catenella</i> )                                   | dinoflagelados pelágicos ( <i>Dinophysis acuta</i> )     | diatomeas ( <i>Pseudonitschia</i> )   | dinoflagelados pelágicos o béticos                            | dinoflagelado epibético  |
| transvector principal ( <i>en Chile</i> )                 | mariscos   | mariscos   | mariscos  | mariscos  | peces  |
| distribución geográfica                                   | mundial, aguas templadas y tropicales  | mundial, aguas templadas                                 | Canadá, Noroeste de E.U.A., sur de Chile  | Golfo de México y Nueva Zelandia                              | mundial, mares tropicales y subtropicales                            |
| toxinas principales (número)                              | saxitoxinas (22+)  | ácido okadaico y derivados (8+)                          | ácido domoico (3+)  | brevetoxinas (10+)  | ciguatoxinas (8+), maitotoxina                                       |
| acción fisiológica  | bloqueadores de canales de sodio   | inhibición de proteína fosfatasas                        | agonista de receptores de glutamato del sistema nervioso central                      | activador de canales de sodio                                 | activador de canales de sodio y calcio                               |
| tiempo de incubación                                      | 2-60 min   | horas  | horas   | 30 min a 3 h  | horas  |
| duración  | 48 horas   | días   | años  | 48 horas  | años   |
| síntomas agudos   | parestesias, depresión respiratoria y cardíaca, parálisis progresiva, coma, muerte | diarrea, náusea, vómitos, no letal                       | náuseas, diarrea, vómitos, parestesias, depresión respiratoria, pérdida de la memoria | náusea, vómitos, diarrea, broncoconstricción, baja de presión | náuseas, vómitos, diarreas, inversión de la sensación de temperatura |
| síntomas crónicos   | no tiene   | no se conocen  | pérdida de la memoria   | no tiene  | parestesias  |
| tasa de mortalidad  | 1-14 %   | 0%   | 3%  | 0%  | 0.1 - 12%  |
| diagnóstico   | síntomas clínicos, bioensayos, radioensayos, HPLC-FD                               | síntomas clínicos, bioensayos, ensayo bioquímico HPLC-FD | síntomas clínicos, radioensayo, HPLC-UV   | síntomas clínicos, bioensayos, test ELISA                     | síntomas clínicos, bioensayos, test ELISA                            |
| terapia   | apoyo respiratorio, diuréticos   | de apoyo, hidratación                                    | apoyo respiratorio  | de apoyo  | de apoyo, manitol  |
| prevención  | vigilancia, vedas cautelares, difusión   | vigilancia, vedas cautelares, difusión                   | vigilancia, vedas cautelares, difusión  | vigilancia, vedas cautelares, difusión                        | vigilancia, vedas cautelares, difusión                               |

## **Capítulo 8. Resultados de proyectos de investigación y desarrollo realizados en Chile (1994-1998).**

La determinación de toxinas paralizantes (VPM) y diarreicas (VDM) en alimentos de origen marino se realiza en el país en los Servicios de Salud de las regiones X, XI y XII, en el Instituto de Salud Pública de Chile y en los laboratorios acreditados de la Universidad de Magallanes y de Chile. Se aplica el bioensayo ratón que es internacionalmente validado. Los Servicios de Salud del país han tenido un éxito notable en proteger la salud de la población, aplicando los bioensayos a miles de muestras obtenidas en su mayoría desde lugares remotos de difícil acceso. Sin embargo, los bioensayos para VPM y VDM disponibles tienen características opuestas en costos, precisión y rapidez de aplicación, especialmente en el caso de VDM, donde su naturaleza es estrictamente cualitativa y es necesario mantener a los ratones en observación por 24 horas. En el caso de la determinación de VPM, el límite de detección del bioensayo (cerca de 40  $\mu\text{g}$  STX/100g) es muy cercano al nivel regulatorio (80  $\mu\text{g}$  STX/100g) y no permite determinar cambios en la toxicidad de lugares con muy bajos niveles de VPM.

Para los fines de la industria pesquera nacional exportadora, la aplicación sistemática de estas pruebas biológicas en las zonas remotas de extracción o acuicultura no es practicable. Sin embargo, su realización en plantas procesadoras medianas ha sido demostrada como factible mediante la instalación de laboratorios toxicológicos con mínimo equipamiento. La situación es diferente cuando se requiere cuantificar la toxicidad del recurso extraído en terreno y aplicar oportunamente el bioensayo a un gran número de muestras. Era deseable contar con métodos rápidos cuali- y cuantitativos, aplicables a un gran número de muestras simultáneas.

Para contribuir a mitigar los impactos negativos del fenómeno de florecimientos de algas

nocivas, se elaboró y presentó en 1993 un Proyecto del Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDEF) titulado "Tecnologías para la detección rápida de toxinas marinas (Mareas Rojas)". El objetivo general de este proyecto, que fue aprobado e iniciado en enero de 1994, fue *"ofrecer a las instituciones y organismos públicos y privados afectados por el fenómeno de mareas rojas y al sector productivo pesquero amenazado, tecnologías de detección rápida de toxinas marinas naturales para Veneno Diarreico (VDM) y Paralizante de los Mariscos (VPM)"*.

Este proyecto cumplió la mayor parte de los objetivos programados y abrió nuevas posibilidades de investigación y desarrollo así como nuevas formas de transferencia de tecnologías para el control de materia prima en plantas procesadoras. Gracias a los aportes de recursos del FONDEF y del sector privado, de los recursos humanos y materiales de las Universidades de Chile y de Magallanes y del Instituto de Fomento Pesquero, el país cuenta hoy con Laboratorios especializados en las instituciones referidas y un grupo de expertos que ganaron experiencia concreta en el estudio y manejo de los impactos de los FAN en Chile. Las investigaciones realizadas entregaron los primeros perfiles cuantitativos de toxinas marinas en Chile, lograron el establecimiento de una colección de cultivos de dinoflagelados tóxicos en condiciones de laboratorio, el conocimiento de las variables bio-oceanográficas que pueden determinar la aparición de FAN en las costas nacionales y el desarrollo o puesta en marcha de nuevos métodos cuantitativos para toxinas marinas y de metodologías de aplicación en plantas procesadora o en terreno.

El Laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de Chile fue declarado conforme por el Instituto de Salud Pública para realizar análisis de toxinas marinas en marzo de 1995 y, en

esa calidad, el Laboratorio colabora oficialmente desde agosto de 1995 con el Servicio Nacional de Pesca en el "Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos Sernapesca-Comunidad Europea", para la certificación de sitios y de partidas de mariscos para la exportación a Europa, Estados Unidos, los países asiáticos y latinoamericanos. Este trabajo de apoyo técnico a la acción del Estado se efectúa en colaboración con el Laboratorio de Mareas Rojas del Instituto de Fomento Pesquero en Punta Arenas. En este trabajo se ha desarrollado un método de determinación cuantitativa de toxicidad paralizante por radioensayo, aplicable a 40 muestras simultáneas de extractos de tejidos o de fitoplancton que es 1000 veces más sensible que el bioensayo ratón y un método bioquímico para la detección de toxinas diarreicas. Estos métodos de alta sensibilidad pueden determinar cambios en niveles de VPM y VDM muy inferiores al los valores tóxicos y pueden entregar a los interesados: a) Informes de análisis cuantitativos y b) Informes de alerta temprana, ya que mediante un muestreo periódico, se pueden monitorear niveles subtóxicos de toxinas y sus tendencias de cambio, prediciendo así en qué puntos y plazos podría ocurrir un incremento tóxico a los seres humanos.

Como resultado del proyecto FONDEF, en 1994 se instaló un Laboratorio Toxicológico Piloto en la empresa conservera Trans Antartic de la X Región y en septiembre de 1996 otro Laboratorio la empresa Comtesa S.A. de Puerto Chacabuco (XI Region). En ambas empresas se logró el control rutinario exitoso de la materia prima con aumento de la producción de conservas durante años críticos.

## **Capítulo 9. Perspectivas de mitigación de las floraciones de algas nocivas.**

Los esfuerzos por mitigar o combatir las floraciones algales nocivas no pertenecen al ámbito de la ciencia-ficción y, por el contrario, costosos intentos con variadas técnicas de en este



sentido se remontan hacia el año 1930 en los Estados Unidos y Japón (citadas en Rounsefell & Nelson, 1966). Entre las estrategias infructuosas intentadas se encuentran uso de emisiones de radio de alta frecuencia, adición de cloruro férrico, carbón activado, sales de amonio, sulfato cúprico e hipoclorito de calcio y uso de yesos pulverizados como agentes floculantes. En primer experimento a gran escala (y probablemente el único) realizado en 1958 por el Fisheries Services, se dispersó sulfato de cobre pulverizado sobre más de 25 kilómetros cuadrados de zonas costeras de la península de Florida desde aviones de fumigación para combatir la presencia del dinoflagelado *Gymnodinium breve*, principal agente causante de las FAN de Florida y de intoxicaciones neurológicas (Rounsefell & Evans, 1958). Estudios de laboratorio habían indicado que los dinoflagelados eran muy sensibles a la presencia de minúsculas concentraciones de cobre en el medio de cultivo. Los problemas de costo, baja capacidad de control de la dispersión y el posible impacto nocivo a otras especies hicieron inaplicable el procedimiento. La creciente preocupación mundial sobre la potencial toxicidad del cobre (en nuestro parecer, motivada por intereses comerciales) harían hoy inaceptable tal estrategia de mitigación.

Japón y Corea han sido los países en los que, por la importancia de la producción de mariscos para la alimentación de su población, se han invertido ingentes sumas para destruir floraciones de algas nocivas en sitios de extracción o cultivo de moluscos. En la actualidad se aplican arcillas pulverizadas (montmorillonita) arrojadas desde aparatos dispersadores instalados en embarcaciones. El objetivo es flocular las microalgas y llevarlas al fondo. Las arcillas empleadas en Corea provienen de canteras cercanas a los lugares de acuicultura, por lo que su adición al mar representa un riesgo ambiental menor que la presencia de microalgas tóxicas. Estas complejas técnicas han mostrado resultados promisorios en pocos casos. El más notable es

la significativa disminución de la microalga nociva *Cochlodinium* en sitios de acuicultura de ostras en las costas del sur de Corea.

Los estudios para posibilitar el uso de predadores naturales de las microalgas tóxicas se encuentran en sus inicios. Como ha sido en el caso del combate de plagas de parásitos o insectos de plantas superiores de interés alimenticio, las aplicaciones exitosas requieren largas investigaciones previas que determinen las relaciones de interacción entre las microalgas tóxicas y sus potenciales predadores. En ese caso es aún más relevante establecer el impacto ecológico que produciría la introducción de una especie de microalga depredadora sobre otros componentes del fitoplancton y sobre los propios mariscos que se desea extraer.

Un procedimiento diferente que ha logrado resultados en la industria procesadora, ha sido el de disminuir la toxicidad de los mariscos en las plantas de procesamiento mediante lavados y tratamientos de decantación. En España existe un marisco bivalvo llamado *Acanthocardia tuberculatum* L. que puede acumular toxinas paralizantes por largo tiempo por sobre los niveles permitidos. Los estudios realizados en plantas industriales demostraron que los tratamientos lograban disminuir la toxicidad de la parte comestible del marisco por debajo de la norma establecida de 80 µg STX/100 g. Por estas razones la Comunidad Europea emitió una Directiva especial en 1994 que permite la extracción de *Acanthocardia* tóxica desde zonas en veda. Esta Directiva contiene un resumen del proceso industrial al que deben someterse estos productos.

En nuestra opinión, creemos necesario apoyar los estudios científicos y aplicados que permitan a mediano plazo, la generación de aplicaciones factibles y de bajo impacto ambiental para disminuir la densidad o la toxicidad de las microalgas tóxicas.

## Índice de materias

|   |    |
|---|----|
| Prólogo   | 2  |
| Introducción  | 3  |
| Capítulo 1 Mareas rojas y bioluminiscencia.   | 10 |
| 1.1 Aspectos históricos   | 10 |
| 1.2 La expresión “marea roja”   | 15 |
| Capítulo 2 El fitoplancton nocivo.  | 16 |
| 2.1 Dinoflagelados y diatomeas.   | 17 |
| Capítulo 3 Floraciones de algas nocivas en Chile.   | 20 |
| 3.1 Factores que contribuyen a la formación de un FAN.  | 22 |
| Capítulo 4 Las toxinas marinas y sus efectos fisiológicos.  | 23 |
| 4.1 Receptores y canales iónicos  | 23 |
| 4.2 Toxinas del canal de sodio  | 24 |
| 4.3 Toxinas diarreicas  | 26 |
| 4.4 Toxina amnésica   | 28 |
| 4.5 Efectos fisiológicos de toxinas marinas sobre los moluscos transvectores.   | 29 |
| Capítulo 5 Métodos de detección de toxinas marinas.   | 30 |
| 5.1 Toxinas paralizantes y diarreicas.  | 31 |
| 5.2 El bioensayo ratón  | 31 |
| 5.2.1 Detección de Veneno Paralizante de los Mariscos (VPM).  | 31 |
| 5.2.2 Detección de Veneno Diarreico de los Mariscos (VDM).  | 32 |
| 5.3 Detección de toxinas paralizantes, diarreicas y amnésicas por cromatografía líquida de alto rendimiento (técnica HPLC). | 33 |
| Principios generales.   |    |
| 5.4 Radioensayo para toxinas paralizantes.  | 35 |
| 5.5 Ensayo colorimétrico para toxinas diarreicas.   | 36 |
| Capítulo 6. La sanidad de los alimentos marinos y las regulaciones nacionales e internacionales.                            | 37 |
| 6.1 Regulaciones para el consumo nacional.  | 37 |
| 6.2 La regulación de la exportación de alimentos de origen marino.  | 38 |
| Capítulo 7. Aspectos epidemiológicos y de salud pública.  | 40 |
| Capítulo 8. Resultados de proyectos de investigación y desarrollo realizados en Chile (1994-1998).                          | 46 |
| Capítulo 9. Perspectivas de mitigación de las floraciones de algas nocivas.   | 49 |

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| Indice de materias               | 52 |
| Bibliografía                     | 54 |
| Glosario de términos científicos | 56 |
| Agradecimientos                  | 57 |

**Bibliografía.**

Albers, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. “Biología Molecular de la Célula”, 3a edición. Garland Publishing Inc., New York & London. 1994.

AOAC. Paralytic Shellfish Poison. Biological Method. Final Action. En: Hellrich, K. (ed.) Official Methods of Analysis. 15th Edition, pp. 881-882, Sección 959.08. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA.

Avaria, S., Revista de Sanidad de la Defensa Nacional, 9, 99-99 (1992).

*Este volumen de la revista contiene las comunicaciones de un importante simposio sobre mareas rojas en Chile.*

Dale, B. y Yentsch, C.M. Oceanus, 21: 41-49 (1978)

Darwin, C. en “Darwin en Chile (1832-1835) Viaje de un naturalista alrededor del mundo. Edición preparada por David Yudilevich y Eduardo Castro. Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 1996.

Dodge, J.D., en “Dinoflagellates”, ed. by D.L. Spector, Academic Press, capítulo 2, pp. 17-42 (1982).

Fleming y cols., Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraef, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.) *International Oceanographic Commission (IOC) Manual and Guides No. 33, UNESCO 1995*. Capítulo 24. pp. 475-486.

Halstead, B.W., “Poisonous and Venomous Marine Animals of the World”. The Darwin Press Inc. Princeton, New Jersey, 1980.

Hille, B. “Ionic Channels in Excitable Membranes”, Segunda Edición, Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1992.

Hastings, J.W. en 1st International Conference on Toxic Dinoflagellates. Massachussets. Science and Tecnology Foundation, Wakefield, MA; ed. V.R. LoCicero. pp 235-248 (1975).

Huidobro, R., Revista de Sanidad de la Defensa Nacional, 9, 133-138 (1992)

Loeblich, L.A. and Loeblich, A.R. Journal of Plankton Research, 13: 207-224 (1991).

Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraef, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.) *International Oceanographic Commission (IOC) Manual and Guides No. 33, UNESCO 1995*.

*Esta es una referencia insustituible que se puede obtener desde el IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae, University of Copenhagen, Oster Farimagsgade 2D, DK-1353 Copenhagen K, Denmark.*

Marambio, J.C., Fernández, V., López, I., Varnava, C., Igor, R. y Uribe, J.C. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 13: 34-40 (1996).

Palma, S. & Kaiser, K. "Plancton Marino de Aguas Chilenas", Ediciones Universitarias de Valparaiso, (1993). *Esta es una publicación esencial para los que deseen tener una visión de conjunto de este tema para las costas de Chile.*

Rounsefell & Evans, 1958, referencia citada en Roundsefell, G.A. and Nelson, W.R. 1966.

Roundsefell, G.A. and Nelson, W.R. 1966. "Redtide research summarized to 1964 including an anotated bibliography". U.S. Fish and Wildlife Service. Special Scientific Report No 535, 85 pp.

Sournia, A., Chrétiennot-Dinet, M.-J and Ricard, M. J. of *Plankton Res.* 13: 1093-1099 (1991).

Steidinger, K.A. *CRC Critical Reviews of Microbiology*, 3: 49-68 (1973)

Sweeney, B.M. Bioluminiscent dinoflagellates. *Biol. Bull.* 125: 177-181 (1963).

Taylor, F.J.R. en "The Physiological Ecology of Phytoplankton", ed. by I. Morris, U. California Press, Capítulo 1, pp. 3-55, 1980.

Twarog, B.M., Hidaka, T., y Yamaguchi, H. *Toxicon*, 10: 273-278 (1972)

Twarog, B.M. y Yamaguchi, H. en 1st International. Conference on Toxic Dinoflagellates. Massacchussets. Science and Tecnology Foundation, Wakefield, MA; ed. V.R. LoCicero. pp 381-393 (1974).

Tomas, C.R. "Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates". Academic Press, Inc. London. (1996)

Uribe, J.C. *Revista de Sanidad de la Defensa Nacional*, 9, 100-104 (1992)

van den Hoek, C., Mann, D.G. y Jahns, H.M. "Algae: an introduction to phycology", Cambridge University Press, Cambridge, U.K. (1995)

Vancouver, G., en "*A Voyage of Discovery to the North Pacific Ocean, and Round the World*", publicado en 1798.

Yasumoto, T. y Murata, M. "Marine Toxins". *Chemical Reviews*, 93: 1897-1909 (1993).

## Glosario de términos científicos

*organismo bentónico*: organismo que vive en el fondo de los hábitats acuáticos (en oposición a lo que vive suspendido en el agua, organismo pelágico).

*organismo autotrófico*: con la capacidad de sintetizar sustancias orgánicas a partir de sustratos inorgánicos, usando energía lumínica o química.

*organismo heterotrófico*: organismos que presenta formas autotróficas y fagotroficas de alimentación.

*organismos fagotrófico*: que se alimenta de partículas sólidas de alimento que son acumuladas en una vacuola a menudo con ayuda de pseudopodios.

*organismo saprotrofico*: que se alimenta absorbiendo sustancias que son previamente degradadas parcialmente fuera del organismo.

*organismo eucariote*: con las características de los Eucariotes, a saber, con núcleo, mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y flagelos con estructura 9 + 2.

*organismo procariote*: que posee las características de los Procariotes, a saber, ADN y tilacoides libres en el citoplasma, ausencia de membrana nuclear o de cloroplastos, ausencia de mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplasmático.

*zona estuarina*: una bahía o cuerpo de agua encerrado que normalmente presenta un influjo de agua fresca.

*zona nerítica*: el área de la plataforma continental donde el fondo del mar no está a más de 200 metros de profundidad.

*quiste*: una célula protegida de condiciones adversas (sequía, frío, calor, falta de nutrientes) por una gruesa pared.

*surgencia*: corriente ascendente de agua normalmente rica en nutrientes que se producen en mares y lagos.

## **Agradecimientos.**

Esta publicación es uno de los resultados del Proyecto FONDEF 2-37 “Tecnologías para la detección rápida de toxinas marinas” financiado por CONICYT y otorgado en 1994 a un equipo interdisciplinario de investigadores de la Universidad de Chile, el Instituto de Fomento Pesquero y la Universidad de Magallanes.

Deseamos agradecer especialmente a los colegas del Servicio de Salud Magallanes, Dres. Gabriel González, Rubén Vergara, Rolando Igor y a su equipo de profesionales. A los colegas del Servicio de Salud Aysén, Rubén Fernández y Ximena Azurmendi, a su equipo de profesionales y al Director Regional de Salud Dr. Jorge Montecino. A los colegas del Servicio de Salud Llanquihue, Dra. Clara Kieguel y Ximena González.

Nuestro reconocimiento a los colegas del Instituto de Salud Pública de Chile, Dres. Sergio Romero y Oriasis Villaruel, por su guía y apoyo científico permanente. A los colegas del Ministerio de Salud, Departamento de Programas del Ambiente, Dres. Julio Monreal y Jaime Cornejo.

Nuestro reconocimiento a las profesionales del Departamento de Sanidad Pesquera, Sras. Inés Montalva y Ruth Alarcón, que posibilitaron de manera fundamental el respaldar técnicamente la acción del Estado.

Destacamos y agradecemos el apoyo científico inestimable de los Dres. Sherwood Hall (U.S. Food and Drug Administration), Donald M. Anderson (Woods Hole Oceanographic Institution), Gregory Doucette (National Ocean Service), Allan Cembella (National Research Council Canada) y Beatriz Reguera (Instituto Oceanográfico de Vigo).

Al Dr. Patricio Bernal quien dió su apoyo incansable para que todo partiera.

A Cristián Jélvez y su visión, quien un 1 de julio de 1993 imaginó que era posible enfrentar este problema en un esfuerzo de colaboración.

Este libro está dedicado a los profesionales y personal de los servicios de salud de las regiones mencionadas, que trabajan literalmente “contra viento y marea” protegiendo la salud de sus conciudadanos en zonas remotas y hermosas que es, según un dicho local que compartimos, “donde las teorías crujen”.