

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA**

**DETERMINACIÓN DEL DAÑO EN TEJIDOS Y MODIFICACIÓN DEL  
COMPORTAMIENTO DE *TOTOABA MACDONALDI* POR EXPOSICIÓN A  
ÁCIDO DOMOICO**

**T E S I S**

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**PRESENTA**

**KASSANDRA BELTRÁN SOLÍS**

**Ensenada, Baja California, México a 21 de junio de 2021**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA

DETERMINACIÓN DEL DAÑO EN TEJIDOS Y MODIFICACIÓN DEL  
COMPORTAMIENTO DE *TOTOABA MACDONALDI* POR EXPOSICIÓN A  
ÁCIDO DOMOICO

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA


PRESENTA

KASSANDRA BELTRÁN SOLÍS

Aprobada por:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Samuel Sánchez Serrano  
Director de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ernesto García Mendoza  
Sinodal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Conal David True  
Sinodal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Lus Mercedes López Acuña  
Sinodal

## RESUMEN

### Determinación del daño en tejidos y modificación del comportamiento de *Totoaba macdonaldi* por exposición a ácido domoico

Con el fin de generar información enfocada a evaluar el efecto que el ácido domoico (AD) provoca en los peces, en este trabajo se evaluó la susceptibilidad de (*Totoaba macdonaldi*) al efecto inducido por la exposición al AD. Se inyectó vía intraperitoneal el AD con las dosis de 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  seguido de disección y obtención de muestras de tejido para evaluar la patología inducida por el AD a nivel tisular y caracterizar la bioacumulación y distribución en tejidos. Se presentó mortalidad únicamente en la dosis de 6.4  $\mu\text{gAD/g}$  en un tiempo promedio de 49 minutos posterior a la inyección. Se observaron signos excitotóxicos, como hiperactividad, nado en círculos, nado en espiral y nado invertido, los cuales, fueron observados para las dosis de 3.2 y 1.6  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  seguidos de una aparente recuperación, mientras que para la dosis de 0.8  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  no se detectaron alteraciones conductuales en los peces. Resultados proporcionan evidencia de que la totoaba es neurológicamente susceptible al AD. Además, en cerebro se presentaron lesiones en lóbulo óptico y cerebelo, caracterizadas por neuronas en distintas etapas de necrosis oncótica y pérdida de neuropilo. Así mismo, se realizó exposición de los organismos al AD por vía oral a una única dosis de 1.6  $\mu\text{gAD g}^{-1}$ . Luego del tratamiento oral no se observaron signos excitotóxicos sin embargo se detectaron niveles de AD de 0.1, 0.07 y 0.06  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  en hígado, 0.71, 0.08 y 0.07  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  en riñón, así como 0.08, 0.064 y 0.063  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  en cerebro, a las 2, 24 y 72 horas, respectivamente. La evaluación histopatológica muestra lesiones en lóbulo óptico similares a las observadas en inyección intraperitoneal, lo que indica que el AD es absorbido a través del tracto digestivo en peces y atraviesa la barrera sangre-cerebro. Asimismo, a las 72 horas luego del tratamiento oral se detectó en tejidos un 12.75% del total del AD administrado lo que sugiere que el AD es bioacumulado por totoaba y por lo tanto podría presentarse un efecto a largo plazo por el consumo crónico de la toxina.

**Palabras clave:** ácido domoico, peces, excitotoxicidad, bioacumulación, histopatología, *Totoaba macdonaldi*.

## ABSTRACT

### Tissue damage and behavioral modification in *Totoaba macdonaldi* by exposure to domoic acid

In order to generate more information about the effect of domoic acid (DA) on fish, in this work we evaluate if totoaba (*Totoaba macdonaldi*) is susceptible to DA. Intraperitoneal injection (IP) was performed, with doses of 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  followed by a series of tissue dissections to assess the induced pathology by DA on tissues and characterize uptake, bioaccumulation and tissue distribution in fish. Mortality was only observed in dose of 6.4  $\mu\text{gAD g}^{-1}$ . Excitotoxic signs like hyperactivity, circle-swimming, spiral-swimming and upside-down swimming, were observed in the doses of 3.2 y 1.6  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  followed by and apparent recovery, whereas the dose of 0.8  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  did not induce alteration in. These results provide evidence that totoaba is neurologically susceptible to DA. Moreover, brain lesions induced by DA were prominent in optic lobe (tectum) and cerebellum, characterized by different stages of oncotic necrosis and neuropil loss. Oral gavage was also performed by a single dose of 1.6  $\mu\text{gAD g}^{-1}$ . After oral gavage, excitotoxic signs were not observed however levels of DA 0.1, 0.07 and 0.06 were detected in liver, 0.71, 0.08 and 0.07 in kidney and 0.08, 0.064 and 0.0063 in brain at 2, 24 and 72 hours, respectively. Histopathologic evaluation shows lesions in optic lobe similar to those reported for IP injection. These data indicate that DA is absorbed in the GI tract of fish and crosses the blood-brain barrier (BBB). Likewise, at 72 hours after oral gavage 12.75% of the total DA administered were still detected on brain and liver tissue which suggests that DA could be bioaccumulated by totoaba and therefore there is the possibility of a long-term effect from chronic consumption of the toxin.

**Keyword:** Domoic acid, fish, excitotoxicity, bioaccumulation, histopathology, *Totoaba macdonaldi*.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

A mi director de tesis, Dr. Samuel Sánchez Serrano por aceptarme y confiar en mí. Por todo el apoyo durante el desarrollo del experimento y el trabajo escrito. Y por ayudarme a mantener la cordura durante estos dos años a pesar de todo. Gracias infinitamente.

A los miembros del comité de tesis, al Dr. Ernesto García Mendoza por su apoyo para la realización de las pruebas que cambiaron el rumbo de todo, por su tiempo y dedicación para ayudarme a mejorar este trabajo a través de sus minuciosas revisiones. Al Dr. Conal David True por la donación de los animalitos que dieron su vida en nombre de este trabajo. Y a la Dra. Lus López Acuña por su disposición y comentarios en las presentaciones de avances.

A mi familia y amigas, Gloria y Jandy, por siempre estar ahí. Por darme su apoyo incondicional a pesar de mis constantes desapariciones, por estar conmigo cuando más lo necesite y nunca abandonarme aún cuándo ni yo misma sabía donde me encontraba. Gracias eternas.

Por último, pero no menos importante, a Nahla, mi incondicional. Aunque nunca leerás esto es necesario incluirte por ser la más fiel compañera.

# Tabla de contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	15
2.1 Ácido domoico .....	15
2.1.1 <i>Pseudo-nitzschia</i> sp. ....	15
2.1.2 Estructura del ácido domoico .....	18
2.1.3 Mecanismo de acción .....	19
2.1.4 Efecto en tejidos .....	20
2.1.5 Transferencia en la cadena trófica .....	23
2.1.6 Efecto del ácido domoico en peces .....	24
2.2. <i>Totoaba macdonaldi</i> .....	28
2.2.1 Cultivo de totoaba .....	29
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	30
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	32
4.1 Objetivo general .....	32
4.2 Objetivos específicos .....	32
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	33
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	34
6.1 Mantenimiento de organismos vivos .....	34
6.2 Exposición al ácido domoico .....	34
6.2.1 Inyección intraperitoneal .....	34
6.2.1.1 Eutanasia y disección .....	37
6.2.2 Tratamiento oral .....	39
6.2.3 Recuperación .....	40
6.4 Análisis histológico .....	41
6.5 Cuantificación de ácido domoico .....	44
6.6 Análisis estadístico .....	45
<b>7. RESULTADOS</b> .....	48
7.1 Inyección intraperitoneal .....	48
7.1.1 Comportamiento .....	48
7.1.1.1 Análisis estadístico: tiempos de respuesta .....	49
7.1.2 Evaluación histopatológica .....	51
7.1.2.1 Cerebro .....	51
7.1.2.2 Corazón .....	56
7.1.3 Contenido de ácido domoico .....	60
7.2 IP Recuperación después de la administración de AD intraperitonealmente .....	61

7.2.1 Comportamiento .....	61
7.2.2 Evaluación histopatológica .....	61
7.2.2.1 Cerebro.....	61
7.2.2.2 Corazón.....	64
7.3 Tratamiento oral.....	65
7.3.1. Comportamiento .....	65
7.3.2 Evaluación histopatológica .....	65
7.3.2.1 Cerebro.....	65
7.3.2.2 Corazón.....	67
7.3.3 Contenido de ácido domoico.....	69
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>73</b>
8.1 Inyección intraperitoneal .....	73
8.1.1 Comportamiento .....	74
8.1.2 Alteraciones histológicas .....	75
8.1.3 Contenido de AD.....	76
8.2 Recuperación después de la administración de AD intraperitonealmente .....	77
8.3 Tratamiento oral.....	78
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>81</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>82</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Especies de Pseudo-nitzschia posibles productoras de ácido domoico reportadas en México.1) Pseudo-nitzschia australis (Ferrario y Reguera, 2002). 2) Pseudo-nitzschia multiseriata (J.P, et al. 2021). 3) Pseudo-nitzschia pungens (Ferrario y Reguera, 2002) 4) Pseudo-nitzschia brasiliensis (Lundholm, et al. 2002) 5) Pseudo-nitzschia calliantha (Caroppo, et al. 2005) 6) Pseudo-nitzschia cuspidata (Arapov, et al. 2017) 7) Pseudo-nitzschia delicatissima (Caroppo, et al. 2005) 8) Pseudo-nitzschia subfraudulenta (Lu, et al. 2021). .....	18
<b>Figura 2.</b> Estructura del ácido domoico, ácido kaínico y glutamato. Adaptado de Bates et al. (1998). .....	19
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acción de ácido domoico. Adaptado de Saeed et al., (2017). .....	21
<b>Figura 4.</b> Totoaba macdonaldi cultivada en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la FCM de la UABC. Fotografía tomada por Lus M. López. ....	29
<b>Figura 5.</b> Tanques con sistemas de recirculación de agua de mar (SRA) donde se mantuvieron los organismos previo al inicio de los experimentos.....	35
<b>Figura 6.</b> 1) Ácido domoico (Sigma aldrich). 2) Jeringas de 3 ml utilizadas para inyección intraperitoneal. ....	37
<b>Figura 7.</b> Diagrama de sitio de inyección intraperitoneal.....	37
<b>Figura 8.</b> Acuario donde se liberaron los organismos posteriormente a la inyección intraperitoneal para observación. ....	37
<b>Figura 9.</b> Disección de organismos de Totoaba macdonaldi. ....	39
<b>Figura 10.</b> Órganos extraídos de Totoaba macdonaldi. 1) Cerebro en casete de histología. 2) Corazón en casete de histología. 3) Bazo en tubo Eppendorf para posterior congelación. ....	40
<b>Figura 11.</b> Administración de ácido domoico a totoaba por vía oral.....	41
<b>Figura 12.</b> Técnica histológica. 1) Procesador automático de tejidos LEICA TP 1020. 2) Corte de muestra de cerebro en regiones de interés previo a la inclusión en parafina. 3) Incluidor de tejidos LEICA EG 1150 H. 4) Enfriamiento de bloques de parafina en placa fría LEICA EG 1150 C. 5) Bloques de parafina con	

muestras incluidas. 6) Corte de muestras incluidas en bloque de parafina en micrótopo LEICA RM 21. 7) Cortes en parafina colocados en portaobjetos. 8) Cubetas de tinción. ....	43
<b>Figura 13.</b> Regiones de cerebro de teleósteos. Izquierda: plano general. Adaptado de Sullivan. Derecha: cerebro de <i>Totoaba macdonaldi</i> . Tel: telencéfalo. Di: diencéfalo. Mes: mesencéfalo. Met: metaencéfalo. ....	44
<b>Figura 14.</b> Corazón de <i>Totoaba macdonaldi</i> . Línea punteada indica sitio de corte (corte sagital). BA: bulbo arterioso. V: ventrículo.....	44
<b>Figura 15.</b> Laminillas con muestras montadas en resina.....	45
<b>Figura 16.</b> Comportamiento (signos de excitotoxicidad) presentados por <i>Totoaba macdonaldi</i> tras exposición a ácido domoico a través de inyección intraperitoneal. Imágenes obtenidas de video de evaluación conductual de organismo expuesto a la dosis de 6.4 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido. ....	51
<b>Figura 17.</b> Histopatología de tejido cerebral (Lóbulo óptico). A) Histología normal de lóbulo óptico. Neuronas (círculos). Capilares (flecha). Células gliales (cabeza de flecha). Neuropilo (asterisco). Grupo control. 40x. B) Grupo 0.8 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido. Neuronas (circulo). Capilares (flecha) Células gliales (cabeza de flecha). Neuropilo (asterisco). 40x. C) Grupo 1.6 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido. Neuronas con eosinofilia citoplasmática (circulo). Capilares (flecha). Pérdida de neuropilo (asterisco). 40x. D) Grupo 3.2 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido. Neurona con eosinofilia citoplasmática (circulo). Capilar (flecha). Células gliales (cabeza de flecha). Pérdida de neuropilo (asterisco). 40x. E) Grupo 6.4 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido. Neurona con citoplasma eosinófilo (círculo central). Neuronas con necrosis (círculos). Capilares (flecha). Vacuolización de citoplasma (asterisco). 40x. F) Grupo 6.4 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido. Neuronas con necrosis (circulo). Pérdida de neuropilo (asterisco). 40x. Barra = 10 $\mu\text{m}$ . ....	53
<b>Figura 18.</b> Histopatología de tejido cerebral (Cerebelo). A) Histología normal de cerebelo. M: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. G: capa granular. Grupo control. 40x. B) M: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. G: capa granular Grupo 0.8 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido. 40x. C) Neuronas con necrosis (círculos). Grupo 1.6 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido. 40x. D) Cariolisis (círculo continuo). Neurona con apariencia encogida y núcleo picnótico (círculo punteado). Hiperemia (flecha). Grupo 3.2 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido. 40x. E) Neuronas dañadas con citoplasma pálido (flechas). Vacuolización de citoplasma (círculo). Grupo 6.4 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido. 40x. F) Cariolisis: neuronas con atrofia y pérdida de integridad de membrana (flechas). Hiperemia (asterisco). Grupo 6.4 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido. 40x. Barra = 10 $\mu\text{m}$ .....	54

**Figura 19.** Histopatología de tejido cerebral grupo con dosis más alta ( $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido). A) Cerebelo. Neuronas con vacuolización de citoplasma (círculos). 100x. B) Cerebelo. Neuronas con atrofia y pérdida de integridad de membrana (cariolisis) (asterisco). 100x. C) Cerebelo. Cariolisis (círculo). 100x. D) Lóbulo óptico. Pérdida de neuropilo (asterisco). Neuronas necróticas (asterisco). 100x. E) Lóbulo óptico. Neurona con apoptosis (cuerpo apoptótico) (círculo continuo). Cariolisis (flechas). Neurona “fantasma” (círculo punteado) con pericarion pálido, núcleo y borde indefinido. 100x. F) Lóbulo óptico. Neuronas en distintas etapas de necrosis. Cariolisis (Flecha). Picnosis (círculo). Neurona con citoplasma eosinófilo (asterisco). 100x. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . ..... 55

**Figura 20.** Lesiones histopatológicas en tejido cerebral. Grupo con dosis más alta ( $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido) A) Células necróticas. Neurona con atrofia, citoplasma eosinófilo y núcleo picnótico (flecha). Neurona con vacuolización de citoplasma y núcleo picnótico (Círculo continuo). Cariorrexis (círculo punteado). 100x. B) Necrosis coagulativa. Núcleo picnótico (Flecha). Vacuolización de citoplasma (Círculos). 100x. C) Neuronas con pericarion pálido y atrofia. Núcleo y bordes difusos (cariolisis). 100x. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . D) Hemorragia (cabeza de flecha). 10x. E) Hemorragia (Cabeza de flecha). Pérdida de neuropilo (asterisco). 10x. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . ..... 56

**Figura 21.** Estructura histológica de corazón (ventrículo). A) Histología normal de ventrículo. Grupo control. 40x. B) Grupo  $0.8 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. C) Grupo  $3.2 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. D) Grupo  $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. EP: epicardio. MIO: miocardio. Flechas: eritrocitos. Asteriscos: espacios de circulación sanguínea. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . ..... 58

**Figura 22.** Estructura histológica de ventrículo (miocardio). A) Histología normal de miocardio. Grupo control. 40x. B) Grupo  $0.8 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. C) Grupo  $3.2 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. D) Grupo  $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . ..... 59

**Figura 23.** A) Grupo  $0.8 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Ep: epicardio. Fibras musculares (flechas). 100x. B) Grupo  $0.8 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Eritrocitos en lumen. 100x. C) Grupo  $3.2 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Leucocitos (círculo). 100x. D) Grupo  $3.2 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Infiltración de leucocitos (flechas). Espacio intersticial con restos de tejido conectivo (asterisco). 100x. E) Grupo  $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Eritrocitos con bordes irregulares (círculos). Restos de tejido conectivo (asterisco). 100x. F) Grupo  $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Infiltración de leucocitos (flechas). 100x. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . ..... 60

**Figura 24.** Tejido cerebral de grupo tratado con  $1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. A) Cerebelo. 24 horas. M: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. G: capa granular. Hemorragias (flechas). 40x. B) Lóbulo óptico. 24 horas. Hemorragias (flechas). Pérdida de neuropilo (asteriscos). 40x. C) Cerebelo. 48 horas. Neurona con fragmentación nuclear (cariorrexis) (círculo). 40x. D) Lóbulo óptico. 48 horas. Neuronas

con condensación de núcleo (picnosis) (círculos). Perdida de neuropilo (asteriscos). Capilar hiperémico (flecha) 40x. E) Cerebelo. 72 horas. Células de Purkinje con eosinofilia citoplasmática. 40x. F) Lóbulo óptico. 72 horas. Perdida de neuropilo (asteriscos). 40x. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . ..... 63

**Figura 25.** Tejido cerebral de grupo tratado con 1.6  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. A) Cerebelo. 24 horas. Neurona hipertrófica (flecha). Neuronas picnóticas (círculos punteados). 100x. B) Lóbulo óptico. Hipertrofia y cariorrexis (flecha). Neurona picnótica (círculo punteado). 24 horas. 100x. C) Cerebelo. Neuronas con picnosis (flechas). 48 horas. 100x. D) Lóbulo óptico. 48 horas. Cariolisis (círculo). Vacuolización de citoplasma (flecha). 100x. E) Cerebelo. 72 horas. Neuronas con picnosis (flechas). Células con cariorrexis (círculos). 100x. F) Lóbulo óptico. 72 horas. Cariorrexis (flechas). 100x. Barra = 20  $\mu\text{m}$ ..... 64

**Figura 26.** Histología de miocardio grupo tratado con 1.6  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. A) 24 horas. 100x. B) 48 horas. 100x. C) 72 horas. 100x. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . ..... 65

**Figura 27.** Histología tejido cerebral grupo control. A) Lóbulo óptico. B) Cerebelo. G: capa granular. CP: capa de células de Purkinje. M: capa molecular..... 67

**Figura 28.** Histología de tejido cerebral grupo con tratamiento oral (2 horas). A) Lóbulo óptico. B) Cerebelo. G: capa granular. CP: capa de células de Purkinje. M: capa molecular. .... 67

**Figura 29.** Histología de tejido cerebral grupo con tratamiento oral (24 horas). A) Cerebelo. M: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. G: capa granular. 40x. B) Lóbulo óptico. Neuronas con condensación de núcleo (círculos continuos). Neuronas con citoplasma pálido y morfología anormal (Círculo punteado). Perdida de neuropilo (asterisco). Capilar (Flecha). 40x. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . ..... 68

**Figura 30.** Histología de tejido cerebral grupo con tratamiento oral (72 horas). A) Cerebelo. M: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. G: capa granular. 40X. B) Lóbulo óptico. Neuronas con condensación de núcleo (círculos). Células gliales (cabeza de flecha). Capilar (flecha). Perdida de neuropilo (asterisco). 40x. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . ..... 68

**Figura 31.** Histología de tejido cardiaco. Grupo control. A) Miocardio. 40x. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . B) Miocardio. 100x. Barra = 20  $\mu\text{m}$ ..... 69

**Figura 32.** Histología de tejido cardiaco grupo con tratamiento oral (2 horas). A) Miocardio. 40 x. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . B) Miocardio. 40x. Barra = 10  $\mu\text{m}$ . ..... 69

<b>Figura 33.</b> Histología de miocardio grupo con tratamiento oral (24 horas). A) Miocardio. Zona con fibrosis (asterisco). 40x. Barra = 10 $\mu\text{m}$ . B) Miocardio. Hipercontracción de bandas. Células con necrosis (flechas). 100x. Barra = 20 $\mu\text{m}$ . .....	70
<b>Figura 34.</b> Histología de miocardio grupo con tratamiento oral (72 horas). A) Miocardio 40x. Barra = 10 $\mu\text{m}$ .B) Miocardio. Leucocito (flecha). 100x. Barra = 20 $\mu\text{m}$ . .....	70
<b>Figura 35.</b> Contenido de AD ( $\mu\text{gAD g}^{-1}$ tejido) en cerebro de totoaba luego de la administración por vía oral de 200 $\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$ d conteniendo 1.6 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ tejido. ....	72
<b>Figura 36.</b> Contenido de AD ( $\mu\text{gAD g}^{-1}$ tejido) en riñón de totoaba luego de la administración por vía oral de 200 $\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$ d conteniendo 1.6 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ tejido. ....	73
<b>Figura 37.</b> Contenido de AD ( $\mu\text{gAD g}^{-1}$ tejido) en hígado de totoaba luego de la administración por vía oral de 200 $\mu\text{l}$ de $\text{H}_2\text{O}$ d conteniendo 1.6 $\mu\text{gAD g}^{-1}$ tejido. ....	73

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Efectos histopatológicos inducidos por el ácido domoico en distintos grupos de vertebrados.....	23
<b>Tabla 2.</b> Signos conductuales de excitotoxicidad reportados en diferentes grupos de vertebrados. IP: intraperitoneal. IV: intravenosa. ....	27
<b>Tabla 3.</b> Signos conductuales de excitotoxicidad reportados en diferentes especies de peces. IC: intracelómica. Las dosis se indican en mg AD kg <sup>-1</sup> de peso salvo donde se indican unidades distintas..	28
<b>Tabla 4.</b> Dosis utilizadas en inyección intraperitoneal. ....	36
<b>Tabla 5.</b> Se indican los tiempos de respuesta en minutos para la categoría de desorientación con el nombre de cada grupo en el encabezado (grupo 6.4, grupo 3.2 y grupo 1.6) en la columna siguiente de cada grupo se indica el rango correspondiente a cada valor. ....	47
<b>Tabla 6.</b> Se indican los tiempos de respuesta en minutos para la categoría nado en espiral con el nombre de cada grupo en el encabezado (grupo 6.4, grupo 3.2 y grupo 1.6) en la columna siguiente de cada grupo se indica el rango correspondiente a cada valor. ....	47
<b>Tabla 7.</b> Tiempos de respuesta.....	49
<b>Tabla 8.</b> Peso de las muestras de órganos obtenidas de los organismos utilizados en inyección intraperitoneal de AD. Se indica el peso de cada órgano en gramos.....	61
<b>Tabla 9.</b> Concentración de AD en hígado de totoaba tras exposición por vía intraperitoneal a cuatro dosis distintas.....	61
<b>Tabla 10.</b> Peso de las muestras de órganos obtenidas de los organismos utilizados en el tratamiento oral de AD. Se indica el peso de cada órgano en gramos.....	71
<b>Tabla 11.</b> Porcentaje de recuperación de AD tras exposición por vía oral de 200µl de H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> con 1.6 µgAD g <sup>-1</sup> tejido. ....	72
<b>Tabla 12.</b> Distribución de AD en órganos de totoaba tras exposición por vía oral de 200 µl de H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> con 1.6 µgAD g <sup>-1</sup> tejido. Las muestras fueron tomadas a las 2 horas, 24 horas y 72 horas posteriores a la administración de la solución.....	72

## 1. INTRODUCCIÓN

En 1987, en la Isla del Príncipe Eduardo, Canadá se presentó un evento de contaminación de mejillón azul (*Mytilus edulis*) con una potente neurotoxina que ocasionó que 107 personas enfermaran y al menos 3 personas murieran como consecuencia del consumo del mejillón. Después de 104 horas de trabajo por parte de detectives e investigadores la neurotoxina conocida como ácido domoico fue identificada como el agente contaminante (Bates, 1989). El interés en el estudio de esta toxina incrementó cuando se detectó que ocasionó eventos de mortandad masiva de aves y mamíferos marinos en 1991 (Work et al., 1993).

El ácido domoico (AD) es una toxina algal producida naturalmente responsable de una enfermedad humana conocida como síndrome de intoxicación amnésica por consumo de mariscos en humanos (ASP, por sus siglas en inglés) (Lefebvre et al., 2002). El nombre está asociado con los síntomas inducidos por la intoxicación con la misma entre los que se incluyen dolor abdominal, vómito y daño neurológico que ocasiona desorientación y pérdida de memoria que puede persistir por tiempo indefinido (Perl et al., 1990). Varias especies de microalgas y principalmente de diatomeas son productoras de la toxina, las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* se cree que representan el mayor riesgo ya que son responsables de la acumulación de AD en organismos filtradores que luego serán consumidos por organismos en niveles tróficos superiores (Lefebvre et al., 2002).

La acumulación de AD en moluscos bivalvos representa un problema de salud pública. Asimismo, representa un riesgo para la industria acuícola y de pesca, principalmente de moluscos bivalvos. La investigación enfocada a determinar el efecto que el AD tiene en los organismos de cultivo y pesca, es limitada (Anderson et al., 2000). Los impactos en la industria pesquera, en acuicultura de peces y otros mariscos, provocados por la presencia de ficotoxinas generan una pérdida estimada entre los 13 y 25 millones de dólares anuales (Anderson et al., 2000). Las actividades pesqueras y acuícolas son de gran importancia

económica en el noroeste de México por lo que es necesario considerar medidas sanitarias sustentadas con investigación científica que garanticen la sanidad de los organismos. Por todo lo anterior, en el presente trabajo se caracterizó el efecto del ácido domoico con diferentes concentraciones en juveniles de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) a nivel conductual y tisular.

## 2. ANTECEDENTES

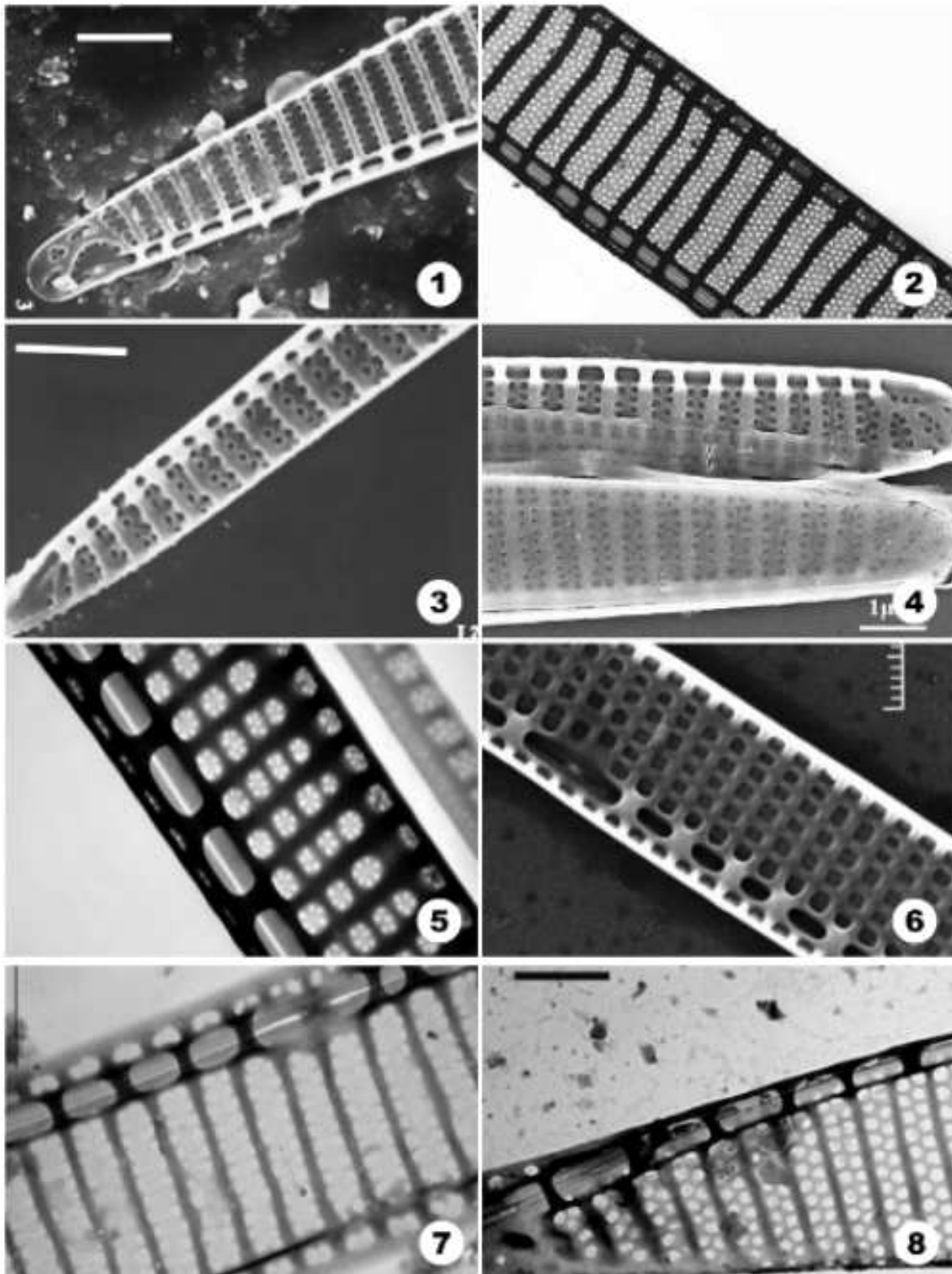
### 2.1 ÁCIDO DOMOICO

#### 2.1.1 *Pseudo-nitzschia* sp.

El AD es un aminoácido neuroexcitatorio que fue aislado por primera vez del alga rodofita *Chondria armata* (Takemoto et al., 1958) como parte de una investigación sobre el efecto antiparasitario y antiviral de extractos algales (Lefebvre et al., 2010). Las investigaciones realizadas luego del evento de intoxicación humana en 1987 por consumo de mejillón azul (*Mytilus edulis*) contaminados con AD llevaron a relacionar este evento con un florecimiento de *Pseudo-nitzschia multiseries* del cual se alimentaron los mejillones (Lelong et al., 2012). Esta fue la primera vez que se reportó que una diatomea era capaz de producir una neurotoxina. El interés en el estudio de la toxina incrementó cuando se detectó que ocasionó eventos de mortandad masiva de aves (Fritz et al., 1992; Work et al., 1993) y mamíferos marinos (Scholin et al., 2000; Work et al., 1993) como resultado de la transferencia del AD producido por *Pseudo-nitzschia* en la trama trófica a través de la acumulación en organismos filtradores (Lefebvre et al., 2009).

El género *Pseudo-nitzschia* fue originalmente clasificado como parte del género *Nitzschia*, sin embargo, dadas sus características morfológicas tales como la formación de cadenas por traslape de los extremos de las células, presencia de tecas aplanadas, rafe excéntrico y presencia de bandas estriadas se separó en un género independiente (Hasle, 1994).

Hasta la fecha, se han descrito 54 especies de *Pseudo-nitzschia* de las cuales 26 (50%) han sido reportadas como potencialmente productoras de AD: *P. abrensis*, *P. australis*, *P. batesiana*, *P. brasiliana*, *P. caciantha*, *P. calliantha*, *P. cuspidata*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. fukuyoi*, *P. galaxiae*, *P. granii*, *P. hasleana*, *P. kodamae*, *P. lundholmiae*, *P. multiserias*, *P. multistriata*, *P. obtusa*, *P. plurisecta*, *P. pseudodelicatissima*, *P. pungens*, *P. pungens* var. *Pungens*, *P. seriata*, *P. simulans*, *P. subfraudulenta*, *P. subpacificica* y *P. turgidula* (Bates et al., 2018).

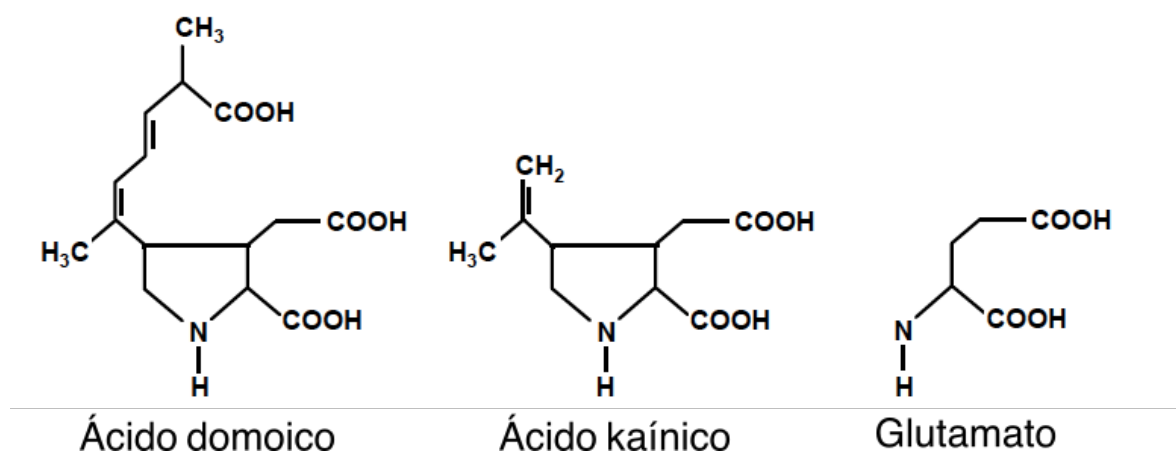


**Figura 1.** Especies de *Pseudo-nitzschia* posibles productoras de ácido domoico reportadas en México. 1) *Pseudo-nitzschia australis* (Ferrario y Reguera, 2002). 2) *Pseudo-nitzschia multiseries* (J.P, et al. 2021). 3) *Pseudo-nitzschia pungens* (Ferrario y Reguera, 2002) 4) *Pseudo-nitzschia brasiliiana* (Lundholm, et al. 2002) 5) *Pseudo-nitzschia calliantha* (Caroppo,

et al. 2005) 6) *Pseudo-nitzschia cuspidata* (Arapov, et al. 2017) 7) *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Caroppo, et al. 2005) 8) *Pseudo-nitzschia subfraudulenta* (Lu, et al. 2021).

### 2.1.2 Características químicas del ácido domoico

El AD es un aminoácido no proteico con un peso molecular de 311 D, contiene un anillo de prolina, un grupo imino y tres grupos carboxilos, los cuales son responsables de sus características hidrofílicas y polaridad de la molécula (Zabaglo et al., 2016). Es una molécula de estructura rígida análoga a otra neurotoxina como el ácido kainico, y al glutamato (Fig. 2), el cual es el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro y si bien es un componente crítico para todas las transmisiones sinápticas, el exceso de este se ha asociado con neurodegeneración, convulsiones y apoptosis (Lefebvre et al., 2010). Olney (1984), fue el primero en establecer que el neurotransmisor glutamato, cuando está presente en exceso, presenta potencial excitotóxico, es decir, produce la muerte neuronal bajo ciertas condiciones como la exposición intensa (Pulido, 2008). El AD es uno de los compuestos excitotóxicos más potentes por lo que constituye un tema de preocupación en salud alimentaria (Pulido, 2008).



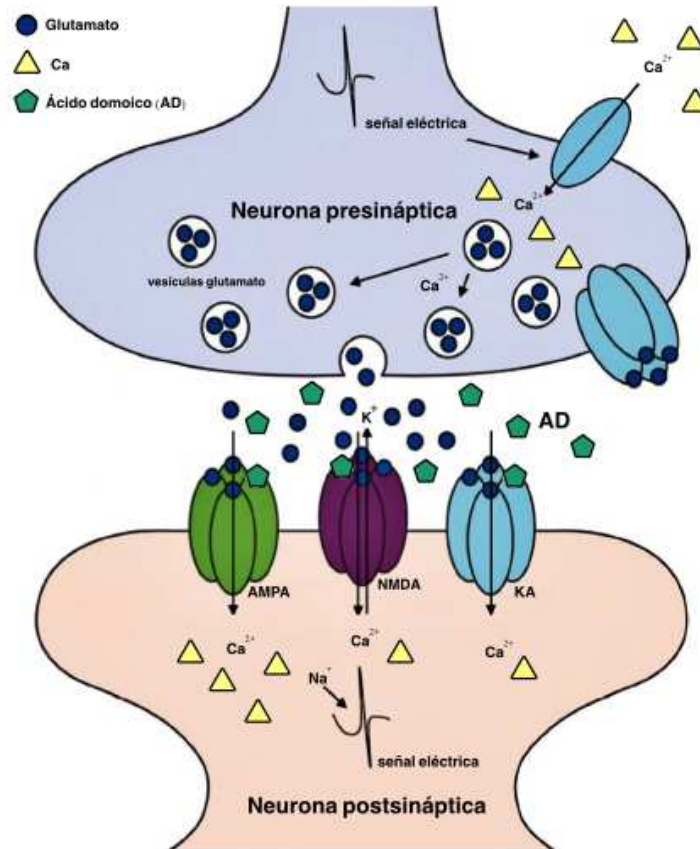
**Figura 2.** Estructura del ácido domoico, ácido kaínico y glutamato. Adaptado de Bates et al. (1998).

### 2.1.3 Mecanismo de acción

Debido a su similitud estructural con el glutamato, el AD actúa sobre los receptores de glutamato presentes en el sistema nervioso central y miocardio de vertebrados (Zabaglo et al., 2016). Existen dos tipos principales de receptores de glutamato: 1) receptores ionotrópicos que están acoplados directamente a los canales iónicos de membrana y 2) receptores metabotrópicos acoplados a proteínas-G que regulan mensajeros secundarios intracelulares y cascadas (Lefebvre et al., 2010). El AD induce excitotoxicidad al tener acción integrativa en receptores ionotrópicos de Glutamato tanto en la terminal pre-sináptica como en la terminal post-sináptica (Pulido, 2008) formando uniones con dichos receptores que son tres veces más potentes que las uniones que estos forman con el ácido kainico y hasta 100 veces más fuertes que las formadas con el glutamato (Zabaglo et al., 2016).

La excitotoxicidad inducida por el AD inicia cuando este se une a los receptores alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) y receptores tipo kainato lo que ocasiona despolarización celular en la terminal pre-sináptica (Pulido, 2008). La despolarización activa la liberación endógena de  $Ca^{2+}$  que participa en la movilización de vesículas de glutamato a la superficie de la membrana celular para ser liberado posteriormente en la terminal sináptica por exocitosis (Lefebvre et al., 2009) donde puede interactuar libremente con los receptores ionotrópicos de glutamato en la terminal post-sináptica. Esta interacción, en conjunto con la acción del AD endógeno, ocasiona la activación y apertura de los canales N-methyl-D-aspartic-acid (NMDA) lo que genera un flujo de  $Ca^{2+}$  hacia el interior de la célula (Zabaglo et al., 2016). El AD también puede unirse a los receptores NMDA que se encuentran asociados a canales iónicos  $Na/K^+$  lo que resulta, además del flujo de  $Ca^{2+}$ , en un flujo de estos iones al interior de la célula (Fig. 3) (Lefebvre et al., 2009). A diferencia del glutamato el AD induce una despolarización celular de gran duración (Zabaglo et al., 2016) así como una activación prolongada de los receptores ionotrópicos de glutamato lo que resulta en un flujo constante de cationes al interior de la

célula (Lefebvre et al., 2009). Adicionalmente a esta alta afinidad la toxicidad del AD es resultado de la no desensibilización del canal (Pulido, 2008).



**Figura 3.** Mecanismo de acción de ácido domoico. Adaptado de Saeed et al., (2017).

### 2.1.4 Efecto en tejidos

Además de los impactos neuroconductuales inducidos por el AD, existe evidencia que esta toxina genera efectos histopatológicos (Tabla 1) en el sistema nervioso central de los diferentes grupos de vertebrados (Lefebvre et al. 2010). El AD también daña el tejido cardíaco ya que esta presenta cantidades importantes de receptores ionotrópicos de glutamato (Zabaglio et al., 2016) que actúan como mediadores de inflamación y lesión celular a través de una vía de lesión común (Pulido, 2008).

El daño celular asociado a la excitotoxicidad producida por el AD puede asociarse con dos vías de acción:

1) Inflamación del tejido.

Los receptores ionotrópicos de glutamato son canales selectivos a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ , por lo que cualquier estimulación de estos puede resultar en daño tisular osmótico que se ve reflejado en la inflamación por un flujo constante de cationes y líquido extracelular (Pulido, 2008). La inflamación es una respuesta estereotipada de los animales vivos a una variedad de lesiones en la cual se involucra la vasculatura, células inflamatorias y mediadores químicos. El propósito de la respuesta inflamatoria es diluir, aislar y destruir al agente causante de la lesión para facilitar la curación (Heidel y Smith, 2007).

2) Incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

El exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  es altamente tóxico para las células al desencadenar diferentes vías enzimáticas y cascadas de señalización incluyendo producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zabaglo, 2016) y daño por fosforilación oxidativa (Pulido, 2008). Además de la activación de enzimas nucleares lo que resulta en la condensación de cromatina nuclear (picnosis), fragmentación del núcleo (cariorrhexis) y por último la ruptura del mismo (cariolisis) en un proceso conocido como necrosis oncótica la cual es resultado de un daño irreversible a las células (Zachary, 2017).

La actividad cardiotoxica del AD ha sido confirmada por el daño extensivo observado en corazones de leones marinos (Zabka et al., 2009) y peces zebra (Hong et al., 2015) expuestos a la toxina. Estudios in vitro han demostrado que la estimulación de los receptores NMDA en cardiomiocitos puede llevar a apoptosis a través del incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y ROS (Gao X. et al., 2007) así como fragmentación de fibras musculares e infiltración de leucocitos (McHuron et al., 2013).

**Tabla 1.** Efectos histopatológicos inducidos por el ácido domoico en distintos grupos de vertebrados.

Especie	Exposición	Histopatología	Autor
Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	Natural	<b>Cerebro:</b> Necrosis Astrocitosis Atrofia neuronal (Regiones: lóbulo temporal, hipocampo, amígdala, tálamo)	Teitelbaum. (1990)
Foca común ( <i>Phoca vitulina richardii</i> )	Natural	<b>Cerebro:</b> Necrosis en hipocampo Pérdida neuronal Hemorragias <b>Corazón:</b> Necrosis en miocardio	McHuron et al. (2013)
Macaco cangrejero ( <i>Macaca fascicularis</i> )	Intraperitoneal	<b>Cerebro:</b> Vacuolización de neuropilo Hipertrofia de astrocitos Necrosis (Regiones: área postrema, hipotálamo e hipocampo)	Tryphonas et al. (1990)
Tiburón leopardo ( <i>Triakis semifasciata</i> )	Intraperitoneal	No se reportó.	Schaffer et al. (2016)
Dorada ( <i>Sparus aurata</i> )	Intraperitoneal	No se reportó.	Nogueira et al. (2010)
Oso marino ( <i>Callorhinus ursinus</i> )	Natural	<b>Cerebro:</b> Atrofia en hipocampo Pérdida de células granulares Pérdida de células piramidales Edema en neuropilo Necrosis <b>Corazón:</b> Degeneración vacuolar en miocardio Necrosis Reemplazo de cardiomiocitos por adipocitos	Lefebvre et al. (2010)
Ratón ( <i>Mus musculus</i> )	Intraperitoneal	<b>Cerebro:</b> Atrofia Picnosis Necrosis (Regiones: hipocampo)	Vieira et al. (2015)
León marino ( <i>Zalophus californianus</i> )	Natural	<b>Corazón:</b> Vacuolización de citoplasma en cardiomiocitos Separación intercardiomiocito Transparentación tejido intersticial Edema intersticial	Zabka et al. (2009)
Rata ( <i>Rattus sp.</i> )	Intraperitoneal Intrahipocampal	<b>Corazón:</b> Vacuolización Hipercontractura Necrosis inflamatoria Infiltración células inflamatorias	Vranyac-Tramounandas et al. (2011)

### 2.1.5 Transferencia en la cadena trófica

Durante los florecimientos de especies de *Pseudo-nitzschia* productoras de AD, la toxina es acumulado por el zooplancton, moluscos bivalvos, crustáceos, equinodermos y otros invertebrados (Zabaglo et al., 2016), también se sabe que peces, aves y mamíferos marinos pueden acumular la toxina al consumir alimento contaminado (Lefebvre et al., 2012).

En mar abierto, la presencia de AD extracelular no constituye un riesgo debido a que este no puede ser acumulado en la columna de agua debido a fotodegradación por luz solar (Zabaglo et al., 2016) la cual se cree es la principal ruta de eliminación del AD del ambiente marino (Bouillon et al., 2006). Sin embargo, factores como el agotamiento de nutrientes ocasiona que las células de *Pseudo-nitzschia* tengan menor flotabilidad y por lo tanto se hundan en la columna de agua (Trainer et al., 2000). Una vez en el sedimento, el AD puede tener un efecto a largo plazo en la cadena trófica bentónica (Zabaglo et al., 2016). Los organismos bentónicos y filtradores son considerados los vectores de AD más importantes (Bejarano et al., 2008) al acumularlo en su glándula digestiva, sin aparente efecto toxicológico, pero con consecuencias negativas para niveles tróficos superiores. Dentro de los vectores invertebrados más importantes destacan el mejillón (*Mytilus sp.*) y la almeja navaja del Pacífico (*Siliqua patula*) (Lefebvre et al., 2012).

Aunque los vectores de toxinas algales mejor estudiados sean los moluscos bivalvos, es bien conocido que los peces pelágicos menores, cuyas dietas están constituidas parcial o totalmente por diatomeas marinas (peces planctívoros u omnívoros), acumulan en su tracto digestivo altos niveles de células de *Pseudo-nitzschia* y, en consecuencia, de AD durante los florecimientos algales tóxicos lo que los convierte en vectores hacia niveles tróficos más elevados como aves, mamíferos marinos y humanos (Lefebvre et al., 2012).

Además de la transferencia a través de la cadena trófica es posible que el AD ingrese al suministro de alimentos para animales y peces en cultivo. Los peces planctívoros han sido

los vectores del AD durante los eventos de mortandad de aves y mamíferos marinos en los cuales se identificó como vector a peces planctívoros (Fritz et al., 1992; Work et al., 1993; Sierra-Beltran et al., 1997) Los peces pueden acumular una concentración importante de AD por lo que su uso para la elaboración de harina de pescado, puede resultar en un producto con altos niveles de la toxina (Lefebvre et al., 2002) si es que soporta los procesos de fabricación del producto (Hardy et al., 1995). La presencia alimento contaminado con AD para peces en cultivo es una posibilidad. No existe un control de ficotoxinas en el material crudo utilizado para la producción de harina de pescado, por lo que es posible que los productores utilicen, inadvertidamente, pescados o subproductos de los mismos que contengan estos metabolitos (Hardy et al., 1995).

#### **2.1.6 Efecto del ácido domoico en peces**

De forma natural, la intoxicación por AD se ha observado en humanos (Bates et al., 1989; Lefebvre et al., 2012), aves (Fritz et al., 1992; Work et al., 1993; Sierra-Beltran et al., 1997) y mamíferos marinos piscívoros (Lefebvre et al., 2002; Fire et al., 2009; Sierra-Beltran et al., 2004; Work et al., 1993). Los peces planctívoros acumulan en su tracto digestivo altos niveles de la toxina durante los florecimientos algales de *Pseudo-nitzschia* (Lefebvre et al., 2012). Aún cuando las anchovetas se encuentran crónicamente expuestas al consumo de altas dosis de AD, sin embargo, los signos conductuales de daño neurológico no han sido verificados en campo (Lefebvre et al., 2007).

Luego del evento del año 1987 en Canadá, se han realizado numerosos estudios de laboratorio para evaluar el efecto del AD en diferentes especies de vertebrados utilizando distintos regímenes de exposición entre los que se incluye inyección intraperitoneal y exposición por vía oral (Lefebvre et al., 2007). Los efectos neurotóxicos resultado de la exposición al AD son similares en la mayoría de los vertebrados examinados a la fecha (Tablas 2 y 3), pero los peces presentan una respuesta neurotóxica únicamente al ser inyectados intraperitonealmente con AD, mientras que la exposición por consumo oral

aparentemente no tiene efectos excitotóxicos en peces (Hardy et al., 1995) como los tiene en humanos, aves y mamíferos marinos (Lefebvre et al., 2001). Los estudios realizados en salmón (*Oncorhynchus kisutch*) (Lefebvre et al., 2007), trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (Hardy et al., 1995; Bakke et al., 2010) y anchoveta (*Engraulis mordax*) (Lefebvre, et al., 2001) demostraron que este grupo no presenta excitotoxicidad aun cuando presentaron distintas concentraciones de AD en cerebro, riñón e hígado. Los resultados de dichas investigaciones son diferentes entre sí por lo que es importante realizar investigación sobre la respuesta que otras especies presentan al AD para así obtener un mejor entendimiento del efecto de la toxina en peces.

**Tabla 2.** Signos conductuales de excitotoxicidad reportados en diferentes grupos de vertebrados. IP: intraperitoneal. IV: intravenosa.

<b>Mamíferos</b>				
<b>Especie</b>	<b>Exposición</b>	<b>Dosis</b> (mg AD/kg de peso)	<b>Signos</b>	<b>Autor</b>
Ratón ( <i>Mus musculus</i> )	IP	0.59	Rascado Convulsiones Muerte	Iverson et al. (1989)
		2.4	Muerte	
Ratón ( <i>Mus musculus</i> )	Oral	9 - 18	No se reportaron	Iverson et al. (1989)
		35 - 70	Rascado Convulsiones	
		47 - 104	Muerte	
Macaco cangrejero ( <i>Macaca fascicularis</i> )	Oral	0.5	No se reportaron	Truelove et al. (1998)
		0.75	No se reportaron	
Macaco cangrejero ( <i>Macaca fascicularis</i> )	IP	4	Vomito súbito Rechinar dientes Masticacion	Tryphonas et al. (1990)
	IV	0.025 - 0.5	Movimiento de labios Masticación Vomito	
Ratón ( <i>Mus musculus</i> )	IP	1.5 - 2	Reducción de actividad	Vieira et al. (2015)
		2.5	Hiperactividad Convulsiones Pérdida de equilibrio	
		3.5	Muerte	

**Tabla 3.** Signos conductuales de excitotoxicidad reportados en diferentes especies de peces. IC: intracelómica. Las dosis se indican en mg AD/kg de peso salvo donde se indican unidades distintas.

<b>Peces</b>				
<b>Especie</b>	<b>Exposición</b>	<b>Dosis</b> (mg AD/kg de peso)	<b>Signos</b>	<b>Autor</b>
Salmon ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> )	Oral	10 - 12	No se reportaron	Lefebvre et al. (2007)
Salmon ( <i>Oncorhynchus kisutch</i> )	IC	0.25 – 34	Nado circular Nado en espiral	Lefebvre et al. (2007)
Trucha arcoiris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Oral	50	No se reportaron	Hardy et al. (1995)
	IC	0.75	Desorientación Nado en espiral	Bakke et al. (2010)
Anchoveta ( <i>Engraulis mordax</i> )	Oral	40 ( $\mu\text{gAD g}^{-1}$ peso)	No se reportaron	Lefebvre et al. (2001)
Anchoveta ( <i>Engraulis mordax</i> )	Oral	165 ( $\mu\text{gAD g}^{-1}$ peso)	No se reportaron	Lefebvre et al. (2002)
Anchoveta ( <i>Engraulis mordax</i> )	IC	1 – 14 ( $\mu\text{gAD g}^{-1}$ )	Desorientación Nado en espiral Muerte	Lefebvre et al. (2001)
Sardina ( <i>Sardinops sagax</i> )	Oral	66	No se reportaron	Lefebvre et al. (2002)
Pez zebra ( <i>Danio rerio</i> )	IC	1.2	Nado errático Nado en círculos Nado en espiral	Lefebvre et al. (2009)
		0.47	No se reportaron	
Tiburón leopardo ( <i>Triakis semifasciata</i> )	IC	1	No se reportaron	Schaffer et al. (2006)
		3	No se reportaron	
		9	No se reportaron	
		27	No se reportaron	
Dorado ( <i>Sparus aurata</i> )	IC	0.45	No se reportaron	Nogueira et al. (2010)
		0.9	No se reportaron	
		9	Nado circular Nado en espiral	

## 2.2. *Totoaba macdonaldi*

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) (Fig. 4) es un pez de gran tamaño, endémico del Golfo de California. Su rango de distribución abarca desde la boca del Río Colorado a la boca del Río Fuerte a lo largo de la costa continental de México y de la boca del Río Colorado a Bahía Concepción a lo largo de la costa de Baja California (Valenzuela, et al. 2015). Es la especie más grande la familia *Sciaenidae* pudiendo alcanzar un peso de hasta 135 kg y una longitud de hasta 2 metros con una esperanza de vida de hasta 30 años (Juárez, et al. 2016).



**Figura 4.** *Totoaba macdonaldi* cultivada en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología en Piscicultura (UBP) de la FCM de la UABC. Fotografía tomada por Lus M. López.

Los organismos adultos desovan en las aguas turbias del delta del Río Colorado en el Golfo de California (GC), México durante la primera tardía, los juveniles permanecen en esta zona durante los primeros 2 a 3 años de vida para posteriormente migrar hacia el sur del GC en otoño (Valenzuela et al., 2015) siguiendo la ruta de migración de las sardinas que constituyen su principal fuente de alimento (Juárez et al., 2016).

Totoaba presenta un cuerpo elongado, con el hocico afilado, la boca es grande y oblicua con la mandíbula inferior proyectada hacia el exterior (Juárez et al., 2016). Poseen una vejiga natatoria, un órgano de flotación presente en muchos peces óseos, la vejiga es un órgano lleno de gas que además de regular la flotación funciona como cámara de

resonancia actuando en conjunto con un grupo de músculos especializados que vibran contra ella produciendo sonidos similares a tambores o graznidos los cuales sirven para localización y comunicación intraespecífica (Cisneros-Mata et al., 1995).

### **2.2.1 Cultivo de totoaba**

A principios del siglo XX los ejemplares adultos de totoaba eran pescados con fines de consumo local cerca de Guaymas, Sonora y en San Felipe, Baja California; la captura de los organismos incremento debido a la demanda de la vejiga natatoria (conocida como “buche”) de las hembras, la cual era exportada a China y a la comunidad china en San Francisco, Estados Unidos, sitios donde es altamente apreciada como alimento (Cisneros-Mata et al., 1995). La demanda china del buche de totoaba en conjunto con la degradación del hábitat, la captura incidental (Valenzuela et al., 2015) y los retos en la regulación pesquera contribuyeron al eventual colapso de las poblaciones de totoaba en la mitad del siglo XX (Juárez et al., 2016). La pesca de totoaba fue prohibida en 1975 y en 1976 la especie fue listada como especie en peligro crítico por CITES y, en el año 1996, obtuvo la misma categoría por parte de IUCN (Valenzuela et al., 2015).

La totoaba es una especie muy adecuada para su desarrollo en acuicultura. El inicio de los esfuerzos para el cultivo de la especie fue implementado por el gobierno de México en un programa en la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) donde iniciaron los procesos de captura de reproductores, maduración, crianza de larvas y crecimiento de juveniles. Posteriormente se creó un segundo programa en el Centro de Reproducción de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) en Bahía Kino (Juárez et al., 2016).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Existe poco conocimiento sobre el efecto del consumo crónico por vía oral de ácido domoico tiene en peces. Existen solamente tres estudios en peces donde se ha realizado administración de AD por vía oral a peces y solamente uno de estos estudios ha sido basado en dieta con alimento contaminado con la toxina. Según el estudio de Hardy et al. (1995) en el que se alimentó durante 15 semanas a organismos de la especie *Oncorhynchus mykiss* con alimento adicionado con 130  $\mu\text{gAD g}$  de alimento, la toxina no es acumulada en sangre o tejidos por lo que no constituye un riesgo para la salud del animal o del consumidor humano.

El AD, al ser consumido por vía oral, no afecta a los peces ya que: (1) los peces no son neurológicamente susceptibles a la toxina, (2) el AD que es absorbido en el tracto digestivo es rápidamente excretado a través de mecanismos metabólicos específicos de los peces (Lefebvre et al., 2007).

De acuerdo con la primera hipótesis se sugiere que cambios en la estructura de los receptores de glutamato en peces le confiere resistencia a la toxina. Sin embargo, esta hipótesis queda descartada al existir evidencia de que los peces, al ser inyectados por vía intraperitoneal, presentan síntomas de sensibilidad neurológica similar a la respuesta estudiada en mamíferos. (Lefebvre et al., 2001; Lefebvre et al., 2007; Lefebvre et al., 2012)

En la segunda hipótesis se establece que, la alta tolerancia al AD en peces, en comparación con la observada en mamíferos y aves, está relacionado con la diferencia en los mecanismos metabólicos de absorción y excreción. Los patrones de captura, distribución en tejido y depuración en peces revelan que los niveles más altos de toxina se acumulan en riñón y vesícula biliar, mientras que los niveles acumulados en bazo, hígado, músculo, corazón y tejido conectivo son de una orden de magnitud menor, lo que sugiere que los primeros

órganos pueden fungir como las rutas primarias de excreción de la toxina y el remanente de esta excreción es lo que se acumula en el resto de los tejidos (Lefebvre et al., 2001).

Esta rápida expulsión sugiere que el AD no es acumulado a niveles preocupantes en los tejidos, a pesar de esto, se sabe que durante los eventos de florecimientos algales nocivos los peces pueden contener en su tracto digestivo niveles de AD de hasta  $1800 \mu\text{gAD g}^{-1}$  en víscera (Lefebvre et al., 2001).

Dado el auge de las actividades acuícola a nivel internacional, es necesario considerar medidas sanitarias sustentadas con investigaciones científicas que garanticen la sanidad de los organismos y la inocuidad de los productos. En el presente trabajo se caracteriza el probable daño del AD en totoaba (*Totoaba macdonaldi*) a nivel conductual y tisular.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Caracterizar la susceptibilidad de la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) a la exposición al ácido domoico por vía oral e intraperitoneal.

### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar si la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es neurológicamente susceptible al ácido domoico.
- Determinar la dosis máxima tolerable de ácido domoico en totoaba (*Totoaba macdonaldi*) a través de inyección intraperitoneal.
- Evaluar la patología inducida por el ácido domoico en el cerebro y otros órganos internos.
- Evaluar la bioacumulación y distribución del ácido domoico en tejidos a través de inyección intraperitoneal y exposición por vía oral.

## 5. HIPÓTESIS

1. El ácido domoico al ser consumido por vía oral no es acumulado en los tejidos de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) por lo que no genera daño tisular ni constituye un riesgo para la salud del organismo.
2. La inyección intraperitoneal de ácido domoico permite que este alcance el sistema nervioso induciendo una respuesta neurotóxica y daño tisular en cerebro.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Mantenimiento de organismos vivos

Un total de 30 organismos de *Totoaba macdonaldi* fueron obtenidos de las instalaciones de la Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre para el cultivo de *Totoaba macdonaldi* de la Facultad de Ciencias Marinas (FCM) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) unidad Ensenada, Baja California, México. Los organismos fueron distribuidos aleatoriamente en 2 tanques con sistemas de recirculación de agua de mar (SRA) (Fig. 5) donde fueron alimentados a saciedad con una dieta comercial. Luego de 24 horas de aclimatización a los sistemas de confinamiento y una vez que se encontró que no presentaron comportamiento anormal como consecuencia del movimiento se procedió a iniciar con la primera parte de los experimentos.



**Figura 5.** Tanques con sistemas de recirculación de agua de mar (SRA) donde se mantuvieron los organismos previo al inicio de los experimentos.

### 6.2 Exposición al ácido domoico

#### 6.2.1 Inyección intraperitoneal

Para determinar si la totoaba es susceptible al ácido domoico y seleccionar una dosis del mismo que causara alteraciones conductuales pero sin causar la muerte de los organismos se diseñó un experimento de inyección intraperitoneal considerando 4 concentraciones

(Tabla 4). El tratamiento control consistió en inyectar peces con 200  $\mu$ l de agua destilada (n=3, peso promedio = 12.52  $\pm$  1.13 g).

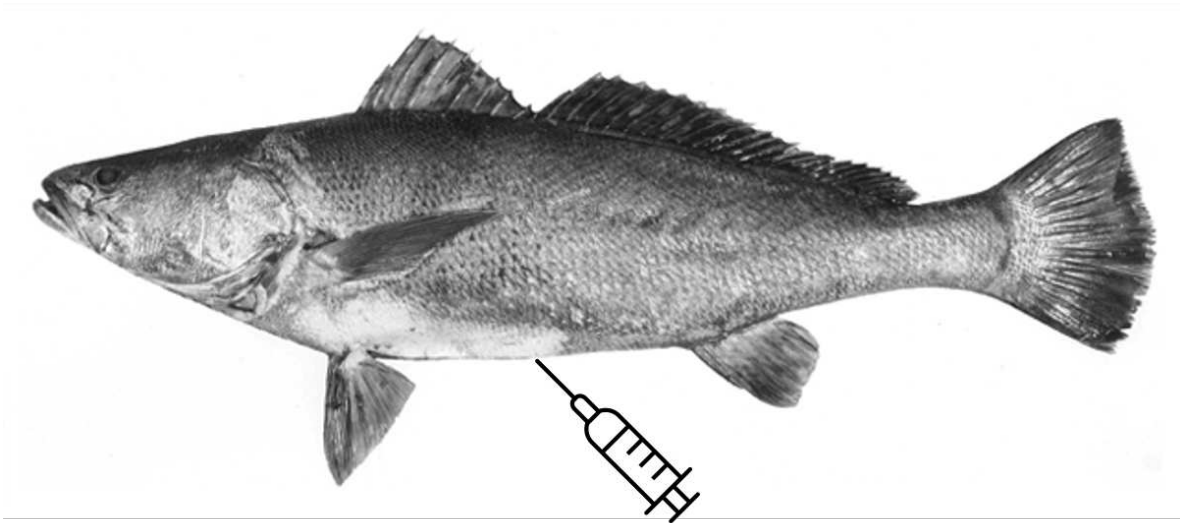
**Tabla 4.** Dosis utilizadas en inyección intraperitoneal.

Dosis ( $\mu$ gAD g <sup>-1</sup> de tejido)	Peso de los organismos (g)	Número de organismos
6.4	11.67 $\pm$ 2.70 g	3
3.2	13.34 $\pm$ 4.85 g	3
1.6	11.92 $\pm$ 3.91g	3
0.8	12.95 $\pm$ 1.75 g	3

De acuerdo al protocolo descrito por Lefebvre et al. (2001) cada pez fue inyectado en el lado ventral en un punto intermedio entre las aletas ventrales y el ano (Fig. 7) utilizando una jeringa de 3ml (Fig. 6.2) con la guja en ángulo hacia el extremo posterior. Se inyectó lentamente el ácido domoico (Sigma aldrich) (Fig. 6.1) en la cavidad intraperitoneal y posteriormente los peces fueron liberados en un acuario (Fig. 8) y observados durante 6 horas. El efecto del AD sobre la conducta de los organismos se evaluó considerando la presencia o ausencia de nado errático, nado en espiral, nado en círculo o nado invertido.



**Figura 6.** 1) Ácido domoico (Sigma aldrich). 2) Jeringas de 3 ml utilizadas para inyección intraperitoneal.



**Figura 7.** Diagrama de sitio de inyección intraperitoneal.



**Figura 8.** Acuario donde se liberaron los organismos posteriormente a la inyección intraperitoneal para observación.

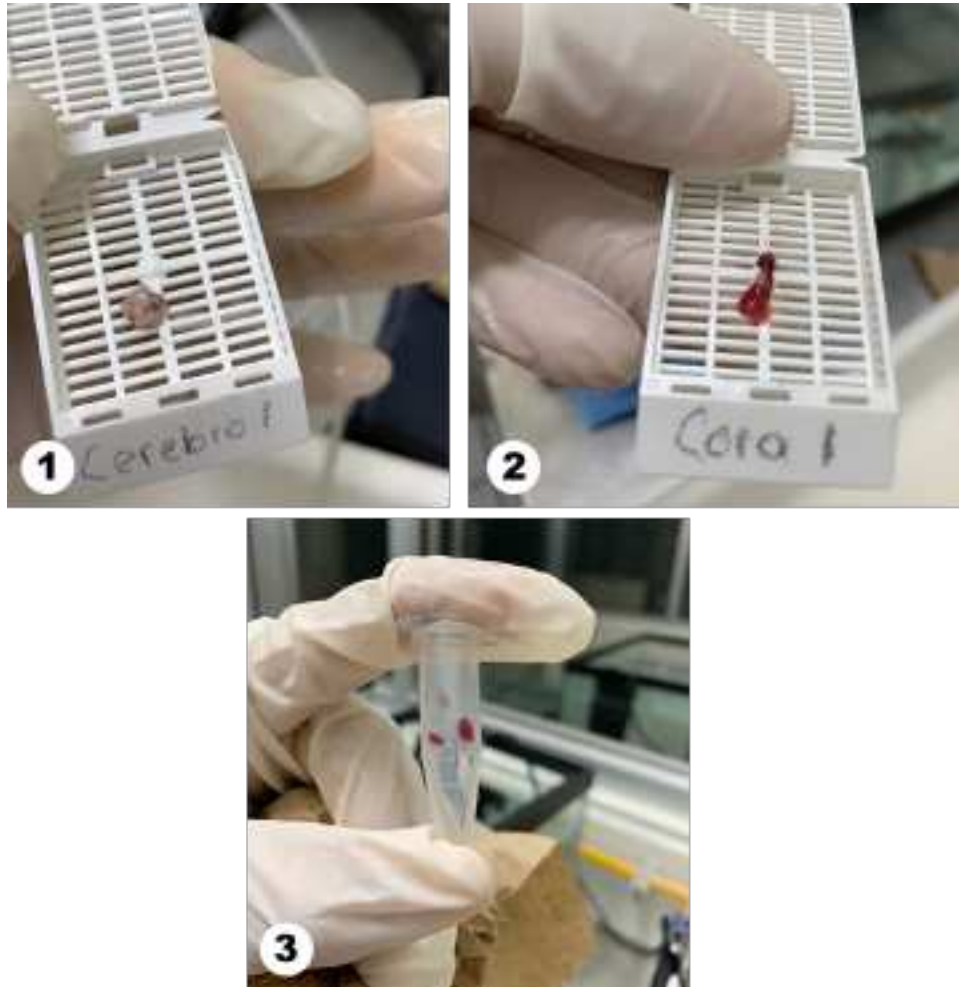
### **6.2.1.1 Eutanasia y disección**

Se realizó eutanasia de los organismos, primero fueron colocados en agua fría para su aletargamiento y después se realizó corte de branquias. No se utilizaron anestésicos para la eutanasia como el MS-222 y aceite de clavo (eugenol) ya que tienen un efecto directo en los receptores de glutamato en células nerviosas bloqueando la actividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Irie, 2006) ejerciendo un mecanismo contrario al inducido por el AD por lo que podrían potencialmente alterar los resultados del efecto del AD en tejidos.

Posteriormente, se realizó la disección de cada organismo realizando una incisión entre las aletas ventrales con navaja y se prolongó con tijeras hacia la mandíbula y posteriormente hacia el ano (Fig. 9.2-9.3). El hígado, corazón, riñón y bazo fueron removidos y enjuagados con agua destilada. Posteriormente se realizó un corte en el cráneo con tijeras para extraer el cerebro completo (Fig. 9.4). Una porción de cada órgano se colocó en casetes de histología (Fig. 10.1-10.2) que se sumergieron en formol al 10% durante 48 horas, mientras que otra porción fue colocada en tubos Eppendorf (Fig. 10.3) y conservada en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la cuantificación de contenido de ácido domoico.



Figura 9. Disección de organismos de *Totoaba macdonaldi*.

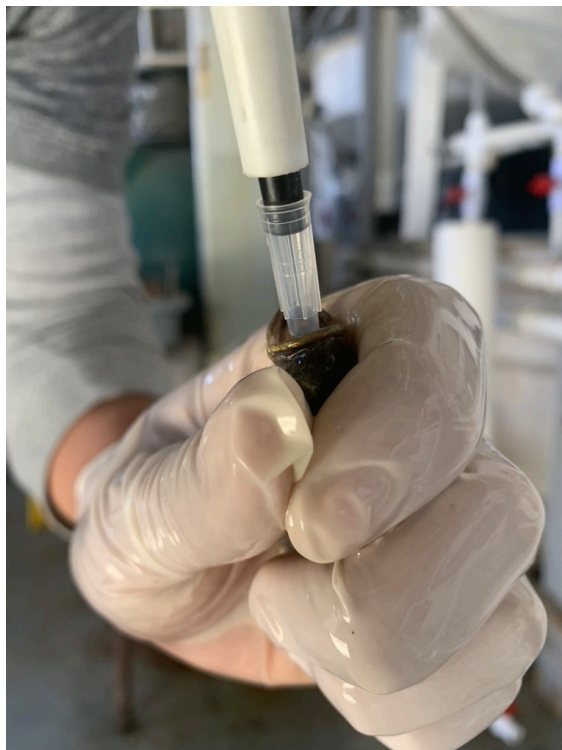


**Figura 10.** Órganos extraídos de *Totoaba macdonaldi*. 1) Cerebro en casete de histología. 2) Corazón en casete de histología. 3) Bazo en tubo Eppendorf para posterior congelación.

### 6.2.2 Tratamiento oral

Con el fin de caracterizar la acumulación del ácido domoico, la distribución en tejidos y potenciales efectos neurotóxicos se seleccionó la concentración de  $1.6 \mu\text{gAD/g}$  de tejido para realizar un experimento de exposición por vía oral. A 12 organismos (peso promedio =  $11.58 \pm 2.28 \text{ g}$ ) se les administró el ácido domoico diluido en  $200 \mu\text{l}$  de agua destilada. Cada pez fue capturado con red y posteriormente utilizando una micropipeta se administró lentamente la solución por vía oral (Fig. 11). Peces control se les administraron  $200 \mu\text{l}$  de agua destilada ( $n = 3$ , peso promedio =  $12.34 \pm 1.23 \text{ g}$ ) siguiendo el protocolo descrito. Luego de la administración los peces fueron liberados en un tanque para observar su comportamiento. Se realizó eutanasia siguiendo el protocolo anteriormente descrito a las

2 horas (n=2), 24 horas (n=5) y 72 horas (n=5). En cada etapa se tomaron muestras de cerebro, hígado y riñón las cuales fueron enjuagadas con agua destilada, colocadas en tubos Eppendorf y congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la cuantificación de ácido domoico. Adicionalmente, a las 24 y 72 horas, se tomaron muestras de cerebro, corazón e hígado las cuales fueron enjuagadas con agua destilada y colocadas en casetes de histología.



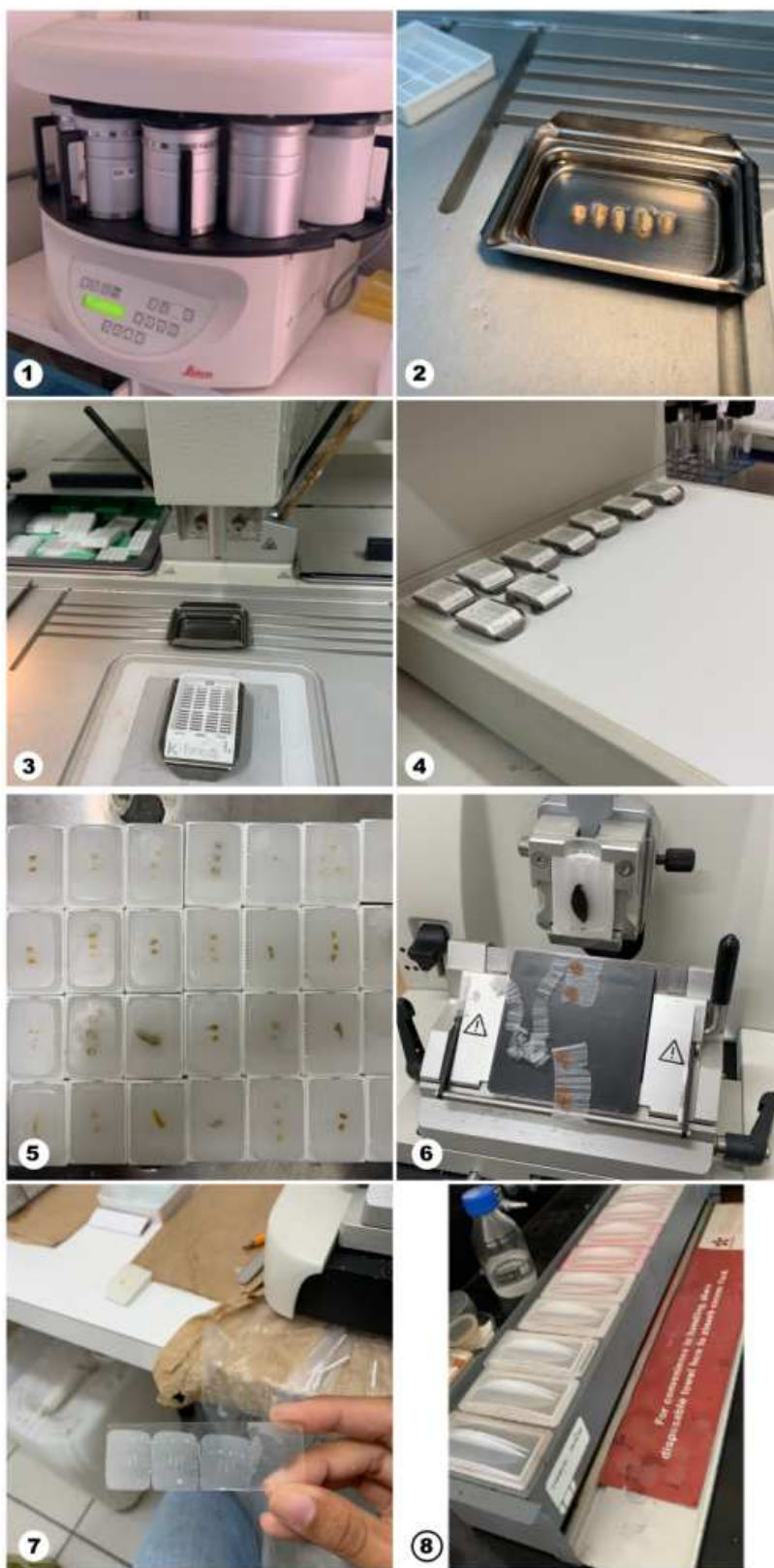
**Figura 11.** Administración de ácido domoico a totoaba por vía oral.

### **6.2.3 Recuperación después de la administración de AD intraperitonealmente**

Con el propósito de evaluar los efectos del ácido domoico en cerebro a corto y mediano plazo se seleccionó la concentración de  $1.6 \mu\text{gAD/g}$  de tejido (n=5, peso promedio=  $9.01 \pm 2.91$  g). Los organismos fueron inyectados siguiendo el protocolo anteriormente descrito y fueron sacrificados a las 24 horas (n=1), 48 horas (n=1) y 72 horas (n=1) siguiendo el protocolo de eutanasia y disección descrito anteriormente. Cerebro, hígado y corazón fueron removidos, enjuagados con agua destilada y colocados en casetes de histología los cuales fueron colocados en formol al 10% durante 48 horas.

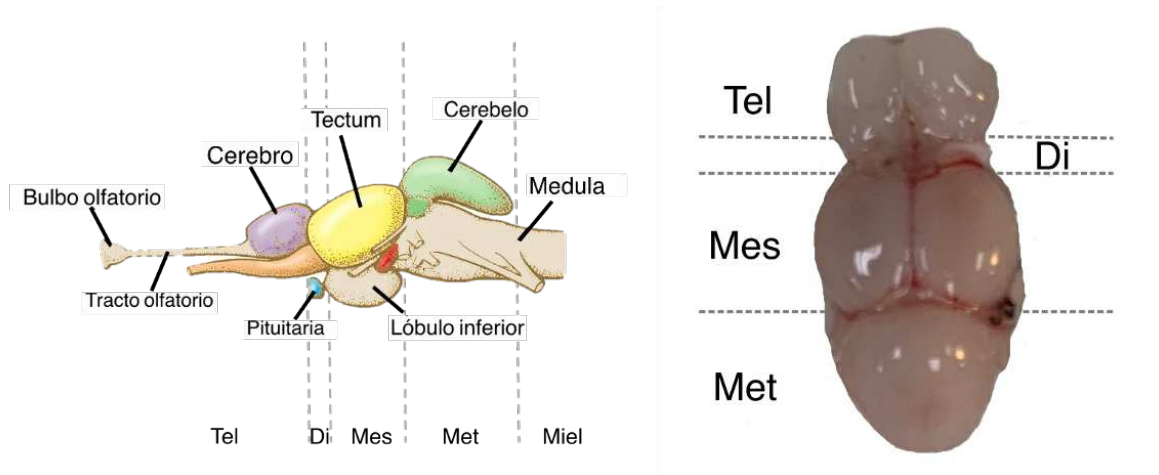
#### **6.4 Análisis histológico**

El análisis histológico de las muestras se realizó siguiendo la técnica descrita en Ross y Pawlina (2009). Las muestras en los casetes de histología que se encontraban en formol al 10% fueron transferidas a etanol al 70% durante 60 minutos para posteriormente pasar por un proceso de deshidratación en baños sucesivos en soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico, diafanización en xileno y posterior inclusión en parafina, este proceso se llevo a cabo en un procesador automático de tejidos LEICA TP 1020 (Fig. 12.1). Al finalizar el proceso se formaron los bloques de parafina utilizando un incluidor de tejidos LEICA EG 1150 H (Fig. 12.3-12.4) una vez formados los bloques se colocaron en una placa fría LEICA EG 1150 C (Fig. 12.4) para la solidificación homogénea de la parafina en los bloques (Fig. 12.5). Se realizaron cortes histológicos de 3  $\mu\text{m}$  de espesor con un micrótopo LEICA RM 21 25 (Fig. 12.6), obteniéndose cortes transversales de mesencéfalo y metaencéfalo para cerebro (Fig. 13) y corte sagital de corazón (Fig. 14), los cortes se extendieron en un baño de agua destilada para su posterior fijación a portaobjetos. Las laminillas se dejaron secar en una estufa a 50°C durante 24 horas para posteriormente pasar por un proceso de desparafinización y tinción utilizando la técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E) (Fig. 12.8). Finalmente, las muestras fueron montadas utilizando resina Cytoseal y cubiertas con un cubreobjetos (Fig. 15).

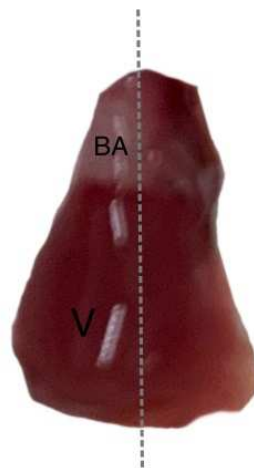


**Figura 12.**Técnica histológica. 1) Procesador automático de tejidos LEICA TP 1020. 2) Corte de muestra de cerebro en regiones de interés previo a la inclusión en parafina. 3) Incluidor

de tejidos LEICA EG 1150 H. 4) Enfriamiento de bloques de parafina en placa fría LEICA EG 1150 C. 5) Bloques de parafina con muestras incluidas. 6) Corte de muestras incluidas en bloque de parafina en micrótopo LEICA RM 21. 7) Cortes en parafina colocados en portaobjetos. 8) Cubetas de tinción.



**Figura 13.** Regiones de cerebro de teleosteo. Izquierda: plano general. Adaptado de Sullivan. Derecha: cerebro de *Totoaba macdonaldi*. Tel: telencéfalo. Di: diencefalo. Mes: mesencéfalo. Met: metaencéfalo.



**Figura 14.** Corazón de *Totoaba macdonaldi*. Línea punteada indica sitio de corte (corte sagital). BA: bulbo arterioso. V: ventrículo.



**Figura 15.** Laminillas con muestras montadas en resina.

### **6.5 Cuantificación de ácido domoico**

Las muestras para cuantificación de AD se analizaron mediante un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS, Agilent 6470). Las muestras que se encontraban almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se descongelaron a temperatura ambiente por aproximadamente una hora. La extracción se realizó en tubos tipos Eppendorff de 2 ml donde se colocó la muestra y se añadió el solvente de extracción (MeOH 50%) en una relación 1:4. Las muestras se homogenizaron en un agitador de tubos vortex K-550-G durante 3 minutos para posteriormente pasar al proceso de limpieza mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 8 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se recuperó el sobrenadante para la cuantificación del AD, este se filtró utilizando filtros de polipropileno Agilent Technologies de  $0.2\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro, el filtrado se recuperó en un inserto de 250  $\mu\text{l}$  que fue colocado en tubos ambar de 1.5 ml donde finalmente se añadió ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración final de 0.15%.

El análisis por LC-MS/MS se llevó a cabo de acuerdo a Mafra, et al. 2009. Utilizando un espectrómetro de masas Agilent 6470 con triple cuadrupolo con fuente de ionización

electrospray que utiliza nitrógeno como gas de nebulización y una columna analítica Agilent Zorbax Eclipse Plus-C18 (100 x 2.1 mm de diámetro interno, tamaño de poro 1.8  $\mu\text{m}$ ). El tiempo de corrida fue de 8 minutos a una temperatura de 45°C con un flujo constante de 0.25 ml/min. La fase móvil fue agua + ácido fórmico (0.2%) como solución A y acetonitrilo + ácido fórmico (0.2%) como solución B. El gradiente de bombeo en dicha fase fue (Tiempo, %B): 0 min, 10 %; 4 min, 35%; 7.3 min, 35% y 8 min, 10%.

### **6.6 Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas en el análisis de los tiempos de respuesta. Al tener un  $n < 5$  para cada grupo se descarta la posibilidad de utilizar pruebas paramétricas, con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre dosis de los grupos que presentaron signos basándose en las hipótesis:

Ho: grupo 6.4 = grupo 3.2 = grupo 1.6

Ha: Al menos uno de los grupos es diferente

Los datos sobre el tiempo de respuesta fueron divididos en dos categorías: 1) tiempo en que los organismos presentaban desorientación y 2) tiempo en el cual se presentaba nado en espiral.

El primer paso para aplicar la prueba consiste en asignar un rango a cada valor:

**Tabla 5.** Se indican los tiempos de respuesta en minutos para la categoría de desorientación con el nombre de cada grupo en el encabezado (grupo 6.4, grupo 3.2 y grupo 1.6) en la columna siguiente de cada grupo se indica el rango correspondiente a cada valor.

	<b>Grupo 6.4</b>	<b>Rango</b>	<b>Grupo 3.2</b>	<b>Rango</b>	<b>Grupo 1.6</b>	<b>Rango</b>
	24	3	24	4	41	9
	22	2	27	5	31	6
	3	1	40	8	34	7
<b>Σ Rangos</b>		6		17		22
<b>n</b>		3		3		3

**Tabla 6.** Se indican los tiempos de respuesta en minutos para la categoría nado en espiral con el nombre de cada grupo en el encabezado (grupo 6.4, grupo 3.2 y grupo 1.6) en la columna siguiente de cada grupo se indica el rango correspondiente a cada valor.

	<b>Grupo 6.4</b>	<b>Rango</b>	<b>Grupo 3.2</b>	<b>Rango</b>	<b>Grupo 1.6</b>	<b>Rango</b>
	37	5	31	3	76	7
	41	6	212	9	34	4
	5	2	0	1	160	8
<b>Σ Rangos</b>		13		13		19
<b>n</b>		3		3		3

Luego de asignar un rango a cada valor, se suman los rangos de cada columna, estos datos son utilizados para obtener un valor de H calculada mediante la siguiente formula:

$$H \text{ cal} = [ (12 / n_{\text{Tot}} * n_{\text{Tot}} + 1) (\sum (T_k^2 / n_k)) - 3 (n_{\text{Tot}} + 1) ]$$

Donde:

$n_{\text{Tot}}$ = total de observaciones (9)

$T_k$ = sumatoria de rangos por columna

$n_k$ = número de observaciones por columna

Posteriormente se calcula un valor de H calculada, utilizando Minitab, fundamentada en la siguiente formula:

$$H \text{ cri} = \chi^2_{1-\alpha, k-1}$$

Donde:

$\alpha = 0.5$

$k-1 = 2$

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Inyección intraperitoneal

#### 7.1.1 Comportamiento

Los organismos inyectados vía intraperitoneal con la dosis más baja de ácido domoico ( $0.8 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido) mostraron un incremento en su actividad y una ligera desorientación caracterizada por nado cercano a la superficie del agua y choque contra las paredes del acuario al nadar. Se observó este comportamiento durante los primeros 5 a 15 minutos luego de la inyección recuperando su actividad normal después de este periodo de tiempo.

Los organismos tratados con las dosis intermedias ( $1.6$  y  $3.2 \mu\text{gAD g}^{-1}$ ) presentaron signos de daño neurológico caracterizados por desorientación, nado errático, nado en espiral y nado invertido. Los signos se presentaron en un tiempo promedio de 30.33 minutos para el grupo tratado con  $1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido y 35.33 minutos, para el grupo tratado con  $3.2 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Ninguno de los organismos murió con estas dosis como consecuencia de la inyección después 6 horas de observación.

Los peces que recibieron la dosis más alta,  $6.4 \mu\text{gAD/g}$  de tejido, presentaron signos severos de excitotoxicidad y el total de organismos murieron dentro del tiempo de observación ( $49.33 \pm 22.8$  minutos).

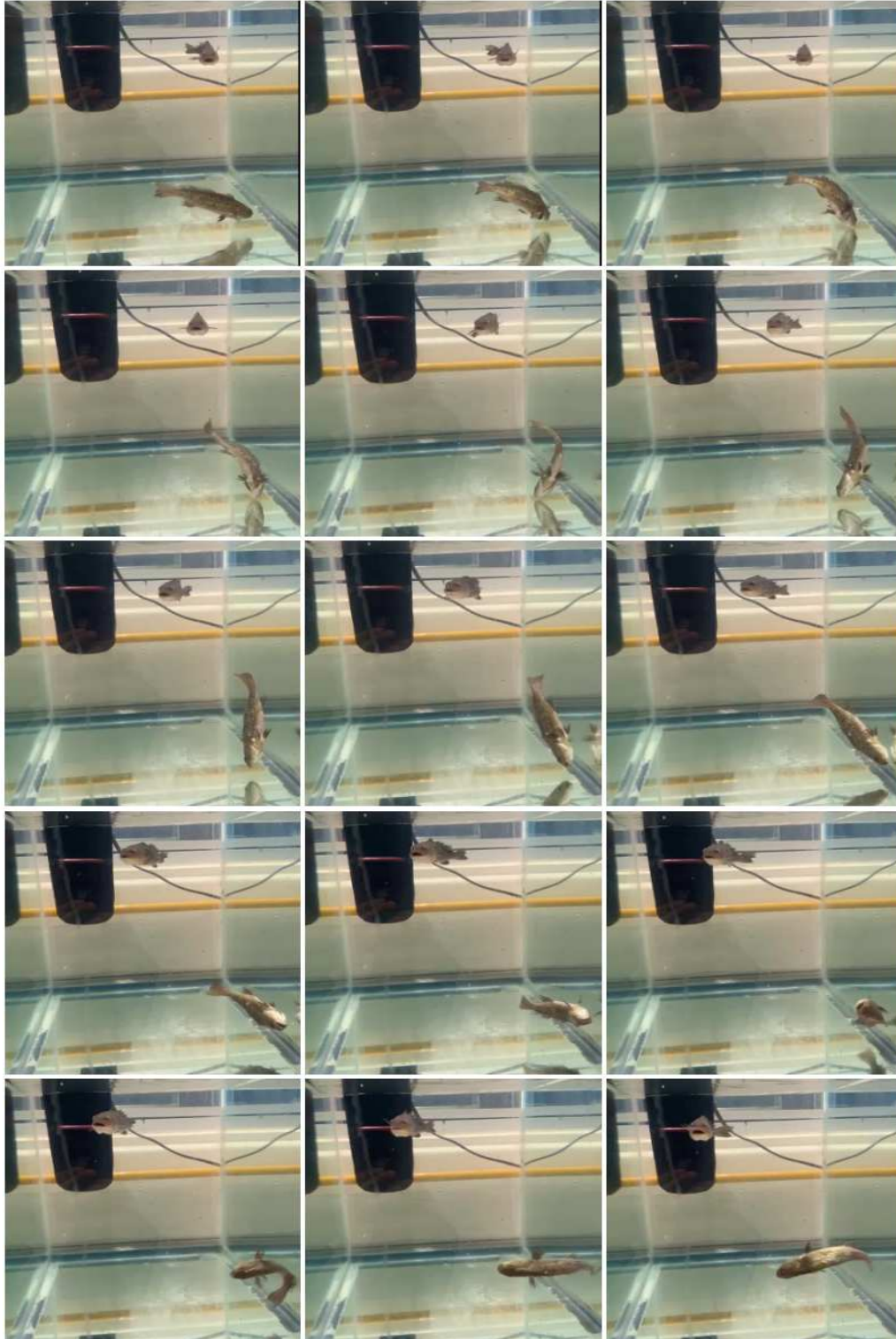
**Tabla 7.** Tiempos de respuesta.

Dosis ( $\mu\text{gAD g}^{-1}$ de tejido)	Número de organismos tratados	Número de organismos sintomáticos	Tiempo de respuesta (min)	Número de organismos muertos	Tiempo (min)
0.8	3	0	-	0	-
1.6	3	3	$35.33 \pm 5.13$	0	-
3.2	3	3	$30.33 \pm 8.5$	0	-
6.4	3	3	$16.33 \pm 11.6$	3	$49.33 \pm 22.8$

En todos los organismos que presentaron signos el daño neurológico se caracterizó por alteraciones en la forma de nadar. Durante los primeros minutos, los peces presentaron desorientación, mostraron incremento de actividad caracterizado por giros rápidos y nadar alternativo hacia el fondo del acuario y hacia la superficie del mismo. A medida que los signos progresaron los peces se mantienen flotando cerca de la superficie del acuario en una posición ligeramente vertical sacando la cabeza del agua por fragmentos de cortos de tiempo. Además, los peces adquieren una posición totalmente vertical con la cabeza orientada hacia la superficie del acuario, presentan nado vertical y, a medida que los síntomas avanzan, los peces comenzaron a dar vueltas sobre su propio eje manteniendo la posición vertical. Finalmente, se presentó el nado en espiral siendo el signo más evidente de daño neurológico. El nado en espiral persistió hasta el final de las 6 horas de observación o, en el caso de la dosis más alta, hasta la muerte de los organismos.

#### **7.1.1.1 Análisis estadístico: tiempos de respuesta**

Como resultado del análisis de varianza de una vía de Kruskal-Wallis se obtuvo un valor de H calculada de 5.96 para la categoría de desorientación y un valor de 1.07 para la categoría de nado en espiral teniendo para ambos casos un valor de H crítica de 5.99. Al ser H calculada < H crítica en ambos casos se acepta la hipótesis nula lo cual indica que no existen diferencias estadísticamente significativas en los tiempos de respuesta entre los grupos tratados con distintas dosis.



**Figura 16.** Comportamiento (signos de excitotoxicidad) presentados por *Totoaba macdonaldi* tras exposición a ácido domoico a través de inyección intraperitoneal. Imágenes obtenidas de video de evaluación conductual de organismo expuesto a la dosis de  $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido.

## 7.1.2 Evaluación histopatológica

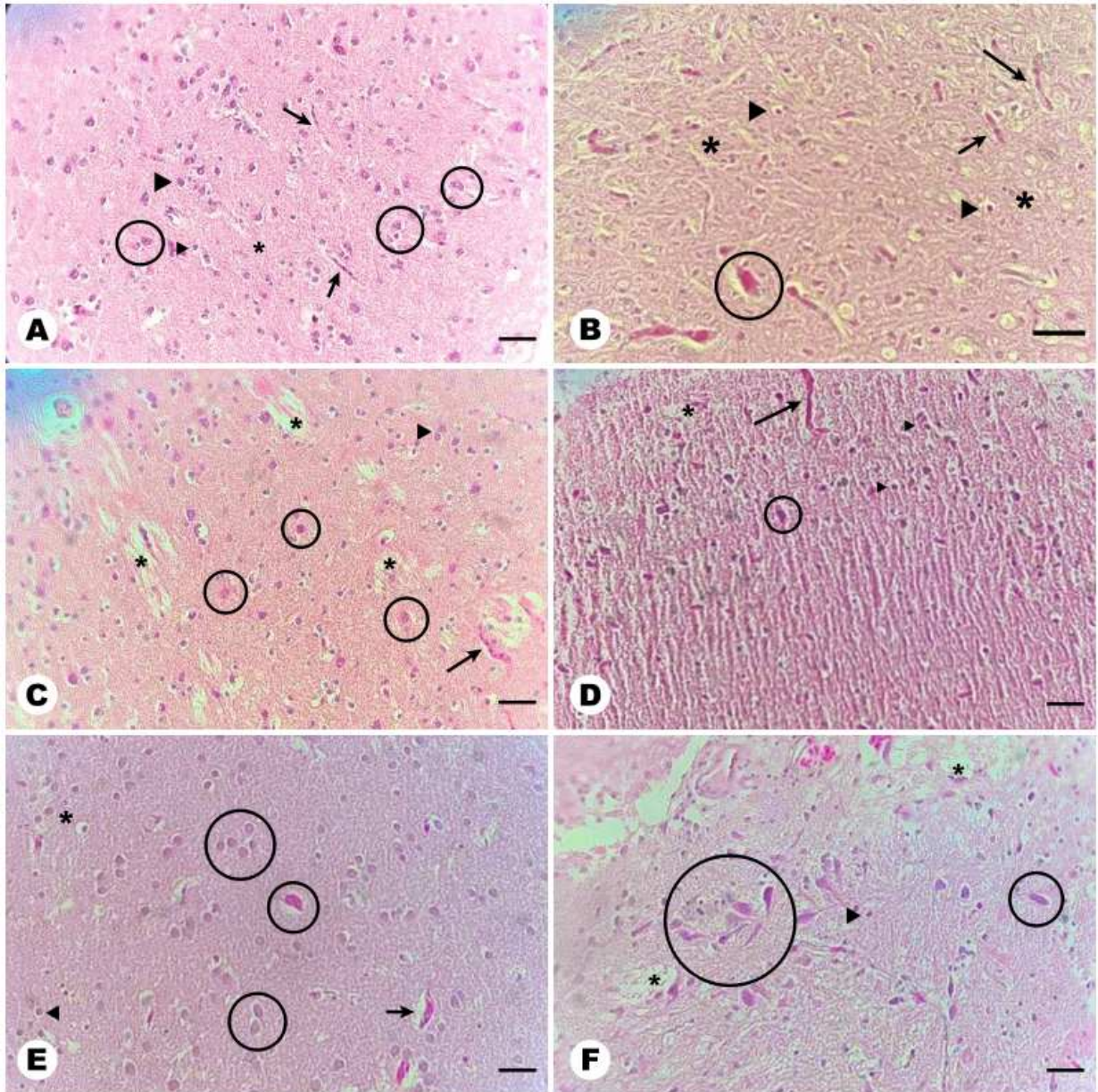
### 7.1.2.1 Cerebro

Se obtuvieron cortes transversales de mesencéfalo y metaencéfalo obteniendo imágenes de lóbulo óptico (tectum) y cerebelo, respectivamente. El tejido cerebral del grupo control (Fig. 17A y Fig. 18A) mostró características histológicas normales. El grupo con la dosis más baja (0.8  $\mu\text{gAD/g}$  de tejido) presentó capilares hiperémicos en el tejido del lóbulo óptico (Fig. 17B) y características histológicas normales en cerebelo (Fig. 18B).

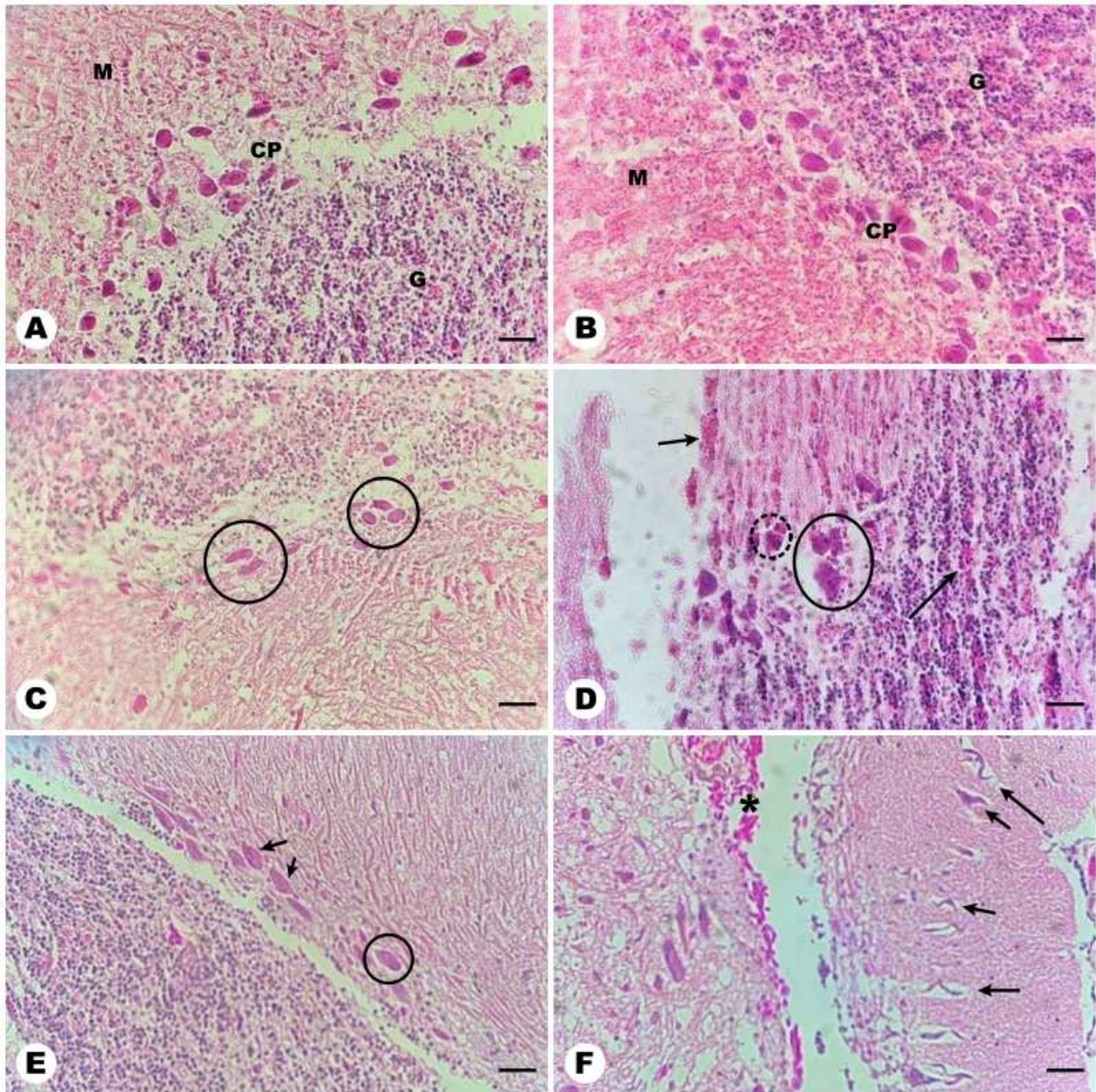
En lóbulo óptico (tectum) (Fig. 17) se identificaron alteraciones evidentes en el tejido a partir del grupo tratado con la dosis de 1.6  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido entre las que se observan células con eosinofilia citoplasmática (Fig. 17C, D, E) que indica una de las primeras etapas de necrosis, pérdida de neuropilo (Fig. 17C, D, F), vacuolización de citoplasma (Fig. 17E) y necrosis (Fig. 17F).

En cerebelo el grupo control y el grupo tratado con la dosis de 0.8  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido no presentaron alteraciones histológicas. Los grupos tratados con las dosis 1.6, 3.2 y 6.4  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido presentaron daño histopatológico evidente caracterizado por la presencia de células necróticas en distintas etapas entre las que se incluyen picnosis (Fig. 18D) y cariólisis (Fig. 18D, F), hiperemia (Fig. 18D, F), vacuolización de citoplasma (Fig. 18E) y presencia de células con citoplasma pálido indicador de las primeras etapas de necrosis.

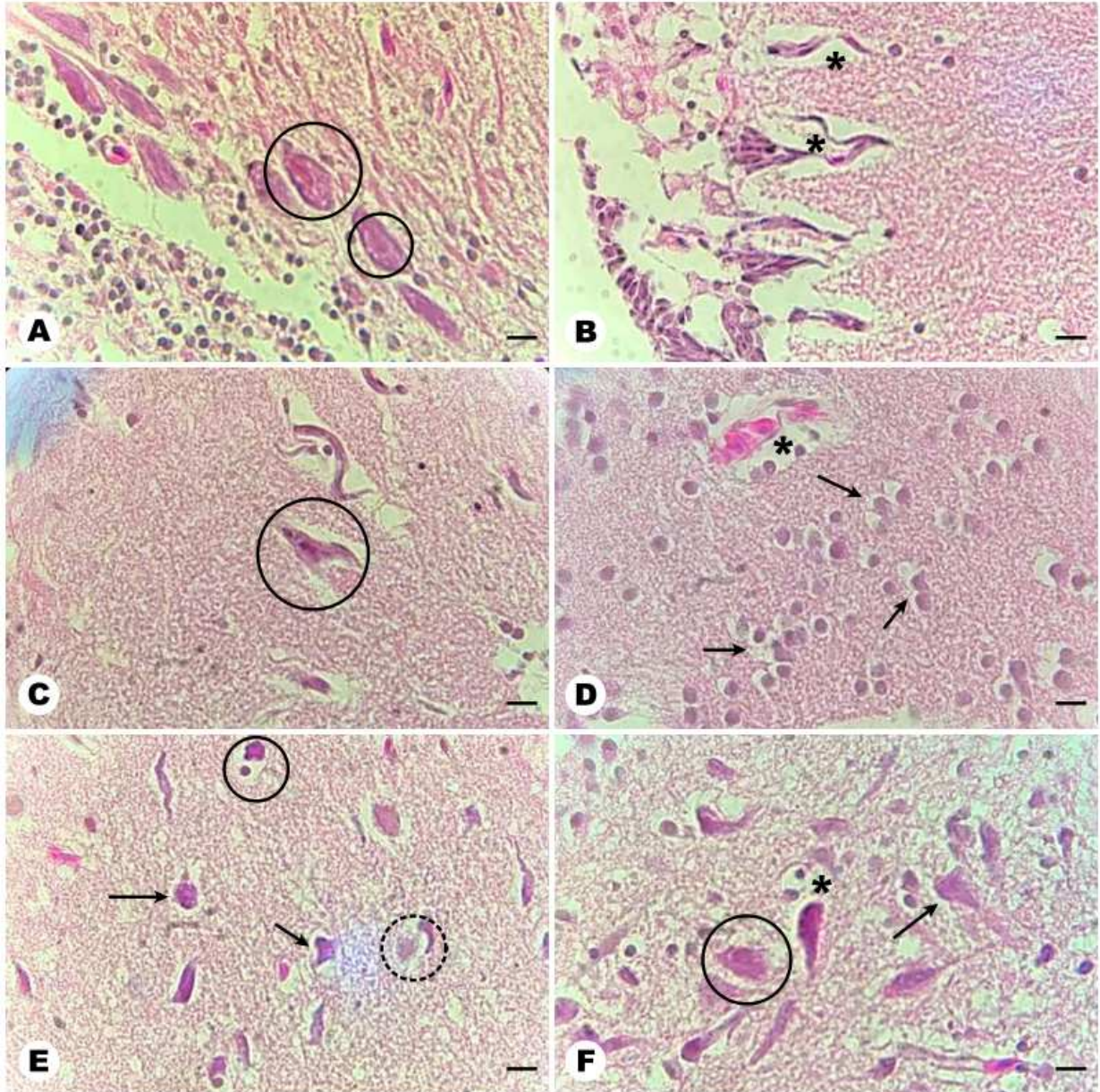
Se consideraron las muestras del grupo tratado con la dosis más alta para caracterizar el daño histopatológico causado por el ácido domoico. Se observaron distintas etapas de necrosis oncótica incluyendo separación de las células adyacentes como la característica más evidentes (Fig. 19D), picnosis (Fig. 19F, 20A, B), cariorrexis (Fig. 20A) y cariólisis (Fig. 19B, C, E, F). También se detectó pérdida de neuropilo (Fig. 19D), células en apoptosis (Fig. 19E), necrosis coagulativa (Fig. 20B) y hemorragias severas (Fig. 20E, D).



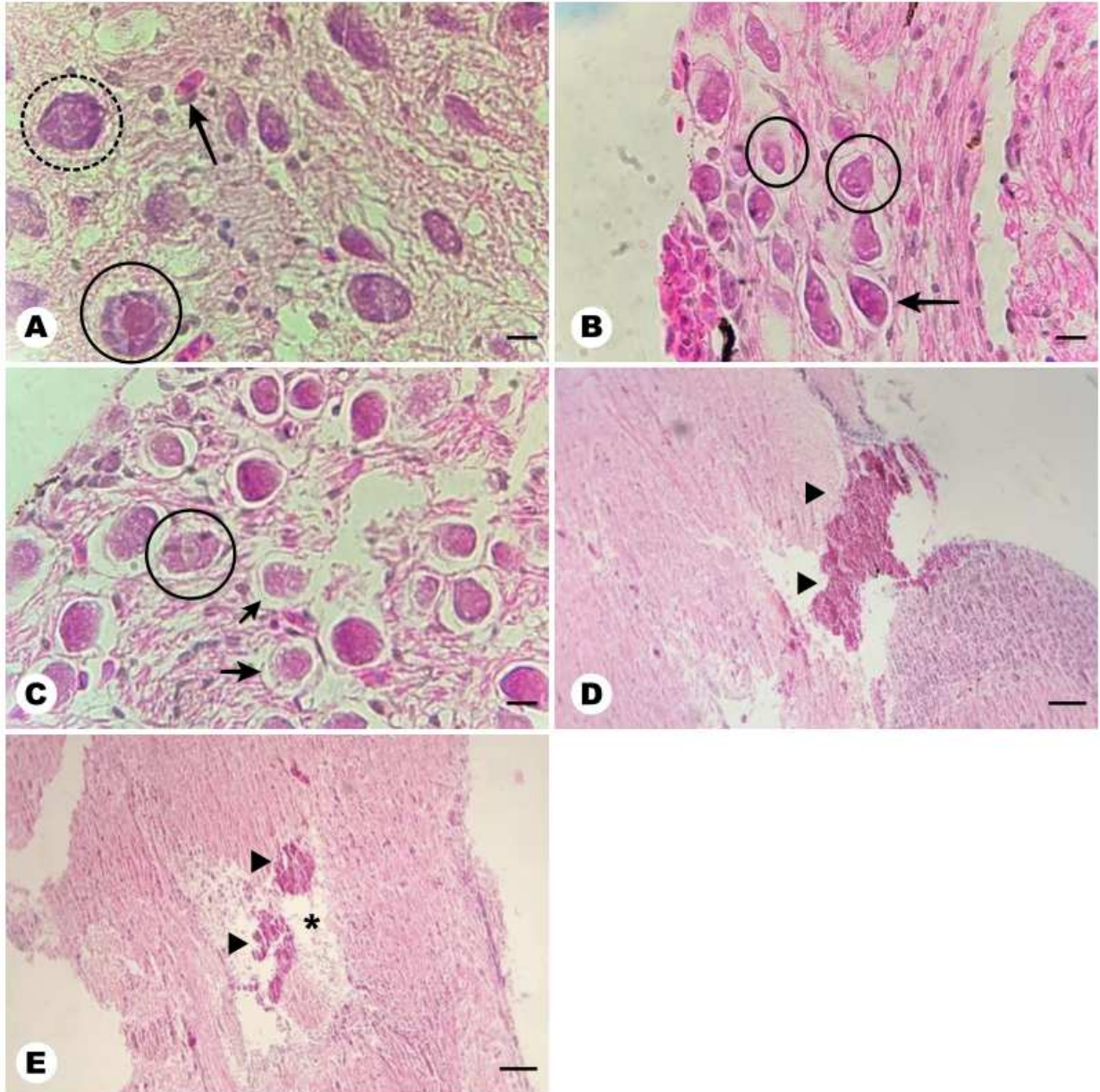
**Figura 17.** Histopatología de tejido cerebral (Lóbulo óptico). A) Histología normal de lóbulo óptico. Neuronas (círculos). Capilares (flecha). Células gliales (cabeza de flecha). Neuropilo (asterisco). Grupo control. 40x. B) Grupo 0.8  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Neuronas (círculo). Capilares (flecha) Células gliales (cabeza de flecha). Neuropilo (asterisco). 40x. C) Grupo 1.6  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Neuronas con eosinofilia citoplasmática (círculo). Capilares (flecha). Pérdida de neuropilo (asterisco). 40x. D) Grupo 3.2  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Neurona con eosinofilia citoplasmática (círculo). Capilar (flecha). Células gliales (cabeza de flecha). Pérdida de neuropilo (asterisco). 40x. E) Grupo 6.4  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Neurona con citoplasma eosinófilo (círculo central). Neuronas con necrosis (círculos). Capilares (flecha). Vacuolización de citoplasma (asterisco). 40x. F) Grupo 6.4  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Neuronas con necrosis (círculo). Pérdida de neuropilo (asterisco). 40x. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 18.** Histopatología de tejido cerebral (Cerebelo). A) Histología normal de cerebelo. M: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. G: capa granular. Grupo control. 40x. B) M: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. G: capa granular Grupo 0.8  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. C) Neuronas con necrosis (círculos). Grupo 1.6  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. D) Cariolisis (círculo continuo). Neurona con apariencia encogida y núcleo picnótico (círculo punteado). Hiperemia (flecha). Grupo 3.2  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. E) Neuronas dañadas con citoplasma pálido (flechas). Vacuolización de citoplasma (círculo). Grupo 6.4  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. F) Cariolisis: neuronas con atrofia y pérdida de integridad de membrana (flechas). Hiperemia (asterisco). Grupo 6.4  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 19.** Histopatología de tejido cerebral grupo con dosis más alta ( $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido). A) Cerebelo. Neuronas con vacuolización de citoplasma (círculos). 100x. B) Cerebelo. Neuronas con atrofia y pérdida de integridad de membrana (cariolisis) (asterisco). 100x. C) Cerebelo. Cariolisis (círculo). 100x. D) Lóbulo óptico. Pérdida de neuropilo (asterisco). Neuronas necróticas (asterisco). 100x. E) Lóbulo óptico. Neurona con apoptosis (cuerpo apoptótico) (círculo continuo). Cariolisis (flechas). Neurona “fantasma” (círculo punteado) con pericarion pálido, núcleo y borde indefinido. 100x. F) Lóbulo óptico. Neuronas en distintas etapas de necrosis. Cariolisis (Flecha). Picnosis (círculo). Neurona con citoplasma eosinófilo (asterisco). 100x. Barra =  $20 \mu\text{m}$ .

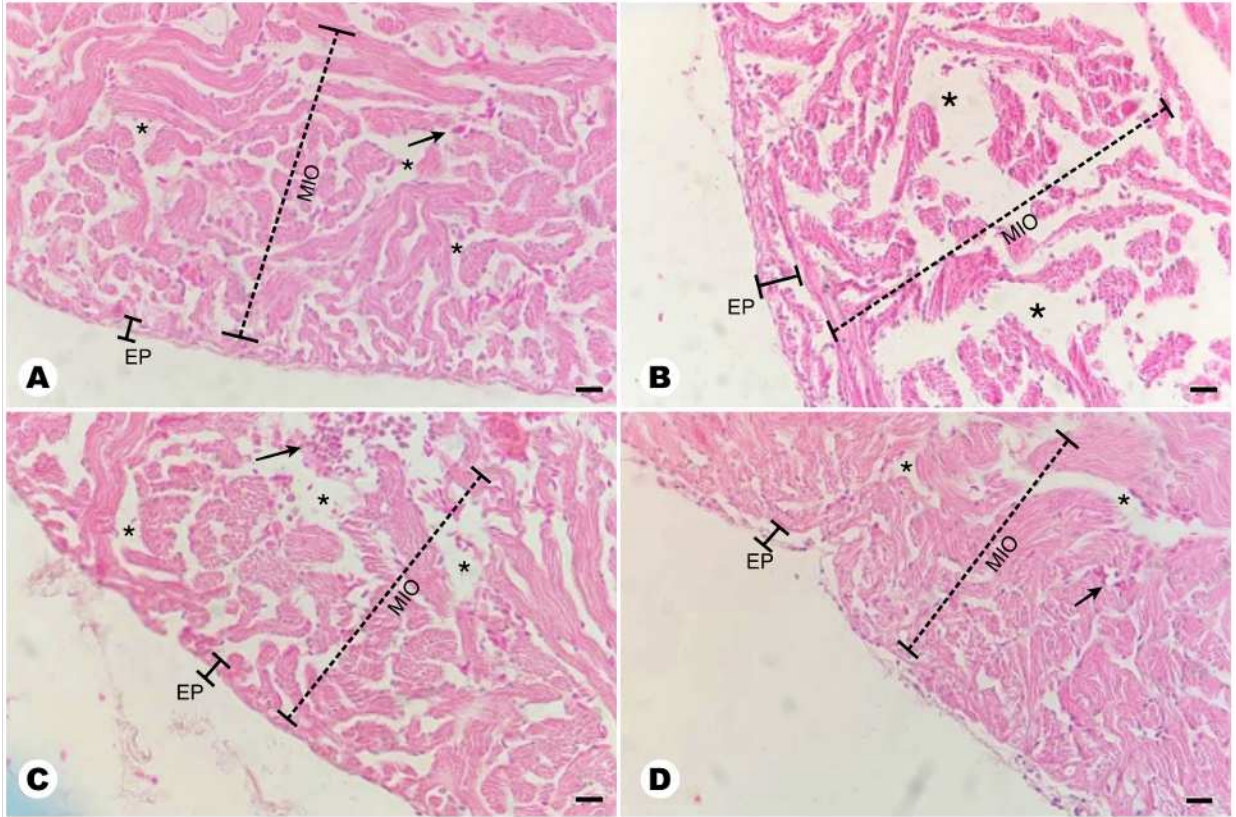


**Figura 20.** Lesiones histopatológicas en tejido cerebral. Grupo con dosis más alta ( $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido) A) Células necróticas. Neurona con atrofia, citoplasma eosinófilo y núcleo picnótico (flecha). Neurona con vacuolización de citoplasma y núcleo picnótico (Círculo continuo). Cariorrhexis (círculo punteado). 100x. B) Necrosis coagulativa. Núcleo picnótico (Flecha). Vacuolización de citoplasma (Círculos). 100x. C) Neuronas con pericarion pálido y atrofia. Núcleo y bordes difusos (kariolisis). 100x. Barra =  $20 \mu\text{m}$ . D) Hemorragia (cabeza de flecha). 10x. E) Hemorragia (Cabeza de flecha). Pérdida de neuropilo (asterisco). 10x. Barra =  $10 \mu\text{m}$ .

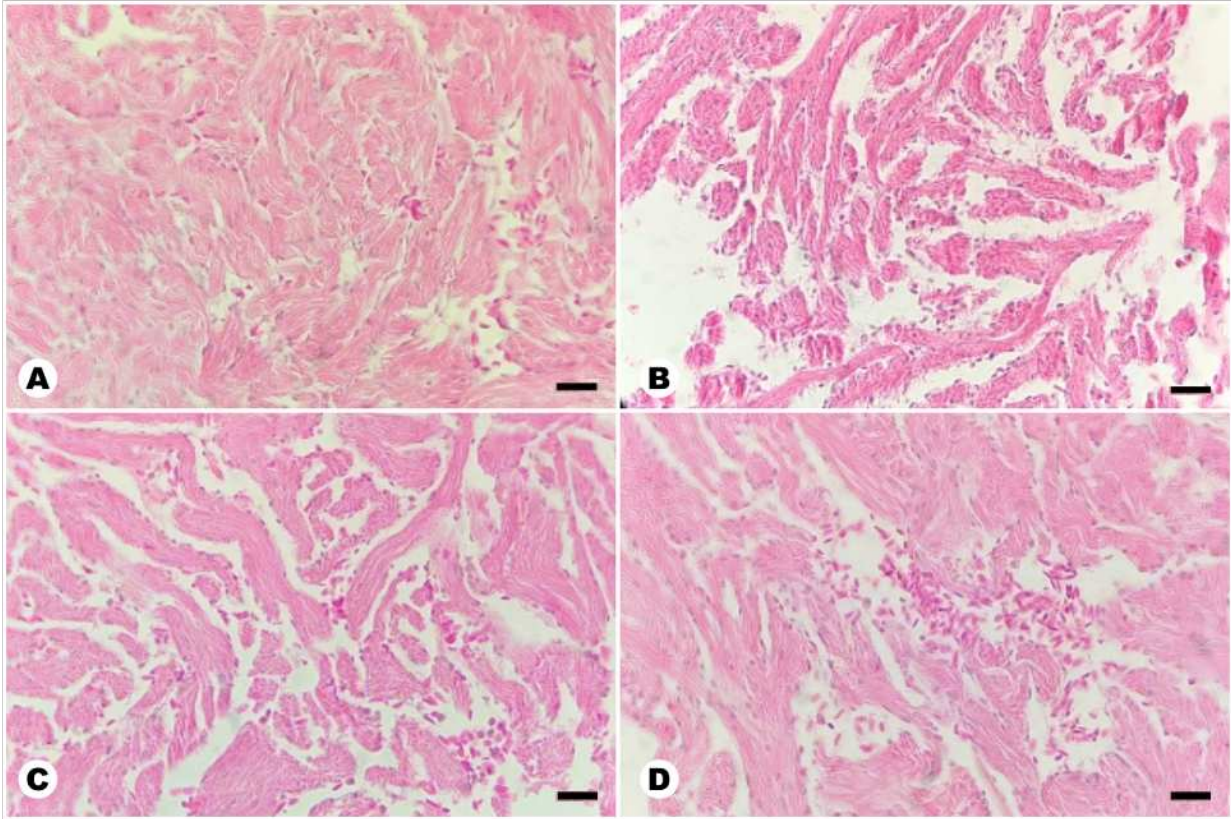
### 7.1.2.2 Corazón

Se obtuvieron cortes sagitales de corazón. En imágenes de bajo aumento (Fig. 21) es posible observar dos de las tres capas que componen el corazón de los peces: 1) la capa más externa es el epicardio (EP) que consiste en una única capa de tejido epitelial plano sobre una delgada capa de tejido conectivo y la capa intermedia, 2) el miocardio (MIO) compuesto por varias capas de fibras musculares, con apariencia esponjosa y con espacios para la circulación sanguínea. El tejido cardíaco del grupo control (Fig. 21A) presenta características histológicas normales, el grupo tratado con la dosis más baja ( $0.8 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido) presenta signos de cardiomiopatía dados por amplia separación entre fibras musculares dejando espacios vacíos (Fig. 21B; 22B; 23A) además de hipercontracción de bandas (Fig. 21B; 22B), así como un incremento en la irrigación sanguínea (Fig. 22B) lo cual fue un signo consistente en los grupos con las dosis más altas (Fig. 22C-D).

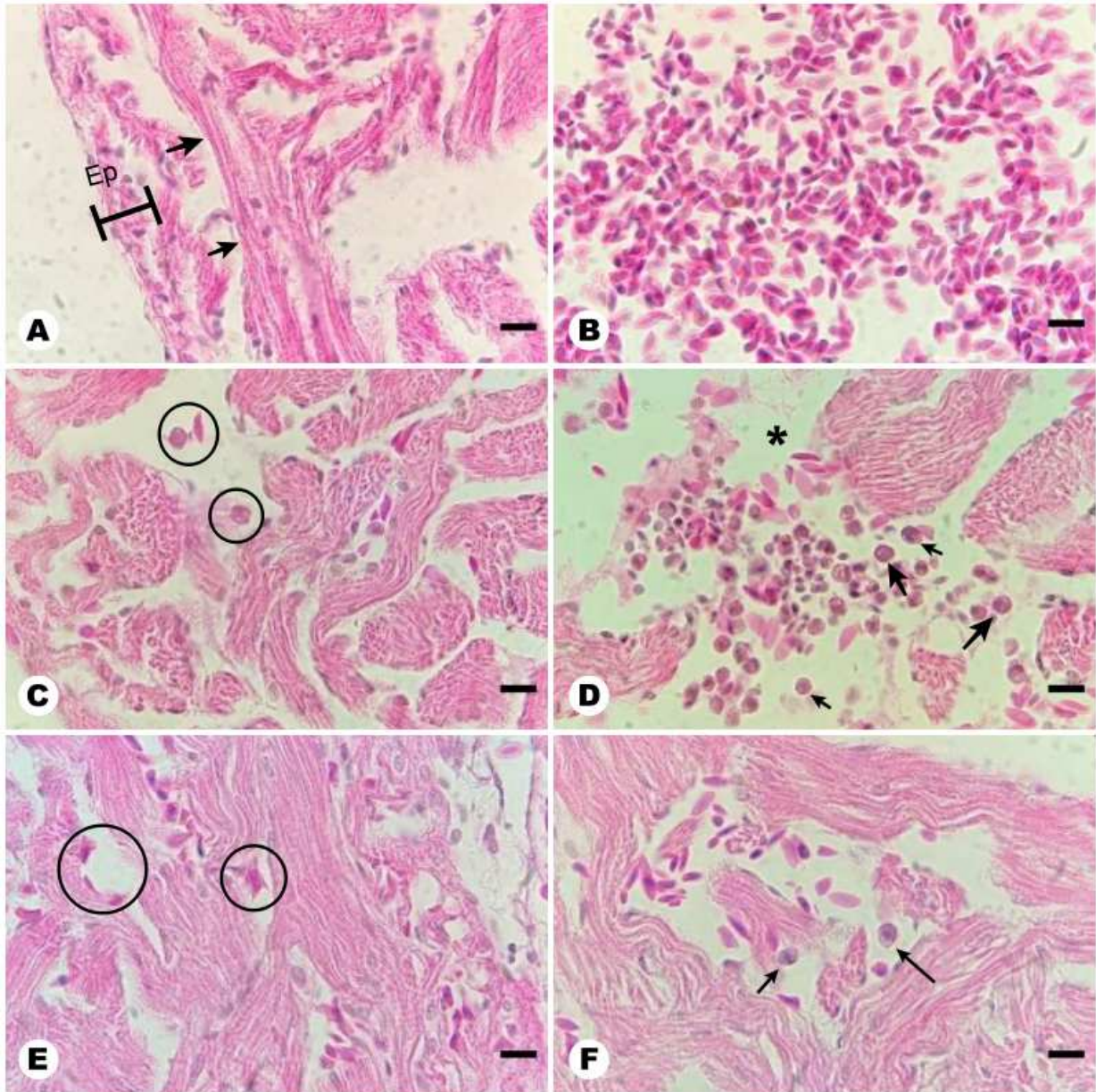
Los grupos tratados con las dosis de 3.2 y  $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  presentaron amplia separación de fibras musculares dejando espacios vacíos en los que se observan restos de tejido conectivo (Fig. 23D-E). También en estos grupos se presentó infiltración de células inflamatorias en los espacios intersticiales (Fig. 23C, D, E y F) así como presencia de eritrocitos con bordes irregulares (Fig. 23E).



**Figura 21.** Estructura histológica de corazón (ventrículo). A) Histología normal de ventrículo. Grupo control. 40x. B) Grupo  $0.8 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. C) Grupo  $3.2 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. D) Grupo  $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. EP: epicardio. MIO: miocardio. Flechas: eritrocitos. Asteriscos: espacios de circulación sanguínea. Barra =  $10 \mu\text{m}$ .



**Figura 22.** Estructura histológica de ventrículo (miocardio). A) Histología normal de miocardio. Grupo control. 40x. B) Grupo  $0.8 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. C) Grupo  $3.2 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. D) Grupo  $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. 40x. Barra =  $10 \mu\text{m}$ .



**Figura 23.** A) Grupo  $0.8 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Ep: epicardio. Fibras musculares (flechas). 100x. B) Grupo  $0.8 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Eritrocitos en lumen. 100x. C) Grupo  $3.2 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Leucocitos (círculo). 100x. D) Grupo  $3.2 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Infiltración de leucocitos (flechas). Espacio intersticial con restos de tejido conectivo (asterisco). 100x. E) Grupo  $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Eritrocitos con bordes irregulares (círculos). Restos de tejido conectivo (asterisco). 100x. F) Grupo  $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. Infiltración de leucocitos (flechas). 100x. Barra =  $20 \mu\text{m}$ .

### 7.1.3 Contenido de ácido domoico

Debido al tamaño de los organismos utilizados en el experimento el volumen de las muestras de órganos fue escaso. La cantidad de muestra de riñón y bazo fue insuficiente para realizar el análisis de contenido de AD (Tabla 7). Por lo tanto, el análisis se realizó únicamente en las muestras de hígado.

**Tabla 8.** Peso de las muestras de órganos obtenidas de los organismos utilizados en inyección intraperitoneal de AD. Se indica el peso de cada órgano en gramos.

Dosis ( $\mu\text{gAD/g}$ )	Hígado (g)	Riñón (g)	Bazo (g)
6.4	0.15	0.18	0.06
3.2	0.1	0.04	0.05
1.6	0.18	0.07	0.06
0.8	0.16	0.07	0.06
Blanco	0.24	0.09	0.07

Se detectó la presencia de AD en todas las muestras de hígado obtenidas a las 6 horas después de la inyección intraperitoneal. Las concentraciones medias de AD en hígado para cada dosis se presentan en la tabla 8. Se indica el porcentaje de recuperación en hígado considerando la dosis total inyectada como el 100%.

**Tabla 9.** Concentración de AD en hígado de totoaba tras exposición por vía intraperitoneal a cuatro dosis distintas.

Dosis	AD en hígado	% recuperación
6.4	2.568	40.13
3.2	1.262	39.44
1.6	1.211	75.69
0.8	0.46	57.50
B	No detectado	-

## **7.2 IP Recuperación después de la administración de AD intraperitonealmente**

### **7.2.1 Comportamiento**

El total de los organismos tratados presentaron signos de daño neurológico en un tiempo promedio de  $43.8 \pm 6.0$  minutos. Las alteraciones conductuales que se presentaron fueron similares a las descritas anteriormente para la inyección intraperitoneal. Se presentó al inicio un incremento de actividad y nado en superficie, para posteriormente pasar a un nado en posición vertical con pérdida de equilibrio y finalmente el signo más evidente de daño neurológico que corresponde al nado en espiral.

Tres de los organismos tratados mostraron signos de recuperación ( $n_1 = 4$  horas;  $n_2 = 10$  horas;  $n_3 = 22$  horas) y otros dos organismos murieron ( $n_1 = 23$  horas;  $n_2 = 32$  horas). Los organismos recuperados nadaban de forma normal sin presentar alteración conductual evidente.

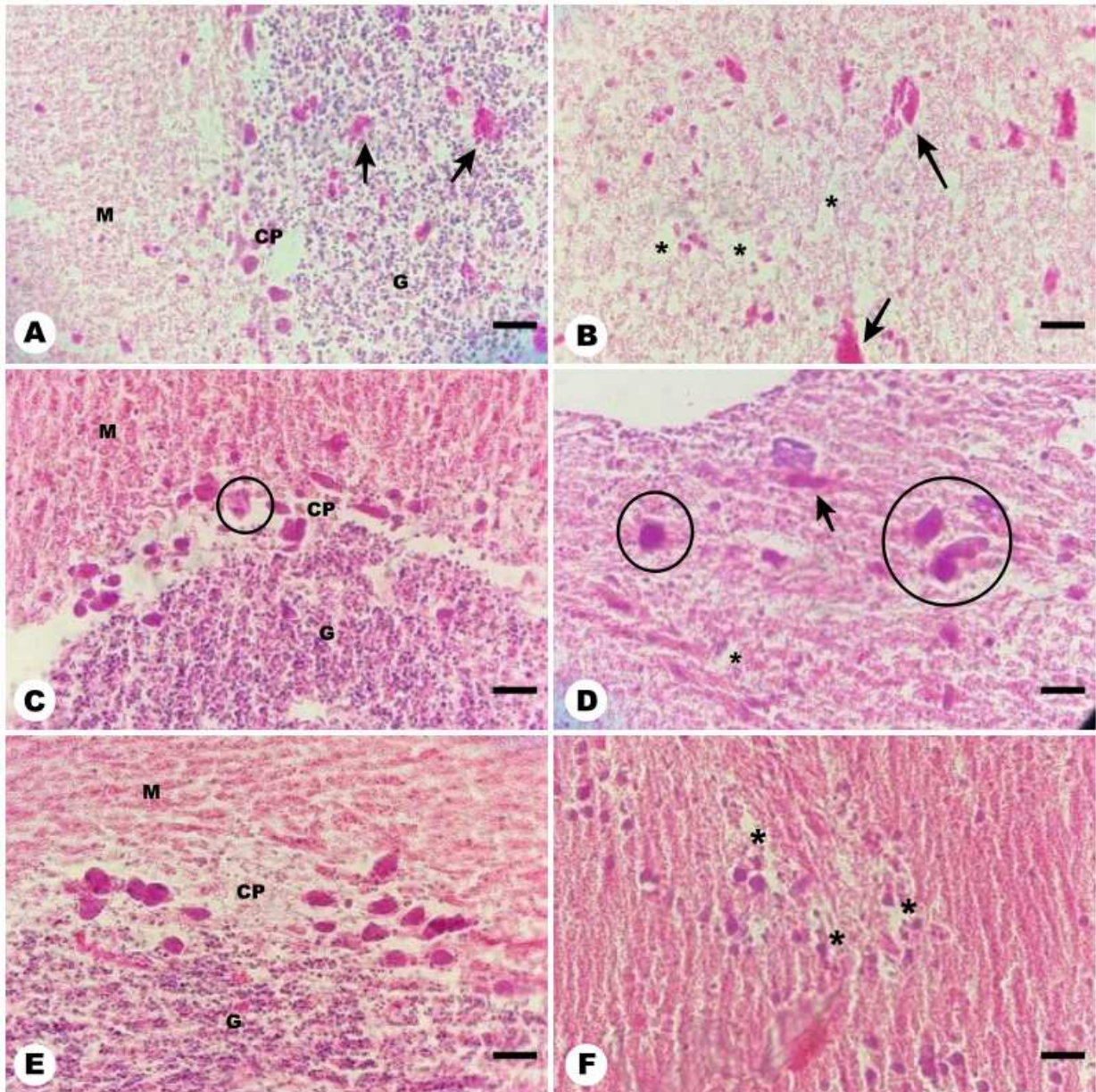
### **7.2.2 Evaluación histopatológica**

#### **7.2.2.1 Cerebro**

Se obtuvieron cortes transversales de mesencéfalo y metaencéfalo obteniendo imágenes de lóbulo óptico (tectum) y cerebelo, respectivamente. El tejido cerebral de los organismos sacrificados 24 horas después de la inyección (Fig. 35A, B) presenta hemorragias severas en la capa granular de cerebelo (Fig. 35A) así como pérdida de neuropilo en el lóbulo óptico (Fig. 35B).

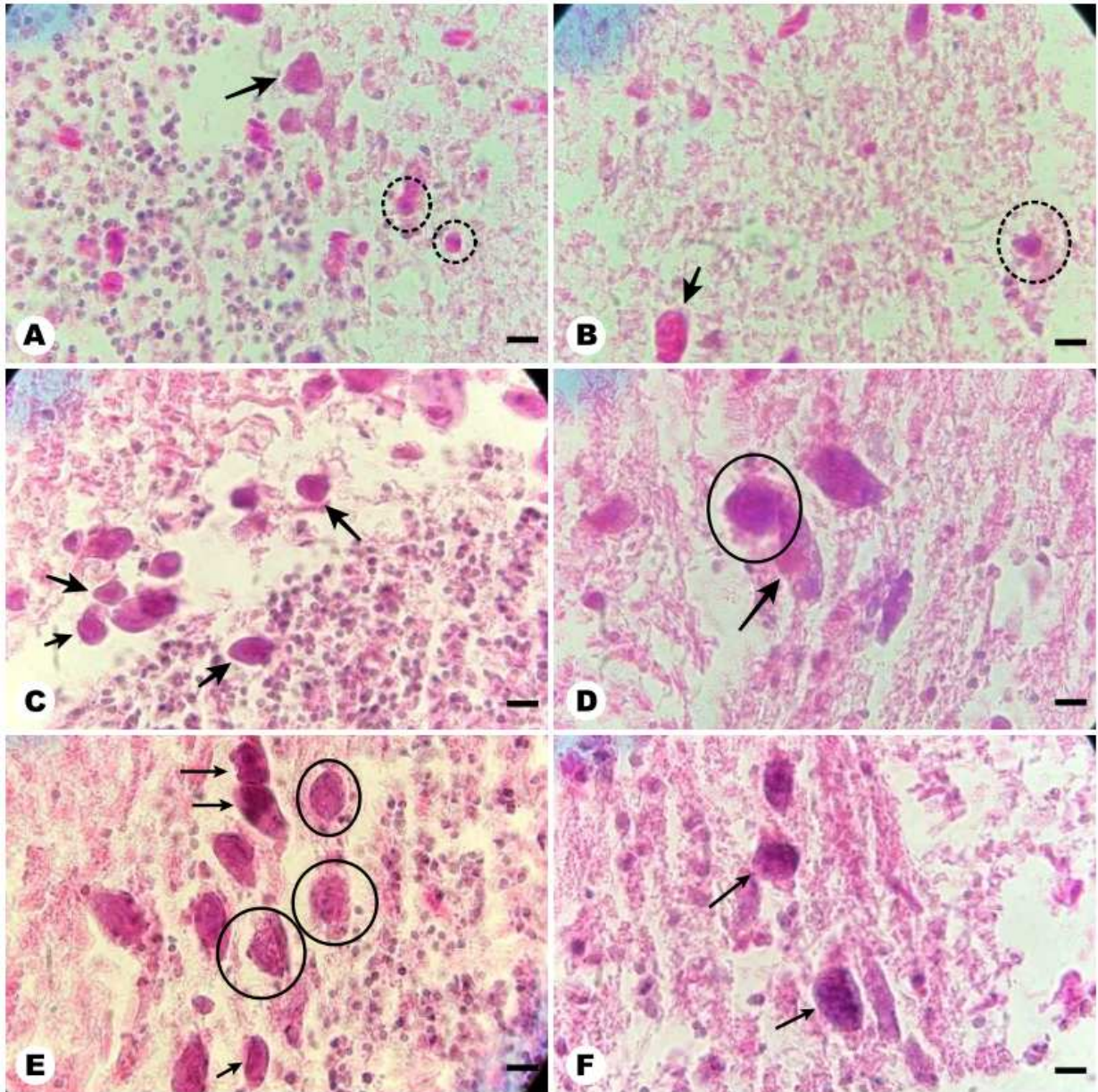
A las 48 horas (Fig. 35C, D) en cerebelo (Fig. 35C) se observó separación de las capas granular y molecular, así como neuronas necróticas en la capa de células de Purkinje. En el lóbulo óptico (Fig. 35D) se presentó pérdida de neuropilo y neuronas con condensación del núcleo (picnosis). El último grupo de organismos, sacrificados 72 horas después de la inyección presentó alteraciones histológicas tanto en cerebelo (Fig. 35E) como en lóbulo óptico (Fig. 35F). En el cerebelo el daño se caracterizó por células de Purkinje con eosinofilia

citoplasmática y fragmentación nuclear (Cariorrexis), mientras que en lóbulo óptico se presentó pérdida de neuropilo y neuronas picnóticas.



**Figura 24.** Tejido cerebral de grupo tratado con 1.6 µgAD g-1 de tejido. A) Cerebelo. 24 horas. M: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. G: capa granular. Hemorragias (flechas). 40x. B) Lóbulo óptico. 24 horas. Hemorragias (flechas). Pérdida de neuropilo (asteriscos). 40x. C) Cerebelo. 48 horas. Neurona con fragmentación nuclear (cariorrexis) (círculo). 40x. D) Lóbulo óptico. 48 horas. Neuronas con condensación de núcleo (picnosis) (círculos). Pérdida de neuropilo (asteriscos). Capilar hiperémico (flecha) 40x. E) Cerebelo.

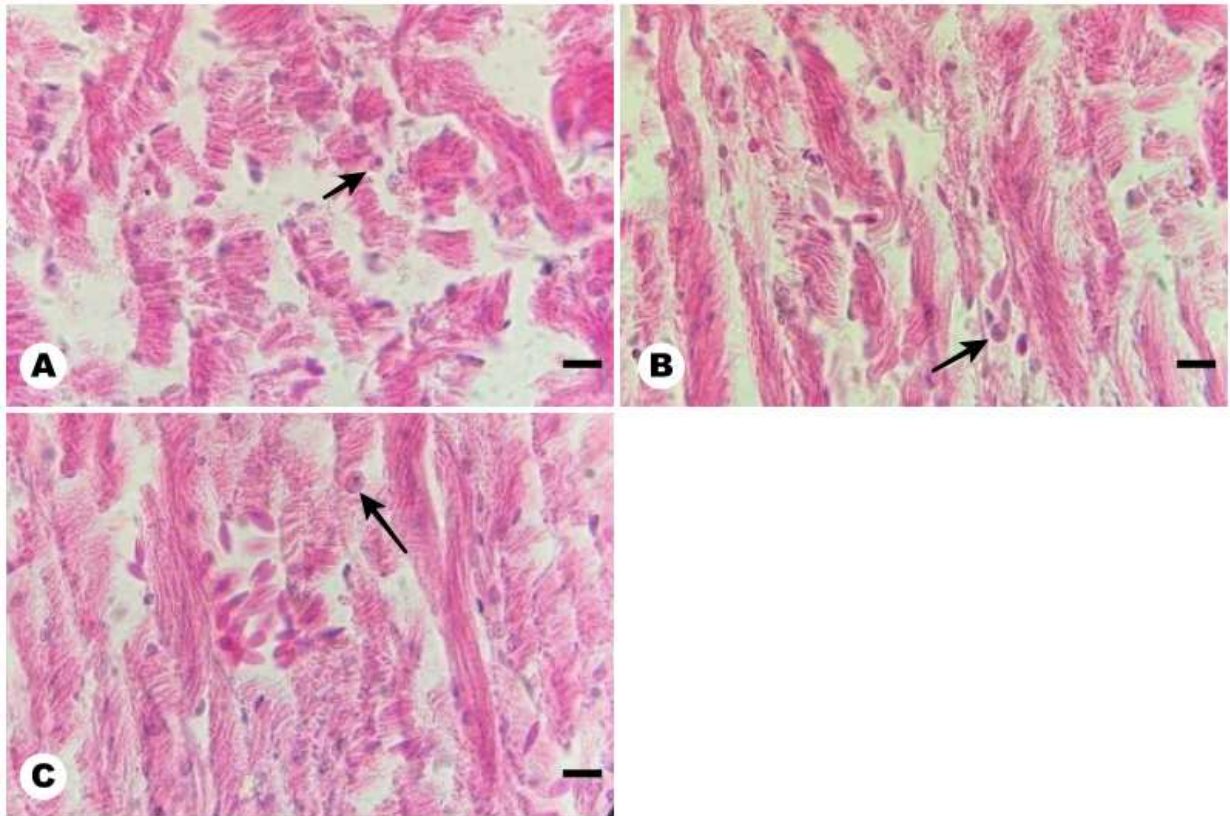
72 horas. Células de Purkinje con eosinofilia citoplasmática. 40x. F) Lóbulo óptico. 72 horas. Perdida de neuropilo (asteriscos). 40x. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 25.** Tejido cerebral de grupo tratado con  $1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. A) Cerebelo. 24 horas. Neurona hipertrófica (flecha). Neuronas picnóticas (círculos punteados). 100x. B) Lóbulo óptico. Hipertrofia y cariorrexis (flecha). Neurona picnótica (círculo punteado). 24 horas. 100x. C) Cerebelo. Neuronas con picnosis (flechas). 48 horas. 100x. D) Lóbulo óptico. 48 horas. Cariolisis (círculo). Vacuolización de citoplasma (flecha). 100x. E) Cerebelo. 72 horas. Neuronas con picnosis (flechas). Células con cariorrexis (círculos). 100x. F) Lóbulo óptico. 72 horas. Cariorrexis (flechas). 100x. Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

### 7.2.2.2 Corazón

El tejido cardíaco de los organismos sacrificados a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la inyección presentó características similares. En los tres casos se presentó amplia separación de fibras musculares con restos de tejido conectivo en los espacios resultantes, así como hipercontracción de bandas e infiltración de células inflamatorias.



**Figura 26.** Histología de miocardio grupo tratado con  $1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido. A) 24 horas. 100x. B) 48 horas. 100x. C) 72 horas. 100x. Barra =  $20 \mu\text{m}$ .

## **7.3 Tratamiento oral**

### **7.3.1. Comportamiento**

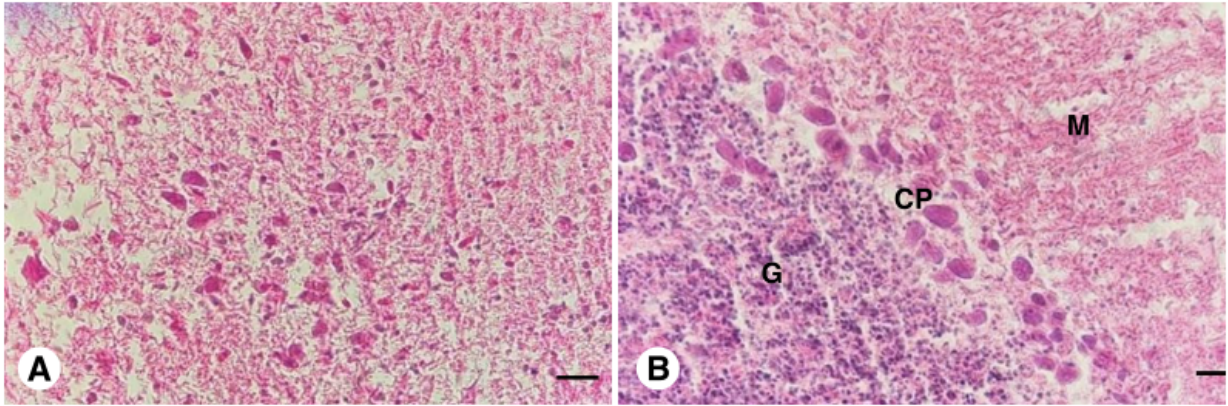
Los organismos que recibieron la solución de ácido domoico por vía oral no presentaron alteraciones conductuales que indicaran daño neurológico. Luego de la administración de la solución al ser liberados al tanque presentaban un incremento de actividad, caracterizado por nado rápido y cercano a la superficie del agua, recuperando su actividad normal dentro de los primeros 5 minutos posteriores. Los organismos del grupo control tampoco presentaron alteraciones conductuales.

### **7.3.2 Evaluación histopatológica**

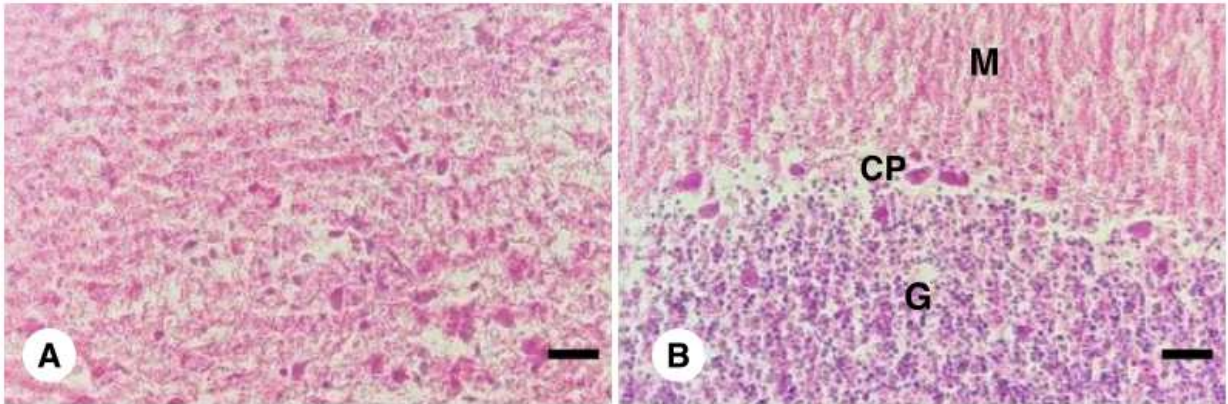
#### **7.3.2.1 Cerebro**

Se obtuvieron cortes transversales de mesencéfalo y metaencéfalo obteniendo imágenes de lóbulo óptico (tectum) y cerebelo, respectivamente. El tejido cerebral del grupo control muestra características histológicas normales (Fig. 24A y 24B). En las muestras obtenidas en las 2 horas posteriores a la administración del AD (Fig. 25) no se observaron alteraciones histológicas. Mientras que, a las 24 y 72 horas, en cerebelo (Fig. 26A y Fig. 27A) no se observaron alteraciones histológicas indicadoras de daño neurológico, en capa granular las células son pequeñas y numerosas, las células de Purkinje se encuentran alineadas sobre la capa granular y presentan morfología normal. En capa molecular, neuropilo no presenta alteraciones estructurales.

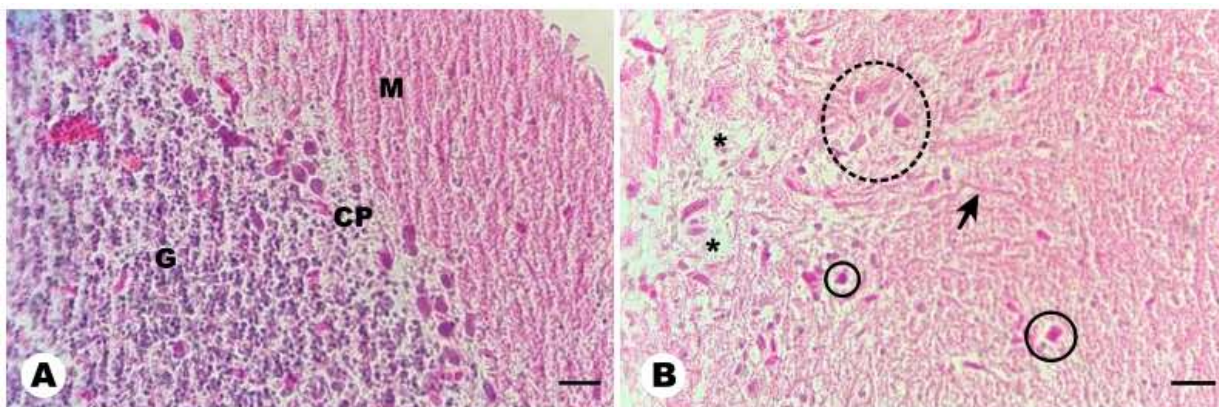
Por otra parte, a las 24 y 72 horas, en lóbulo óptico (tectum) (Fig. 26B y Fig. 27B) se identificaron alteraciones en el tejido caracterizadas por pérdida de neuropilo (asteriscos), neuronas con condensación del núcleo lo que es indicador de picnosis, una de las primeras etapas de necrosis oncótica.



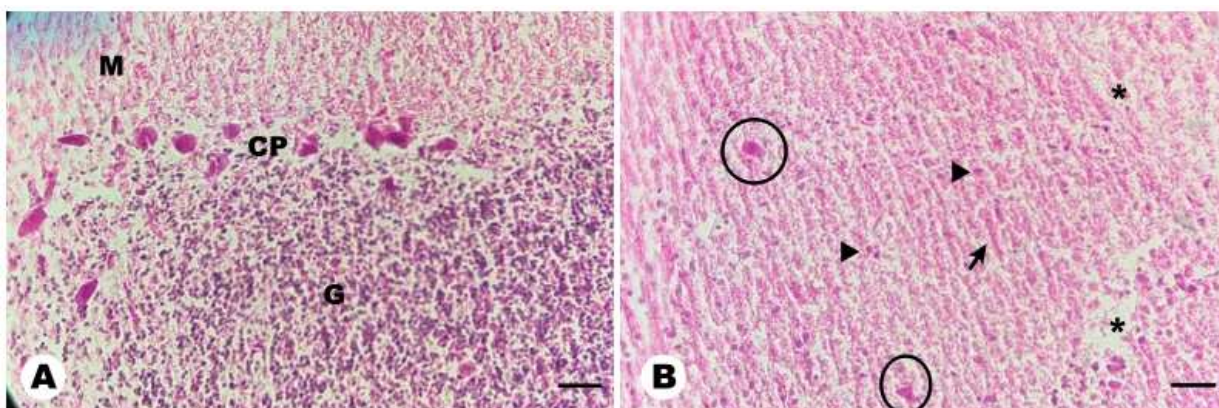
**Figura 27.** Histología tejido cerebral grupo control. A) Lóbulo óptico. B) Cerebelo. G: capa granular. CP: capa de células de Purkinje. M: capa molecular.



**Figura 28.** Histología de tejido cerebral grupo con tratamiento oral (2 horas). A) Lóbulo óptico. B) Cerebelo. G: capa granular. CP: capa de células de Purkinje. M: capa molecular.



**Figura 29.** Histología de tejido cerebral grupo con tratamiento oral (24 horas). A) Cerebelo. M: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. G: capa granular. 40x. B) Lóbulo óptico. Neuronas con condensación de núcleo (círculos continuos). Neuronas con citoplasma pálido y morfología anormal (Círculo punteado). Pérdida de neuropilo (asterisco). Capilar (Flecha). 40x. Barra = 10  $\mu$ m.

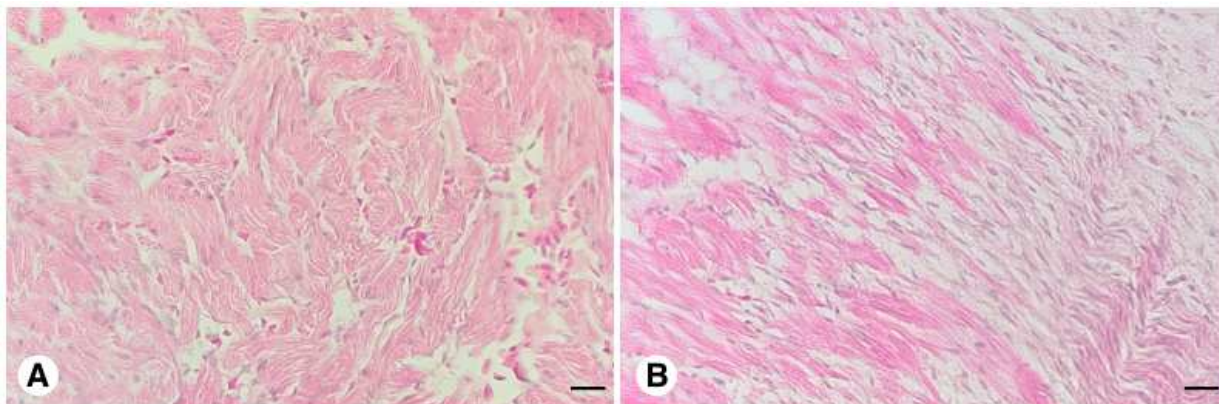


**Figura 30.** Histología de tejido cerebral grupo con tratamiento oral (72 horas). A) Cerebelo. M: capa molecular. CP: capa de células de Purkinje. G: capa granular. 40X. B) Lóbulo óptico. Neuronas con condensación de núcleo (círculos). Células gliales (cabeza de flecha). Capilar (flecha). Pérdida de neuropilo (asterisco). 40x. Barra = 10  $\mu$ m.

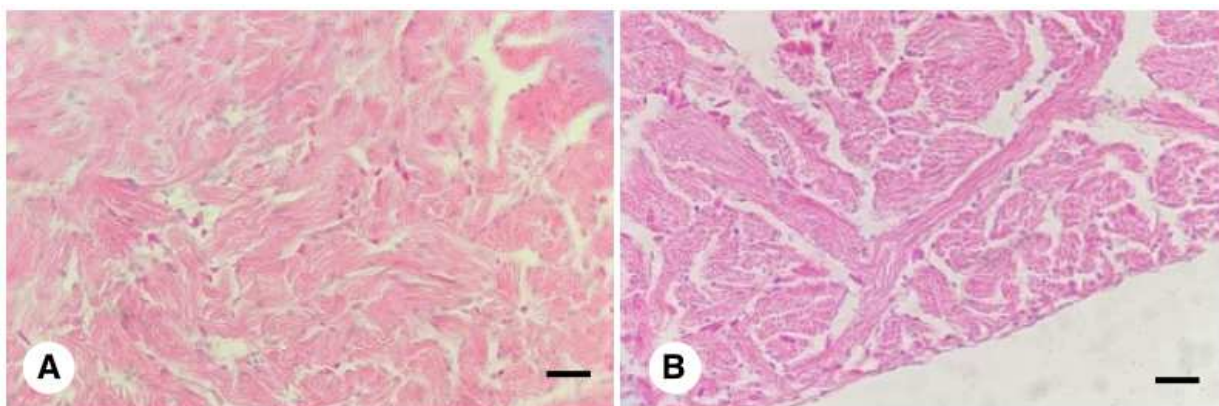
### 7.3.2.2 Corazón

El tejido cardíaco de grupo control presentó características histológicas normales (Fig. 28). En las muestras obtenidas en las dos horas posteriores al tratamiento se observaron características histológicas normales en tejido cardíaco (Fig. 29). En el corte de corazón del grupo de 24 horas se presentó edema intersticial y regiones con fibrosis (Fig. 30A) además se presentó hipercontracción de bandas con desarreglo de fibras musculares y células con

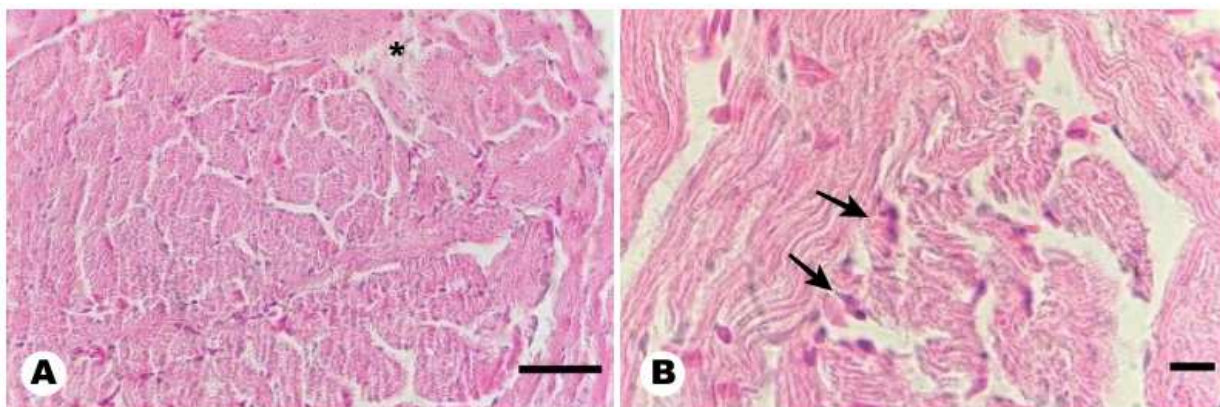
necrosis (Fig. 30B). A las 72 horas se presentó edema intersticial más acentuado (Fig. 31A) con respecto al observado a las 24 horas, espacios intersticiales con restos de tejido conectivo (Fig. 31B) e infiltración de células inflamatorias.



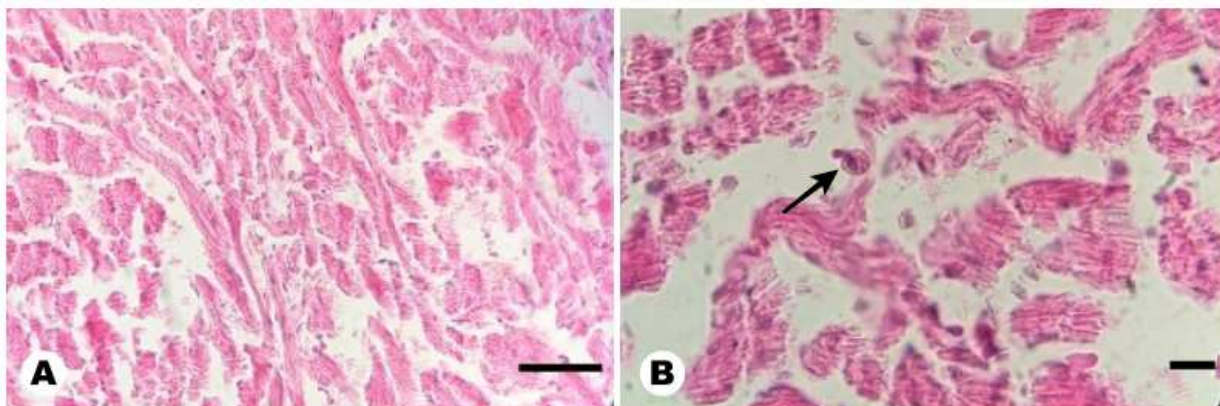
**Figura 31.** Histología de tejido cardiaco. Grupo control. A) Miocardio. 40x. Barra = 10 µm. B) Miocardio. 100x. Barra = 20 µm.



**Figura 32.** Histología de tejido cardiaco grupo con tratamiento oral (2 horas). A) Miocardio. 40 x. Barra = 10 µm. B) Miocardio. 40x. Barra = 10 µm.



**Figura 33.** Histología de miocardio grupo con tratamiento oral (24 horas). A) Miocardio. Zona con fibrosis (asterisco). 40x. Barra = 10  $\mu$ m. B) Miocardio. Hipercontracción de bandas. Células con necrosis (flechas). 100x. Barra = 20  $\mu$ m.



**Figura 34.** Histología de miocardio grupo con tratamiento oral (72 horas). A) Miocardio 40x. Barra = 10  $\mu$ m. B) Miocardio. Leucocito (flecha). 100x. Barra = 20  $\mu$ m.

### 7.3.3 Contenido de ácido domoico

Las muestras de órganos (cerebro, hígado y riñón) obtenidas de los organismos en este experimento se obtuvieron por duplicado. Debido a la poca cantidad de muestra que se pudo obtener debido al tamaño de los organismos utilizados para el experimento, las dos fracciones de cada órgano se analizaron en conjunto con el propósito de aumentar el volumen de muestra (Tabla 9). Se realizaron dos mediciones de contenido de AD para cada muestra.

**Tabla 10.** Peso de las muestras de órganos obtenidas de los organismos utilizados en el tratamiento oral de AD. Se indica el peso de cada órgano en gramos.

<b>Tratamiento oral</b>			
	<b>2 hr</b>	<b>24 hr</b>	<b>72 hr</b>
<b>Cerebro 1</b>	0.03	0.07	0.11
<b>Cerebro 2</b>	0.07	0.09	0.1
<b>Total</b>	0.1	0.16	0.21
<b>Hígado 1</b>	0.15	0.33	0.18
<b>Hígado 2</b>	0.09	0.24	0.34
<b>Total</b>	0.24	0.57	0.52
<b>Riñón 1</b>	0.05	0.05	0.07
<b>Riñón 2</b>	0.06	0.09	0.07
<b>Total</b>	0.11	0.14	0.14

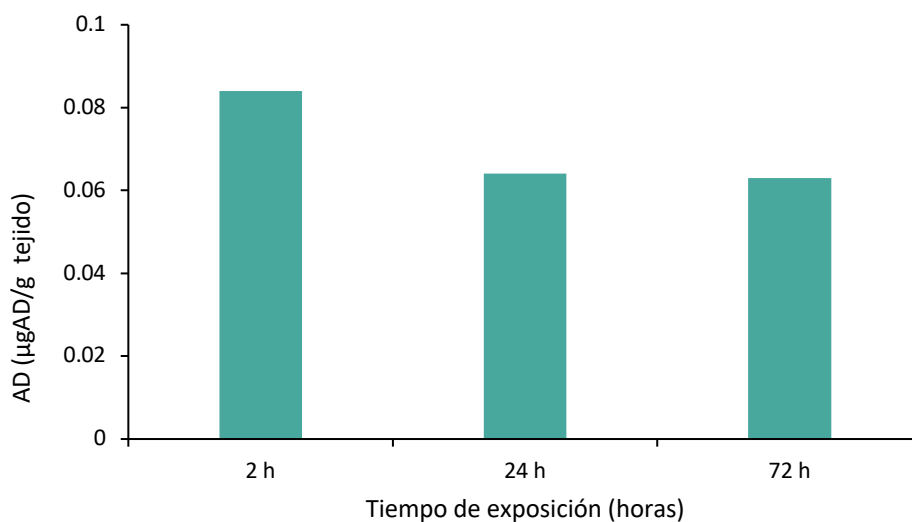
En todos los órganos analizados se detectó la presencia de AD en los distintos tiempos (2, 24 y 72 horas) posteriores a la administración de los 200µl de H<sub>2</sub>Od con 1.6 µgAD g<sup>-1</sup> tejido por vía oral. Los niveles más altos de contenido de AD se detectaron en las primeras dos horas luego de la inoculación con una recuperación del 56.75% (tabla 10), considerando que el 100% de la dosis total haya sido ingerido, a las 24 horas únicamente el 13.75% del total administrado permanecía en los organismos. La concentración más alta de AD se encontró en riñón a las 2 horas (0.719 ± 0.02 µgAD g<sup>-1</sup>) seguido de una disminución importante a las 24 horas (0.086 ± 0.005 µgAD g<sup>-1</sup> tejido). A las 72 horas se detectó 0.072 ± 0.07 µgAD g<sup>-1</sup> tejido (Fig. 33). La siguiente concentración más elevada se encontró en hígado también a las 2 horas (0.105 ± 0.007 µgAD g<sup>-1</sup>). Mientras que las concentraciones más bajas se encontraron en cerebro con valores de 0.084 ± 0.006 (2 horas), 0.064 ± 0.001 (24 horas) y 0.063 ± 0.00 (72 horas) (Figura 32). Estos resultados preliminares sugieren que el AD cuando es administrado por vía oral es absorbido por el tracto digestivo dentro de las primeras 2 horas posteriores a la administración siendo el riñón el primer órgano contaminado antes de alcanzar otros órganos y, al contener este los niveles más elevados de AD, actúa como la principal vía de excreción.

**Tabla 11.** Porcentaje de recuperación de AD tras exposición por vía oral de 200µl de H<sub>2</sub>Od con 1.6 µgAD g<sup>-1</sup> tejido.

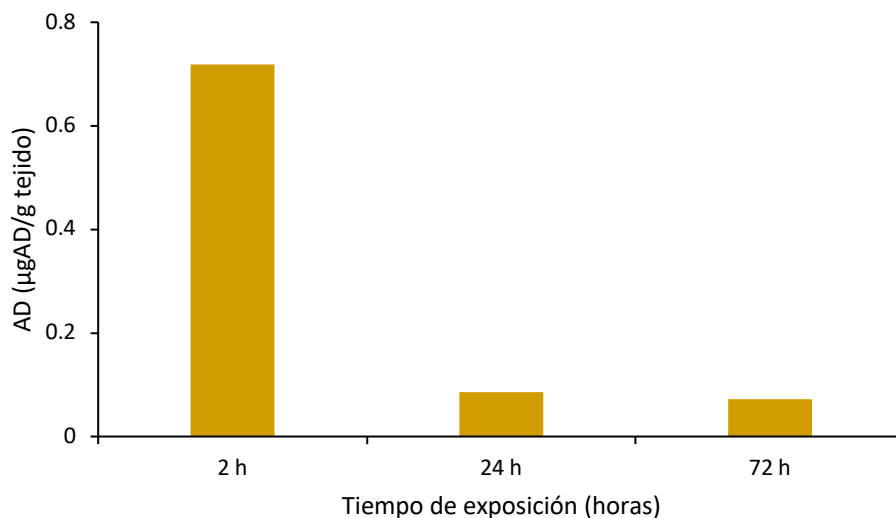
Tiempo	AD total (µgAD g <sup>-1</sup> )	% recuperación
2 horas	0.908	56.75
24 horas	0.22	13.75
72 horas	0.204	12.75

**Tabla 12.** Distribución de AD en órganos de totoaba tras exposición por vía oral de 200 µl de H<sub>2</sub>Od con 1.6 µgAD/g tejido. Las muestras fueron tomadas a las 2 horas, 24 horas y 72 horas posteriores a la administración de la solución.

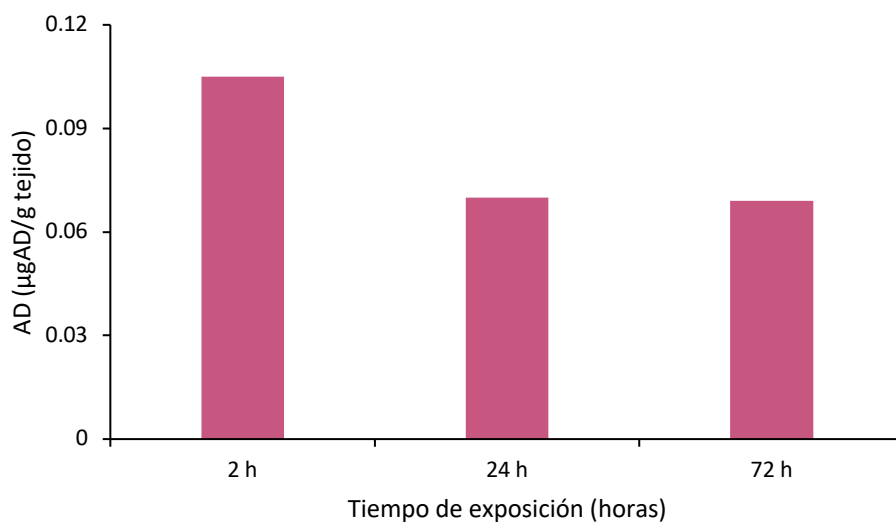
Tiempo	Cerebro (µgAD g <sup>-1</sup> )	Hígado (µgAD g <sup>-1</sup> )	Riñón (µgAD g <sup>-1</sup> )
2 horas	0.084 ± 0.006	0.105 ± 0.007	0.719 ± 0.01
24 horas	0.064 ± 0.001	0.07 ± 0.002	0.086 ± 0.004
72 horas	0.063 ± 0.00	0.069 ± 0.005	0.072 ± 0.07



**Figura 35.** Contenido de AD (µgAD g<sup>-1</sup> tejido) en cerebro de totoaba luego de la administración por vía oral de 200 µl de H<sub>2</sub>Od conteniendo 1.6 µgAD g<sup>-1</sup> tejido.



**Figura 36.** Contenido de AD ( $\mu\text{gAD g}^{-1}$  tejido) en riñón de totoaba luego de la administración por vía oral de 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_d$  conteniendo  $1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  tejido.



**Figura 37.** Contenido de AD ( $\mu\text{gAD g}^{-1}$  tejido) en hígado de totoaba luego de la administración por vía oral de 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_d$  conteniendo  $1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  tejido.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Inyección intraperitoneal

Los signos de excitotoxicidad que se observaron después de la inyección intraperitoneal confirman que la totoaba es neurológicamente susceptible al ácido domoico (AD). Los organismos tratados con una dosis  $\geq 1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido presentaron signos neurotóxicos caracterizados por desorientación, pérdida de equilibrio y nado en espiral. Estos signos se han descrito en anchoveta, salmón y dorada después de la administración del AD por vía intraperitoneal, donde el comportamiento más evidente asociado con el daño neurotóxico es el nado en espiral (Lefebvre et al., 2001; Lefebvre et al., 2007; Nogueira et al., 2010).

Los organismos que recibieron la dosis más baja ( $0.8 \mu\text{gAD/g}$  tejido) no presentaron signos de intoxicación, pero si presentaron alteraciones histológicas menores en los tejidos analizados. Viera, et al. (2015) establece que un factor clave en la intoxicación por AD es que las alteraciones histológicas únicamente se desarrollan en organismos que muestran alteraciones conductuales.

Por otro lado, los organismos tratados con la dosis más alta  $6.4 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido murieron en un tiempo promedio de  $49.33 \pm 22.8$  minutos y presentaron alteraciones histológicas importantes en cerebro y corazón. Para este trabajo se consideró la dosis de  $1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido como la dosis efectiva al ser la dosis más baja que induce signos neurotóxicos en los organismos tratados sin ocasionar la muerte de estos. Esta concentración es reportada como  $\text{ED}_{50}$  para anchoveta (Lefebvre et al., 2001).

Los organismos tratados con dosis de  $\geq 1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido presentaron signos de intoxicación lo que sugiere que la susceptibilidad de la totoaba es mayor a la reportada en otros peces como anchoveta ( $\geq 4.3 \mu\text{gAD g}^{-1}$ ) (Lefebvre, et al. 2001), salmón ( $6.3 \mu\text{gAD g}^{-1}$ ) (Lefebvre et al., 2007) y dorada ( $\geq 9 \mu\text{gAD g}^{-1}$ ) (Nogueira et al., 2010). Mientras que la

susceptibilidad neurológica es menor a la reportada en mamíferos. Los ratones presentan signos neurotóxicos con dosis entre 0.59 y 2.5  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido (Iverson et al., 1989; Vieira et al., 2015) y primates como el macaco cangrejero que presenta signos neurotóxicos con una dosis de 4  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido (Tryphonas et al., 1990). Lefebvre, et al. (2007) sugiere que una combinación de excreción biliar y renal eficiente contribuye a que los peces presenten una mayor tolerancia al AD con respecto a mamíferos marinos y aves.

### **8.1.1 Comportamiento**

Los patrones de comportamiento en peces que han recibido administración sistémica de AD se caracteriza por alteraciones generales en la forma de nadar e incremento de actividad (Bakke et al., 2010). En este estudio los organismos de *T. macdonaldi* que presentaron signos de daño neurológico las alteraciones conductuales se manifestaron en los primeros minutos posteriores a la administración del AD. Estos signos de excitotoxicidad así como los reportados en otros organismos como temblores en primates (Tryphonas et al., 1990), rascado, pérdida de equilibrio y convulsiones en ratones (Iverson, et al., 1989; Vieira et al., 2015), desorientación y movimientos en cabeza en aves (Work et al., 1993) sugieren que el AD actúa sobre el sistema nervioso central al atravesar la barrera sangre-cerebro en los organismos afectados (Lefebvre et al., 2001; Lefebvre, et al., 2007). Además, los signos observados en este trabajo, son consistentes con los observados en salmón (Lefebvre et al., 2007), anchoveta (Lefebvre et al., 2001) y dorada (Nogueira et al., 2010) demostrando que el AD actúa sobre dos de los principales centros integrativos del sistema nervioso en peces, el lóbulo óptico y cerebelo. Estas regiones son responsables de controlar tareas relacionadas con la orientación, como localización e identificación de objetos y la coordinación del control motor, además de estar encargadas del aprendizaje motor y la coordinación (Wullimann y Vernier, 2007). En vertebrados superiores el hipocampo es la región cerebral donde se localiza la mayor cantidad de receptores de glutamato tipo KA (London et al., 1980) y, por lo tanto, es la región donde se observa un mayor efecto tras la exposición al AD (Teitelbaum J. 1990; Tryphonas et al., 1990; Lefebvre et al., 2010; McHuron

et al., 2013; Vieira et al., 2015). Sin embargo, el hipocampo es una región que no está desarrollada en el cerebro de los peces (Schaffer et al., 2006) por lo que es importante identificar las regiones en el cerebro de estos que puedan verse afectadas por la exposición al AD.

### 8.1.2 Alteraciones histológicas

Existe poca información respecto a las alteraciones histológicas en órganos de peces expuestos a AD, Nogueira, et al. (2010) reportaron que la administración intraperitoneal de una única dosis de  $9.0 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido en dorada (*Sparus aurata*) no genera alteraciones en tejido cerebral. Por otra parte, Lefebvre, et al. (2010) describen que el AD genera efectos histopatológicos en el sistema nervioso central de vertebrados. Asimismo, se ha reportado que genera alteraciones en el tejido cardíaco (McHuron et al., 2013) ya que presenta cantidades importantes de receptores ionotrópicos de glutamato (Zabaglo et al., 2016). En este trabajo se observaron alteraciones histológicas en los tejidos de cerebro y corazón de los organismos expuestos a dosis  $\geq 1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido.

En cerebro, dichas alteraciones se caracterizaron por neuronas con eosinofilia citoplasmática, indicador de una de las primeras etapas de necrosis (Zachary, 2017), pérdida de neuropilo y vacuolización de citoplasma en lóbulo óptico, y neuronas en distintas etapas de necrosis oncótica en cerebelo. Estos resultados son similares a los descritos para mamíferos como macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) o ratón (*Mus musculus*) al recibir una dosis de AD por vía intraperitoneal resultando en cambios morfológicos en tejido cerebral como vacuolización en neuropilo, hipertrofia en astrocitos, pérdida neuronal y necrosis (Tryphonas et al., 1990; Vieira et al., 2015). Estas alteraciones también se han registrado en humanos (*Homo sapiens*), foca común (*Phoca vitulina richardii*) y oso marino (*Callorhinus ursinus*) luego de exposición natural al AD (Teitelbaum, J. 1990; McHuron, et al. 2013; Lefebvre et al., 2010).

El AD provoca alteraciones cardiovasculares en humanos (Teitelbaum, et al. 1990) así como en foca común (*Phoca vitulina richardii*) y oso marino (*Callorhinus ursinus*) luego de la exposición a la toxina de forma natural (McHuron, et al. 2013; Lefebvre, et al. 2010) y en rata al administrarse por vía intraperitoneal (Vranyac-Tramounandas, et al. 2011). Las alteraciones descritas por estos autores son necrosis en miocardio, degeneración vacuolar, reemplazo de cardiomiocitos por adipocitos, hipercontractura, necrosis inflamatoria e infiltración de células inflamatorias. Se encontraron las mismas alteraciones histológicas en el corazón de la totoaba, del presente estudio, además de que se observó separación entre fibras musculares, hipercontracción de bandas, aumento en irrigación sanguínea, infiltración de células inflamatorias y necrosis en miocardio. Esta es la primera descripción del efecto del AD en corazón en peces.

### **8.1.3 Contenido de AD**

La presencia de AD en los hígados de los organismos tratados con distintas dosis a las 6 horas posteriores de la inyección indica que este fue bien absorbido de la cavidad intraperitoneal hacia el torrente sanguíneo a través de capilares.

La detección de AD en los organismos tratados con la dosis más baja ( $0.8 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido) indica que la toxina entra a la circulación sistémica. Sin embargo, la ausencia de signos neurotóxicos sugiere que la dosis más baja no alcanza el sistema nervioso. Los signos neurotóxicos observados en los organismos tratados con las dosis más altas (6.4, 3.2 y  $1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido) son indicadores de que la toxina atravesó la barrera sangre-cerebro e ingresó al sistema nervioso. Se ha documentado que las dosis elevadas de AD pueden incrementar la permeabilidad de la barrera sangre-cerebro a través de la producción de convulsiones, en mamíferos, ya que estas incrementan la pinocitosis de las células endoteliales de los capilares (Ramsdell, 2007). Considerando los signos neurotóxicos presentados en totoaba un análogo de las convulsiones en mamíferos se podría explicar porque las dosis más altas ( $6.4$  y  $3.2 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido) para totoaba indujeron los signos

de intoxicación en un periodo más corto de tiempo respecto a la dosis de  $1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido.

La dosis de  $1.6 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido al ser administrada por vía intraperitoneal presentó una recuperación del 75.69% a las 6 horas. Mientras que la misma dosis administrada vía oral tiene una recuperación del 56.75% a las 2 horas. El hecho de que el porcentaje de recuperación sea mayor en el tratamiento intraperitoneal sugiere que la biodisponibilidad del AD es mayor al ser administrado por esta vía. Perez y Tasker (2014) establecen que la absorción del AD en el tracto gastrointestinal es errática. Se ha documentado biodisponibilidad del 5-10% en rata, ratón y macaco cangrejero (Iverson et al., 1989; Iverson et al., 1990; Tryphonas et al., 1990) al administrarse el AD por vía oral, mientras que por vía intraperitoneal la disponibilidad es completa.

## **8.2 Recuperación después de la administración de AD intraperitonealmente**

En este trabajo la dosis seleccionada para desarrollar un experimento con el propósito de caracterizar la recuperación de los organismos fue de  $1.6 \mu\text{gAD/g}$  de tejido, siendo la dosis más baja que provocó signos neurotóxicos sin ocasionar la muerte de los organismos en el primer experimento de inyección intraperitoneal. Al utilizar esta dosis con el propósito de evaluar la recuperación de la totoaba al efecto del AD, dos de los organismos tratados murieron, y los sobrevivientes mostraron todos los signos de excitotoxicidad y una posterior recuperación aparente en un tiempo de  $12 \pm 9$  horas. Esta aparente recuperación es similar a la descrita en Nogueira, et al. (2010) donde organismos de la especie *Sparus aurata* mostraron signos neurotóxicos 20-30 minutos después de recibir  $9.0 \mu\text{gAD/g}$  de tejido intraperitonealmente y, los organismos que sobrevivieron mostraron una recuperación total luego de 24 horas. Estos resultados son también similares a los reportados para ratón donde estos mostraron una recuperación total en los 10 minutos posteriores a recibir una inyección intraperitoneal de  $2.5 \mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido (Vieira, et al. 2015).

El hecho de que los signos de intoxicación fueron reversibles sugiere la posibilidad de una recuperación neuronal en los organismos afectados, sin embargo, el análisis histológico muestra alteraciones histológicas tanto en cerebro como en corazón a las 24, 48 y 72 horas. En cerebro, a las 24 horas, se observaron hemorragias tanto en cerebelo como en lóbulo óptico lo cual es una alteración que no se había observado en ninguna de las dosis anteriormente administradas por vía intraperitoneal. A las 48 y 72 horas el daño estuvo caracterizado por neuronas con necrosis en distintas etapas sin observarse hemorragias en ninguna de las dos estructuras lo cual sugiere que las hemorragias son una alteración reversible. Estas observaciones son distintas a lo descrito para dorada (*Sparus aurata*) (Nogueira et al., 2010) donde no se reportaron alteraciones histológicas en tejido cerebral en los organismos 24 horas después de la inyección, sin embargo, en ratón Vieira et al. 2015 describe que aun cuando los organismos expuestos al AD presenten una completa recuperación pueden observarse lesiones neurológicas a las 24 horas después de la exposición siendo estas lesiones más severas en los 5 a 14 días posteriores.

### **8.3 Tratamiento oral**

La ausencia de signos de excitotoxicidad después de la exposición al AD por vía oral sugieren que la toxina no alcanza el cerebro al ser administrada de esta forma. Sin embargo, la presencia de AD en cerebro, así como la evaluación histológica de cerebro y corazón indica que la toxina es capaz de atravesar la barrera sangre-cerebro e inducir alteraciones que representan un riesgo para la salud del organismo.

La ausencia de signos excitotóxicos después de la administración oral de AD ha sido reportada para trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Los organismos fueron alimentados durante 15 semanas con pellets adicionados con 130  $\mu\text{gAD/g}$  (Hardy, et al. 1995). En este trabajo concluyen que el AD no puede ser absorbido en el tracto gastrointestinal de los peces, al únicamente detectarse en vísceras y una cantidad significativa en heces, pero no en otros tejidos. Sin embargo, en anchoveta (*Engraulis mordax*) a la que se le administró una dosis de 800  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido (Lefebvre et al., 2001) y para salmón (*Oncorhynchus*

*kisutch*) con una dosis de 10  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido (Lefebvre et al., 2007) se detectó AD en hígado y riñón. Por lo tanto, se propuso, que el AD puede ser absorbido en el estómago y su excreción a través del hígado y riñón previene que alcance el sistema nervioso. En el presente trabajo se detectaron asimismo concentraciones altas de AD en hígado y riñón en las primeras dos horas luego de la exposición con valores de 0.084 y 0.719  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  tejido, respectivamente. Sin embargo, la toxina también se detectó en cerebro a las 2 horas. Se detectaron 0.084  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido que fue un orden de magnitud menor al encontrado en los otros órganos analizados. El hecho de que las concentraciones detectadas en cerebro sean significativamente más bajas respecto a las concentraciones en hígado y riñón sugiere que son remanentes en la vasculatura cerebral luego del primer paso de excreción renal (Lefebvre et al., 2007). Sin embargo, a las 24 y 72 horas posteriores a la exposición se detectaron niveles de AD en cerebro de 0.064 y 0.063  $\mu\text{gAD g}^{-1}$  de tejido, respectivamente. Mientras que en hígado y riñón a las 24 horas los valores de contenido de AD fueron significativamente más bajos en ambos órganos, alcanzado un orden de magnitud menor en riñón, esto indica el AD puede acumularse en cerebro y mantener un nivel relativamente estable a través del tiempo existiendo así la posibilidad de que este ejerza un efecto crónico en tejido cerebral. Esta posibilidad se sustenta con el patrón de depuración observado en el presente estudio, donde la bioacumulación del AD es mayor a las 2 horas de la exposición (56.75%) pero no se observan alteraciones histológicas en el tejido cerebral, mientras que a las 24 horas se observó una importante disminución en la biodisponibilidad del AD con un valor de 13.75% y en este tiempo es cuando se presentaron las primeras alteraciones histológicas en tejido cerebral relacionadas con la exposición al AD.

Las diferencias existentes entre los resultados del estudio de Hardy, et al. (1995), donde el consumo del AD fue en alimento, y lo reportado para salmón (Lefebvre et al., 2007) y anchoveta (Lefebvre et al., 2001), donde la administración del AD por vía oral fue disuelto en agua, así como los resultados obtenidos en el presente trabajo para totoaba, sugieren que la matriz en la cual se encuentre el AD influye en la absorción que pueda tener en el tracto gastrointestinal. Estudios en simios, ratas y ratones han utilizado administración de

AD vía oral, intraperitoneal e intravenosa y han determinado que la vía oral es diez veces menos efectiva que otras rutas de exposición (Iverson et al., 1990; Ramsdell, 2007). Los resultados de Hardy, et al. (1995) sugieren que si el AD se encuentra en una matriz como el alimento no puede ser absorbido por el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, no alcanza el sistema nervioso. Sin embargo, los resultados para salmón, anchoveta y totoaba, donde el AD se administró disuelto en agua, sugieren que esta forma de exposición (disuelto) facilita la absorción en tracto gastrointestinal lo que permite que ingrese a la circulación sistémica e ingrese al sistema nervioso.

Los estudios realizados para salmón y anchoveta caracterizan la absorción y distribución de la toxina en tejidos sin considerar el análisis histológico de los mismos. La evidencia encontrada en el presente trabajo sugiere que, aunque no se presenten alteraciones conductuales que sean indicadoras de intoxicación el AD si alcanza el sistema nervioso y es capaz de inducir alteraciones histológicas en cerebro, así como en corazón. El tipo de alteraciones histológicas encontradas en cerebro y corazón en las totoabas que recibieron el tratamiento oral es similar a lo descrito para las totoabas tratadas con inyección intraperitoneal. En cerebro, se encontraron lesiones en lóbulo óptico, dadas por neuronas en primeras etapas de necrosis oncótica y pérdida de neuropilo, mientras que en cerebelo no se observaron alteraciones histológicas. Por otro lado, en corazón las lesiones consistieron en edema intersticial, desarreglo de fibras musculares, necrosis en miocardio e infiltración de células inflamatorias. Estos resultados son similares a lo descrito por Truelove et al. 1996 para ratas, donde se administró por vía oral una dosis de  $0.5 \text{ mgAD kg}^{-1}$  de peso durante 64 días y no se observaron signos de intoxicación, sin embargo, se reportaron alteraciones morfológicas en el hipocampo de los organismos entre las que se incluye vacuolización de citoplasma de neuronas.

Estos resultados indican que la dosis que induce alteraciones histológicas es menor que la requerida para la inducción de signos clínicos de intoxicación, lo que sugiere que una

exposición crónica a dosis bajas pudiera ocasionar un efecto a largo plazo en juveniles de totoaba.

## **9. CONCLUSIONES**

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es afectada por el ácido domoico (AD) al ser expuesta tanto por vía intraperitoneal como vía oral. Aún cuando no se presenten alteraciones conductuales existen alteraciones tisulares en cerebro características del efecto por AD.

El AD atraviesa la barrera sangre-cerebro cuando es administrado por vía oral.

Los resultados de histología sugieren que el lóbulo óptico es probablemente la región con mayor cantidad de receptores de glutamato al ser la región más afectada. Se observó esto independiente de la vía de administración del AD.

Aún cuando no se presenten signos neurotóxicos el AD entra en la circulación sistémica y es acumulado en hígado, riñón y cerebro.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Anderson, D., Kaouru, Y., White, A. (2000). Estimated Annual Economic Impacts from Harmful Algal Blooms (HABs) in the United States. National Oceanic and Atmospheric Administration under Grants.

Arapov, J., Skejic, S., Buzancic, M., Bakrac, A., Vidjak, O., Bojanic, N., Ujevic, I. y Gladan, Z. (2017). Taxonomical diversity of *Pseudo-nitzschia* from the Central Adriatic Sea. *Phycological Research*. 65(4).

Band-Schmidt, C., Bustillos-Guzman, J., Lopez-Cortes, D., Nuñez-Vazquez, E. y Hernandez-Sandoval, F. (2011). El estado actual del estudio de los florecimientos algales nocivos en México. *Hidrobiológica* 21(3):381-413.

Bates, S., Hubbard, K., Lundholm, N., Montresor, M. y Pin, C. (2018). *Pseudo-nitzschia* and domoic acid: New research since 2011. *Harmful Algae*. 29: 3-43.

Bates, S., Bird, C., de Freitas, A., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L., ..., Wright, J. (1989). Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquaculture*. 46:1230-1215.

Bejarano, A., Vandola, F., Gulland, F., Rowles, T. y Schwacke, L. (2008). Production and Toxicity of the Marine Biotoxin Domoic Acid and Its Effects on Wildlife: A review. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 14:3, 544-567.

Bakke, M., Hustoft, H. y Horsberg, T. (2010). Subclinal effects of saxitoxin and domoic acid on aggressive behaviour and monoaminergic turnover in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 99:1-9.

R. Bouillon, T.L. Knierim, R.J. Kieber, S.A. Skrabal, J.L.C. Wright. (2006). Photodegradation of the algal toxin domoic acid in natural water matrices. *Limnol. Oceanogr.* 51:321-330.

Caroppo, C., Congestri, R., Bracchini, L. y Albertano, P. (2005). On the presence of *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle and *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden in the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea, Italy). *Journal of Plankton Research.* 27(8):763-774.

Cisneros-Mata, M., Montemayor-López, G., Román-Rodríguez, J. (1995). Life history and Conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology.* 9:806-814.

Ferrario, M., Sar, E. y Sala, S. (2002). Capítulo 7: Diatomeas potencialmente toxígenas del cono Sur Americano. (pp. 167-194).

Fritz, L., Quilliam, M., Wright, J. Beale, A., Work, T. (1992). An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudo-nitzschia australis*. *Journal of Phycology.* 38:439-442.

Gao, X., Xu, X., Pang, J., Zhang, C., Ding, J.M., Peng, X., Liu, Y. y Cao, J.M. NMDA receptor activation induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress and apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Physiology Research.* 56: 559-569.

Hardy, R., Scott, T., Hatfiel, C., Barnett, H., Gauglitz, E., Wekell, J., Eklund, M. (1995). Domoic acid in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) feeds. *Aquaculture* 131(3-4): 253-260.

Hasle, G. (1994). *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae). *Phycology.* 30:1036-1039.

Heidel, J. y Smith, C. (2007). General Pathology. En Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., MacConnell, B. y Blazer, V. (Ed.). Fish Histology and Histopathology. (pp. 116-208). West Virginia, Estados Unidos: US fish and Wildlife Service.

Hong, Z., Zhang, Y., Zuo, Z., Zhu, R. y Gao, Y. Influences of Domoic Acid Exposure on Cardiac Development and the Expression of Cardiovascular Relative Genes in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Biochem Molecular Toxicology*.

Irie, Y. (2006). Effects of Eugenol on the Central Nervous System: Its Possible Application to Treatment of Alzheimer's Disease, Depression and Parkinson's Disease. *Current Bioactive Compound*. 2:57-66.

F. Iverson, J., Truelove, E. Nera, Tryphonas, J. Campbell y E. Lok. (1989). Domoic acid poisoning and mussel-associated intoxication: preliminary investigations into the response of mice and rats to toxic mussel extract. *Fd Chem Toxic*. 27(6):377-384.

Juarez, L., Konietzko, P. y Schwarz, H. (2016). Totoaba aquaculture and conservation: hope for and endangered fish from Mexico Sea Of Cortez. *World aquaculture*. 16:30-38.

Kociolek, J.P.; Blanco, S.; Coste, M.; Ector, L.; Liu, Y.; Karthick, B.; Kulikovskiy, M.; Lundholm, N.; Ludwig, T.; Potapova, M.; Rimet, F.; Sabbe, K.; Sala, S.; Sar, E.; Taylor, J.; Van de Vijver, B.; Wetzel, C.E.; Williams, D.M.; Witkowski, A.; Witkowski, J. (2021). DiatomBase. *Pseudonitzschia multiseriis* (Hasle) Hasle, 1995. Accessed through: World Register of Marine Species at: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=175738> on 2021-01-29

Lefebvre, K., Dovel, S., Silver, M. (2001). Tissue distribution and neurotoxic effects of domoic acid in a prominent vector species the northern anchovy *Engraulis mordax*. *Mar. Biol*. 138:693-700.

Lefebvre, K. y Silver, M. (2002). Domoic acid in planktivorous fish in relation to toxic *Pseudo-nitzschia* cell densities. *Marine biology*. 140(3):625-631.

Lefebvre, K., Noren, D., Schultz, I., Bogard, S., Wilson, J. y Eberhart, B. (2007). Uptake, tissue distribution and excretion of domoic acid after oral exposure in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic toxicology*. 81(3):266-274.

Lefebvre, K., Tilton, S., Bammler, T., Beyer, R., Srinouanprachan, S., Stapleton, P., Farin, F. y Gallagher, E. (2009). Gene expression profiles in zebrafish brain after acute exposure to domoic acid at symptomatic and asymptomatic doses. *Toxicological Sciences*. 107(1):218-230.

Lefebvre, K. y Roberston, A. (2010). Domoic acid and human exposure risks: A review. *Toxicon*. 218-230.

Lefebvre, K., Robertson, A., Frame, E., Colegrove, K., Nance, S., Baugh, K., Wiedehoft, H. y Gulland, F. (2010). Clinical signs and histopathology associated with domoic acid poisoning in northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) and comparison of toxin detection methods. *Harmful Algae*. 9:374-383.

Lefebvre, K., Frame, R. y Kendrick, P. (2012). Domoic acid and fish behavior: A review. *Harmful algae*. 13:126-130.

Lelong, A., Hegaret, H., Soudant, P. y Bates, S. (2012). *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia*. 51(2):168-216.

Lu, S. Li, Y., Lundholm, N., Ma, Y., y Ho, K.C. (2012). Diversity, taxonomy and biogeographical distribution of the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Guangdong coastal waters, South China Sea. *Nova Hedwigia* 95:123-152.

Lundholm N, Hasle GR, Fryxell GA, Hargraves PE. 2002. Morphology, phylogeny and taxonomy of species within the *Pseudo-nitzschia americana* complex (Bacillariophyceae) with descriptions of two new species, *Pseudo-nitzschia brasiliiana* and *Pseudo-nitzschia linea*. *Phycologia* 41: 480-497.

McHuron, E., Greig, D., Colegrove, K., Fleetwood, M., Spraker, T., Gulland, F., Harvey, J., Lefebvre, K. y Frame, E. (2013). Domoic acid exposure and associated clinical signs and histopathology in Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardii*). *Harmful Algae*. 23:28-33.

Niebla, J. (2012). Infografía sobre la Totoaba. [Figura]. Recuperado de <https://www.iaes.gob.mx/index.php?pag=infografia-de-la-totoaba>

Nogueira, I., Lobo-da-Cunha, A., Afonso, A., Rivera, S., Azevedo, J., Monteiro, R., Cervantes, R., Gago-Martinez, A. y Vasconcelos, V. (2010). Toxic effects of domoic acid in the seabream *Sparus aurata*. *Marine drugs*. 8(10):2721-2732.

Olney, J.W. (1984). Excitotoxic food additives-relevance of animal studies to human safety. *Neurobehaviour Toxicology*. 6(6):455-462.

Perl, T., Bedard, L., Kosatsky, T., Hockin, J., Todd, E. y Remis, R. (1990). An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *N Engl J Med*. 322(25):1775-1780.

Pulido, O. (2008). Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Marine drugs*. 6:180-219.

Ramsdell, J. (2007). The molecular and integrative basis to Domoic Acid toxicity. En Botana, L. (Ed.), Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry. (pp. 223-250). Blackwell Publishing.

Ross, M.H. y Pawlina, W. (2009). Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Schaffer, P., Reeves, C., Casper, D.R. y David, C.R. (2006). Absence of neurotoxic effects in leopard sharks, *Triakis semifasciata*, following domoic acid exposure. *Toxicon*. 47:747-752.

Scholin, C.A., Gulland, F., Doucette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cordaro, J.,..., Van-Dolah, F.M. (2000). Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*. 403(6765)80-84.

Sierra-Beltrán, A., Palafox-Uribe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A. y Ochoa, J.L. (1997). Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon*. 35(3):447-453.

Stonik, V. y Stonik, I. (2020). Marine Excitatory Amino Acids: Structure, Properties, Biosynthesis and Recent Approaches to Their Syntheses. *Molecules*. 25, 3049.

Sullivan, M. (s.f.). Fish Brain Anatomy. [Figura]. Recuperado de <https://sen842cova.blogspot.com/2018/10/fish-brain-anatomy.html>

Takemoto, T. y Diago, K. (1958). Constituents of *Chondria armata*. *Pharm Soc Jpn*. 5:578-580.

Teitelbaum, J.S., Zatorre, R.J., Carpenter, S., Gendron, D., Evans, A.C., Gjedde, A. y Cashman, N.R. (1990). Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *N Engl J Med*. 322(25):1781-1787.

Trainer, V., Bates, S., Lundholm, N., Thessen, A., Cochlan, W., Adams, N. y Trick, C. (2012). *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae*. 14:271-300.

Truelove, J., Mueller, R., Pulido, O., Martin, L., Fernie, S. e Iverson, F. (1997). 30-day Oral Toxicity Study of Domoic Acid in Cynomolgus Monkeys: Lack of Overt Toxicity at Doses Approaching the Acute Toxic Dose. *Natural Toxins*. 5:111-114.

Tryphonas, L., Truelove, J. e Iverson, F. (1990). Acute Parenteral Neurotoxicity of Domoic Acid in Cynomolgus Monkeys (*M. fascicularis*). *Toxicologic Pathology*. 18(2). 297-303.

Valenzuela, F., Salas, S., Arreguin, F. y Garcia-De Leon, F. (2015). Critically endangered totoaba *Totoaba macdonaldi*: Signs of recovery and potential threats after a population collapse. *Endangered Species Research*. 29:1-11.

Vieira, A., Aleman, N., Cifuentes, J., Bermudez, R., Lopez-Peña, M. y Botana, L. (2015). Brain Pathology in Adult Rats Treated With Domoic Acid. *Veterinary Pathology*.

Vranyac-Tramoundanas, A., Harrison, C., Sawant, P., Kerr, S. y Sammut, I. (2011). Ischemic Cardiomyopathy Following Seizure Induction by Domoic Acid. *The American Journal of Pathology*. 179:141-154.

Work, T., Barr, B., Beale, A., Fritz, L., Quilliam, M. y Wright, J. (1993). Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 24:54-62.

Zabaglo, K., Chrapusta, E., Bober, B., Kaminski, A., Adamski, M. y Bialczyk, J. (2016). Environmental roles and biological activity of domoic acid: A review. *Algal Research*. 13:94-101.

T.S. Zabka, T. Goldstein, C. Cross, R. W. Mueller, C. Kreuder-Johson, S. Gill, y F.M.D. Gulland. (2009) Characterization of a Degenerative Cardiomyopathy Associated with Domoic Acid Toxicity in California Sea Lions (*Zalophus californianus*). *Veterinary Pathology*. 46:105-119.

Zachary, J. (2017). Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation and Death. En Miller, M. y Zachary, F. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. (pp. 2-43.e19).

