

Trabajo Fin de Grado

**Biotoxinas marinas:
contaminantes y/o dianas
terapéuticas**

Ciguatera y Ciguatoxinas

Cultivo de especies del Género *Gambierdiscus*.
Estudio de la Ciguatera en Canarias.

Karen Báez Martín

Curso 2017-2018



Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora M^a Luisa Souto todo el apoyo y dedicación, así como el haber propuesto un proyecto tan interesante con el que he disfrutado muchísimo.

A mi compañero de Laboratorio Víctor porque sin él esto no hubiera sido lo mismo, gracias por todo lo que me has enseñado y por las conversaciones tan interesantes que hemos tenido para amenizar las horas que pasamos en el laboratorio.

A mis padres que no hay palabras suficientes de agradecimiento, los pilares fundamentales de mi vida, gracias por todo, pero sobre todo por darme la oportunidad de llegar hasta aquí.

También agradecer a mis amigos y compañeros de clase, todo el apoyo y la ayuda incondicional. A mis amigos y pareja que han pasado este último mes de junio conmigo en la biblioteca acabando cada uno su TFG, apoyándonos y ayudándonos unos a otros.

Y por último agradecer a mi pareja tanto y tanto que ha hecho por mí, por levantarme en mis peores momentos y hacerme creer que puedo con todo, por confiar en mí más de lo que yo nunca lo he hecho.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Contexto.....	3
1.2 Definición.....	3
1.3 Ciguatoxinas.....	5
1.4 Intoxicación por pescado ciguaterico (CFP).....	7
1.5 Tratamiento	9
1.6 Sistemas de detección.....	9
1.7 Ciguatera en Canarias.....	10
1.7.1 Presencia de <i>Gambierdiscus</i> en Canarias.....	12
1.7.2 Presencia de <i>Gambierdiscus</i> en Lanzarote y Fuerteventura.....	13
2. OBJETIVOS	15
3. PARTE EXPERIMENTAL	16
3.1 Cultivo artificial de especies del género <i>Gambierdiscus</i> y extracción de las Ciguatoxinas producidas.....	17
3.1.1 Material físico	17
3.1.2 Material biológico	17
3.1.3 Condiciones de los cultivos.....	18
3.1.4 Ciclos de cultivo.....	21
3.1.5 Extracción Ciguatoxinas	26
3.1.6 Resultados	33
3.2 El estudio de la variación de la temperatura del agua del mar y el aporte de la calima en Canarias.....	40
3.2.1 Aumento de la temperatura del agua de mar.....	40
3.2.2 Aporte del Hierro (nutriente limitante) por el polvo sahariano.....	45
3.2.3 Resultados	46
3.3 Estudio de la sensibilización que tiene la población canaria sobre la Ciguatera.....	53
3.3.1 Encuesta	53
3.3.2 Resultados	55
4. DISCUSIÓN RESULTADOS.....	59
5. CONCLUSIONES	61
6. BIBLIOGRAFÍA.....	63

“Tan racional no es el ser humano, cuando destroza la fuente de su supervivencia “

Karen Báez

RESUMEN

Las Ciguatoxinas son compuestos tóxicos de origen marino producidos por especies del género *Gambierdiscus*, cuya ingestión causa una enfermedad conocida como Ciguatera (CFP). La intoxicación se produce a través del consumo de pescado contaminado, esta enfermedad es de origen tropical, pero desde 2005 se están produciendo casos en Canarias.

El impacto que ha tenido la Ciguatera sobre la salud pública en Canarias ha despertado el interés de estudio dentro de la comunidad científica. En el marco de este proyecto se han planteado dos posibles hipótesis para la aparición de casos CFP en las islas, el incremento de la temperatura del mar, y el aporte de hierro transportado por el polvo sahariano.

Otra parte fundamental de este TFG ha sido el cultivo artificial de *Gambierdiscus sp* en el laboratorio, con el objetivo final de la extracción y estudio de las Ciguatoxinas. Para ello se han establecido las condiciones óptimas que permiten el cultivo de distintas especies. Se han observado claras diferencias en los tiempos medios necesarios para el cultivo de cada una.

ABSTRACT

The Ciguatoxins are toxic compounds of marine origin produced by species of the genus *Gambierdiscus*, whose ingestion causes a disease known as Ciguatera (CFP), poisoning occurs through consumption of contaminated fish, this disease is of tropical origin, but since 2005 it is being produced cases in the Canary Islands.

The impact that Ciguatera has had on public health in the Canary Islands has aroused the interest of study within the scientific community. In the framework of this project, two possible hypotheses have been proposed for the appearance of CFP cases in the Islands, the increase in sea temperature, and the contribution of iron transported by the saharan dust.

Another fundamental part of this final degree project has been the artificial cultivation of *Gambierdiscus sp* in the laboratory, with the final objective of the extraction and study of the Ciguatoxins. For this purpose, the optimal conditions that allow the cultivation of different species have been established. Clear differences have been observed in the average of time that it is necessary for the cultivation of each.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contexto

El Instituto Universitario de Biorgánica de la Universidad de La Laguna está inmerso en un proyecto sobre la Ciguatera, donde están llevando a cabo cultivos de distintas especies de *Gambierdiscus*, la parte experimental de mi TFG va ligado a este proyecto, en el que he colaborado con Víctor Hernández López biólogo a cargo.

El trabajo de laboratorio se basa en establecer las condiciones idóneas de cultivo de las especies productoras de Ciguatoxinas, con el objetivo de conseguir extraer las toxinas que producen para su posterior estudio. Para ello he tenido que conocer las técnicas necesarias para el cultivo de dinoflagelados.

El cultivo artificial de este organismo permitirá el acceso a las toxinas que produzcan y supone no tener que esperar a que se produzca un crecimiento descontrolado (“*Bloom*”) de estos dinoflagelados en el medio natural. Por eso el objetivo principal es encontrar las condiciones idóneas de cultivo para obtener un volumen de células lo suficientemente grande que nos permita continuar la investigación

Esto persigue mejorar los sistemas de detección, saber que especies son más tóxicas, y conocer las concentraciones en las que nos empiezan a provocar síntomas, tanto gastrointestinales^[1] que se producen en concentraciones menores, como los neurológicos para los que ya se necesita una mayor concentración de toxinas.^[1] Todo esto solo se podrá lograr si se obtienen las suficientes densidades celulares y una buena producción de toxinas.

El trabajo bibliográfico ha sido fundamental para documentar y confirmar o rechazar las hipótesis planteadas que justifican el aumento de CFP en Canarias; el aumento de la temperatura del mar, y el aporte de hierro por las calimas; así como conocer más a fondo la enfermedad y sus efectos sobre la salud.

1.2 Definición

La ciguatera es una enfermedad de origen alimentario que se produce al consumir pescados que contengan en su interior altas concentraciones de toxinas producidas por dinoflagelados del género *Gambierdiscus*, conocidas como Ciguatoxinas. Estas toxinas producen diversos efectos, gastrointestinales, neurológicos y cardiovasculares.^[2]

Los dinoflagelados son organismos en su mayoría unicelulares y biflagelados, que son abundantes tanto en el mar como en las aguas continentales, representando una parte importante del fitoplacton y por lo tanto del principio de la cadena trófica. [3]

Los dinoflagelados del género *Gambierdiscus* viven asociados a los arrecifes de coral y a las macroalgas. Los peces que se alimentan de estas algas biotransforman y acumulan las toxinas, que posteriormente son devorados por peces carnívoros de mayor tamaño, y son éstos los que tienen grandes cantidades de toxinas que pueden causar daños al ser humano. [4]

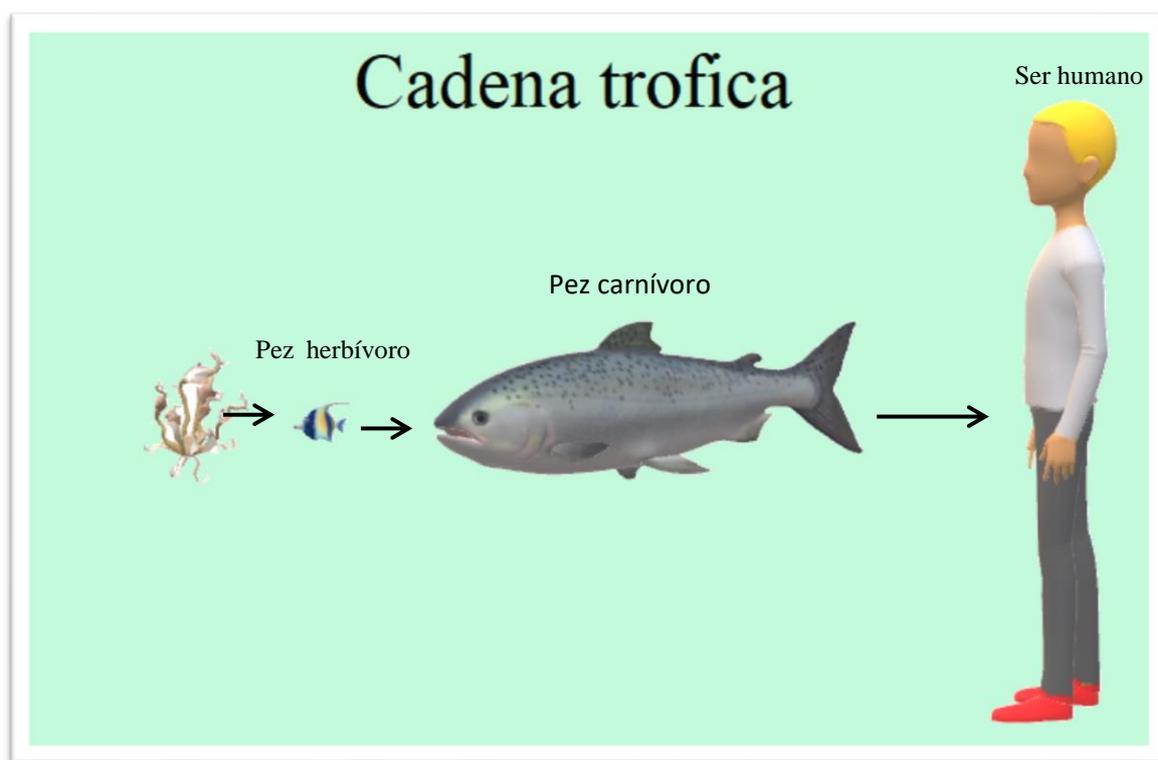


Figura 1. Esquema explicativo de la cadena trófica, hasta que las toxinas llegan al ser humano.

Esta enfermedad es endémica de las zonas tropicales y subtropicales distribuidas circunferencialmente, entre 30°N y 30°S [5] que afectan cada año a entre 10.000-50.000 personas [4]. Las zonas donde es común el consumo de peces de arrecife como Australia, El Caribe, sur de Florida y el Pacífico meridional presentan las áreas endémicas de la enfermedad. [6]

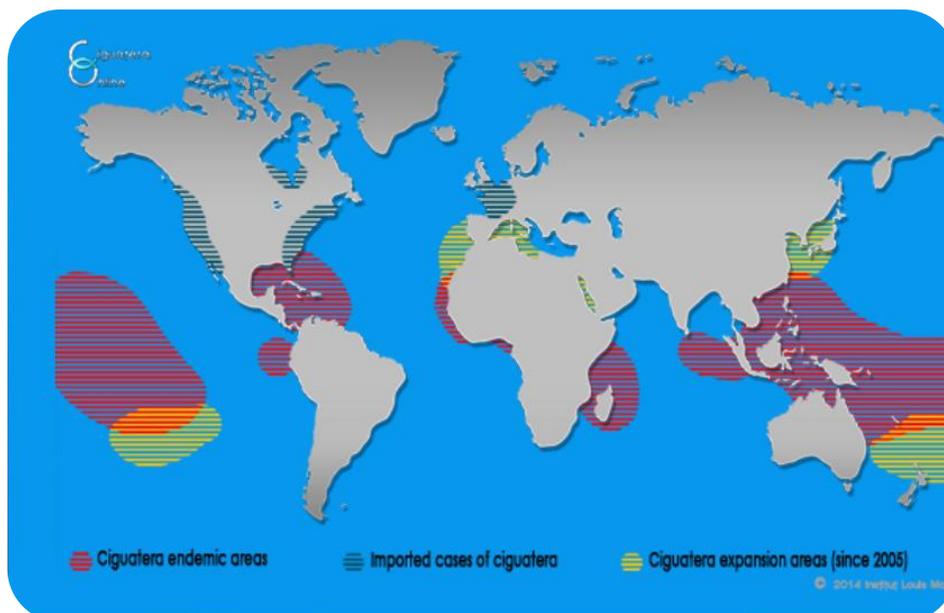


Figura 2. Mapa distribución de casos de Ciguatera. [7]

1.3 Ciguatoxinas

Las Ciguatoxinas (CTXs) son poliéteres que constan de 13 a 14 anillos fusionados una estructura rígida. Son moléculas termoestables, permanecen tóxicas aún después de la cocción del pescado, y son también estables a las condiciones ácidas y básicas leves. Carecen de olor y sabor, lo que hace muy difícil detectarlas. Por otro lado, otra característica asociada a su toxicidad es su liposolubilidad, permitiendo que se acumulen en el tejido adiposo de los peces y de los humanos al ingerirlos, produciéndose biomagnificación a lo largo de la cadena trófica. Según el océano donde se hayan aislado las toxinas, se usa un código de letras para diferenciarlas; de esta manera las C-CTX son las Ciguatoxinas aisladas en el Caribe, I-CTX aisladas en el Índico y las P-CTX en el Pacífico. Se han descrito numerosos tipos de toxinas con diferencias moleculares y toxicidad, la Ciguatoxina CTX-1 es la más común encontrada en peces carnívoros. [4]

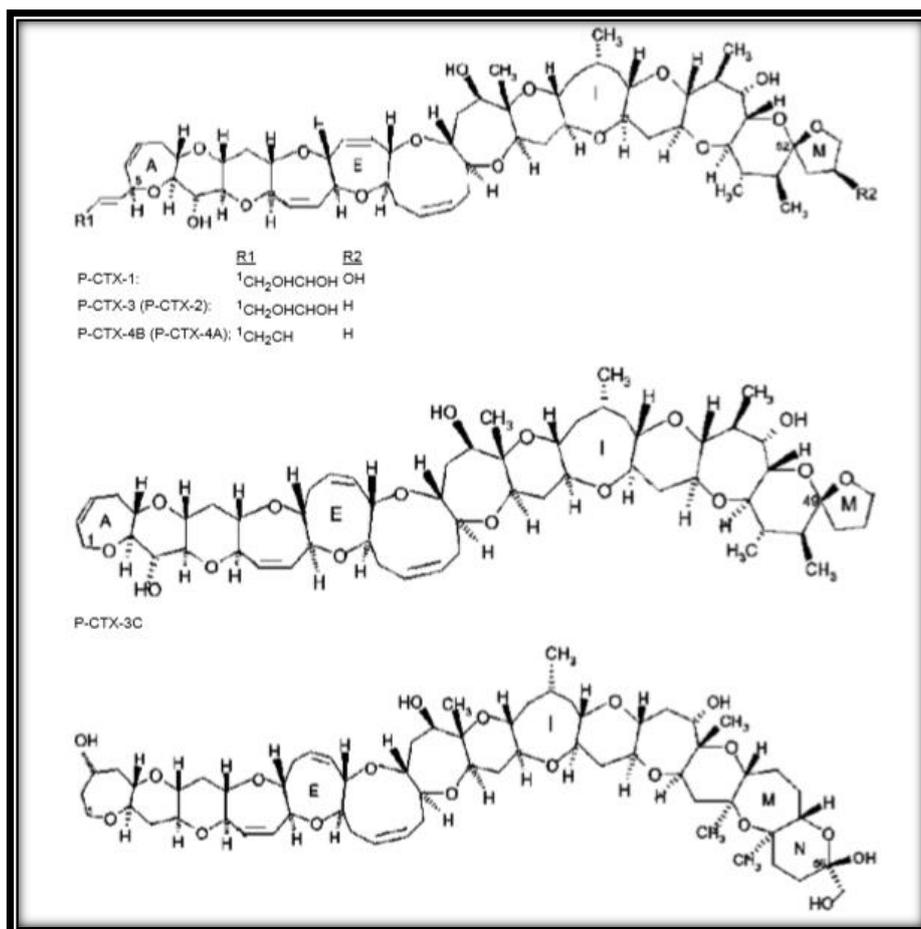


Figura 3. Estructuras de algunas Ciguatoxinas ^[4]

Durante el paso a través de la cadena alimentaria la biotransformación oxidativa de las toxinas las hace más tóxicas. En el estómago de peces herbívoros, se observa una biotransformación incompleta, mientras que el metabolismo del pez carnívoro produce una biotransformación completa produciendo mayor toxicidad. ^[4]

Las especies del género *Gambierdiscus* producen dos tipos de toxinas marinas, las Maitotoxinas (MTX) que son solubles en agua, y las Ciguatoxinas (CTXs) liposolubles. Los MTXs son producidas por todas las cepas de *Gambierdiscus* mientras que las Ciguatoxinas solo son producidas por ciertas cepas. Las MTXs al ser mucho más polares, es decir solubles en agua, son desechadas con facilidad, presentando menor toxicidad. ^[4]

Las toxinas se encuentran en mayor cantidad en hígado, vísceras y gónadas de los peces afectados. No se conoce la razón de porqué los peces son asintomáticos después de la ingestión, y pueden seguir siendo tóxicos durante años. Aun así es raro que acumulen la suficiente cantidad de toxinas para que la ingestión pueda ser letal para los humanos. ^[4]

Si es cierto que se ha observado que los peces contaminados por ciguatera en su natación realizan un movimiento en zigzag, pero es un parámetro muy difícil de medir para asegurar la concentración.

Aunque la gran mayoría de intoxicaciones por ciguatera se producen por la ingestión de peces carnívoros, otras especies marinas también pueden contener Ciguatoxinas, por ejemplo se han encontrado toxinas en *Turbo argyrostoma* (Un caracol marino), o pequeños invertebrados como camarones y cangrejos pueden ser vectores de transferencia de toxinas a peces carnívoros. ^[4]

1.4 Intoxicación por pescado ciguatérico (CFP).

En la actualidad, la ciguatera es el tipo más común de intoxicación alimentaria marina a nivel mundial, con una estimación de 10.000 a 50.000^[4] personas que padecen la enfermedad anualmente.

El área endémica de la enfermedad como ya hemos comentado, son las zonas tropicales, en el Océano Pacífico, en el Índico y en el mar Caribe tropical ^[4]. El incremento de casos de ciguatera fuera de su área endémica nos hace reflexionar que el problema es de carácter mundial.

La incidencia de la enfermedad es difícil de estimar ya que muchas veces solo se producen los síntomas de menor gravedad que corresponden con los síntomas de una gastroenteritis y no se relaciona con un posible caso de CFP.

Los síntomas que produce la ciguatera son:

- **Gastrointestinales:** Produce los efectos típicos de una gastroenteritis, vómitos, diarreas, náuseas y dolor abdominal. Suelen aparecer durante las primeras 24 horas desde el consumo del organismo contaminado y durante uno o 3 días. ^[8-10]
- **Neurológicos:** La intoxicación puede producir parestesias (entumecimiento y hormigueo) en las extremidades (pies y manos), prurito generalizado (picazón), mialgia (dolor muscular), artralgia (dolor en las articulaciones) y fatiga. Un síntoma distintivo informado por muchos pacientes es una alteración o "inversión" de la percepción de la temperatura caliente / fría, en la que las superficies frías se perciben como calientes para el paciente o producen disestesia (sensación desagradable, anormal). Esta disestesia relacionada con la

temperatura se considera característica de la CFP, aunque no todos los pacientes informan experimentar este síntoma. [2,10,11]

La inversión de la temperatura está relacionada con las fibras mielínicas de tipo cutáneo que son las que responden a la mecánica, frío, calor. Por este mismo mecanismo es por el cual una gran cantidad de pacientes sienten una alta sensación de picor. [4] Las fibras mielínicas son aquellas que están recubiertas de mielina, que es una sustancia que permite viajar mucho más rápido a los impulsos nerviosos. Lo que ocurre es que se produce una despolarización intensa del nervio alterando dichas fibras. [4]

En los casos muy graves y raros los síntomas neurológicos pueden evolucionar a coma o paro cardíaco. [6]

- Cardiovasculares: Se incluyen la bradicardia e hipotensión, estos síntomas se producen por intoxicaciones más agudas. [6]

Las alteraciones neurológicas pueden desaparecer en semanas, pero la picazón, fatiga, y los dolores en las articulaciones pueden durar meses o años. [6]

No existe ninguna prueba analítica que confirme que el paciente sufre la enfermedad, solo se puede confirmar si se encuentra presencia de Ciguatoxinas en el pescado que hayan consumido. [9]

Las CTXs permanecen durante mucho tiempo dentro de nuestro organismo. Se observó en un paciente que tras 22 semanas de haber consumido pescado ciguatérico, se seguían encontrado niveles moderados de Ciguatoxinas. Estas toxinas se transmiten a través de la leche materna, pueden atravesar la placenta, afectar al feto y también se han descrito la transmisión sexual de Ciguatera. La micción dolorosa sugiere que se excretan por la orina, pero tras observar que después de 22 semanas aún el paciente tiene concentraciones de Ciguatoxinas, indica que la excreción no puede ser rápida ni completa. [4]

Estas toxinas al ser acumuladas en el tejido adiposo y ser almacenadas durante largos periodos de tiempo, pueden volver a producir la enfermedad si una persona por ejemplo pierde rápidamente peso corporal. [4]

1.5 Tratamiento

No existe un tratamiento efectivo para la CFP. Los tratamientos que se administran disminuyen los síntomas que produce la intoxicación, es decir no existe una cura para la enfermedad, sino que se administran medicamentos que permiten hacer más llevadera la misma. En primer lugar, cuando se conoce que el paciente sufre CFP sería conveniente realizar un lavado gástrico para eliminar todas aquellas toxinas que aún no han sido metabolizadas. Por otro lado, se administran opiáceos para el dolor, antihistamínicos para el prurito y antidiarreicos, sobre todo para la intoxicación con Ciguatoxinas del pacífico se usa el Manitol, que tiene efectos osmóticos y eleva el pulso cardiaco ^[12]. Por último los síntomas cardiacos se tratan con los tratamientos específicos. ^[13]

1.6 Sistemas de detección

Los sistemas de detección de toxinas deben ser simples y a su vez altamente sensibles, por ello supone un gran desafío.

El método más utilizado para la detección de Ciguatoxinas en peces es el bioensayo de ratón^[4] basado en el método descrito por Banner. El método consiste en inyectar extractos tóxicos semi purificados o crudos en ratones y observar su comportamiento durante 24 horas. Se le administran diferentes concentraciones y se observa su reacción, y también se controla su temperatura. Es recomendable realizar una purificación adicional para separar las Maitotoxinas de las Ciguatoxinas, ya que las Maitotoxinas inducen efectos en ratones que se pueden confundir con el efecto de las Ciguatoxinas, a pesar de las claras diferencias. El ensayo en ratón no es adecuado como prueba para el mercado, ya que puede variar mucho el peso del ratón y la relación del tiempo de muerte con la dosis no es lineal.

Otro método sería alimentar con el hígado de pescados a gatos, mangostas y a pollos, y observar su comportamiento, siendo un medio rápido para analizar su toxicidad. Aunque esta prueba sea muy simple es muy engorrosa, poco cuantitativa y de dudosa ética moral. ^[4]

Hace unos años existía un test denominado cigua-Check, que determinaba rápidamente la presencia de CTXs, pero fue retirado del mercado por la gran cantidad de falsos positivos y negativos que daba. ^[12]

Debido a la escasez de métodos de detección rápidos y eficaces, los pescados deben pasar mucho tiempo en los laboratorios para determinar la concentración de CTXs; esto supone una pérdida de tiempo y ganancias para los pescadores, por esta razón es muy importante mejorar los sistemas de detección.

1.7 Ciguatera en Canarias

Hasta el año 2004 no se habían hecho estudios en Canarias sobre la Ciguatera, pero tras la intoxicación de 5 personas por un Medregal capturado en la costa norte de las islas, se empezaron a llevar a cabo diversas actuaciones. Actualmente un total de 108 personas se han visto afectadas por la enfermedad en Canarias. ^[1]

Es posible que anterior a esta primera intoxicación documentada hayan existido otras, pero por su sintomatología tan parecida a la gastroenteritis, se hayan ignorado.

Las toxinas comienzan a presentar síntomas cuando son acumuladas a lo largo de la cadena trófica en suficiente cantidad, por lo tanto, los peces más grandes, de más edad, son más tóxicos ^[6].

Debido al problema de Salud que supone la Ciguatera en Canarias el Servicio Canario de Salud (SCS) instauró un protocolo de actuación, donde estableció las especies y los pesos de las mismas que deben pasar por controles antes de ser puestos a la venta.

Las especies consideradas de riesgo por el Servicio Canario de Salud en Canarias son: Medregal (*Seriola dumerili*), Medregal negro (*Seriola rivoliana*), Peto (*Acanthocybium solandri*), Mero (*Epinephelus marginatus*), Abade o Abae (*Mycteroperca fusca*), Pejerrey (*Pomatus saltator*), la Morena negra (*Muraena augusti*) y la Bicuda (*Sphyrna viridensis*).

A continuación, se muestra una tabla donde se recogen los casos de Ciguatera que se han producido en Canarias, en la cual se observa que los problemas surgen de la pesca recreativa, ya que los pescadores no llevan las capturas a pasar los análisis establecidos. Esto puede ocurrir por dos razones, en primer lugar, el desconocimiento, y por otro el hecho de tener que pagar el análisis. Es primordial la concienciación y divulgación de la información sobre todo dentro del sector de la pesca recreativa.

La especie del Medregal ha sido el responsable de 2 de cada 3 intoxicaciones. Las especies de Mero oscuro y el Mero de peine que suelen habitar en arrecifes rocosos han sido responsables de los brotes de ciguatera más recientes. ^[1]

Fecha	Confirmado (C) Sospechoso (S)	Nº Afectados	Zona o Localidad	Especie	Procedencia	Kg
2005	C	5	Fuerteventura	Medregal negro (<i>Seriola rivoliana</i>)	Pesca recreativa	26
2008	C	25	Tenerife	Medregal (<i>Seriola sp</i>)	Mercado local	37
2009	C	4	Tenerife	Medregal (<i>Seriola sp</i>)	Pesca recreativa	67
		3	Gran Canaria	Medregal (<i>Seriola sp</i>)		Desc.
		2	Tenerife	Medregal (<i>Seriola sp</i>)		Desc.
2010	C	6	Tenerife	Medregal (<i>Seriola sp</i>)	Desconocido	80
2011	C	5	Gran Canaria	Medregal (<i>Seriola sp</i>)	Pesca recreativa	24
2012	C	10	Lanzarote	Medregal (<i>Seriola sp</i>)	Pesca recreativa	15
	C	9	Lanzarote	Medregal (<i>Seriola sp</i>)	Pesca recreativa	26
	C	4	Tenerife	Medregal (<i>Seriola sp</i>)		desc
	C	12	Tenerife	Mero (<i>Epinephelus guaza</i>)	Pesca recreativa	18
2013	C	16	Lanzarote	Mero (<i>Epinephelus guaza</i>)	Pesca recreativa	Desc.
2014						
2015	C	3	Tenerife	Medregal (<i>Seriola sp</i>)	Pesca recreativa	Desc.
2015		2	Lanzarote	Mero (<i>Epinephelus guaza</i>)		
2015		3	Tenerife	Medregal (<i>Seriola sp</i>)		

Tabla 1. Incidencias registradas por el SCS relacionadas con la CFP ^[6]

Nombre común	Límite	Peso
Medregal	Mayor	15 Kg
Peto	Mayor	35 Kg
Abade	Mayor	12 Kg
Pejerrey	Mayor	9 Kg
Mero	Igual o Mayor	19 Kg
Picudo	Mayor	270 Kg
Pez espada	Mayor	270 Kg

Tabla 2. Límites de pesos de las especies que presentan riesgo de producir Ciguatera. Gobierno de Canarias. Viceconsejería de Pesca, mayo 2012.

1.7.1 Presencia de *Gambierdiscus* en Canarias

Una de las acciones que se llevaron a cabo tras la aparición de la enfermedad en las islas, fue la realización de diversos estudios para conocer la presencia y distribución del género *Gambierdiscus* en Canarias.

Inicialmente, tras muestras recogidas en charcos intermareales de costas rocosas se encontraron las siguientes especies ^[14-16]:

G. cf polyniesensis

G. excentricus

G. australes

G. silvae

Destacar que las especies *G. excentricus* y *G. silvae* fueron descritos por primera vez en las aguas de Canarias.

En un estudio más reciente de distribución, abundancia y composición del género *Gambierdiscus* en las islas de El Hierro, Tenerife, Gran Canaria Fuerteventura y Lanzarote. ^[4]

Se encontraron las especies

G. australes

G. caribeus

G. carolineanus

G. excentricus

G. silvae

Del estudio se sacan las siguientes conclusiones:

- ✓ Las islas con mayor concentración de células del género *Gambierdiscus* son Lanzarote y Fuerteventura.
- ✓ Los picos más altos de concentraciones dentro de cada isla se asociaron con temperaturas del mar superiores a 20°C.
- ✓ *G. excentricus* y *G. australes* son las especies dominantes en Canarias representado el 98%.
- ✓ Canarias representa un punto crítico de biodiversidad en cuanto a especies de *Gambierdiscus*, bastante sorprendente debido a la pequeña extensión geográfica, y al no ser un área endémica. El rango de densidades promedio de este estudio coincide e incluso superan los valores comunes de las áreas endémicas.

Esta alta diversidad de especies en las islas nos podría indicar que el género *Gambierdiscus* lleva en Canarias mucho tiempo y que podría estar favorecido por un clima más cálido en la época del Mioceno.^[1] La presencia de *G. excentricus* y *G. silvae* únicamente en Canarias, refuerza aún más esta hipótesis.

Si estas especies no se encuentran en ningún otro lugar del mundo nos indica que han estado aquí el suficiente tiempo para sufrir un proceso de separación genética convirtiéndolas en nuevas especies.

La alta diversidad de especies en Canarias hace que este archipiélago sea objeto de estudio a nivel mundial.

1.7.2 Presencia de *Gambierdiscus* en Lanzarote y Fuerteventura

Estas dos islas prestan un especial interés debido a las altas densidades de *Gambierdiscus spp* que hay en sus costas. Además cabe destacar que la especie *G. excentricus* es la más tóxica que se ha descrito^[2], encontrando altas densidades en estas dos islas.

Por ello el riesgo de consumir un pescado en las costas de Lanzarote y Fuerteventura es mucho más alta que en el resto de islas.

La presencia de mayores densidades en Lanzarote y Fuerteventura se podría explicar por las siguientes razones:

- ✓ Poseen una plataforma continental menos profunda e inclinada que el resto de islas, donde existe un mayor sustrato para que pueda desarrollarse el Bentos. ^[2]
- ✓ El fenómeno de “upwelling” en las aguas de Marruecos produce que las islas de Lanzarote y Fuerteventura tengan una mayor concentración de nutrientes que las demás islas. ^[17]
- ✓ El aporte de calima del desierto del Sáhara cede nutrientes como el hierro que es un elemento limitante, ya que se encuentra en bajas concentraciones en el mar. ^[17,18,19]

2. OBJETIVOS

Los objetivos que conforman este TFG son:

1. El estudio y comprensión de las causas ambientales y sociales por las cuales se están produciendo más casos de Ciguatera en Canarias.
2. Evaluación del impacto de los cambios de temperatura y de la frecuencia de las calimas en Canarias.
3. Conocer las técnicas y las características de los cultivos de dinoflagelados, en mayor detalle los de *Gambierdiscus*.
4. Cultivar diferentes especies de *Gambierdiscus spp* con el objetivo final de extraer y estudiar las Ciguatoxinas producidas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Este Trabajo de Fin de Grado consta de tres partes experimentales:

1. Cultivo artificial de especies del género *Gambierdiscus* y extracción de las Ciguatoxinas producidas.
2. El estudio de la variación de la temperatura del agua del mar y el aporte de la calima en Canarias.
3. Estudio de la sensibilización que tiene la población canaria sobre la Ciguatera.

3.1 Cultivo artificial de especies del género *Gambierdiscus* y extracción de las Ciguatoxinas producidas.

3.1.1 Material físico

- ✓ Autoclave (PELTA), aparato cilíndrico que se cierra herméticamente, provocando altas presiones de vapor que nos permite esterilizar el material con el que vamos a trabajar.
- ✓ Campana de flujo laminar (Telstar BH-100).
- ✓ Filtros por bombeo (Gelman Sciences, Inc.), filtros de distintos diámetros de poro para esterilizar el agua de mar.
- ✓ Bomba peristáltica (J.P Selecta[®], modelo PR-2003).
- ✓ Matraces Erlenmeyer de distintos volúmenes donde se realizan los cultivos.
- ✓ Vasos de precipitados, se usaron para cubrir los matraces y evitar que la muestra se contamine.
- ✓ Mechero, tiene la finalidad de esterilizar las bocas de los matraces.
- ✓ Centrifugadora (Sorval[®] RC-5B), máquina que aplica fuerza centrífuga a una muestra para acelerar su decantación o sedimentación.
- ✓ Tubos de centrifuga, tubos especiales adaptados a la centrifugadora.
- ✓ Sonicador (Selecta), aparato que aplica ultrasonido para producir la agitación de la muestra.
- ✓ Rotavapor (Buchi R-200), aparato de destilación.
- ✓ Microscopio (Leica DM/L), para la observación celular.
- ✓ Pipetas, permite extraer un volumen concreto de líquido.

3.1.2 Material biológico

Lo primero y más importante para poder comenzar con los cultivos es obtener las células de cada especie de manera aislada. El Instituto Oceanográfico de Vigo ha llevado a cabo esta labor. En la localización La Punta del Higaldo en Tenerife se recolectaron algas de la zona intermareal donde se forman charcos. Como ya he comentado anteriormente las microalgas crecen sobre macrofitos superiores, por lo tanto en estas algas aparecen distintos tipos de dinoflagelados. Gracias a la taxonomía y el uso del microscopio se aíslan las diversas especies. Esto nos permite la realización de cultivos monoespecíficos, es decir de una sola especie.

Se han realizado cultivos de las siguientes especies:

Para hacer más fácil la identificación de las especies se le asigna un acrónimo que viene dado desde Vigo.

- *Gambierdiscus excentricus* 0791
- *Gambierdiscus carolinianus* (Esta es la única especie que no tiene un acrónimo asignado)
- *Gambierdiscus silvae* 1180
- *Gambierdiscus australes* 1198
- *Gambierdiscus australes* 1270
- 1278, se desconoce aún cual es la especie.

3.1.3 Condiciones de los cultivos

Encontrar las condiciones óptimas en las cuales los microorganismos puedan crecer y que además excreten metabolitos secundarios, como en nuestro caso las Ciguatoxinas, es un procedimiento muy difícil y requiere mucho tiempo. Destacar que el cultivo de especies de *Gambierdiscus* es algo innovador de los cuales no se tiene mucha información.

Se ha intentado establecer unas condiciones en las que todas las especies puedan crecer. Aunque sean el mismo género, tienen diferentes tasas de crecimiento en los parámetros que hemos establecido.

Los factores principales que tenemos que tener en cuenta en los cultivos son:

- Medio de cultivo
- Intensidad de luz (Son organismos fotosintéticos)
- Temperatura

Medio de Cultivo

El medio de cultivo con el que hemos trabajado es el cultivo diseñado por Guillard y Keller ^[20]. El medio debe cumplir con todas las exigencias nutricionales que necesiten los microorganismos.

A la receta original del medio Guillard K se le hicieron unas pequeñas modificaciones, en base a la experiencia obtenida por el grupo de investigación de Productos Naturales Marinos del IUBO-AG de la ULL en este campo. ^[21] Estas modificaciones son el uso de fosfato inorgánico en lugar de B-glicerofosfato como fuente de fosforo, sustituir FeCl₃ por FeEDTA y la eliminación del Na₂SiO₃.

Para la preparación del medio de cultivo se usa agua marina, la misma se debe filtrar para conseguir las mayores condiciones de esterilidad, se pasa por filtros estériles de tamaño de poro 5 μm , 0.65 μm y 0.22 μm , y de esta manera se van eliminando consecutivamente las partículas y evitando que los filtros se obstruyan. Es necesario rebajar la salinidad del agua a un 5% con agua destilada para conservar el equilibrio osmótico.



Figura 4. Proceso de filtración del agua marina.

Una vez se haya filtrado el agua se le añaden las disoluciones patrón de los distintos nutrientes que previamente se han preparado, y se añadirán en las concentraciones establecidas en la tabla.

Componentes	Disolución patrón (g/l) dH ₂ O	Cantidad usada (ml/l)	Concentración final en el medio (M)
Nutrientes Mayoritarios			
NaNO₃	75.00	1	8.82 x 10 ⁻⁴
NH₄Cl	2.67	1	5.0 x 10 ⁻⁵
NaH₂PO₄	1.38	1	1.0 x 10 ⁻³
Tris	121.10	1	1.0 x 10 ⁻³
Metales Traza			
Na₂EDTA.2H₂O	33.6	1	9.00 x 10 ⁻⁵
FeEDTA.3 H₂O	4.30	1	1.46 x 10 ⁻⁵

MnCl₂. 6 H₂O	0.178	1	9.00 x 10 ⁻⁷
ZnSO₄. 7 H₂O	0.02	1	8.00 x 10 ⁻⁸
CoCl₂. 6 H₂O	0.014	1	5.00x 10 ⁻⁸
Na₂MoO₄.2H₂O	0.007	1	3.00x 10 ⁻⁸
H₂SeO₃	0.00129	1	1.00 x 10 ⁻⁸
CuSO₄. 5 H₂O	0.00250	1	1.00x 10 ⁻⁸
Vitaminas			
Tiamina. HCl	0.2	1	2.96 x 10 ⁻⁷
Biotina	0.01	1	2.05 x 10 ⁻⁹
Cianocobalamina	1	1	3.69 x 10 ⁻¹⁰

Tabla 3. Componentes del medio Guillard y Keller modificado [21,22]

El elemento Tris [(2-amino(2-hidroximetil) 1,3-propanodiol], es una disolución tampón, con esta disolución se mantiene el pH constante del cultivo y no es necesario la adición de otras sustancias.

Irradiancia y fotoperiodo

Al ser organismos fotosintéticos necesitan una cierta intensidad de luz, para estas especies se ha trabajado entre 300-500 lux. El valor de la intensidad de la luz es muy delicado ya que debe existir la suficiente intensidad para que se pueda realizar la fotosíntesis pero sin sobrepasarnos, porque se puede producir el colapso de los fotosistemas y que los organismos mueran por fotoinhibición. Cuando se le somete a mucha intensidad de luz, los individuos tienden a unirse para protegerse de la radiación y al final acaban muriendo. Lo ideal en el cultivo es que todos los individuos crezcan separados en el fondo. El fotoperiodo que hemos establecido son 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad.

Temperatura

La temperatura es un factor fundamental sobre todo para las reacciones metabólicas, ya que todos los equilibrios de las reacciones químicas que se producen dentro de los organismos vivos vienen regidos por unas ciertas temperaturas. Por otro parte cada especie tiene unas temperaturas óptimas para su reproducción y crecimiento. Como ya

se ha comentado en diversos estudios, y se observa también en las áreas endémicas, las temperaturas altas les favorecen, por lo tanto se ha trabajado en torno a 23 y 25°C. Como solo existe una única cámara de cultivo la temperatura ha sido la misma para todas las especies.

3.1.4 Ciclos de cultivo

Lo primero es dejar los recipientes en los que se recibieron las especies desde Vigo, durante 1 semana o 10 días para que se aclimaten a las nuevas condiciones, dentro de la cámara de cultivo.

Los cultivos de microalgas se realizan a través de unos protocolos microbiológicos estándar, tales como las técnicas asépticas y observaciones microscópicas para el manejo de las mismas.

Para conseguir las condiciones de asepsia del cultivo es importante:

- Todos los utensilios como los filtros, los matraces y vasos de precipitado donde se van a realizar los cultivos, se deben poner en el autoclave, para esterilizar todo el material.
- Desinfección de la campana de cultivo con luz ultravioleta (Daña el ADN y ARN de las células) y limpieza con alcohol.
- Filtrado del agua de mar con la que se realiza el medio de cultivo.
- Uso de guantes y bata.
- El flujo de aire de la campana es de dentro hacia fuera, es decir hacia el exterior, evitando que entren los microorganismos expulsándolos fuera de la campana donde estamos realizando el cultivo.
- Utilización de fuego para flambear la boca de los matraces.

Con estos procedimientos aseguramos que los cultivos se realizan en condiciones de asepsia, aunque siempre hay que asumir el posible error humano.

Escalado

Los cultivos de las diferentes especies de *Gambierdiscus* se llevaron a cabo a través de la técnica del escalado que consiste en ir aumentando progresivamente el número de células en función de la cantidad de medio de cultivo que añadamos, por ello existe un equilibrio entre densidad celular y volumen, que nos permite tener la mayor cantidad posible de células en el menor espacio, permitiéndonos un menor manejo de las mismas.

El escalado se lleva a cabo en la fase exponencial del cultivo, donde está en sus mejores condiciones.

Esta técnica nos permite optimizar el crecimiento celular ya que:

- Se produce una renovación del medio de cultivo y por lo tanto de nutrientes, ajustando los nutrientes a las necesidades de cada volumen celular.
- En cada renovación se desecha parte del medio de cultivo que contiene células muertas.

Es importante tener en cuenta que a mayores volúmenes mayor debe ser la intensidad de luz, porque las células se protegen unas a otras de la radiación.



Figura 5. Cámara de cultivo.

En la imagen se puede observar como los matraces que se encuentran en la parte inferior (50 ml) a la derecha reciben menor cantidad de luz (300 lux Aprox), mientras que las que están arriba (250 ml) y a la izquierda reciben una mayor cantidad (500 lux aprox).

Fases de crecimiento

Las fases de crecimiento en el cultivo de microalgas son cinco, la fase de latencia o adaptación, la fase exponencial, fase de declinación de la fase exponencial, fase estacionaria y la fase de apoptosis celular es decir la muerte.

En la fase de adaptación el crecimiento es lento, pero una vez aclimatadas a su nuevo medio, la división celular se incrementa en función del tiempo. En la fase exponencial las células se encuentran adaptadas, consumiendo los nutrientes y reproduciéndose de manera asexual. Cuando los nutrientes se empiezan a consumir, se llega la fase

estacionaria donde el factor limitante (carencia de nutrientes) y la velocidad de crecimiento se equilibran, por lo que las densidades celulares se mantienen constantes por un tiempo prolongado. Si el medio de cultivo no se renueva esta fase puede tener un periodo muy corto. Por último cuando hay una gran cantidad de células y gran escasez de nutrientes se produce la fase de declinación o muerte. Al producirse la muerte se liberan azúcares, proteínas y lípidos que aprovechan las microalgas que queden vivas, aunque rápidamente colapsa. ^[23]

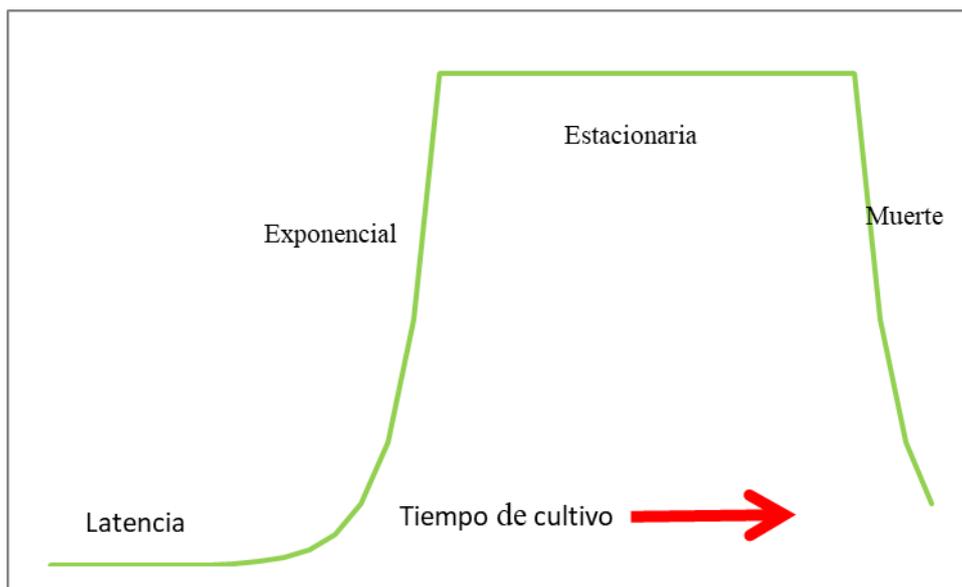


Figura 6. Esquema de las diferentes fases del cultivo de microalgas.

El procedimiento en el laboratorio fue el siguiente:

Una vez que tengamos un cierto volumen celular en los recipientes que vienen de Vigo con células mono específicas, (de una sola especie), se pasa la mitad de este frasco a un matraz de 50 ml y la otra mitad a otro matraz de 50 ml, y se rellenan con 20 ml de medio de cultivo GK.

El cultivo debe llegar a la fase exponencial donde se encuentran en su mejor situación para hacer un trasvase, cada especie crece a un ritmo diferente por lo tanto los tiempos de escalado varían.

Para realizar el trasvase se coge un matraz de 50 ml que tenga la suficiente cantidad de células, y se desecha la parte sobrenadante del cultivo, ya que normalmente las células se encuentran en el fondo del matraz, al deshacernos de parte del medio de cultivo desechamos células muertas que se encuentran en suspensión.

El medio que nos queda en el matraz lo agitamos para homogenizar el contenido de células y se vierte la mitad del contenido en un nuevo matraz de 50 ml, ambos matraces se rellenan con 20 ml de medio de cultivo. Este proceso debe repetirse hasta conseguir 3 matraces con la suficiente densidad celular que nos permita hacer un escalado a un matraz de mayor volumen (250 ml). La necesidad de autoescalar se fundamenta en que cuando la concentración de células en el medio de cultivo es mayor su crecimiento también lo es.

Nota: Se debe flambear la boca de los matraces con fuego para eliminar posibles microorganismos.

Cuando obtengo 3 matraces con un alto contenido celular, desecho parte del medio como en el anterior apartado y vierto el contenido íntegro de los 3 matraces en un matraz de mayor tamaño relleno con medio de cultivo hasta más o menos la mitad del matraz, intentando que haya un equilibrio entre el aire y el medio, para que puedan obtener la suficiente cantidad de oxígeno y dióxido de carbono.

A los 3 matraces de 50 ml se le volverán a añadir medio de cultivo ya que en el fondo del matraz quedan células retenidas, y se producirá una renovación del cultivo para continuar con el ciclo.

Este procedimiento ha sido muy largo y diferente para cada especie, hay condiciones que se desconocen que permiten que en ocasiones un cultivo crezca más rápido que otro. Lo primordial es la continua observación de los cultivos, tanto de manera visual para ver la densidad, como en el microscopio para ver la cantidad de células muertas y así ir controlando el proceso.

En el siguiente esquema se ve de manera gráfica y clara el procedimiento del escalado para conseguir cada vez mayores volúmenes celulares, con la continua renovación de los cultivos para seguir aumentando el volumen celular.

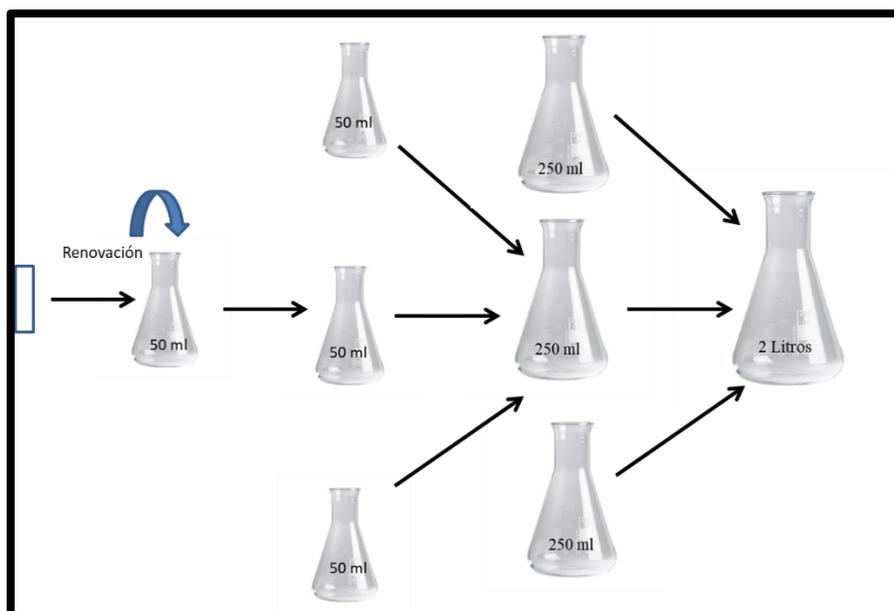


Figura 7. Esquema general del escalado.

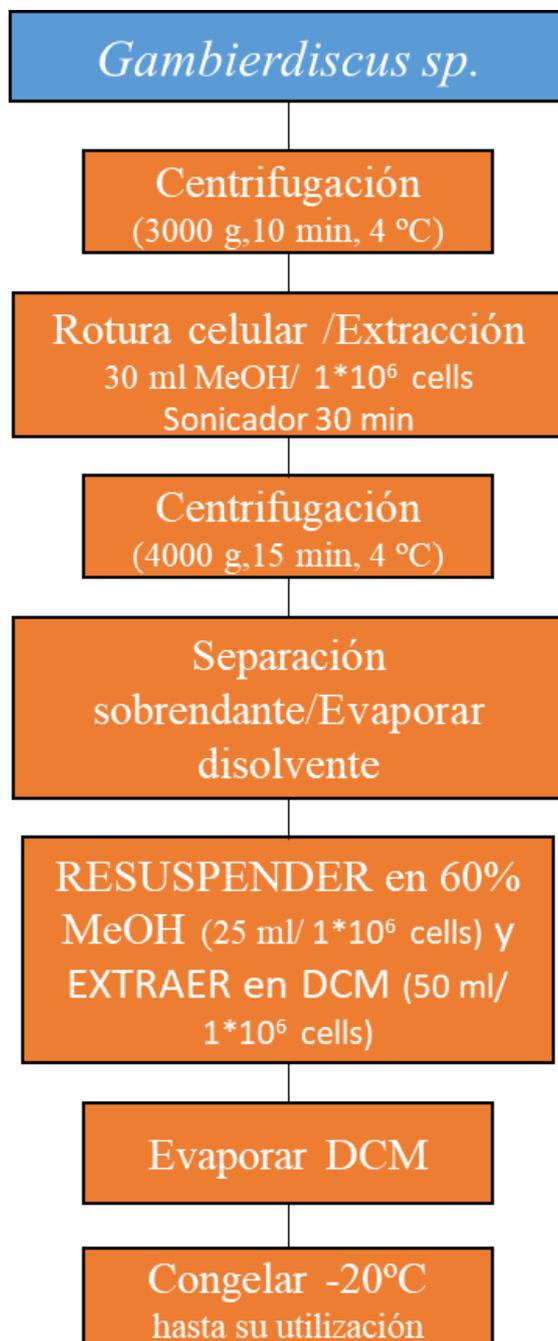
Una vez obtenido el volumen celular que queremos es necesario someter el cultivo a algún tipo de estrés, para provocar que los individuos produzcan las Ciguatoxinas. Existen diferentes tipos de estrés:

- Estrés lumínico: Se varía la intensidad o el fotoperiodo de luz.
- Estrés térmico: Modificar su temperatura
- Estrés por variación pH: Variar levemente el pH del medio
- Estrés por falta de nutrientes: Se mantiene el cultivo durante un largo tiempo sin renovar el medio de cultivo antes de extraer las toxinas.

El estrés al que hemos sometido nuestros cultivos es el estrés por falta de nutrientes, al solo poseer una cámara para todos no se pueden modificar las condiciones de temperatura y luminosidad ya que impediría el crecimiento del resto.

3.1.5 Extracción Ciguatoxinas

Para llevar a cabo la extracción de las Ciguatoxinas se usa un protocolo estándar ^[2] mostrado en el siguiente esquema:



La extracción se va a llevar a cabo con la especie *Gambierdiscus excentricus* 0791. Con los cultivos que yo he realizado no he obtenido la densidad celular suficiente para hacer la extracción debido a que es la especie que más tiempo necesita para crecer. No obstante, en el laboratorio se me cedió un cultivo de esta especie ya que al ser la más toxica es la más interesante para estudiar.

Las cantidades expresadas en el protocolo son referidas a un millón de células, por lo tanto lo principal es obtener la cantidad de células que vamos a extraer y proporcionar las cantidades.

Existen cámaras de conteo que nos dan el número total de células en un cierto volumen pero el diámetro de las especies con las que estamos trabajando es superior al diámetro máximo con el que pueden trabajar las cámaras, por lo que el conteo debemos realizarlo manualmente para ello realizamos lo siguiente:

- Obtener el volumen total del medio de cultivo

$$\text{Volumen} = 3,1 \text{ Litros}$$

- Del volumen total se extrae 1 ml y se vierte en un Eppendorf.
- Con una micropipeta se extraen 5 veces 10 microlitros.
- Con la ayuda del microscopio contamos la cantidad de células que hay en esos 10 microlitros 5 veces y hacemos la media.

$$X = 8,6 \text{ células en } 10 \text{ microlitros.}$$

Por lo tanto en 1 ml tenemos 860 células y en 3,1 L $2,666 \cdot 10^6$ células.

Cálculos

Cantidad celular de la extracción aproximada = $2,666 \cdot 10^6$

Cantidades de las sustancias necesarias para la extracción:

- **MeOH**

$$30 \text{ ml MeOH} \rightarrow 1 \cdot 10^6$$

$$X \text{ ml MeOH} \rightarrow 2,666 \cdot 10^6$$

$$X = 80 \text{ ml de MeOH}$$

- **MeOH+H₂O**

$$25 \text{ ml MeOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 1 \cdot 10^6$$

$$X = 66,65 \text{ ml de MeOH} + \text{H}_2\text{O}$$

$$X \text{ ml MeOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2,666 \cdot 10^6$$

- **DCM (Diclorometano)**

$$50 \text{ ml DCM} \rightarrow 1 \cdot 10^6$$

$$X = 133.3 \text{ ml de DCM}$$

$$X \text{ ml DCM} \rightarrow 2,666 \cdot 10^6$$

Pasos para llevar a cabo la extracción:

1° Se agita el matraz, para separar las células del fondo y homogenizarlas en el medio de cultivo.



Figura 8. Cultivo después de la agitación.

2° Una vez homogenizado se pasa el contenido a un tubo de centrifuga.

3° Se centrifuga durante 10 minutos.

Tras la centrifugación las células van a quedar en la esquina del tubo como se observa en la imagen. Tanto en el medio de cultivo como en el interior celular encontramos los dos tipos de toxinas que produce *Gambierdiscus* (Ciguatoxinas y Maitotoxinas), pero las concentraciones son diferentes, una mayor cantidad de Maitotoxinas en el medio al ser solubles en agua, y una mayor cantidad de Ciguatoxinas dentro de las células por su liposolubilidad.



Medio de cultivo, donde existe mayor proporción de maitotoxinas.

Contenido celular, donde encontramos la mayor proporción de Ciguatoxinas.

Figura 9. Tubo de centrifuga después del proceso de separación.

4° Se extrae con una pipeta la mayor cantidad posible de medio de cultivo, y se deposita en un bote estéril para su posterior análisis.



Figura 10. Proceso de extracción del medio con ayuda de una pipeta.

5° Se vuelve a añadir medio homogenizado en el tubo para centrifugar, y de esta manera se concentrarán todas las células en un solo tubo que nos facilita mucho el trabajo.

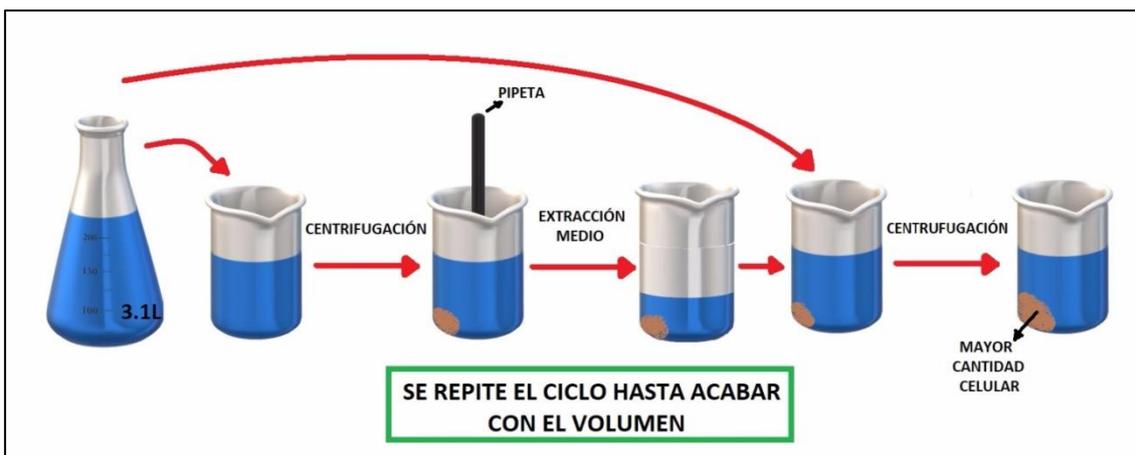


Figura 11. Esquema del proceso de separación del medio de las células a través de la centrifugación.

6° Rotura celular/ Extracción

Una vez que hayamos centrifugado todo el volumen, extraemos con una pipeta la mayor cantidad posible de medio y se añaden los 80 ml de MeOH (Metanol) y se pone el tubo en el Sonicador durante 30 minutos.

Con este proceso se produce la rotura de la membrana celular y gracias al Metanol que es un disolvente orgánico, conseguimos que todo el contenido celular se extraiga. Se encontrarán las Ciguatoxinas, parte de las Maitotoxinas, y sustancias celulares como las clorofilas.



Figura 12. Muestra en el sonicador

7° Centrifugación

Se vuelve a someter a una centrifugación para separar el Metanol de todos los desechos celulares como la pared celular o la membrana plasmática e ir poco a poco depurando el extracto.

8° Separación sobredanante y evaporación del disolvente.

Tras la centrifugación se extrae el Metanol con los diversos compuestos celulares de interés y se desecha lo demás.

Se deposita el Metanol en un recipiente y se evapora en el rotavapor.



Figura 13. Evaporación del Metanol en el Rotavapor.

9° Resuspender en 60% MeOH y extraer en DCM (Diclorometano).

Se añaden los 66,65 ml de MeOH al 60% en Agua y posteriormente 133,3 ml de DCM.

El Diclorometano es un disolvente apolar, por lo tanto las Ciguatoxinas tendrán mayor afinidad y quedaran mayoritariamente disueltas en él, por el contrario las Maitotoxinas se quedaran en el metanol.

Al añadir estos dos disolventes se crean dos capas inmiscibles claramente diferenciadas, el DCM, al ser más denso quedará en la parte inferior, y el MeOH+ H₂O en la parte superior.

Se extrae el DCM gracias a una pipeta, en el disolvente no solo encontraremos Ciguatoxinas, sino también deben existir otras sustancias de carácter lipofílico de la célula, pero no existen Maitotoxinas. De esta manera en los ensayos con las toxinas se aseguran que los efectos que se produzcan son solo causa de las Ciguatoxinas.

No se consigue una purificación total de la toxina, pero sí un compuesto con una alta concentración de las mismas.

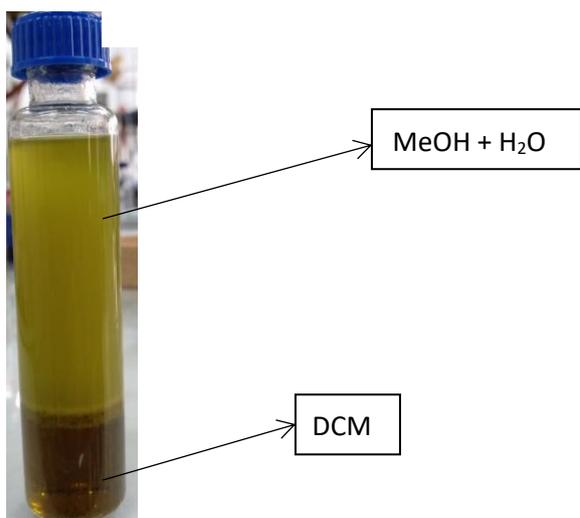


Figura 14. Proceso de separación de dos fases con diferentes densidades.

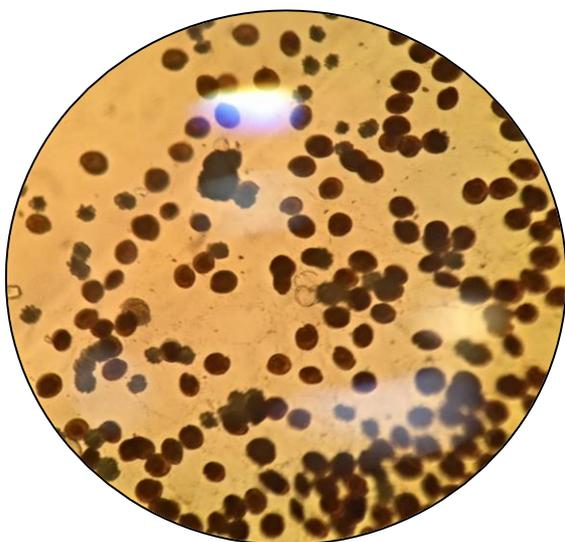
10° Evaporación y congelación

Por último solo se debe evaporar el disolvente y congelar la muestra a -20°C hasta su utilización.

Estas toxinas serán usadas para bioensayo en Ratón (ver apartado sistemas de detección). Los ensayos están programados en fechas posteriores a la presentación de este TFG, por lo que no podré presentar estos resultados.

3.1.6 Resultados

Gambierdiscus excentricus 0791



En la observación al microscopio es la única especie que siempre permanece pegada al fondo y la más estática que se encuentra.

Figura 15. Observación microscopio *G. excentricus*.

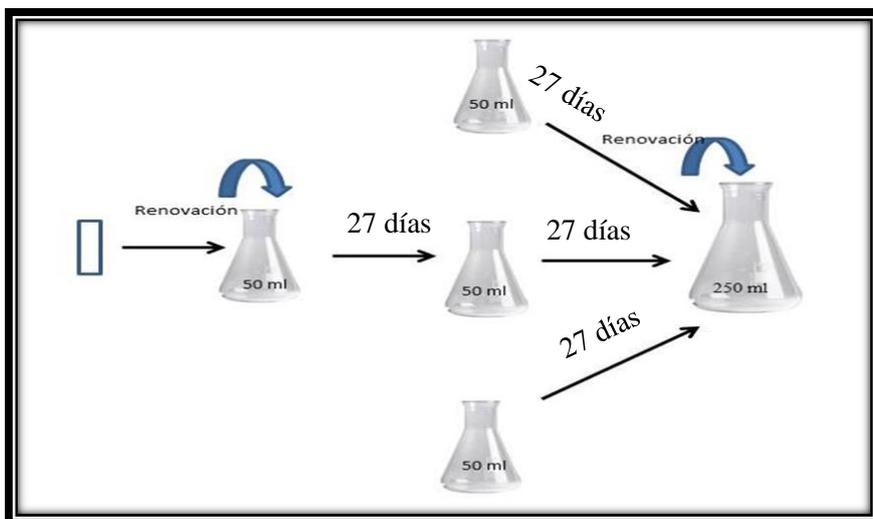
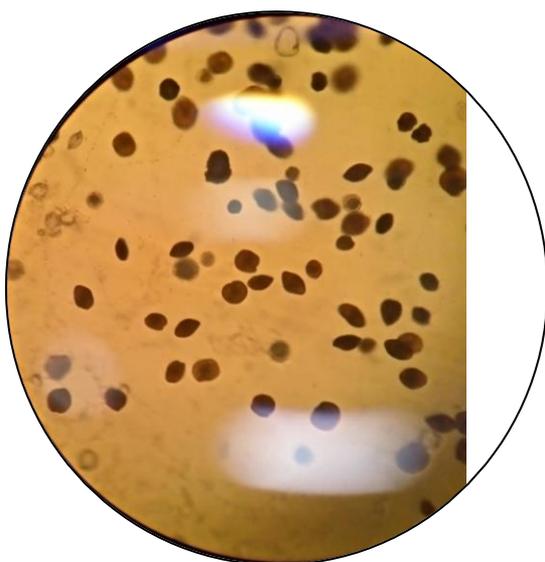


Figura 16. Esquema de cultivo *G. excentricus*.

El tiempo medio que necesitan los matraces de 50 ml para que el cultivo alcance la fase exponencial es de 27 días, es la especie que más tiempo necesita, por lo tanto supone que haya sido la que menos densidad celular hemos obtenido.

Se llegó a un único matraz de 250 ml, porque necesite dos meses para obtener las densidades necesarias en los matraces de 50 ml.

Gambierdiscus carolinianus



Se observan muchos individuos en suspensión el en microscopio, así como movimientos en zigzag (debido a los flagelos que presentan)^[3]

Figura 17. Observación microscopio *G. carolinianus*

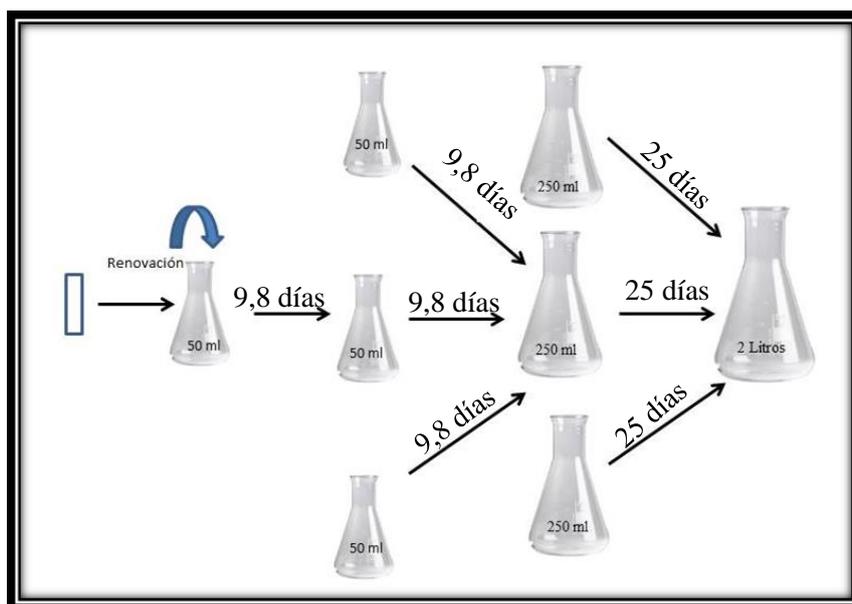


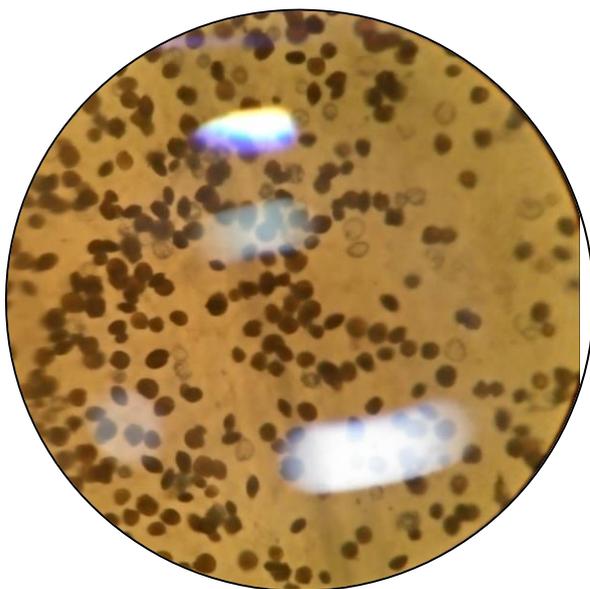
Figura 18. Esquema de Cultivo *G. carolinianus*.

El tiempo medio que tarda el cultivo en llegar a la fase exponencial donde se realiza el trasvase del cultivo en 50 ml es de 9,8 días, este dato se obtiene de la media de los numerosos cultivos que se realizaron. Una vez vertido el contenido de 3 matraces al de 250 ml el tiempo medio de espera para tener un volumen suficiente es aproximadamente 25 días.

En 20 días obtuve la densidad suficiente en los matraces de 50 ml para hacer pases a 250 ml, 30 días menos que *G.excentricus* y en 70 días pude hacer un pase a un matraz de 2 litros.

Los matraces de 250 ml una vez pasados a volúmenes mayores no se renuevan, se coge una alícuota del cultivo y se pasa a un matraz de 50 ml para mantener el cultivo comenzando de nuevo evitando que el cultivo se envejezca.

***Gambierdiscus silvae* 1180**



Como se observa en la imagen es la especie de menor tamaño, al microscopio se observan células en suspensión pero normalmente en menor cantidad que el resto de especies.

Figura 19. Observación microscopio *G. silvae*.

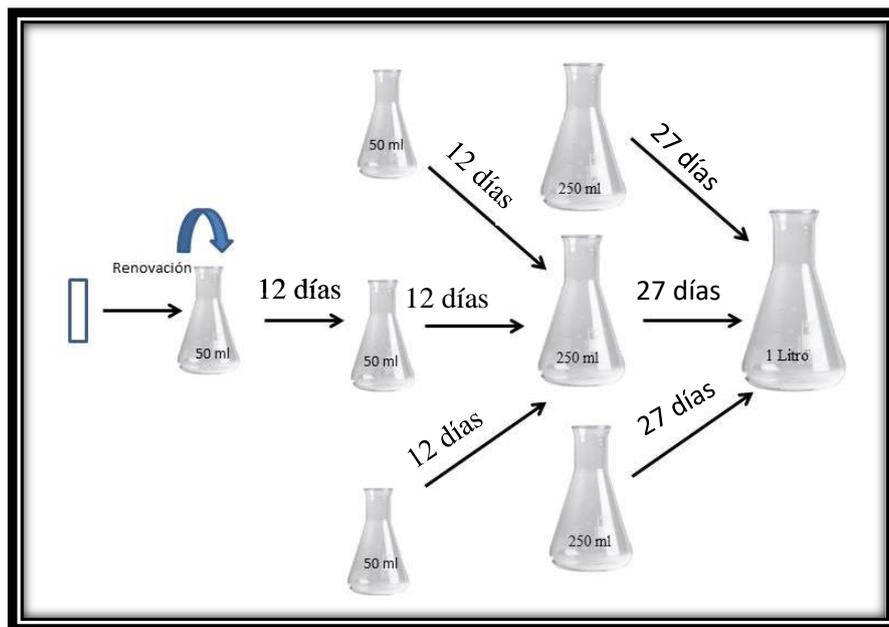
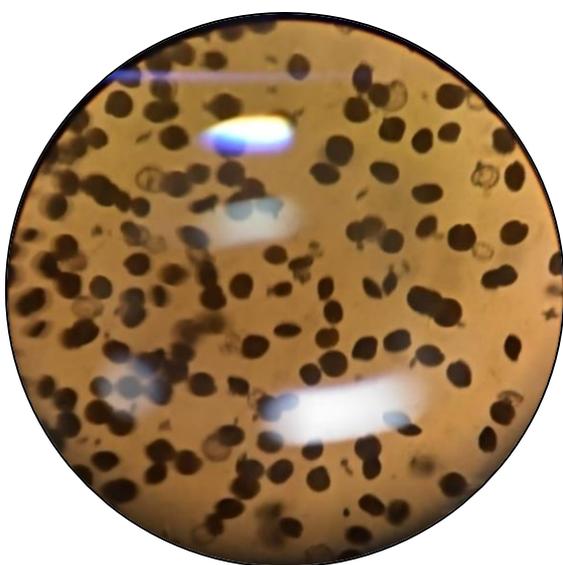


Figura 20. Esquema cultivo de *G. silvae*.

El tiempo de crecimiento de esta especie es muy similar a la anterior, pero su densidad celular cuando alcanza su fase exponencial es menor que en las demás especies. Con esta especie hemos pasado el contenido a un matraz de un 1 litro y su crecimiento también está siendo bueno.

Necesité 24 días para obtener la densidad suficiente en matraces de 50 ml para hacer el pase a 250 ml, a partir de aquí 54 días más para obtener 3 matraces de 250 ml con suficiente densidad, que me permitió obtener un cultivo de 1 Litro. Por lo tanto, el tiempo total fueron 78 días.

***Gambierdiscus australis* 1198**



Al igual que las demás especies se observan en suspensión y en movimiento gracias a los flagelos que poseen.

Figura 21. Observación microscopio *G. australis* 1198.

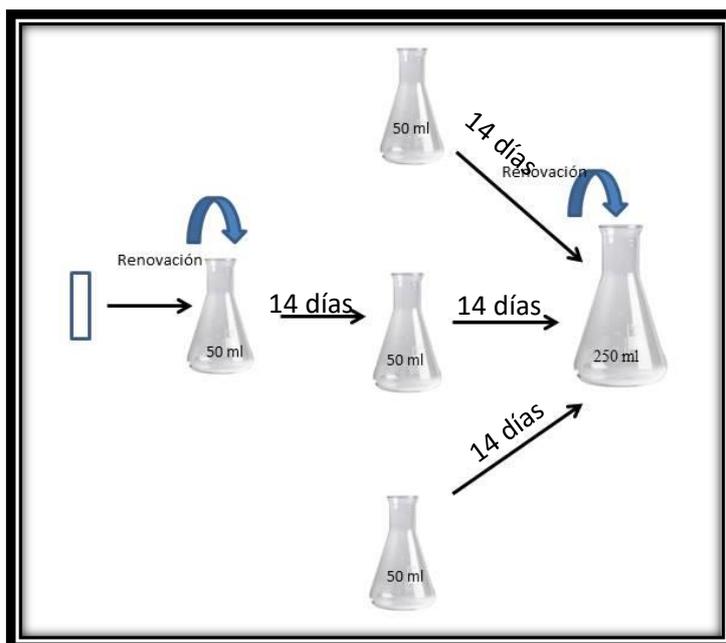
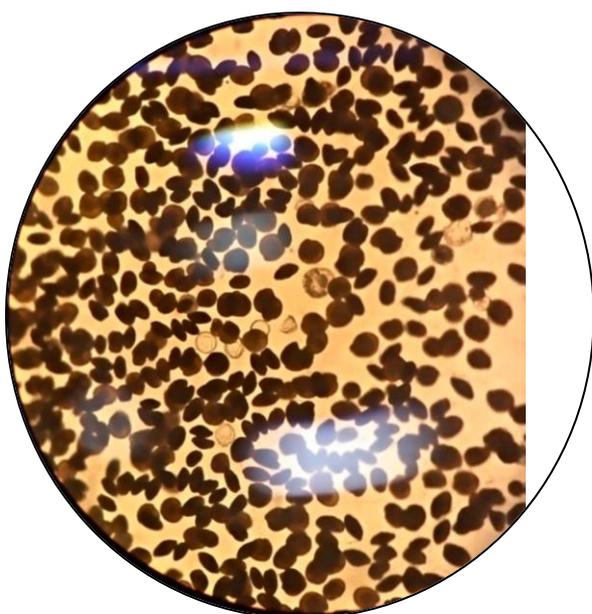


Figura 22. Esquema cultivo *G. australes* 1198.

Esta especie presentó un crecimiento más lento que las dos anteriores por lo que no se obtuvieron volúmenes mayores de 250 ml. Solo se han llegado a duplicar los de 250 ml, con la finalidad de obtener 3 matraces con la suficiente cantidad para llegar a hacer el pase a un volumen superior. El cultivo de 250 ml necesita un mes y medio para obtener la suficiente densidad celular.

***Gambierdiscus australes* 1270**



Observación al microscopio similar a las demás especies, observación de movimientos en zigzag y se observan en suspensión.

Figura 23. Observación microscopio *G. australes* 1270.

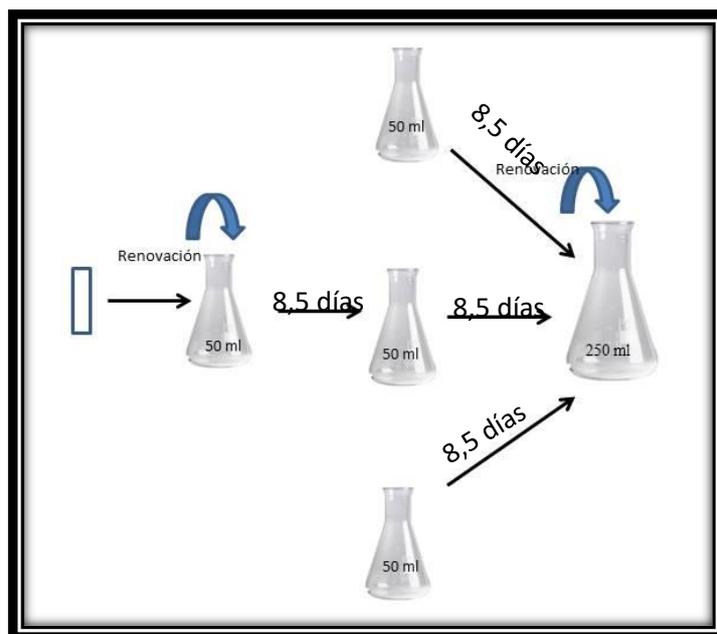
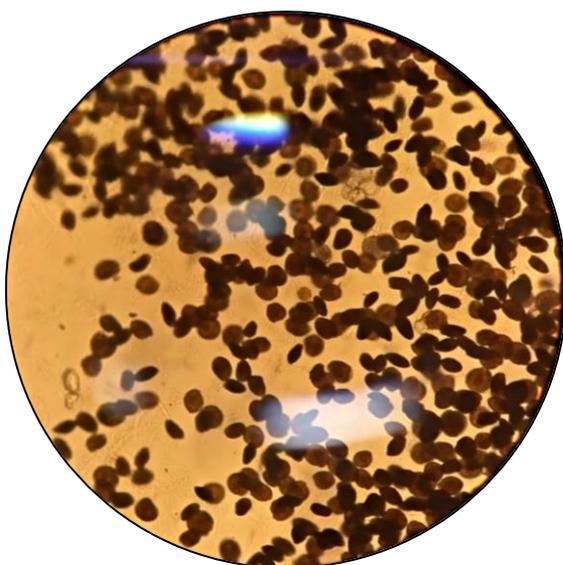


Figura 24. Esquema de cultivo *G. australes* 1270.

Con el cultivo de esta especie hubo un problema, el cultivo comenzó bien y en la renovación de los matraces de 50 ml iban creciendo bastante bien, pero una vez que se pasó el volumen al matraz de 250 ml apenas había crecimiento. Un mes más tarde lo que se hizo fue dividir el volumen para añadir más medio de cultivo e intentar salvar el cultivo, pero sigue estancado, no se sabe muy bien la causa.

1278



Observación similar a las
demás especies

Figura 25. Observación microscopio 1278.

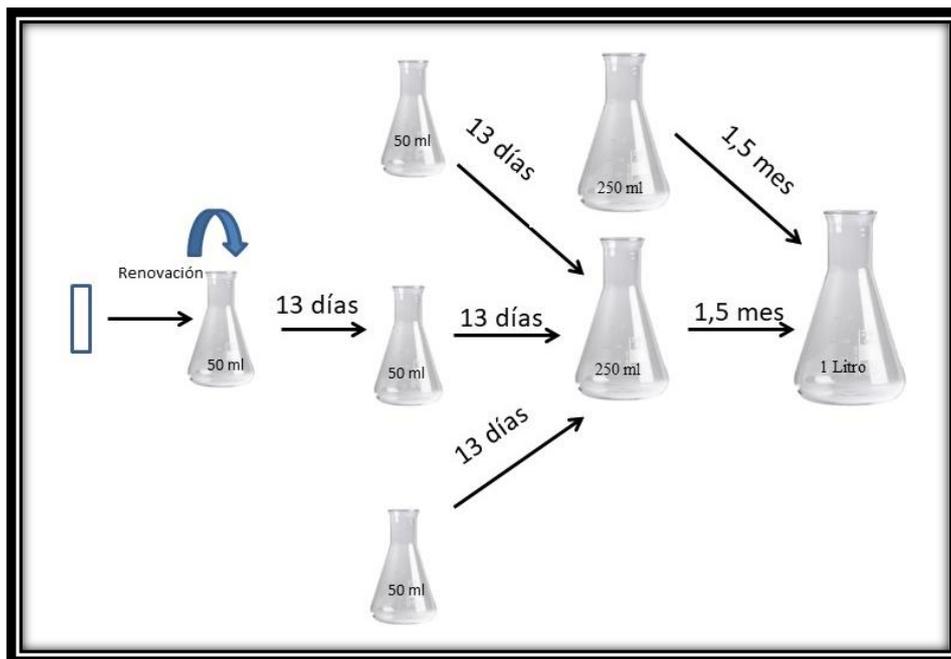


Figura 26. Esquema de cultivo 1278.

El tiempo medio de cultivo en 50 ml es de 13 días y en 250 ml un mes y medio, por lo tanto, el tiempo total necesario para realizar el cultivo fueron 116 días.

3.2. El estudio de la variación de la temperatura del agua del mar y el aporte de la calima en Canarias.

Las dos teorías planteadas para que exista una mayor densidad de especies productoras de Ciguatoxinas son:

- El aumento de la temperatura del agua del mar.
- Aporte del hierro (nutriente limitante) por el polvo sahariano.

3.2.1 Aumento de la temperatura del agua de mar.

Como ya se ha comentado, las áreas endémicas de las diferentes especies de *Gambierdicus* son las áreas tropicales, donde las temperaturas del agua del mar son superiores a las de las Islas Canarias.

Los cambios climáticos están produciendo la tropicalización del clima de Canarias^[17,24], llegando a las costas nuevas especies marinas de origen tropical. En el caso de las especies productoras de Ciguatoxinas, como ya comenté no creo que se trate de un proceso de migración, sino que han estado en Canarias durante mucho tiempo. Por lo tanto se deben estar dando nuevas condiciones ambientales que les está permitiendo desarrollarse mucho mejor.

Este proceso se ha podido ver en muchas especies nativas en Canarias pero de origen tropical como la vieja (*Sparisoma cretense*), la catalufa (*Heteropriacanthus cruentatus*), el gallo azul (*Aluterus scriptus*), o los géneros de algas *Caulerpa* y *Lobophora*, que han experimentado un crecimiento poblacional debido a las nuevas condiciones climáticas. Incluso existe una migración de especies dentro de las islas, donde las más exigentes con la temperatura han migrado a las islas más frías.^[17]

Todos los organismos tienen un rango de temperaturas óptimas donde pueden desarrollarse, esto es debido a que la temperatura controla equilibrios químicos de las reacciones metabólicas que se producen en los organismos.^[25]

En el siguiente esquema se muestra como a medida que nos alejamos por encima o por debajo de la temperatura óptima para reproducirse la especie solo será capaz de crecer pero no de reproducirse, existe un intervalo donde es incapaz de crecer ni reproducirse, y hay temperaturas que son totalmente letales para el organismo.

Es lógico pensar que el aumento de la temperatura del agua del mar podría estar favoreciendo la reproducción de las especies productoras de Ciguatoxinas al acercarnos a su temperatura óptima.

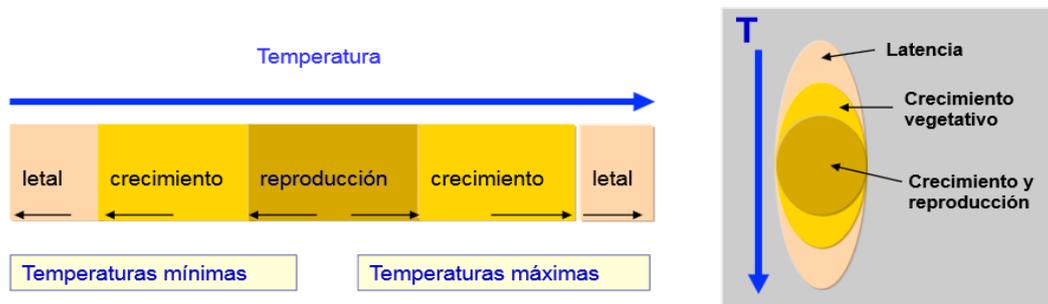


Figura 27. Esquema que muestra la actividad de los seres vivos en función de la temperatura (Marta Sansón).

Para comprobar esta hipótesis, se ha realizado una búsqueda bibliográfica de estudios de temperatura del agua del mar, con especial atención en Canarias. A continuación se exponen los datos encontrados:

A partir de los años 80 ya se observa de manera global un calentamiento de la temperatura del agua de mar cercano a $0,2^{\circ}\text{C}$ por década.

En el siguiente gráfico se ve representada la variación de la temperatura en el periodo 1961-1990. Las líneas continuas son las medias de 10 años, los puntos los valores anuales, y las áreas sombreadas los intervalos de incertidumbre de las medias.

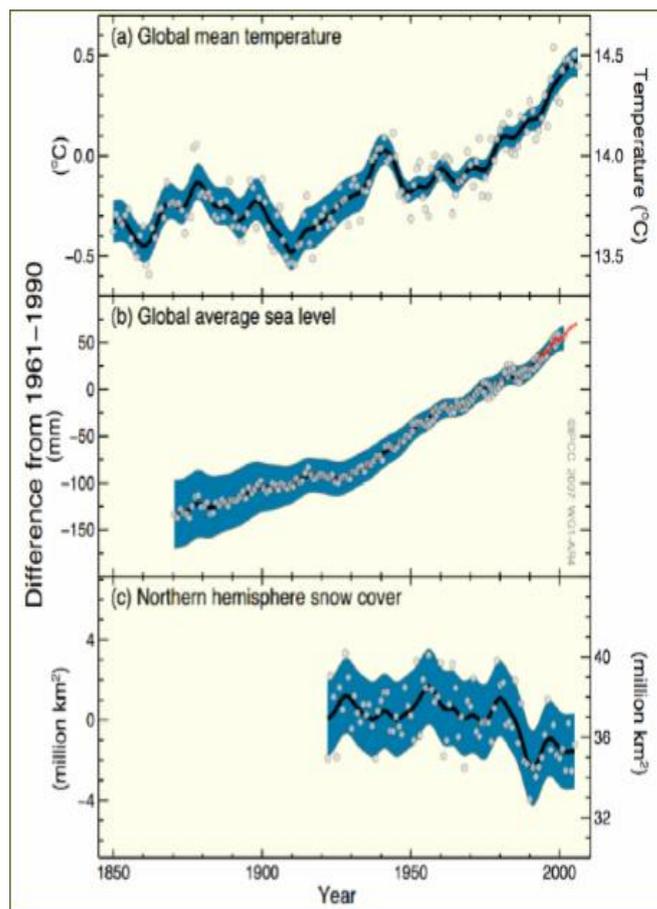


Figura 28. Gráfico que muestra el calentamiento de la temperatura del mar de manera global. [26]

Por otro lado una investigación realizada en Canarias comprobó que en el periodo de 1982-2013 (32 años) ha existido una tendencia de calentamiento del agua del mar con un valor medio de 0,28°C/década, pudiendo llegar en verano a 0,90°C/década. [27]

Canarias tiene una particularidad en sus aguas, y es que como Lanzarote y Fuerteventura se encuentran situadas muy cercas de las aguas frías del afloramiento costero sahariano, existe un gradiente térmico entre las islas orientales y occidentales. Otra característica en la temperatura es que su variación entre el invierno y el verano es mucho menor en comparación con otras zonas templadas y subtropicales con valores extremos entre 17,5°C y 25°C. [17,18]

En el siguiente grafico de un estudio en el periodo 1948-2006, se observa la clara diferencia de temperatura entre La Graciosa, parte más oriental de Canarias y El Hierro, parte más occidental. Se puede apreciar en él la clara tendencia hacia el aumento de la temperatura, no obstante, no se manifiesta de manera uniforme, existiendo periodos más

fríos. En verano de 2004, se produce el pico más alto de temperatura de agua de mar recogido en Canarias, donde se alcanzaron los 27/28°C ^[17]

Se observa que no es a partir de 1997 hasta que no se empiezan a producir temperaturas medias superiores a 22°C.

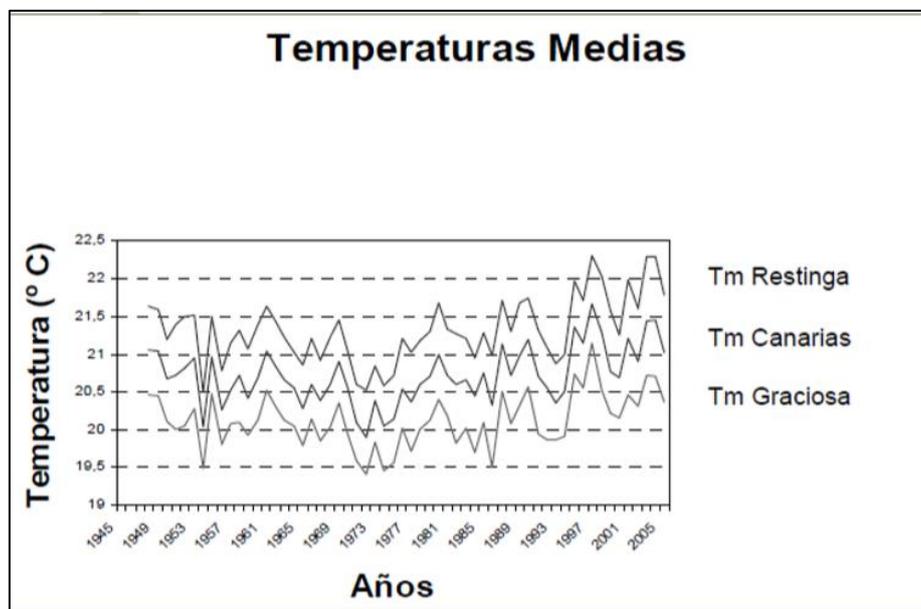


Figura 29. Temperaturas medias superficiales de Canarias en el periodo 1948 a 2006. ^[17]

Una vez demostrada la tendencia hacia el calentamiento de las aguas de Canarias a lo largo de las últimas décadas hasta 2006, nuestro siguiente paso fue intentar obtener los datos de temperatura de los últimos 10 años para comprobar:

- Los periodos de tiempo donde las temperaturas son superiores a 20°C, en base a un estudio realizado en Canarias ^[1] donde se indica que a temperaturas superiores las densidades de *Gambierdiscus* fueron mayores. Con este dato pretendemos hacernos una idea del periodo donde existe riesgo de sufrir una intoxicación.
- Los periodos donde las temperaturas son superiores a 23°C, temperaturas en las que se han realizado los cultivos artificiales de manera satisfactoria. A partir de estas temperaturas la reproducción debe ser mucho más óptima, y el riesgo mayor.

La Colaboración del Instituto Oceanográfico de Santa Cruz ha sido fundamental para realizar esta parte del trabajo. No existe una base de datos a disposición de los usuarios, donde se puedan recoger las temperaturas superficiales de las aguas de Canarias, sin

embargo, gracias al Instituto Oceanográfico de Santa Cruz, se tuvo acceso a algunos datos fundamentales para estudiar mi hipótesis.

Para facilitar el trabajo se seleccionaron varios puntos de las aguas de Canarias, eligiendo, dos puntos de cada isla uno en la zona norte y otro en la zona sur, totalmente al azar.

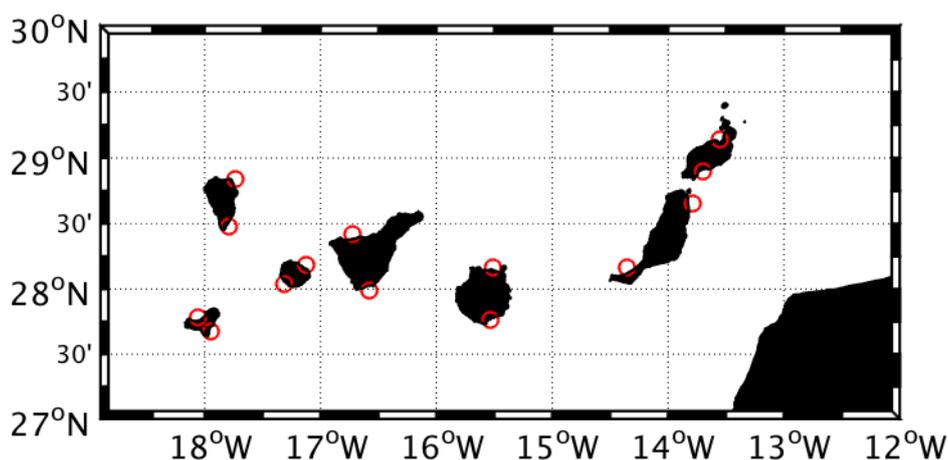


Figura 30. Puntos seleccionados para la obtención de datos de temperaturas superficiales.

De cada uno de los puntos obtuvimos las temperaturas medias diarias, desde el año 2013 hasta el día 6 de junio de 2018, puesto que, no poseían más datos de años anteriores. Me hubiera gustado poder trabajar desde el año 2005, donde comenzaron a existir casos de Ciguatera pero la falta de información lo ha impedido.

A partir de todos estos datos se realizaron una serie de gráficos que permiten visualizar de manera rápida toda la información y entresacar los resultados.

En la realización de todos los esquemas se han establecidos dos marcas de temperatura 20°C y 23°C. Posibilitando una visualización rápida de los periodos que estén por encima.

Para ello se ha realizado un gráfico general donde se han obtenido las medias entre los dos puntos de cada isla, representando todas las islas en un mismo gráfico. Y se ha representado cada isla por separado con los datos de sus respectivas dos costas. Estas figuras se recogen en el apartado de resultados.

3.2.2 Aporte del hierro (nutriente limitante) por el polvo sahariano.

El aumento de temperatura no es la única causa, ya que se puede estar produciendo un efecto de sinergia entre las mayores temperaturas y el aporte de hierro por las calimas.^[17]

El hierro es un nutriente esencial para el desarrollo de los organismos, por ello es fundamental para el crecimiento de *Gambierdiscus spp.* Se encuentra en bajas concentraciones en el agua del mar, por esta razón es un elemento limitante para el crecimiento. Además las entradas significativas de hierro en el mar podrían estimular la fijación de nitrógeno favoreciendo el crecimiento de las comunidades de fitoplacton (entre ellos los dinoflagelados).^[17,18,19]

El impacto de la calima en los ecosistemas marinos ha sido investigado por diferentes autores (Gelado-Caballero, Neuer, González-Ramos), donde se ha observado la importancia del aporte de nutrientes como el aluminio y el hierro, en las aguas que rodean al archipiélago.^[19]

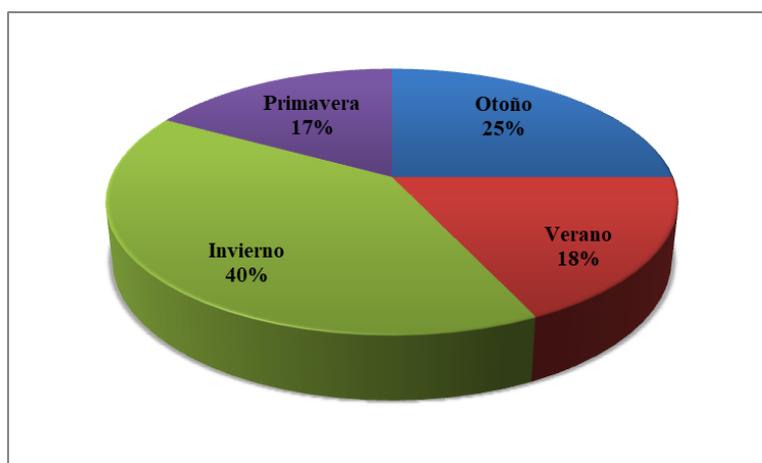


Figura 31. Entradas de polvo sahariano en Canarias (1999).^[28]

Las entradas de polvo sahariano en verano resultan las más peligrosas ya que las temperaturas del agua de mar se encuentran en sus máximos, por suerte solo representan el 18%.

Existe la teoría aún no demostrada que el desplazamiento del anticiclón de las Azores, está produciendo más episodios de calima en las islas Canarias, teoría avalada por muchos profesionales.

En una noticia recogida por el periódico el día se indica: “El desplazamiento del anticiclón de las Azores hacia el este, junto a su intensificación y su alargamiento a partir de la década de los años 80, ha hecho que en invierno se duplique la intensidad y la frecuencia de calima o polvo del desierto en la zona subtropical oriental del Atlántico norte, en la que está Canarias, dentro de la capa de mezcla marina. Así lo ha explicado en una entrevista con Silvia Alonso, del Centro de Investigación Atmosférica de Izaña, en Tenerife, quien ha indicado que el cambio en el anticiclón de las Azores ha hecho que se incremente la intensidad y la frecuencia de los vientos de componente este en el Sáhara Occidental y en el norte de Mauritania”.^[29]

Si este es el caso, existe un mayor aporte de calima, lo que significa un mayor aporte de hierro en las aguas de Canarias, por lo tanto mejores condiciones para el crecimiento de fitoplacton.^[24]

3.2.3 Resultados

Los resultados que tienen una mayor trascendencia para nuestro trabajo obtenidos en el trabajo bibliográfico son los siguientes:

- Existe una tendencia clara hacia el aumento de la temperatura de Canarias en las últimas décadas, que además está favoreciendo el aumento poblacional de especies de origen tropical.
- La temperatura es un parámetro fundamental para la reproducción de los Organismos.
- El aporte de hierro por las calimas supone una mejora en el crecimiento del fitoplacton.
- Respecto a los gráficos elaborados con los datos aportados por el Instituto Oceanográfico, se representan a continuación.

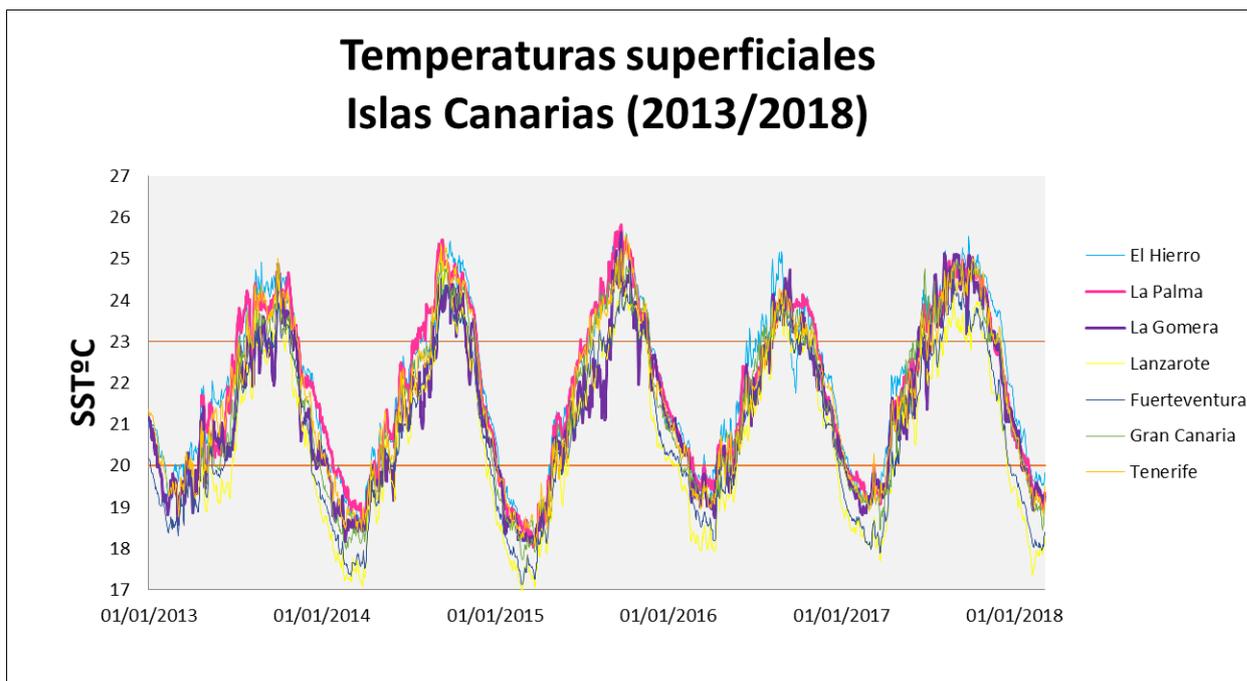


Figura 32. Gráfico general de las temperaturas superficiales en las Islas Canarias (2013/2018).

En esta gráfica general se puede observar que durante más de la mitad del año las temperaturas son superiores a 20°C, pudiéndose afirmar que hay un largo periodo donde las densidades de *Gambierdiscus spp* pueden ser altas en Canarias.^[1]

Existe además un periodo donde las temperaturas son superiores a los 23°C, temperaturas que consideramos óptimas para el crecimiento de *Gambierdiscus spp* en el cultivo artificial.

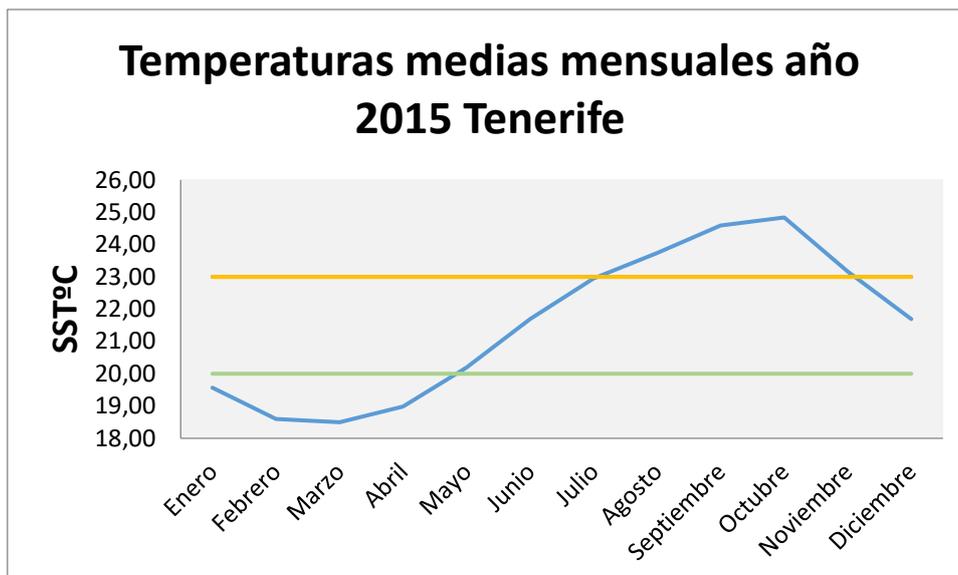


Figura 33. Temperaturas medias mensuales en el año 2015 en Tenerife.

En la figura 33 se observa que la tendencia de todas las islas hacia el aumento y la disminución de la temperatura dentro de cada año es el mismo, por consiguiente se muestra este gráfico a modo de ejemplo para observar los cambios.

Los meses de enero a abril supondrían los de menor riesgo para el crecimiento y reproducción de *Gambierdiscus spp*, ya que las temperaturas medias se encuentran por debajo de los 20°C.

En mayo, junio, parte de julio, parte de noviembre y diciembre las temperaturas son superiores a 20°C.

Es a partir de julio y hasta mediados de noviembre donde se puede presentar una mayor densidad de *Gambierdiscus spp* en las costas de Canarias.

Al existir un gradiente de temperatura entre las islas, no se mostrará exactamente el mismo patrón en todas, pero sí nos sirve para hacernos una idea de los meses de mayor riesgo.

A continuación, se muestran los gráficos de cada una de las islas por separado que permiten ver la información de manera más clara:

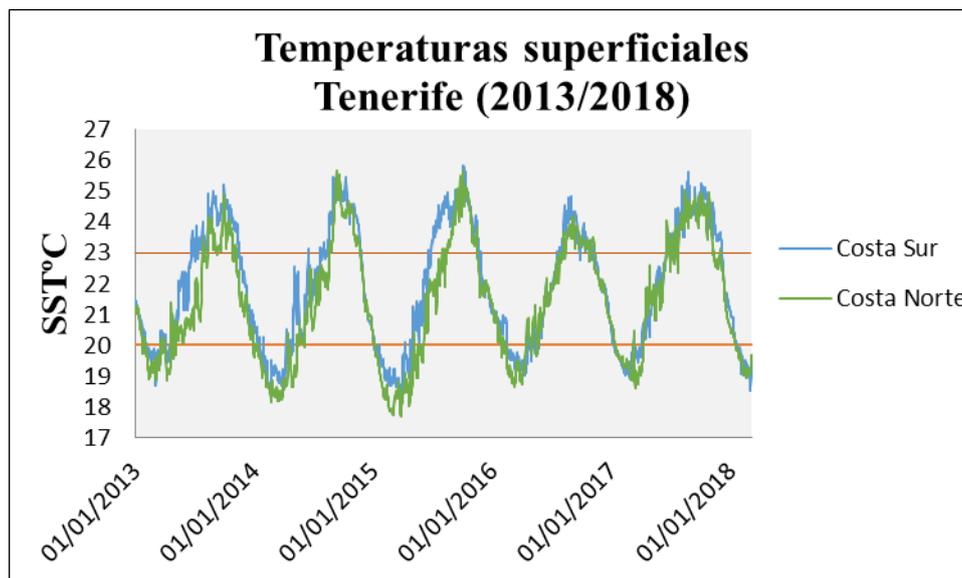


Figura 34. Temperaturas superficiales en dos puntos de la Isla de Tenerife (2013/2018).

Las temperaturas en ambas vertientes de la isla presentan ciertas diferencias, como va a suceder en todas las representaciones.

Dentro de este periodo el año 2015 se presenta como el año donde las temperaturas han alcanzado mayor valor llegando a los 26°C, coincidiendo con dos episodios de Ciguatera en la isla.

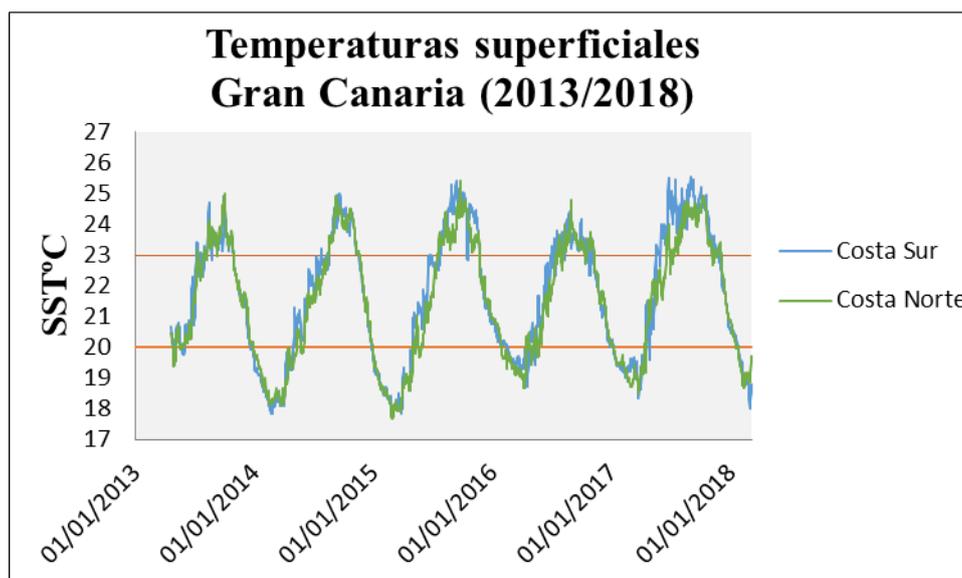


Figura 35. Temperaturas superficiales en dos puntos de la Isla de Gran Canaria (2013/2018).

En este último año (2018) se pueden observar diferencias más marcadas entre la costa sur y Norte de Gran Canaria, los intervalos de la costa sur en el 2018 junto con el año 2015 presentan los valores de temperaturas más altos.

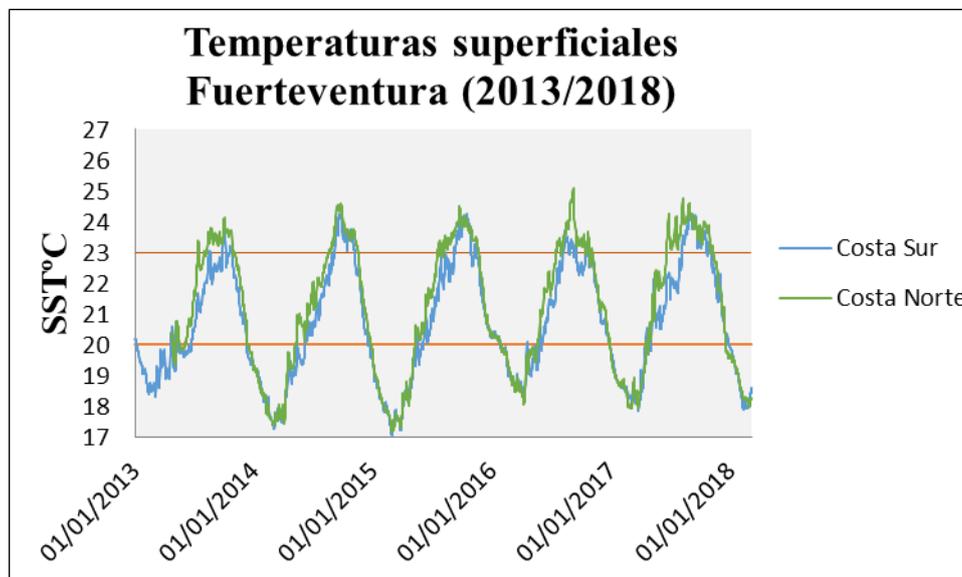


Figura 36. Temperaturas superficiales en dos puntos de la Isla de Fuerteventura (2013/2018).

En todos los demás puntos se observa como la costa sur siempre es más cálida que la norte por motivos lógicos, pero en Fuerteventura como podemos observar ocurre lo contrario. Esto se debe a que el punto de la costa sur se encuentra más cerca de África, por lo tanto, de las aguas frías.

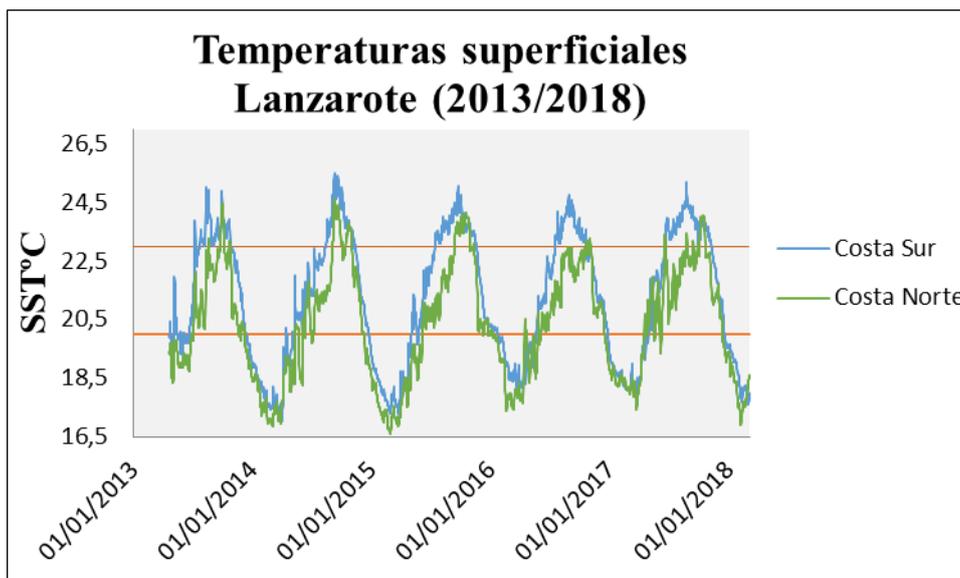


Figura 37. Temperaturas superficiales en dos puntos de la Isla de Lanzarote (2013/2018).

Los rangos donde las temperaturas son superiores a 23°C tanto en Lanzarote como en Fuerteventura son menores que en las demás islas, no obstante, existen. Mantienen la tendencia de las demás islas al tener más de la mitad del año temperaturas superiores a 20°C. A pesar de que sus temperaturas son inferiores existen otros fenómenos que les confieren una cierta ventaja, ya comentados, el fenómeno de “*upwelling*”, mayor aporte de nutrientes, y más superficie donde producir Bentos.

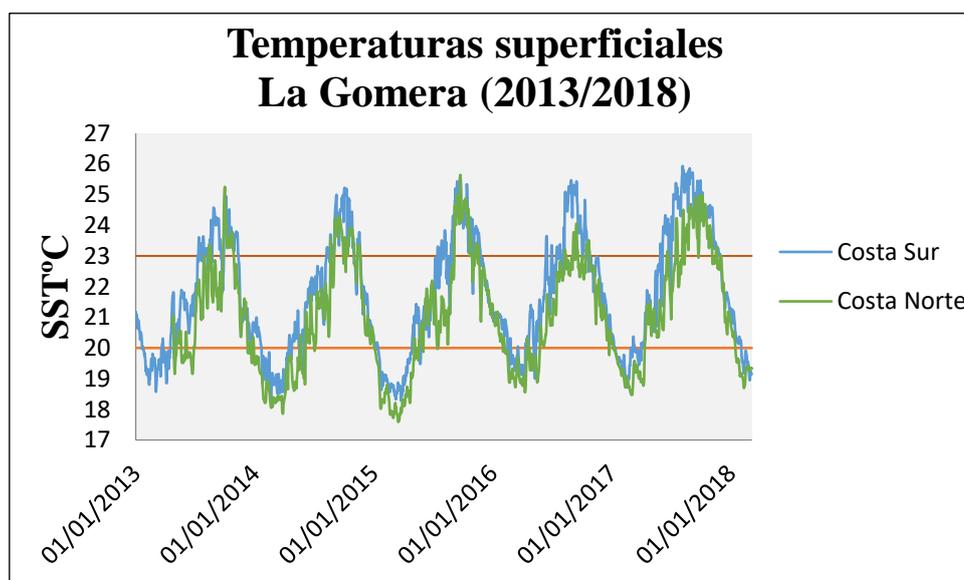


Figura 38. Temperaturas superficiales en dos puntos de la Isla de La Gomera (2013/2018).

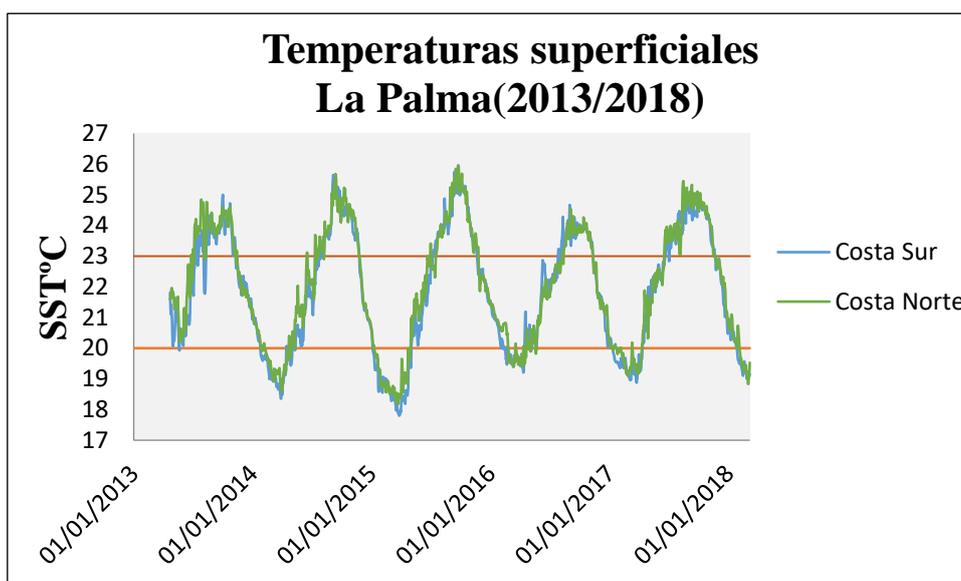


Figura 39. Temperaturas superficiales en dos puntos de la Isla de La Palma (2013/2018).

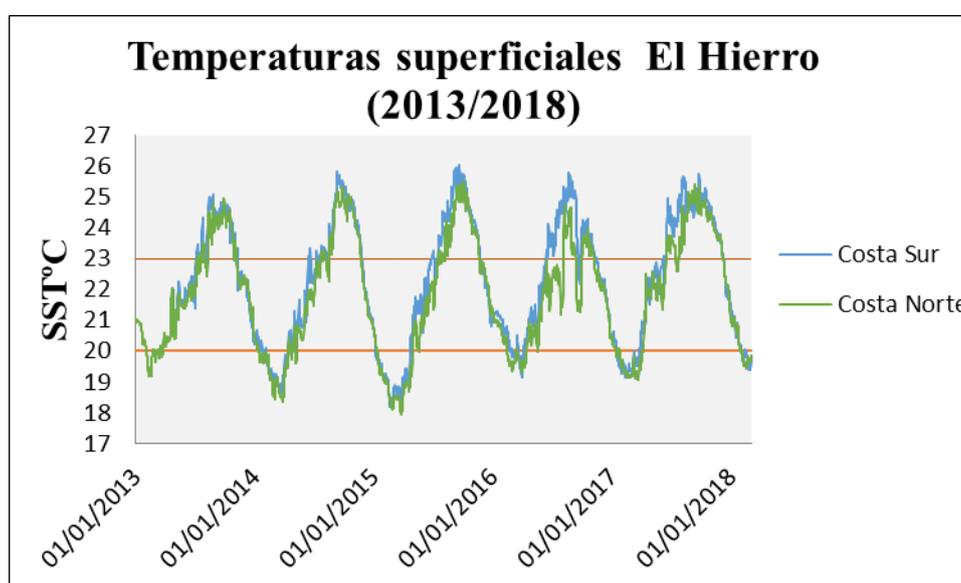


Figura 40. Temperaturas superficiales en dos puntos de la Isla de El Hierro (2013/2018).

En las islas occidentales se presentan las mayores temperaturas recogidas en las Islas Canarias, aun así no se han producido casos de Ciguatera al menos demostrados clínicamente.

3.3 Estudio de la sensibilización que tiene la población canaria sobre la Ciguatera.

3.3.1 Realización de una encuesta.

Las intoxicaciones por pescado contaminado con Ciguatoxinas se producen principalmente a través de la pesca deportiva. El desconocimiento de la población conlleva al consumo de este pescado, sin conocer las consecuencias. Todo producto que se comercializa debe pasar controles de calidad, por lo que no debería haber ningún pescado que cause Ciguatera a la venta.

Para conocer el grado de conciencia que tiene la población canaria acerca de la enfermedad se realizó una encuesta, intentado que llegara a gente de todas las islas y también a pescadores deportivos.

Las preguntas que se realizaron en la encuesta son:

1. ¿A qué isla perteneces?

Esta pregunta se estableció con la finalidad de conocer si existe alguna isla en la que exista una mayor concienciación, con el punto de mira en Lanzarote y Fuerteventura ya que es donde más casos de Ciguatera se han producido.

2. ¿Conoces los cambios en el clima que se están producido en Canarias?

- Sí
- No

Con esta información pretendemos obtener un balance general del nivel de conocimiento acerca de los problemas ambientales que se producen en Canarias.

3. ¿Sabes que es la Ciguatera?

- Sí
- No

4. En caso afirmativo ¿Sabes que se han producido casos en Canarias?

- Sí
- No

Gracias a esta pregunta sabremos si las personas que conocen la enfermedad, es por su origen tropical o si realmente saben que se están produciendo casos en Canarias.

5. Se explica que es la enfermedad y se comenta que esta aumentado el crecimiento de los dinoflagelados que producen la enfermedad, y a continuación se establece la pregunta.

¿A qué crees que es debido esto?

- Aumento de la temperatura del mar.
- Vertidos descontrolados.
- Mayor aporte de nutrientes.
- Contaminación por metales pesados.
- Aporte de nutrientes escasos en el mar.

6. ¿Sabías que al igual que los dinoflagelados que producen la Ciguatera, en Canarias hay muchos más dinoflagelados tóxicos?

- Sí
- No

Se han encontrado en las aguas canarias numerosas especies de dinoflagelados que producen toxinas que afectan a nuestra salud, lo único que su crecimiento se mantiene en fase de letargo y no llegan a proliferar en suficiente cantidad para causar daño. Pero al igual que *Gambierdiscus* que ha encontrado sus condiciones óptimas para crecer, estas especies también pueden hacerlo gracias al cambio climático.

Por ello se realiza esta pregunta, para así descubrir el grado de conciencia de la población con este posible problema ambiental y de salud pública.

7. ¿Eres pescador?

- Sí
- No

Esta pregunta nos permite conocer por separado el grado de conciencia de los pescadores y la población en general.

3.3.2 Resultados

El número total de encuestas realizadas es de 226, de las cuales se han obtenido los siguientes resultados:



Figura 41. Resultados pregunta 1 encuesta.

El mayor número de respuestas con una marcada diferencia ha sido de Tenerife. Debido al bajo número de respuestas en Lanzarote y Fuerteventura no se sacarán conclusiones al respecto ya que no serían representativas.

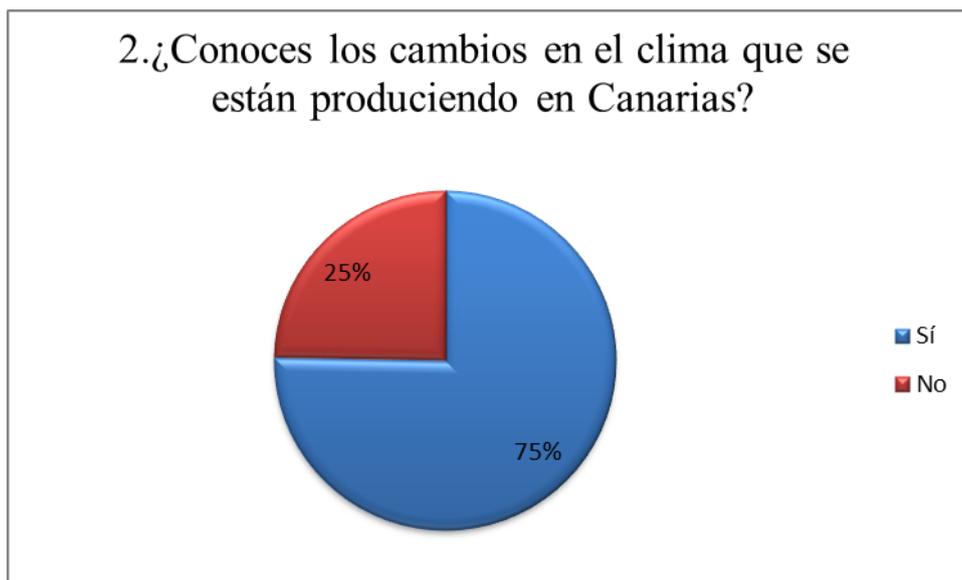


Figura 42. Resultados pregunta 2 encuesta.

Existe un alto porcentaje de los encuestados que conocen los cambios que se están produciendo en el clima representando el 75%, no obstante, en la realización de la encuesta esperaba un resultado mucho mayor, ya que considero, que los cambios son tan importantes que la población debería conocerlos.

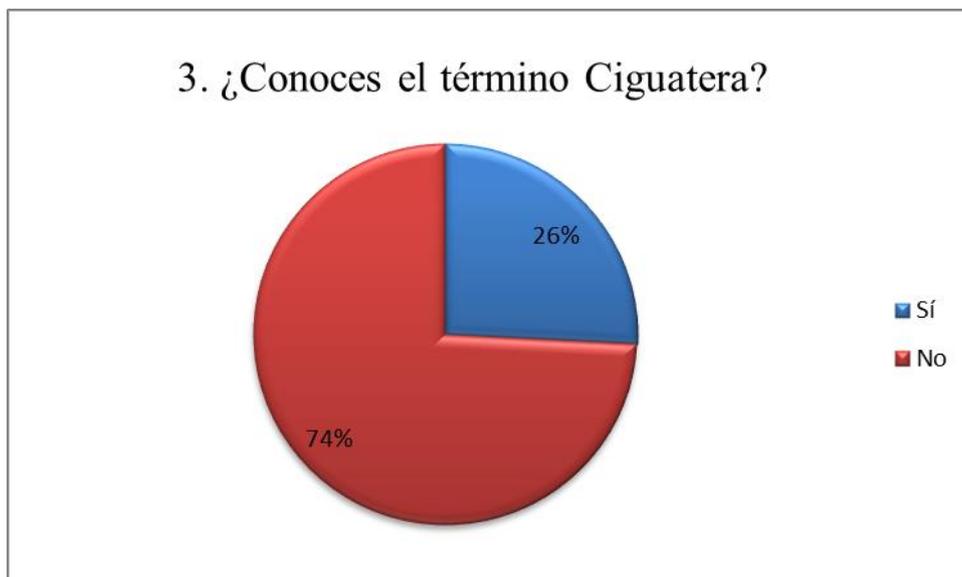


Figura 43. Resultados pregunta 3 encuesta.

Como se puede observar el 74% de los encuestados desconocen el término de la Ciguatera.

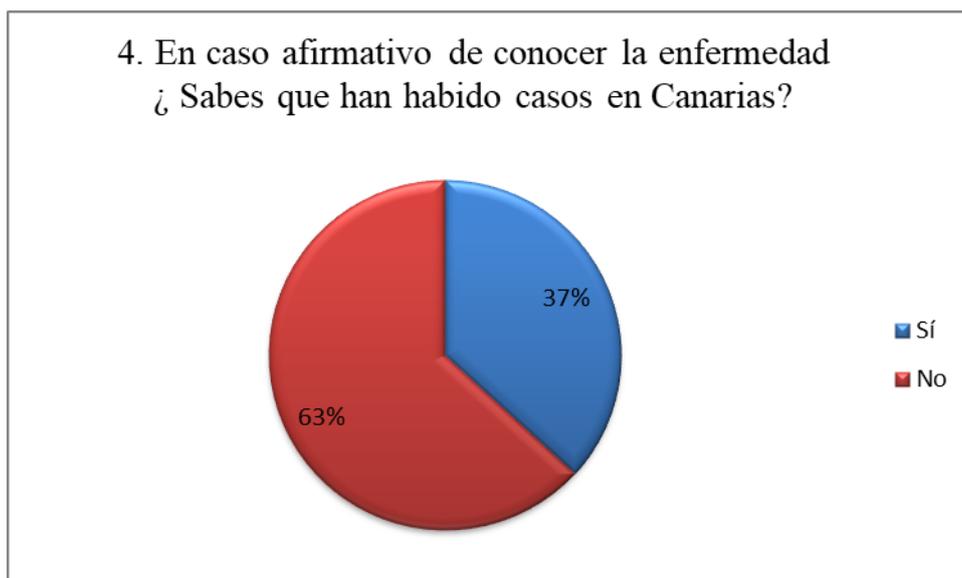


Figura 44. Resultados pregunta 4 encuesta.

Esta pregunta resulta de gran interés, ya que el 37 % de las personas que respondió, que conocía la enfermedad, ignoraba que se ha producido en Canarias. Esto representa que solo el 13,6% de los encuestados sabe que se puede producir la enfermedad en las islas.

5. ¿A qué crees que es debido esto?

La opinión de casi todos los encuestados corresponde a estas respuestas:

- Aumento de la temperatura del agua del mar.
- Vertidos descontrolados.
- Mayor aporte de nutrientes.

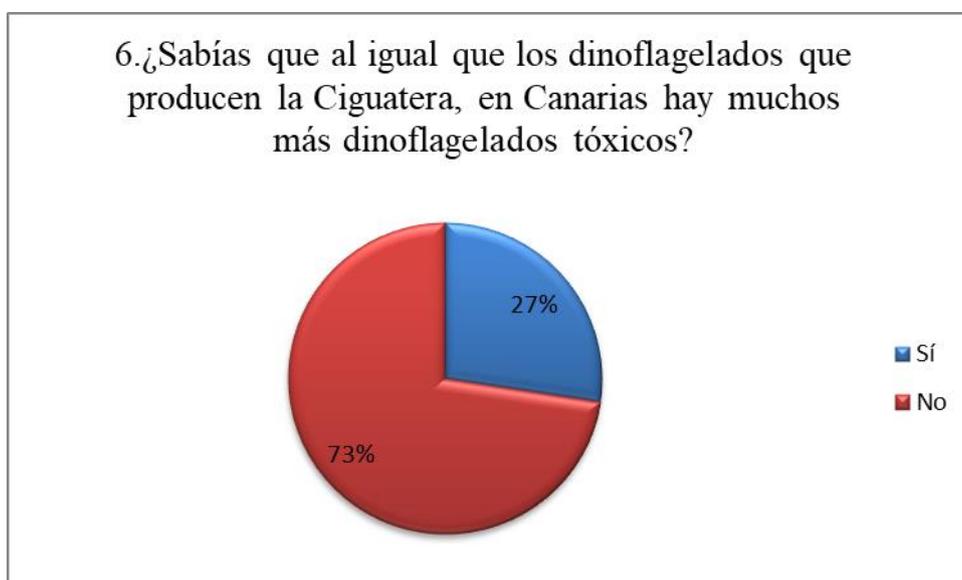


Figura 45. Resultados respuesta 6 encuesta.

El 27% de personas que conocen el problema de la presencia de dinoflagelados tóxicos en Canarias coinciden en su mayoría con los encuestados que respondieron afirmativamente a la tercera pregunta de la encuesta.

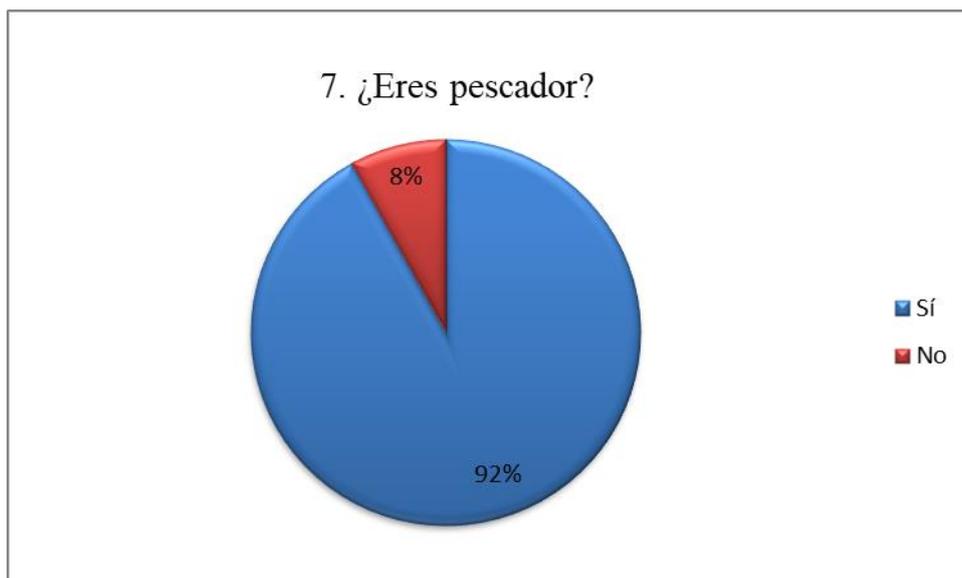


Figura 46. Resultados respuesta 7 encuesta.

El 66,6% de los pescadores encuestados tienen conocimiento de la enfermedad en Canarias, por lo tanto existe una clara diferencia entre el grupo de los pescadores y el resto de la población, no obstante es necesario que todos los pescadores conozcan los riesgos, para que no se produzcan más casos de CFP.

4. DISCUSIÓN RESULTADOS

Las condiciones de cultivo que hemos establecido 23°C y 25°C, con la intensidad de 300 lux y 500 lux y el medio de cultivo Guillard K, han permitido un crecimiento idóneo de las distintas especies, exceptuando *G. australes* 1270.

Establecer las condiciones idóneas de cultivo y obtener densidades celulares de las diferentes especies solo es el comienzo del proyecto en el que he participado. El siguiente paso es estudiar las toxinas excretadas para mejorar los sistemas de detección.

Los datos de temperatura donde hemos demostrado un crecimiento idóneo de *Gambierdiscus spp*, ha fundamentado la hipótesis de que el aumento de la temperatura en Canarias favorece su desarrollo.

Si las especies productoras de Ciguatoxinas se encuentran un aumento de la temperatura del agua del mar, junto con una mayor concentración de hierro, es muy probable que su reproducción y crecimiento se vea favorecida y por lo tanto que su densidad sea mayor.

Los resultados obtenidos tras el estudio bibliográfico y los datos cedidos por el Instituto Oceanográfico refuerzan las hipótesis planteadas al comienzo del trabajo, pero es necesario hacer un estudio en profundidad que lo confirme.

El problema que surgió este verano en las costas Canarias con el afloramiento de las cianobacterias *Trichodesmium spp* es una clara alerta de la situación de cambio a la que se está enfrentando Canarias.

Trichosidesmium spp, es una especie nativa de las aguas de Canarias. En el verano del 2017 se produjo un “*Bloom*” que puso en alerta a toda la población.

Esta proliferación masiva se produjo por:

- Aumento de la temperatura del mar.
- Disminución viento (episodio de calma).
- Aporte de polvo sahariano.

Estas condiciones provocan que aumente su tasa de reproducción y se produzcan proliferaciones de millones de Tricomas por litro, todos los “*Blooms*” se observaron cuando las temperaturas fueron superiores a 23°C. ^[17,18,30].

Es interesante destacar que en las aguas de Canarias se han encontrado junto con los dinoflagelados productores de las Ciguatoxinas, muchos otros dinoflagelados que también son tóxicos ^[1]. Por ello estas condiciones que han favorecido a la proliferación masiva de *Trichosidesmum spp*, pueden estar favoreciendo, o favorecer en un futuro a los dinoflagelados tóxicos que se encuentran en las aguas de Canarias, no obstante, por suerte, las cianobacterias de este género no producen efectos graves a la salud humana.

Llama la atención que no se hayan dado casos de Ciguatera en las Islas occidentales, la teoría principal es que la población de estas islas es muy inferior a las de las islas orientales, reduciendo enormemente las probabilidades de sufrir una intoxicación. A parte de que como ya sabemos poseen poca plataforma continental que permita el desarrollo de Bentos.

El mes de Noviembre de 2016 El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente prohibió la pesca recreativa en el Puerto de La Restinga, en El Hierro, tras detectar Ciguatoxinas. Según una resolución de la Dirección General de Recursos Pesqueros y Acuicultura tras recibir un informe de banco Español de Algas, que indica un Bloom del dinoflagelado *Gambierdiscus caribaeus*.

Es en El Hierro donde por primera vez se prohíbe la pesca a causa de un “*Bloom*” de una especie productora de Ciguatoxinas, y puede guardar estrecha relación con el aumento de temperaturas o cierto aporte de nutrientes, debidos a la erupción del Volcán submarino en 2011.

Se plantea tras la encuesta realizada que la principal causa de la incidencia de la enfermedad en Canarias es el desconocimiento de la población, ya que si se pasarán los controles reglamentarios no se llegaría a consumir pescado contaminado, por lo que resulta de gran importancia la realización de campañas de información y sensibilización, sobre todo a los pescadores recreativos. Una buena forma de advertir del problema sería a través del proceso de obtención de la licencia de pesca.

5. CONCLUSIONES

1. La alta biodiversidad de *Gambierdiscus* en Canarias, incluso la presencia de especies que solo se han descrito en sus costas, conlleva a pensar que estos dinoflagelados llevan mucho tiempo en las islas, y ahora se están produciendo las condiciones idóneas para su crecimiento.

2. Las posibles causas por las que hay mayor densidad de *Gambierdiscus spp* en Canarias, es el aumento de la temperatura del mar, producida por el cambio climático y el aporte de hierro por las calimas saharianas.

Un estudio realizado en las islas para conocer la presencia y distribución del Género *Gambierdiscus*, demuestra que existe, mayor densidad de *Gambierdiscus spp*, cuando las temperaturas son superiores a 20°C. Las temperaturas óptimas que se han observado para el crecimiento en los cultivos artificiales han sido entre 23-25°C. Tras el estudio bibliográfico se ha constatado que gracias al cambio climático, la temperatura del agua del mar en muchas ocasiones es superior a 23°C, afirmación que ayuda a defender nuestra hipótesis.

La tropicalización del clima en Canarias está favoreciendo el aumento poblaciones de especies de origen tropical.

El hierro es un elemento traza para el crecimiento del fitoplacton, que se encuentra en bajas concentraciones en el mar, un aporte extra de hierro mejora el crecimiento, al ser un nutriente limitante, el efecto de sinergia entre el aumento de la temperatura y las entradas de polvo sahariano puede estar favoreciendo el crecimiento de *Gambierdiscus* en Canarias.

3. Tras la encuesta realizada, se deduce que existe un gran desconocimiento de la enfermedad en las islas, razón principal por la que hay tantos casos de Ciguatera en Canarias. Es necesario hacer una campaña de concienciación sobre todo al sector pesquero, para que se realicen los análisis oportunos del pescado antes de ser consumido.

Para ello es muy importante mejorar los sistemas de detección, que sean rápidos y fiables.

5. En Canarias se han encontrado altas densidades de *G. excentricus* representado la especie más tóxica del género *Gambierdiscus*. Esto significa que una menor densidad puede ser igual de tóxica que cualquier otra especie más abundante. Por lo que hay que tener especial cuidado en Canarias
6. Las islas de Lanzarote y Fuerteventura presentan una mayor densidad de dinoflagelados productores de la Ciguatera, además de que la especie más abundante es *G.excentricus*. Por esta razón es la zona de Canarias con mayor riesgo.
7. Este proyecto solo es el comienzo de un largo camino, ya se cuentan con cultivos artificiales de 5 especies y extractos con los que analizar las Ciguatoxinas e iniciar el desarrollo de métodos de detección.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez, F.; Fraga, S.; Ramilo, S.; Rial, P.; Figueroa, R. I.; Riobó, P.; Bravo, I. Canary Island (NEAtlantic) as a Biodiversity 'hotspot' of Gambierdiscus: Implications for Future Trends of Ciguatera in the Area. *Harmful algae* **2017**, *67*, 131-143.
2. Pisapia, F.; Holland, W.; Hardinson, D. R.; Litaker, R. W.; Fraga, S.; Nishimura, T.; Adachi, M.; Nguyen-Ngoc, L.; Séchet, V.; Amzil, Z.; Herrenknecht, C.; Hess, P. Toxicity Screening of 13 *Gambierdiscus* Strains Using Neuro-2a and Erythrocyte Lysis Bioassays. *Harmful algae* **2017**, *63*, 13-183.
3. Ojeda, A. Dinoflagelados de Canarias. Estudio taxonómico y ecológico. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Departamento de Biología, Octubre de **1998**.
4. Visciano, P.; Schirone, M.; Berti, M.; Milandri, A.; Tofalo, R.; Suzzi, G. Marine Biotoxins: Occurrence, Toxicity, Regulatory Limits and Reference Methods. *Microbiol* **2016**, *7*, 1051.
5. Silva, M.; Pratheepa, V. K.; Botana, L. M.; Vasconcelos, V. Emergent Toxins in North Atlantic Temperate Waters: A Challenge for Monitoring Programs and Legislation. *Toxins* **2015**, *7*, 859-885.
6. Protocolo de Actuación Servicio Canario de Salud.
7. Institut Luis Malardé (ciguatera-online.com)
8. Gillespie, N. C.; Lewis, R. J.; Pearn, J. H.; Bourke, A. T.; Holmes, M. J.; Bourke, J. B.; Shields, W. J. Ciguatera in Australia. Occurrence, Clinical Features, Pathophysiology and Management. *Med. J. Aust* **1986**, *145*, 584-590.
9. Lawrence, D. N.; Enriquez, M. B.; Lumish, R. M.; Maceo, A. Ciguatera Fish Poisoning in Miami. *IAMA. J. Am. Med. Assoc.* **1980**, *244*, 254-258.
10. Dawson, J. M. Fish Poisoning in American Samoa. *Hawaii Med. J* **1977**, *36*, 239-243.
11. Schnorf, H.; Taurarii, M.; Cundy, T. Ciguatera Fish Poisoning: a Double-blind Randomized Trial of Mannitol Therapy. *Neurology* **2002**, *58*, 873-880.

12. Llewellyn, L.; Tester, P.; Hallegraeff, G. Ciguatera-A Neglected Tropical Disease, International Plan for Improved Research and Management, http://hab.ioc-unesco.org/index.php?option=com_oe&task=viewDocumentRecord&docID=10751.
13. Nicholson, G. M.; Lewis, R. J. Ciguatoxins: Cyclic Polyether Modulators of Voltage-gated Ion Channel Function. *Mar. Drugs* **2006**, *4*, 82-118.
14. Fraga, S.; Rodríguez, F.; Caillaud, A.; Diogéne, J. Raho, N; Zapata, M. Harmful Algal Blooms in Benthic Systems: Recent Progress and Future Research. *Harmful Algae* **2011**, *11*, 12-22.
15. Chinain, M.; Faust, M. A.; Pauillac, S. Morphology and molecular analyses of three toxic species of *Gambierdiscus* (dinophyceae): *G. pacificus*, sp. nov., *G. australes*, sp. nov., and *G. polynesiensis*, sp. nov. *J. Phycol* **1999**, *35*, 1282-1296.
16. Fraga, S.; Rodríguez, F. Genus *Gambierdiscus* in the Canary Islands (NE Atlantic Ocean) with Escription of *Gambierdiscus silvae* sp. nov., a new Potentially Toxic Epiphytic Benthic Dinoflagellate. *Protist* **2014**, *165*, 839-853
17. Brito, A. Influencia del Calentamiento Global sobre la Biodiversidad Marina de las Islas Canarias, en Afonso-Carrillo (Ed.) *Naturaleza Amenazada por los Cambios en el Clima. Actas III Semana Científica Telesforo Bravo. Instituto de Estudios Hispánicos de Canarias*, **2008**, 141-161.
18. Ramos, A. G.; Martel, A.; Codd, G. A.; Soler, E.; Coca, J.; Redondo, A.; Morrison, L. F.; Metcalf, J. S; Ojeda, A.; Suárez, S.; Petit, M. Bloom of the marine diazotrophic cyanobacterium *Trichodesmium erythraeum* in the Northwest African upwelling. *Mar. Ecol. Prog. Ser* **2005**, *301*, 303-305.
19. Dorta, P.; Gelado, M. D.; Cardona, P.; Collado, C.; Criado, C.; Hernández, J. J.; Mendoza, S.; Siruela, V.; Torres, M. E.; Curbelo, D.; López, P.; Rodríguez, E. Algunas Consideraciones Sobre la Importancia del Polvo de Origen Sahariano en el Clima del Archipiélago Canario y su Aporte a las Aguas Superficiales Oceánicas, **2002**, 14-23.
20. Keller, M. D.; Selvin, R. C.; Claus, W.; Guillard, R. R. L. Media for the Culture of Oceanic Ultraphytoplankton. *J. Phycol* **1987**, *23*, 633-638.

21. Cruz, P. G., Tesis Doctoral: Estudio de toxinas y otros metabolitos secundarios de origen marino, ULL, **2007**, Capítulo II, pp. 42-43.
22. Andersen, R. A. Algal Culturing Techniques, Ed. Elvise Academic. *Press* **2005**, Appendix, pp. 508-509.
23. Arrendondo, B.O.; Voltolina, D. Concentración Recuento Celular y Tasa de Crecimiento, **2007**, 21-29.
24. Brito, A., Falcón, J. M.; Herrera, R. Sobre la Tropicalización Reciente de la Ictiofauna Litoral de las Islas Canarias y su Relación con los Cambios Ambientales y Actividades Antrópicas. *Dialnet* **2005**, 33, 515-525.
25. Rodríguez-Prieto, C.; Ballesteros, E; Boisset, F; Afonso-Carrillo, J. Guía de las macroalgas y fanerógamas marinas del Mediterráneo Occidental. *Ed. Omega* **2013**, Barcelona. 656 pp.
26. Grupo intergubernamental de Expertos sobre el cambio Climático de 2007. Marine Board- European Science Foundation.
27. Vélez, P.; González, M.; Pérez, M. D.; Hernández, A. Open ocean temperature and salinity trends in the Canary Current Large Marine Ecosystem. In: Valdés, L. and Déniz-González, I. (eds). Oceanographic and biological features in the Canary Current Large Marine Ecosystem. IOC-UNESCO, Paris. IOC Technical Series, No.**2015**, 115, pp. 299-308.
28. Dorta, P. Las invasiones de aire sahariano en Canarias. Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias y Caja Rural de Tenerife, Santa Cruz de Tenerife. **1999**.
29. Alonso, S. Artículo publicado por el Periódico el Día, El desplazamiento del anticiclón de las Azores duplica el número de calimas. Publicado el 18 de enero de 2011.
30. Arístegui, J.; González, A.J.; Benavides, M. Informe sobre la presencia de *Trichodesmium spp.* en aguas de Canarias, en el verano de 2017.