

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Ecología Marina**

---

**Evaluación de ácido domoico en mamíferos marinos en Baja  
California, México**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Blanca Azucena Durán Flores**

Ensenada, Baja California, México  
2017

Tesis defendida por  
**Blanca Azucena Durán Flores**

y aprobada por el siguiente Comité

---

Dra. María de la Concepción García Aguilar  
**Codirector de tesis**

---

Dr. Ernesto García Mendoza  
**Codirector de tesis**

**Dra. Gisela Heckel Dziendzielewski**

**Dr. Horacio Jesús de la Cueva Salcedo**

**Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse**



---

**Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes**  
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Blanca Azucena Durán Flores © 2017*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Blanca Azucena Durán Flores** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

### **Evaluación de ácido domoico en mamíferos marinos en Baja California, México**

Resumen aprobado por:

---

Dra. María Concepción García Aguilar

**Codirector de tesis**

---

Dr. Ernesto García Mendoza

**Codirector de tesis**

Se evaluó la exposición ácido domoico (AD) de mamíferos marinos del noroeste de México de mayo de 2016 a mayo de 2017 y se analizó la posible relación de los eventos de varamientos en la Bahía de Todos Santos, con la abundancia *Pseudo-nitzschia* sp. Se confirmó por primera vez en México la presencia de AD en mamíferos marinos por análisis en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), en hígado y riñón de dos delfines varados en la Bahía de Todos Santos en primavera de 2017, pero no se identificó una relación entre varamientos y la abundancia de la diatomea. Los florecimientos algales nocivos (FAN) son proliferaciones de especies de fitoplancton que afectan al ambiente y a la salud pública y animal. Durante los FAN de algunas especies de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* se puede presentar AD, una neurotoxina potente que se puede acumular en organismos filtradores y causar la intoxicación amnésica por consumo de mariscos (ASP) en humanos. Esta intoxicación es uno de los principales síndromes de intoxicación por ficotoxinas que también ha causado vedas sanitarias en la costa oeste de Norteamérica. El AD también afecta a la vida silvestre y en particular a los mamíferos marinos. En años recientes, muchos eventos de varamientos y de mortandad de mamíferos marinos ocurridos en las costas de California se han asociado con intoxicación por AD. En el Océano Pacífico mexicano y golfo de California se ha detectado la presencia de especies de *Pseudo-nitzschia* potencialmente tóxicas, sin embargo, no se había evaluado la presencia de AD en mamíferos marinos de la región.

**Palabras clave:** florecimientos algales nocivos (FAN), *Pseudo-nitzschia*, ficotoxinas, varamiento, mortandad.

Abstract of the thesis presented by **Blanca Azucena Durán Flores** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology.

**Domoic acid evaluation in marine mammals in Baja California, Mexico**

Abstract approved by:

---

Dra. María Concepción García Aguilar  
**Thesis codirector**

---

Dr. Ernesto García Mendoza  
**Thesis codirector**

The exposure of marine mammals to domoic acid (DA) in the northwest of Mexico from May 2016 to May 2017 was evaluated. Also, we evaluated the possible relationship within stranding events in Todos Santos Bay with the abundance of *Pseudo-nitzschia* sp in the region. For the first time in Mexico, the presence of DA was confirmed in marine mammals. DA was detected by Liquid Chromatographic LC-MS/MS analysis in liver and kidney tissue from dolphins stranded at Todos Santos Bay in the spring of 2017. A relation between marine mammal standings and *Pseudo-nitzschia* abundance was not observed. Harmful algal blooms (HABs) are proliferations of phytoplankton species that can affect public and animal health and can also affect the environment. During some HABs of diatoms of the genus *Pseudo-nitzschia*, domoic acid (DA) can appear. DA is a potent neurotoxin that accumulates in filter feeding organisms at levels that can cause amnesic shellfish poisoning (ASP) to humans. Intoxication by DA is considered one of the major syndromes produced by phycotoxins in the North America west coast. Associated to the presence of this toxin in seashell several sanitary bans have been implemented in the region. . DA also affects wildlife and especially marine mammals. In recent years, on the California coasts several stranding events and die-offs of marine mammals have been associated to domoic acid intoxication. In the Mexican Pacific Ocean and Gulf of California, the presence of toxigenic species of *Pseudo-nitzschia* have been detected, however, the presence of DA in marine mammals has not been evaluated.

**Keywords:** Harmful algal bloom (HAB), *Pseudo-nitzschia*, phycotoxins, strandings, mortality.

## Dedicatoria

*A O.R.M. quien partió durante este periodo pero me dio  
la oportunidad de despedirme.*

*A mi familia por creer en mí y apoyarme  
incondicionalmente.*

## Agradecimientos

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada de septiembre de 2015 a septiembre del 2017, sin la cual no habría sido posible cumplir con una meta más en mi vida profesional.

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al posgrado en Ecología Marina por haberme dado la oportunidad de ingresar y lograr un grado académico y más que eso las experiencias que viví durante este periodo.

Agradezco a la Dra. María Concepción por ofrecerme el proyecto de tesis cuando creí que ya no sería posible trabajar en el tema. Por su apoyo como codirectora, que aunque me dio la libertad de trabajar a mi ritmo siempre estuvo al pendiente y supo dar lugar a mi opinión.

Al Dr. Ernesto García Mendoza por su apoyo como codirector. Por la asesoría en un tema totalmente desconocido para mí y por brindar el espacio y material de trabajo en el laboratorio.

A la Dra. Gisela Heckel, el Dr. Horacio de la Cueva y la Dra. Karina Acevedo por fungir como sinodales. A la Dra. Gisela Heckel por prestar tanta atención en las revisiones y por sus comentarios tan acertados. También por su disponibilidad y apoyo para trabajar con los datos de ICMME. Al Dr. Horacio de la Cueva por sus minuciosas revisiones en mi escrito y sus valiosas aportaciones durante el desarrollo del proyecto. A la Dra. Karina Acevedo por tomarse el tiempo para estar (aunque fuera virtualmente) durante las presentaciones de mis avances aun con las complicaciones de su ubicación y por proporcionarme muestras de suero para complementar el estudio.

A ICMME, particularmente a Lupita Gómez, por todo el tiempo que dedicó a que obtuviera los datos que necesitaba, por su paciencia para enseñarme a capturarlos en su sistema y por aguantarme tantos días invadiendo su oficina.

A la tripulación del velero Martin Sheen de la Sea Sheperd Conservation Society con quienes conviví casi tres semanas y viví una de las mejores experiencias durante la maestría.

A los chicos de FICOTOX que me ayudaron y enseñaron a hacer los análisis, y por soportar “el agradable olor” al procesarlas. A Yaireb Sánchez y Axel Rosas por su apoyo y asesorías en cada detalle que necesitaba conocer y por los dolores de cabeza que les causó el análisis de mis muestras.

A la Dra. Mary Carmen Ruíz de la UABC por su tiempo y disponibilidad para aportar datos de fitoplancton para el análisis.

A todos mis profesores por adentrarme en temas tan distintos a los que conocía.

A mis compañeros de generación por estar dispuestos al trabajo en equipo que hizo más llevaderas esas pesadas noches de estudio y tareas. Por brindarme su amistad y porque conocí grandes personas de quienes aprendí muchas cosas y no únicamente académicas.

A Alicia y Sara por abrirme las puertas de su casa aun cuando no me conocían, pero ello facilitó enormemente mi comienzo en la maestría, y por hacerme saber que sigo contando con su apoyo.

Por último, agradezco a mi familia: mis papás, hermanos y hermanas (y Mina) por acompañarme durante todo el trayecto y llegar hasta aquí conmigo.

## Tabla de contenido

	Página
<b>Resumen en español</b> .....	iv
<b>Resumen en Inglés</b> .....	ivi
<b>Dedicatoria</b> .....	iv
<b>Agradecimientos</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	ix
<b>Lista de tablas</b> .....	x
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	3
1.1.1 Especies de Pseudo-nitzschia productoras de ácido domoico.....	3
1.1.2 Ácido domoico.....	5
1.1.3 Transferencia de ácido domoico en la trama trófica .....	6
1.1.4 Intoxicación por ácido domoico .....	7
1.1.5 Ácido domoico en mamíferos marinos .....	9
1.1.6 Métodos de detección y cuantificación de ácido domoico.....	10
1.2 Hipótesis.....	11
1.3 Objetivos .....	12
1.3.1 General.....	12
1.3.2 Específicos .....	12
<b>2. Metodología</b> .....	<b>13</b>
2.1 Colecta de muestras.....	13
2.1.1 Colecta de muestras de animales varados.....	13
2.1.2 Colecta de muestras de animales vivos .....	14
2.2 Análisis en laboratorio.....	17
2.2.1 Extracción de ácido domoico de tejidos, heces y contenido estomacal.....	17
2.2.2 Extracción de ácido domoico de suero .....	17
2.2.3 Cuantificación de ácido domoico .....	18
2.2.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).....	18
2.2.3.2 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	19
2.2.3.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)...	20
2.3 Asociación de abundancia de Pseudo-nitzschia y varamientos de mamíferos marinos .....	22



<b>3. Resultados</b> .....	23
3.1 Análisis de ácido domoico en muestras de mamíferos marinos.....	23
3.1.1 Detección y cuantificación de AD en muestras de animales varados.....	23
3.1.2 Detección y cuantificación de AD en heces de lobo fino de Guadalupe.....	26
3.1.3 Detección y cuantificación de AD en suero de lobo marino de California.....	30
3.2 Abundancia de Pseudo-nitzschia y varamientos de mamíferos marinos .....	32
<b>4. Discusión</b> .....	36
4.1 Métodos de cuantificación de AD .....	36
4.2 Detección de ácido domoico en mamíferos marinos.....	39
4.3 Relación entre la presencia de Pseudo-nitzschia y varamientos de mamíferos marinos en la Bahía de Todos Santos.....	42
4.3.1 Varamientos de mamíferos marinos.....	42
4.3.2 Abundancia de Pseudo-nitzschia y varamientos de mamíferos marinos .....	43
<b>5. Conclusiones</b> .....	46
<b>Literatura citada</b> .....	47
<b>Anexos</b> .....	55

## Lista de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Estructura del ácido domoica (a), glutamato (b) y kainato (c).....	5
<b>Figura 2.</b> Sitios de muestreo y especies de animales varados. Pd= Phocoenoides dalli, Zc= Zalophus californianus, Dc= Delphinus capensis, Dd= Delphinus delphis, Gm= Globicephala macrochorynchus, Be= Balaenoptera edeni, Ps= Phocoena sinus.....	13
<b>Figura 3.</b> Localización de Isla Guadalupe (IG) y las colonias muestreadas de lobo marino de California en el golfo de California. 1. Rocas Consag, 2. Isla San Jorge, 3. El Coloradito, 4. Isla Granito, 5. Los Cantiles, 6. Los Machos, 7. El Partido, 8. El Rasito, 9. San Esteban, 10. San Pedro Mártir, 11. San Pedro Nolasco, 12. Los Islotes. ....	16
<b>Figura 4.</b> Curva de calibración de AD para el análisis en HPLC. ....	19
<b>Figura 5.</b> Curva de calibración de AD para el análisis en LC-MS/MS.....	21
<b>Figura 6.</b> Separación de la señal de triptófano y del estándar de AD (a) y cromatograma del blanco de extracción (b) para el análisis por HPLC.....	23
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de muestras de Delphinus delphis (a) Cerebro: negativo a AD, (b) hígado: positivo. ....	24
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de muestra de riñón de Delphinus capensis con ácido domoico analizada por LC-MS/MS.....	26
<b>Figura 9.</b> Cromatograma de muestra de heces de lobo fino de Guadalupe con señal en el tiempo de retención de ácido domoico. ....	27
<b>Figura 10.</b> Resultados de la prueba rápida de ASP de tres muestras de heces de lobo fino de Guadalupe.....	28
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de una muestra de heces de lobo fino de Guadalupe con señal en el tiempo de retención de AD, con mayor absorbancia a 280 nm (línea roja) y menor a 242 nm (línea azul) analizada mediante HPLC.....	28
<b>Figura 12.</b> Esfuerzo promedio de búsqueda ( $\pm$ desviación estándar) anual (a) y estacional (b) de mamíferos marinos varados en la Bahía de Todos de Santos. ....	33
<b>Figura 13.</b> Registros por unidad de esfuerzo (RPUE) $\pm$ desviación estándar anual (a) y estacional (b) de mamíferos marinos varados en la Bahía de Todos Santos. ....	34
<b>Figura 14.</b> Comparación entre los registros por unidad de esfuerzo (RPUE) de varamientos y abundancia de Pseudo-nitzschia en Bahía de Todos Santos y San Diego. ....	35

## Lista de tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos de tejidos y fluidos analizados para evaluar la presencia de ácido domoico en mamíferos marinos.....	11
<b>Tabla 2.</b> Colecta de muestras de mamíferos marinos varados, mayo 2016-mayo 2017. ID = código del individuo; Región: GC = golfo de California, COBC = costa occidental de Baja California; Localidad: SF= San Felipe, PT= Playas de Tijuana, BTS= Bahía de Todos Santos; Tipo de muestra: H = hígado, R = riñón, C = cerebro, O = ojo, CE = contenido estomacal, F = heces.....	14
<b>Tabla 3.</b> Relación de muestras de suero de hembras adultas de lobo marino de California colectadas en las colonias del golfo de California (Figura 3) en julio de 2016. ....	15
<b>Tabla 4.</b> Condiciones del LC-MS/MS para la detección de ácido domoico. ....	21
<b>Tabla 5.</b> Concentración de ácido domoico (ng/g o ml de muestra) en animales varados detectado por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). ID = individuo, nd = no detectado, na = no analizado. Globicephala macrorhynchus, Balaenoptera edeni, Phocoena sinus, Delphinus delphis, Phocoenoides dalli, Zalophus californianus, Delphinus capensis. ....	25
<b>Tabla 6.</b> Concentración de ácido domoico (ng/g de muestra) en heces de lobo fino de Guadalupe por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). na = no analizado, nd = no detectado. ....	29
<b>Tabla 7.</b> Concentración de ácido domoico (ng/ml de muestra) en suero de hembras adultas de lobo marino de California por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). nd = no detectado, na = no analizado, ++++ = muestra sospechosa. ....	31
<b>Tabla 8.</b> Registro de especies de mamíferos marinos varados en la Bahía de Todos Santos de 1998-2016. ....	32

## 1. Introducción

---

Los florecimientos algales nocivos (FAN) son proliferaciones de especies de fitoplancton que afectan al ambiente y a la salud pública y animal. Estos fenómenos se producen de forma natural cuando se presentan las condiciones que favorecen el desarrollo de algunas especies de microalgas. El conjunto de factores físicos, químicos y biológicos, como corrientes, surgencias, salinidad, nutrientes, luz, temperatura e interacción con otras especies de la comunidad fitoplanctónica y otros niveles tróficos dan lugar a los FAN (Sellner et al., 2003; Kudela et al., 2015; Wells et al., 2015). Los factores que pueden favorecer a los FAN son la concentración y tipo de nutrientes, y su relación estequiométrica. Esta es alterada constantemente por factores naturales como el aporte de nutrientes por escorrentía de aguas pluviales, pero también por actividades humanas debido al incremento del uso de aguas costeras para acuicultura, la descarga de efluentes y escorrentías agrícolas (Anderson, 2009; Glibert, 2015). La expansión de los FAN también se ve favorecida por modificaciones en el ambiente resultantes de las actividades antropogénicas como el transporte de quistes en agua de lastre o por el traslado de moluscos entre diferentes áreas (Hallegraeff, 1993; Glibert, 2015).

Desde la década de 1970, se ha registrado un aumento en la ocurrencia y extensión de los FAN en diversas partes del mundo (Anderson et al., 2002; Glibert et al., 2006). La costa noroeste del océano Pacífico, desde Alaska hasta México, ha experimentado estos eventos con mayor frecuencia desde el año 2000, con graves daños ambientales, económicos y a la salud (Anderson et al., 2008; Lewitus et al., 2012). Específicamente, los florecimientos de dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium*, y de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* son los que mayores daños han provocado en esta región (Van Dolah, 2000; Anderson et al., 2008; Lewitus et al., 2012). Una de las causas de los efectos nocivos de los FAN es que algunas especies de microalgas producen toxinas (ficotoxinas) bajo condiciones ambientales específicas. Estas toxinas son responsables de más de 60,000 incidentes anuales de intoxicación en humanos a nivel mundial, con una tasa de mortalidad del 1.5% (Van Dolah, 2000; Shumway et al., 2003; Gulland y Hall, 2007).

Las toxinas producidas durante los FAN son acumuladas en organismos filtradores, principalmente en moluscos bivalvos, a niveles que pueden ser letales para los seres humanos u otros consumidores. El consumo de moluscos causa síndromes de intoxicación paralítica, diarreica, neurotóxica, amnésica y por azaspirácidos (PSP, DSP, NSP, ASP y AZP, respectivamente). Asimismo, existe otra intoxicación (ciguatera) producida por ficotoxinas asociada al consumo de pescados (CFP) (Hallegraeff, 1993; Anderson, 2009).

Todos son causados por biotoxinas sintetizadas por dinoflagelados, excepto la toxina causante de ASP: ácido domoico (AD). Esta neurotoxina es producida por diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* (Hallegraeff 1993; FAO, 2005; Anderson, 2009).

La intoxicación con AD afecta a varias especies animales, incluyendo peces, aves, roedores, primates y mamíferos marinos (Costa et al., 2010), debido a que es acumulado por el zooplancton, moluscos, crustáceos, equinodermos y gusanos, que son responsables de su transferencia hacia niveles tróficos superiores (Landsberg, 2002; Doucette et al., 2006; Zabaglo et al., 2016). Es considerada uno de los síndromes principales en el Sistema de la Corriente de California (Gulland, 2000; Bargu et al., 2010). En años recientes, muchos eventos de varamientos y de mortandad de mamíferos marinos, ocurridos en las costas de California se han asociado con ASP causada por el AD producido durante FAN de *Pseudo-nitzschia* (Gulland, 2000; Bargu et al., 2010). En las costas de Baja California los eventos de varamientos de mamíferos marinos también son comunes; sin embargo, no se ha comprobado que éstos estén relacionados con una intoxicación por AD. Se sospecha que al menos dos eventos de mortandad masiva, uno en el golfo de California en 1997 y otro en las playas de Tijuana a Ensenada en 2002, pudieran estar relacionados con intoxicación por esta ficotoxina (Hernández-Becerril et al., 2007; García-Mendoza et al., 2009; Lewitus et al., 2012) Sin embargo, no se evaluó la presencia de AD en los organismos afectados en estas epizootias y ni en organismos varados en otras fechas en la región.

La falta de análisis de ficotoxinas durante varamientos o epizootias no implica que no exista la posibilidad de intoxicación por AD en Baja California. En las aguas del noroeste de México, Océano Pacífico y golfo de California, se ha detectado la presencia de especies de *Pseudo-nitzschia* potencialmente tóxicas (Hernández-Becerril et al., 2007; García-Mendoza et al., 2009; Lewitus et al., 2012). Asimismo, se ha detectado AD en material particulado (García-Mendoza et al., 2009), en moluscos bivalvos (García-Mendoza et al., 2016) y en vísceras de sardina y anchoveta colectadas en la región de la Bahía de Todos Santos (Cabrales-Talavera 2010; García-Mendoza et al., 2016). Por lo tanto, como es probable la exposición de mamíferos marinos del noroeste de México al AD, en este estudio se realizó la primera evaluación de esta toxina en diferentes tejidos de especímenes muertos y muestras biológicas de organismos vivos.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Especies de *Pseudo-nitzschia* productoras de ácido domoico

Existen 48 especies reconocidas del género *Pseudo-nitzschia*, de las cuales se han identificado a 23 como especies toxígenas (Teng et al., 2016). Los rasgos morfométricos de la diatomea se han utilizado para clasificarlas en dos grupos: el grupo *P. seriata* y el grupo *P. delicatissima* (Skov et al., 1999; Teng et al., 2016). Algunas de las especies reconocidas como productoras de AD clasificadas en el primer grupo son *P. seriata*, *P. australis*, *P. pungens*, *P. multiseriata*, y *P. fraudulenta*, mientras que *P. delicatissima* y *P. cuspidata* pertenecen al segundo (Skov et al., 1999).

Las especies de *Pseudo-nitzschia* se distribuyen en todo el mundo, tanto en aguas costeras como oceánicas, ya sea en regiones frías, templadas o subtropicales (Lelong et al., 2012; Teng et al., 2016). Este género de diatomeas se encuentra en todos los continentes; las especies productoras de AD se distribuyen globalmente, sólo en la Antártida no se han reportado. Especies como *P. australis*, *P. delicatissima*, *P. fraudulenta*, *P. multiseriata*, *P. pseudodelicatissima* y *P. pungens*, todas ellas productoras de AD, se les considera cosmopolitas (Hasle 2002; Lelong et al., 2012; Teng et al., 2016). En Washington, *P. pseudodelicatissima* y *P. cuspidata* son las principales especies responsables de FAN. En la costa de Alaska y California las especies más problemáticas son *P. australis* y *P. multiseriata* (Trainer et al., 2012). En las costas mexicanas del Pacífico se han reportado seis especies de *Pseudo-nitzschia* productoras de AD: *P. australis*, *P. brasiliana*, *P. fraudolenta*, *P. pungensis*, *P. subfraudolenta* y *P. delicatissima*; cuatro especies se han registrado en el golfo de California: *P. brasiliana*, *P. pungensis*, *P. pseudodelicatissima* y *P. subfraudolenta* (Lundholm et al., 2002; Gómez-Aguirre et al., 2004; Gárate-Lizárraga et al., 2007; García-Mendoza et al. 2009; Quijano-Scheggia et al., 2011).

La formación de FAN de *Pseudo-nitzschia* está vinculada a numerosos factores bióticos, algunos de los cuales son específicos de cada especie (Lelong et al., 2012), pero son influenciados por fenómenos meteorológicos locales, como vientos y lluvias, y pueden ser estimulados por el enriquecimiento de nutrientes provenientes de varias fuentes (Anderson et al., 2008; Trainer et al., 2012). Los FAN se forman frecuentemente en zonas de surgencias, donde las corrientes les permiten permanecer en la parte superior de la columna de agua para aprovechar la luz solar y los nutrientes procedentes del fondo, por ello la mayoría de los impactos por *Pseudo-nitzschia* han ocurrido en los sistemas de surgencias en la costa oeste de los continentes (Lelong et al., 2012; Trainer et al., 2012). En cultivo, *Pseudo-nitzschia* puede crecer

en salinidades bajas (6) hasta muy altas (48), y a temperaturas de 5 a 30°C, con un rango amplio de crecimiento óptimo (Trainer et al., 2012). La abundancia de *Pseudo-nitzschia* y las concentraciones de AD en la costa oeste de Estados Unidos se ha asociado con condiciones de baja temperatura, alta salinidad y alta concentración de nutrientes (Anderson et al., 2006; Trainer et al., 2012).

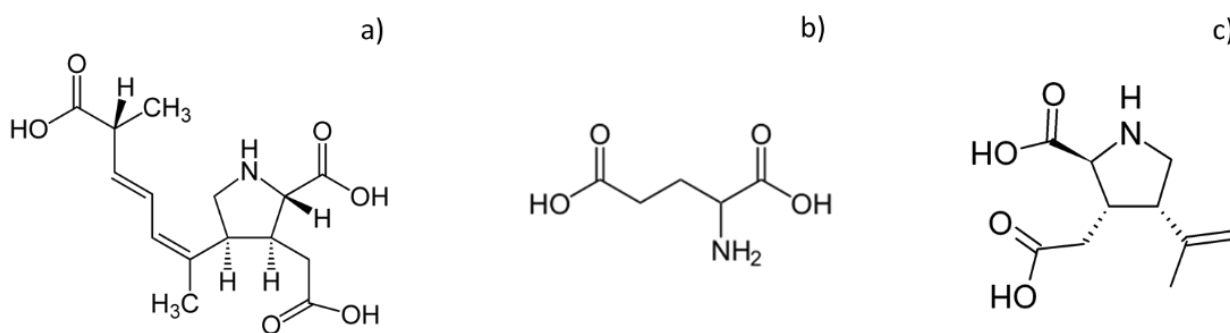
En la costa suroeste de Canadá y la noroeste de Estados Unidos, los FAN de *Pseudo-nitzschia* tienden a comenzar en primavera o verano (Lewitus et al., 2012), pero en California se han registrado FAN de *P. australis* en primavera, verano y otoño (Scholin et al., 2000; Anderson et al., 2006). En 1987 se detectó en la costa este de Canadá el primer FAN en Norteamérica que provocó problemas de salud. *P. multiseriis* fue la especie responsable de la contaminación de mejillones que causaron intoxicación en humanos (Perl et al., 1990; Howard et al., 2007). Desde entonces han registrado FAN tanto en el sureste de Canadá como en el noroeste de Estados Unidos que han afectado el comercio de varias especies de almejas, mejillones y cangrejos (Lewitus et al., 2012; Trainer et al., 2012).

En 1991 en la Bahía de Monterey, California, se comprobó la presencia de AD en anchoveta, la fuente de alimento de pelícanos y cormoranes. En este periodo algunos especímenes presentaron signos neurológicos inusuales y se registró una mortandad de más de 100 individuos (Work et al., 1993; Shumway et al., 2003; Lewitus et al., 2012). Después de este evento, se ha documentado la presencia de FAN de especies productoras de AD en el sur de la costa oeste de Norteamérica. En 1998 se presentaron intensos FAN de *P. australis* y *P. multiseriis* desde la bahía de Monterey hasta Santa Bárbara que causaron graves daños a animales marinos (Scholin et al., 2000; Anderson et al., 2006). En el Canal de Santa Bárbara se han registrado florecimientos de especies de *Pseudo-nitzschia* productoras de AD cada año desde 2002 y en Los Ángeles desde 2003 (Anderson et al., 2006; Anderson et al., 2008). En el 2006 y 2007 los FAN de *P. australis* en el sur de California se caracterizaron por presentar altas concentraciones de AD, de hasta 14.39 µg/L en 2006 y 26.97 µg/L en 2007 (Lewitus et al., 2012). En México se han documentado dos FAN de *Pseudo-nitzschia*, uno de ellos fue un florecimiento de *P. fraudulenta* en La Paz, en el golfo de California en verano de 2006 (Gárate-Lizárraga et al., 2007) y el otro ocurrió en Bahía de Todos Santos, Ensenada, en 2007, donde se detectó una abundancia de  $3.02 \times 10^5$  células/L de *P. australis* (García-Mendoza et al., 2009). Finalmente, en Alaska, *Pseudo-nitzschia* se ha detectado desde el golfo de Alaska al Mar de Bering, y en junio de 2010 alcanzó grandes abundancias en la isla St. Lawrence, pero se desconoce el impacto sobre el ecosistema (Lewitus et al., 2012).

### 1.1.2 Ácido domoico

El ácido domoico (AD) es un aminoácido cíclico con un peso molecular de 311 Da que posee tres grupos carboxilo y un grupo amino secundario (Wright et al., 1990). Es producido de forma natural por especies de algas y actúa como neurotoxina. Fue aislado por primera vez en Japón en 1958 de la macroalga *Chondria armata* (Mos, 2001; Jeffery et al., 2004) y posteriormente fue detectado en otras especies de algas rojas, todas de la familia Rhodomelaceae. En el evento de intoxicación de 1987 se atribuyó la presencia de AD a la diatomea *Pseudo-nitzschia* (Bates et al., 1998). Se han identificado varios isómeros de AD, ácidos isodomoicos A-H, en muestras marinas. Estos pueden ser productos de degradación del AD formados por exposición a radiación UV o calor pero son constituyentes menores en relación con el ácido domoico y no siempre están presentes (Wright et al., 1990; Jeffery et al., 2004).

El AD actúa como un análogo del glutamato, el neurotransmisor excitatorio más importante del sistema nervioso central. La similitud estructural del AD con el glutamato y el kainato (Figura 1) permite una alta afinidad por los receptores de ácido propanoico (AMPA) y de kainato, e interviene en la activación de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), los cuales son receptores de glutamato presentes en el sistema nervioso central y el miocardio (Pulido, 2008; Costa et al., 2010). Los enlaces formados entre el AD y los receptores de glutamato son tres veces más potentes que el ácido kaínico y hasta 100 veces más poderosos que el propio glutamato. La unión a estos receptores induce una activación prolongada de las neuronas y permite un flujo constante de calcio en estas células, lo que provoca su despolarización, además de la producción de especies reactivas de oxígeno, disfunción neurológica, daño al ADN, peroxidación de lípidos, agotamiento energético, daño mitocondrial y finalmente la muerte celular (Perl et al., 1990; Jeffery et al., 2004; Bejarano et al., 2008b; Zabaglio et al., 2016).



**Figura 1.** Estructura del ácido domoico (a), glutamato (b) y kainato (c). Adaptada de Bates et al., 1998.



El AD se une a los receptores de glutamato, los cuales no sólo se encuentran en el sistema nervioso central, sino también en el corazón, riñones, hígado, pulmón, bazo, testículos y ovarios. Aunque la función de los receptores fuera del sistema nervioso central no es clara, sugiere la posibilidad de efectos tóxicos directos del AD en los órganos en los que se encuentran (Gill y Pulido, 2001; Silvagni et al., 2005; Ramsdell y Gulland, 2014).

El AD no es fácilmente absorbido en el tracto gastrointestinal, pero durante la digestión puede ser transportado a través del torrente sanguíneo a otros tejidos y fluidos (Bargu et al. 2012). De la sangre es eliminado relativamente rápido por el aclaramiento renal. La velocidad de depuración es variable entre especies: en ratas es de 10 ml/min·kg, mientras que en monos la tasa de depuración es aproximadamente diez veces menor (Suzuki y Hierlihy 1993; Truelove e Iverson 1994). Aunque la eliminación del AD suele ser rápida, en mamíferos marinos el flujo de sangre a los riñones es restringido debido a adaptaciones fisiológicas como la vasoconstricción periférica. Esto produce una disminución en la tasa de filtración glomerular, es decir, se reduce la detoxificación de la sangre, la cual es desviada desde el hígado hacia el corazón y el cerebro (Silvagni et al., 2005; Bejarano et al., 2008b; Fire et al., 2010).

En ratas y primates no humanos la vida media del AD en sangre es de 20 y 110 min, respectivamente. En ratas, el 2% de la dosis administrada es eliminada en la orina y el resto en las heces, mientras que en primates no humanos el porcentaje es entre el 4 al 7%. Por lo tanto, la detección de AD en fluidos gástricos confirma la exposición inmediata a la biotoxina, mientras que en orina y heces revela el aclaramiento mediante el metabolismo de detoxificación (Suzuki y Hierlihy, 1993; Truelove e Iverson, 1994; Costa et al., 2010; Fire et al., 2010). La orina y las heces representan una fuente importante de muestras para el análisis de AD, ya que su disponibilidad es relativamente común en situaciones de exposición natural y por su uso potencial en el diagnóstico de intoxicación por AD en animales vivos (Tor et al., 2003).

### **1.1.3 Transferencia de ácido domoico en la trama trófica**

Durante los FAN de *Pseudo-nitzschia* el AD es acumulado por el zooplancton, moluscos, crustáceos, equinodermos y gusanos, que son responsables de su transferencia hacia niveles tróficos superiores

(Landsberg 2002; Doucette et al. 2006; Zabaglo et al. 2016). La presencia de AD extracelular en el agua no representa un gran riesgo ya que sufre foto o biodegradación y no se acumula en la columna de agua (Bejarano et al., 2008b; Zabaglo et al., 2016). Sin embargo, la adsorción de AD en el sedimento puede tener un impacto a largo plazo en la trama trófica debido a su transferencia a través de los organismos bentónicos (Burns y Ferry, 2007; Zabaglo et al., 2016).

Los vectores de AD más importantes para aves y mamíferos marinos adultos son los eufáusidos y peces como la sardina y anchoveta, en los que se acumula esta ficotoxina (Gulland, 2000; Scholin et al., 2000; Bargu et al., 2002; Shumway et al., 2003). Por otro lado, las crías de mamíferos pueden adquirir el AD desde el útero, ya que es capaz de atravesar la placenta y acumularse en el líquido amniótico, a través de la leche materna o directamente desde sus presas en la etapa de transición del destete (Lefebvre et al., 2010). La transferencia materna de AD ha sido documentada en lobos marinos en condiciones naturales y en roedores en diversos estudios de laboratorio (Doucette et al. 2004; Maucher y Ramsdell 2005; Maucher y Ramsdell 2007; Pulido, 2008; Rust et al., 2014; Lefebvre et al., 2016).

#### **1.1.4 Intoxicación por ácido domoico**

El cerebro es uno de los órganos con mayor daño por intoxicación con AD. Está protegido por la barrera hematoencefálica que impide el paso de ciertas sustancias o moléculas hacia el cerebro, pero hay regiones, como el área postrema encargada de la respuesta emética (vómito) que carecen de ella (Pulido, 2008; Costa et al., 2010). La ausencia de dicha barrera permite fácilmente la permeabilidad del AD, lo cual explica que el vómito sea la respuesta neurológica más sensible al AD en los primates (Tryphonas et al., 1990). Sin embargo, cuando las dosis de AD son altas es posible que llegue a zonas protegidas por la barrera hematoencefálica por el incremento de la permeabilidad a través de convulsiones (Ramsdell, 2007). El daño más significativo en el cerebro ocurre en el hipocampo debido a la alta densidad de receptores en las regiones CA3 y CA1, lo cual las hace más propensas a la neurodegeneración inducida por DA y conlleva al daño celular y estructural de vías comprometidas con aprendizaje y memoria espacial, entre otros (Ramsdell, 2007; Bejarano et al., 2008b)

La exposición continua al AD durante la gestación y el periodo de lactancia conduce a la acumulación de esta toxina que causa daños en el hipocampo, afecta el desarrollo e incrementa el riesgo de otros efectos a largo plazo (Doucette et al., 2004; Brodie et al., 2006; Levin et al., 2006; Pulido, 2008; Marriott et al., 2012; McHuron et al., 2013; Rust et al., 2014). En ratas de laboratorio se ha demostrado que el AD contribuye al fracaso reproductivo y que la exposición a bajas dosis en etapas tempranas de desarrollo provoca cambios conductuales y cognitivos que persisten hasta la edad adulta (Doucette et al., 2004; Pulido, 2008). El AD llega al feto a través de la sangre y posteriormente es excretado por la orina en el líquido amniótico, el cual llega al estómago del feto y regresa al torrente sanguíneo (Brodie et al., 2006; Ramsdell y Gulland 2014). La respuesta a la exposición a AD en mamíferos marinos es análoga a aquella observada en animales de laboratorio. Sin embargo, existen diferencias entre especies en el umbral de la dosis, el tiempo de respuesta posterior a la ingesta y los efectos sobre diferentes tipos de células (Ramsdell, 2007).

Los signos de intoxicación por AD en ratas son comportamiento exploratorio y rascado seguido de convulsiones, masticación, salivación, y finalmente ataxia y rigidez extrema (Truelove e Iverson, 1994). En monos la intoxicación se manifiesta inicialmente con náuseas y vómitos, posteriormente masticación, rascado, ataxia, pérdida de equilibrio, temblores y rigidez de los movimientos (Tryphonas et al., 1990). La gravedad de los signos presentados en humanos se relacionó con la dosis estimada de AD consumido (Perl et al. 1990; Todd 1993), los primeros signos se percibieron a las 5.5 horas después de ingerir los alimentos contaminados (Todd, 1993). La intoxicación se caracterizó por hiperexcitación neuronal, lo cual produce convulsiones, mioclonos (contracciones musculares repentinas), inestabilidad cardiovascular, anormalidad en la pupila y piloerección, seguida de la pérdida crónica de la función en sistemas neurales y susceptibilidad a degeneración excitotóxica. Los signos clínicos identificados en los casos más graves de ASP en humanos incluyen la confusión, muecas, hipo, falta de respuesta a estímulos dolorosos y presión sanguínea inestable o arritmias cardíacas y estado de coma. La autopsia realizada a los pacientes fallecidos reveló necrosis y pérdidas neuronales, principalmente en el hipocampo y amígdalas (Teitelbaum et al. 1990; Todd 1993).

La intoxicación amnésica por consumo de mariscos (ASP), denominada así debido a que los efectos clínicos observados incluyeron pérdida de memoria, es causada por la ingesta de AD (Jeffery et al., 2004). El primer caso registrado de ASP ocurrió en la provincia Prince Edward Island en Canadá en 1987, cuando más de 100 personas se intoxicaron y algunas de ellas murieron después de consumir mejillones contaminados con AD proveniente de la diatomea *Pseudo-nitzschia* (Bates et al., 1989; Bates et al., 1998;

Lefebvre y Robertson, 2010). Posterior a este evento, los esfuerzos de monitoreo del AD para evitar incidentes en humanos tomaron importancia y no se han registrado más intoxicaciones. Sin embargo, han ocurrido numerosos casos de intoxicación por AD en organismos marinos (Fritz et al., 1992; Work et al., 1993; Wekell et al., 1994; Lefebvre et al., 1999).

### 1.1.5 Ácido domoico en mamíferos marinos

Los florecimientos de *Pseudo-nitzschia* se han asociado a eventos de mortandad del lobo marino de California, *Zalophus californianus* (Lefebvre et al., 1999; Goldstein et al., 2008; Bargu et al., 2012), lobo fino del norte, *Callorhinus ursinus* (Lefebvre et al., 2010; Lefebvre et al., 2016), marsopa común, *Phocoena phocoena* (Lefebvre et al., 2016), delfín común, *Delphinus delphis* (Torres de la Riva et al., 2009), nutria marina, *Enhydra lutris* (Kreuder et al., 2003), ballena gris, *Eschrichtius robustus* (Torres de la Riva et al., 2009), y ballena de minke, *Balaenoptera acutorostrata* (Fire et al. 2010), entre otros.

Los eventos de varamientos y mortandades de lobos marinos de California son cada vez más frecuentes y con mayor número de individuos a lo largo de la costa central de California. Muchos de estos eventos se han asociado con FAN de *Pseudo-nitzschia* (Gulland, 2000; Goldstein et al., 2008; Bargu et al., 2010), pero el AD no fue reconocido como la causa principal de estos sucesos hasta 1998, posterior a un varamiento y mortandad masiva de aproximadamente 400 individuos que sucedió en la Bahía de Monterey, California. Estos animales presentaron los signos típicos de intoxicación por AD como desorientación, convulsiones, ataxia, comportamiento de rascado intenso y falta de respuesta en la fase posterior a las convulsiones (Gulland, 2000; Silvagni et al., 2005; Bejarano et al., 2008b). Sin embargo, las intoxicaciones no siempre se manifiestan como eventos masivos, también se han observado varamientos individuales o de pocos individuos afectados por el AD (Lewitus et al., 2012).

Aunque se ha detectado AD en la costa occidental de Baja California y el golfo de California, donde habitan respectivamente 35 y 32 especies de mamíferos marinos, la evidencia del impacto sobre ellos es anecdótica. Existen sólo dos casos reportados de mortandad masiva de mamíferos marinos en México que se sospecha fueron causados por el AD. El primero ocurrió en 1997 en el golfo de California e involucró el varamiento de 168 delfines, nueve lobos marinos de California y cuatro ballenas de aleta, pero se describió

sólo en un informe técnico oficial emitido por la SEMARNAP (1997). El segundo caso ocurrió en 2002, y se propuso que la causa del varamiento de 87 lobos marinos en las playas de Tijuana a Ensenada fue causado por la intoxicación con AD, sin embargo, no se comprobó la presencia de esta toxina en los organismos afectados (Hernández-Becerril et al., 2007; García-Mendoza et al., 2009; Lewitus et al., 2012). Se han identificado otros eventos probablemente asociados con la intoxicación por AD, ocurridos en 1995 (Sierra-Beltrán et al., 1997) y 2004 (Gallo-Reynoso et al., 2005) en el golfo de California, y en 2006, en Ensenada, Baja California. En este último se encontraron lobos marinos de California: nueve cadáveres y tres animales vivos con signos de toxicidad por AD (Lewitus et al., 2012).

#### **1.1.6 Métodos de detección y cuantificación de ácido domoico**

La presencia de AD en tejidos y fluidos de diversas especies de mamíferos marinos se ha analizado mediante las técnicas de ensayo de unión al receptor (RBA), ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) y por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Brodie et al., 2006; Fire et al., 2010; Hall y Frame, 2010). Los tejidos y fluidos que se han analizado para evaluar la presencia de AD son heces, orina, suero sanguíneo, fluidos gástricos, contenido estomacal, líquido amniótico, hígado, riñón y cerebro (Tabla 1). En el estudio realizado por Fire et al. (2009), además de heces y orina, se analizaron muestras gástricas, hígado, riñón, cerebro y otros fluidos de diversas especies en los que no se detectó AD mediante LC-MS/MS.

**Tabla 1.** Ejemplos de tejidos y fluidos analizados para evaluar la presencia de ácido domoico en mamíferos marinos.

Especie	Muestra	Concentración (ng/g o ml)	Método	Referencia		
<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Fluido gástrico	2350	LC-MS/MS	Fire et al., 2010		
	Orina	2930				
	Heces	258x10 <sup>6</sup>				
<i>Balaena mysticetus</i>	Heces	359	ELISA	Lefebvre et al., 2016		
<i>Kogia sp</i>	Orina	0.4-1.8	LC-MS/MS	Fire et al., 2009		
	Heces	12-13,566				
<i>Phoca vitulina</i>	Heces	25	ELISA	Hall y Frame, 2010		
	Heces	6				
<i>Zalophus californianus</i>	Orina materna	10-261	RBA, LC-MS	Brodie et al., 2006		
	Orina feto	<0.5-38				
	Líquido amniótico	4-34				
	Fluido gástrico fetal	0.5-15	HPLC	Bargu et al., 2010		
	Heces	1400-96800				
	Heces	9100 ± 25500				
	Heces	500 ± 800			HPLC	Bargu et al., 2012
	Heces	6100 ± 8200				
	Heces	2.5x10 <sup>6</sup> -152x10 <sup>6</sup>			HPLC	Lefebvre et al., 1999
	Heces	1x10 <sup>6</sup> -82x10 <sup>6</sup>				
	Heces	1.6x10 <sup>6</sup> -4.15x10 <sup>6</sup>				
	Orina	10000-3.72x10 <sup>4</sup>			ELISA, LC-MS/MS	Goldstein et al., 2008
	Orina	2000-1.1x10 <sup>3</sup>				
Suero	4000-20x10 <sup>4</sup>	3000				
Suero	3000					

## 1.2 Hipótesis

Dado que se han detectado florecimientos de especies de *Pseudo-nitzschia* productoras de ácido domoico tanto en aguas de la costa occidental de Baja California como del golfo de California, los mamíferos marinos que habitan en estas aguas están expuestos a la toxina. Por lo tanto, el ácido domoico se encuentra en estos organismos y existe una relación entre la temporalidad de los florecimientos y el número de organismos varados.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 General**

Evaluar la presencia de ácido domoico en mamíferos marinos de la costa occidental de Baja California y del golfo de California y la posible relación entre la frecuencia de los varamientos y la abundancia de *Pseudo-nitzschia* en la Bahía de Todos Santos.

### **1.3.2 Específicos**

Detectar la presencia y calcular la concentración de ácido domoico en diferentes tejidos y fluidos de mamíferos marinos varados en la región norte de la costa occidental de Baja California y del golfo de California entre mayo de 2016 y mayo de 2017 para vincular con el varamiento de los organismos.

Detectar la presencia de ácido domoico en heces de especímenes vivos del lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus townsendi*) y suero de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) colectadas en verano y otoño de 2016 para identificar la exposición a la toxina.

Analizar la relación entre la abundancia de *Pseudo-nitzschia* y la frecuencia de los varamientos de mamíferos marinos en la Bahía de Todos Santos, Baja California.

## 2. Metodología

### 2.1 Colecta de muestras

#### 2.1.1 Colecta de muestras de animales varados

La colecta de muestras de tejidos y fluidos de animales varados se realizó oportunísticamente entre mayo de 2016 y mayo de 2017. Se colectaron muestras de seis animales varados de cuatro especies en San Felipe, golfo de California, y de cinco animales de cuatro especies en playas de Tijuana y de la Bahía de Todos Santos, costa occidental de Baja California (Tabla 2, Figura 2). Las muestras se obtuvieron de cadáveres relativamente frescos y con poco *rigor mortis* (cadáveres Código 2, Geraci y Lounsbury 1993), se almacenaron individualmente en bolsas con cierre hermético y se congelaron hasta su análisis en el laboratorio de FICOTOX del CICESE.



**Figura 2.** Sitios de muestreo y especies de animales varados. Pd= *Phocoenoides dalli*, Zc= *Zalophus californianus*, Dc= *Delphinus capensis*, Dd= *Delphinus delphis*, Gm= *Globicephala macrochorynchus*, Be= *Balaenoptera edeni*, Ps= *Phocoena sinus*.



**Tabla 2.** Colecta de muestras de mamíferos marinos varados, mayo 2016-mayo 2017. ID = código del individuo; Región: GC = golfo de California, COBC = costa occidental de Baja California; Localidad: SF= San Felipe, PT= Playas de Tijuana, BTS= Bahía de Todos Santos; Tipo de muestra: H = hígado, R = riñón, C = cerebro, O = ojo, CE = contenido estomacal, F = heces.

Especie	ID	Región	Localidad	Fecha	Tipo de muestra
Calderón tropical	Gm1	GC	SF	14/05/2016	H, R
<i>(Globicephala macrorhynchus)</i>	Gm2	GC	SF	14/05/2016	H, R
Rorcual tropical	Be1	GC	SF	21/01/2017	F
<i>(Balaenoptera edeni)</i>	Be2	GC	SF	04/02/2017	F
Vaquita	Ps1	GC	SF	12/03/2017	F
<i>(Phocoena sinus)</i>					
Delfín común de rostro corto	Dd1	GC	SF	13/02/2017	H, R, C, CE
<i>(Delphinus delphis delphis)</i>	Dd2	COBC	BTS	03/05/2017	H, R, CE
Marsopa de Dall	Pd1	COBC	PT	17/08/2016	H, R, O, CE
<i>(Phocoenoides dalli)</i>					
Lobo marino de California	Zc1	COBC	BTS	03/11/2016	H, R, C, O
<i>(Zalophus californianus)</i>	Zc2	COBC	BTS	20/03/2017	H, R
Delfín común de rostro largo	Dc1	COBC	BTS	20/04/2017	H, R
<i>(Delphinus capensis)</i>					

### 2.1.2 Colecta de muestras de animales vivos

Entre el 14 y 26 de octubre de 2016 se colectaron 37 heces frescas de lobo fino de Guadalupe (*Arctocephalus townsendi*) en la Isla Guadalupe (Figura 3). Las heces fueron recogidas con ayuda de una cuchara y se colocaron en bolsas plásticas con cierre hermético. Durante la colecta se mantuvieron con bolsas de gel refrigerante hasta su almacenamiento a 4°C a bordo del velero Martin Sheen de la Sea Sheperd Conservation Society, y a -20 °C en el Laboratorio de Biología Algal en el CICESE desde el desembarque hasta su análisis.

Se obtuvieron 33 muestras de suero de hembras adultas de lobo marino de California (*Zalophus californianus*) colectadas en 12 colonias del golfo de California en julio de 2016 (Tabla 3, Figura 3). Estas muestras fueron proporcionadas por la Dra. Karina Acevedo Whitehouse (Universidad Autónoma de Querétaro) y se mantuvieron congeladas hasta su análisis.

**Tabla 3.** Relación de muestras de suero de hembras adultas de lobo marino de California colectadas en las colonias del golfo de California (Figura 3) en julio de 2016.

Región	Colonia	Numero de muestras
Golfo norte	Rocas Consag	4
	San Jorge	3
	El Coloradito	3
Ángel de la Guarda	Granito	3
	Los Cantiles	3
	Los Machos	3
	El Partido	3
Golfo centro	San Esteban	3
	San Pedro Nolasco	1
	San Pedro Mártir	1
	El Rasito	3
Golfo sur	Los Islotes	3
TOTAL		33



**Figura 3.** Localización de Isla Guadalupe (IG) y las colonias muestreadas de lobo marino de California en el golfo de California. 1. Rocas Consag, 2. Isla San Jorge, 3. El Coloradito, 4. Isla Granito, 5. Los Cantiles, 6. Los Machos, 7. El Partido, 8. El Rasito, 9. San Esteban, 10. San Pedro Mártir, 11. San Pedro Nolasco, 12. Los Islotes.

## 2.2 Análisis en laboratorio

### 2.2.1 Extracción de ácido domoico de tejidos, heces y contenido estomacal

Una vez descongelados los tejidos, heces y contenido estomacal a temperatura ambiente, se pesó 1 g de heces (o lo que se tenía disponible si era menos) o 4 g de tejido o contenido estomacal en tubos para centrífuga de 50 ml. Se añadió a la muestra metanol al 50% en agua en una proporción 1:5 y se homogeneizó durante 3 minutos con vórtex (heces) o con un homogeneizador (tejidos y contenido estomacal). Posteriormente se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró mediante jeringas de vidrio con un filtro de membrana PTFE con un tamaño de poro de 0.2 µm (Frame y Lefebvre, 2013). Se colectaron al menos 500 µl del extracto filtrado en un vial ámbar para automuestreador previamente etiquetado y el resto se almacenó a 4 °C en microtubos.

### 2.2.2 Extracción de ácido domoico de suero

Para el análisis mediante ELISA se tomaron 60 µl de suero previamente descongelado a temperatura ambiente y se añadieron 240 µl de solución de extracción (proporción 1:5). Se mezclaron con vórtex y se sonicaron con un sonicador Qsonica 125 (Qsonica sonicators, Newtown, CT) a una amplitud del 50%, durante 45 s en 5 pulsos. Posteriormente se centrifugaron a 10 000 x g durante 20 minutos a 4 °C. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.45 µm y se almacenó a 4 °C hasta su análisis (Frame y Lefebvre, 2013).

En el caso del análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) se tomaron directamente 500 µl de suero y se añadió una parte de agua y 10 µl de ácido fosfórico. El extracto se homogeneizó con vórtex y se pasó por la columna de extracción de fase sólida Supelclean™ LC-18 previamente hidratada. El cartucho se lavó con 3 ml de metanol y 3 ml de agua, se pasó la muestra a través de la columna y se lavó con 2 ml de metanol al 5% en agua para eliminar interferencias. El ácido domoico se eluyó de la columna con 4 ml de metanol al 50% en agua en un vial de vidrio. El eluyente se filtró a través de un filtro de membrana PTFE con un tamaño de poro de 0.2 µm (Tor et al., 2003).

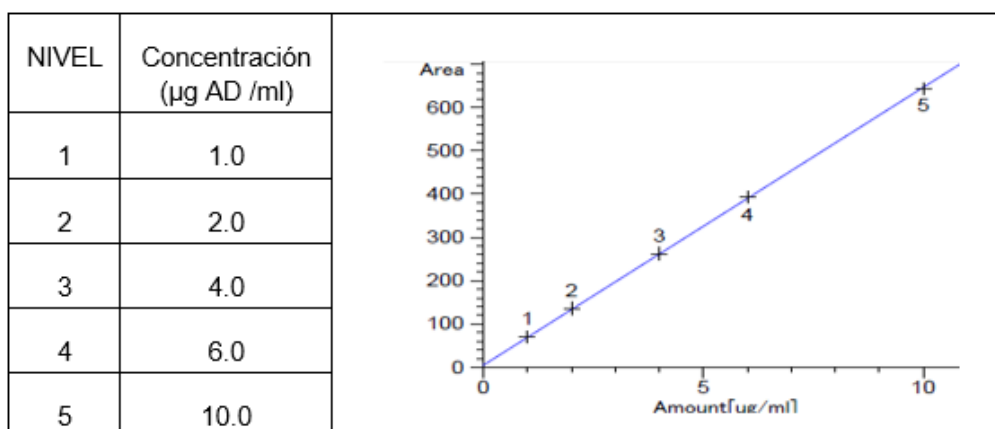
### 2.2.3 Cuantificación de ácido domoico

Se emplearon tres métodos para la detección y cuantificación del ácido domoico: cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Las muestras de tejidos y heces detectadas como positivas por HPLC se analizaron por ELISA, y las muestras positivas en este segundo análisis se evaluaron por LC-MS/MS. Las muestras de suero se analizaron por ELISA y las detectadas como positivas por LC-MS/MS.

#### 2.2.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

El extracto de tejidos, heces y contenido estomacal se analizó mediante HPLC con un detector de arreglo de diodos (DAD). El AD se detectó a 242 nm con un ancho de banda (slit) de 4 nm. Con las condiciones empleadas el AD tiene un tiempo de retención cercano a los 12 min. Para el análisis se utilizó una columna ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical (4.6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de poro; Santa Clara, CA). La temperatura de la columna fue de 40° C y el flujo (isocrático) de la fase móvil (10% acetonitrilo en agua) de 1.5 ml/min por 17 min. La temperatura del automuestreador se mantuvo en 5°C. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µl. Algunas de las muestras se analizaron nuevamente con las mismas condiciones, pero la lectura se realizó a 242 y adicionalmente a 280 nm para descartar la concentración de un compuesto interferente con mayor absorbancia a esta longitud de onda (Lefebvre et al., 1999). Se hizo una corrección restando el área de los compuestos en el tiempo de retención del AD: al área detectada a 280 nm se le restó el área calculada a 242 nm. Con esta corrección se calculó la concentración de AD del extracto y finalmente la concentración de AD por gramo de muestra. Se obtuvo la relación entre el área de ambas longitudes de onda (280/242) y se consideraron como probables positivas a aquellas muestras en las cuales la relación fue  $\leq$  al promedio de todas las muestras analizadas por HPLC (2.08), debido a que el AD no absorbe a 280 nm y aumenta el área a 242 nm, por lo tanto la relación es menor.

Para el cálculo de la concentración de AD en las muestras, se realizó una curva de calibración con un estándar comercial (Sigma-Aldrich, Co.) con una concentración de 832 µg/ml AD. Se preparó una dilución de 100 µg/ml a partir del cual se prepararon diluciones para obtener 5 concentraciones que se muestran en la Figura 4. Se obtuvo la curva con una  $R^2 = 0.9999$ .



**Figura 4.** Curva de calibración de AD para el análisis en HPLC.

### 2.2.3.2 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Todas las muestras de suero y algunas de tejidos y fluidos se analizaron mediante un kit de ELISA para la determinación cuantitativa de ácido domoico (Biosense® Laboratories, Bergen, NO). La placa se empapó con 300 µl de buffer de lavado (PBS-T; Buffer fosfato salino-tween 20) en cada pocillo. Una vez transcurridos 10 min se desechó el buffer y se secó con papel absorbente. Se añadieron 50 µl de buffer de estándar a los pocillos Amax y Blanco y 50 µl de buffer de anticuerpo-HRP de ovoalbúmina (1% de ovoalbúmina en PBS-T) al Blanco.

La curva de calibración se realizó desde una concentración de 10 000 pg de ácido domoico/ml hasta 0.16 pg de ácido domoico/ml. Se cargaron en la placa 50 µl de las diluciones estándar por duplicado. Posteriormente se colocaron en el resto de los pocillos 50 µl de muestra de los extractos diluidos en buffer de muestra (metanol al 10% en PBS-T) de acuerdo a lo sugerido por Lefebvre et al. (2010) y Frame y Lefebvre (2013): suero 1:10, contenido estomacal 1:50, heces y tejidos 1:100. Por último se añadieron 50 µl del conjugado anti-AD-HRP a todos los pocillos excepto al blanco y se incubó 1 hora a temperatura ambiente protegido de la luz. Para la lectura de la placa se desechó el contenido y se lavó cuatro veces con buffer de lavado. Se añadieron 100 µl de sustrato de peroxidasa TMB y se incubó 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 0.3 M. Después de 3 min la placa se leyó a 450 nm en un espectrofotómetro Multiscan™ Go (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se utilizó el modelo de ajuste de curva logística no lineal de cuatro parámetros para obtener la cuantificación de AD

en las muestras a partir de la absorbancia siguiendo las instrucciones de la hoja de cálculo proporcionada por el fabricante.

### **2.2.3.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)**

Las muestras de suero y tejidos con contenido probable de AD se analizaron mediante LC-MS/MS. Estas muestras pasaron por una limpieza adicional a través de cartuchos de extracción de fase sólida Supelclean™ LC-18 (500 mg, 3 ml, Supelco, Bellefonte, PA), como se menciona en la sección 2.2.2, con la diferencia de que para el análisis de muestras de tejido se empleó 1 ml del extracto previamente realizado, adicionado con 10  $\mu$ l de ácido fosfórico. Se realizó un ensayo de recuperación de AD al utilizar este paso de limpieza. Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como matriz adicionada con 20 ng de AD/ml y se obtuvo una recuperación del  $76\% \pm 3.6$  (desviación estándar,  $n=4$ ). Se llevó a cabo el mismo procedimiento de limpieza para el análisis de las muestras y se realizó una corrección de la concentración de acuerdo al ensayo de recuperación.

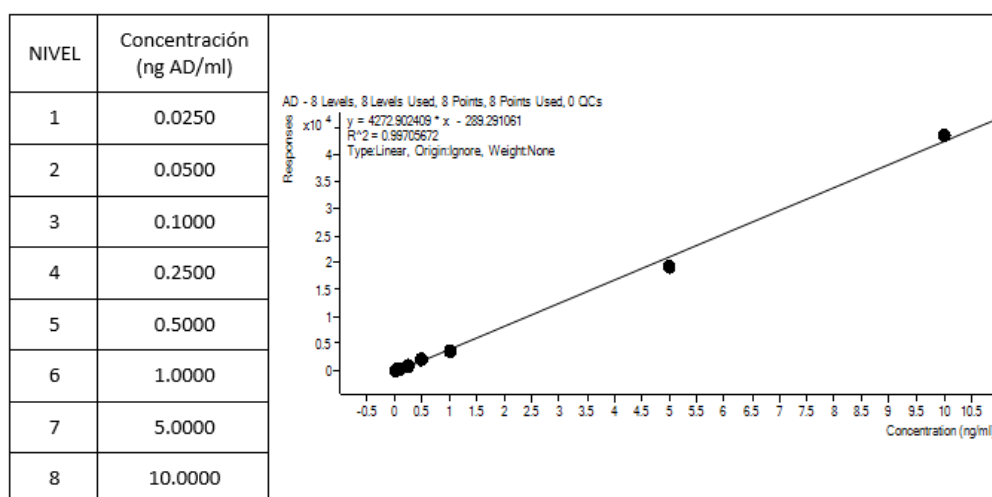
El análisis por LC-MS/MS se realizó utilizando un espectrómetro de masas Agilent 6470 con triple cuadrupolo con fuente de ionización electrospray que utiliza nitrógeno como gas de nebulización. Las condiciones del equipo necesarias para la separación se describen en la Tabla 4 (Mafra et al., 2009; Braña et al., 2014).

La detección del AD se realizó mediante un monitoreo de reacciones múltiples o MRM (Multi Reaction Monitoring) con fuente de ionización en modo positivo. La transición del ion precursor 312.1 m/z al ion producto 266.1 m/z se utilizó como cuantificación y la transición de 312.1 m/z a 161.1 m/z se empleó como referencia. El AD se detectó en el minuto 3.7 y la concentración se calculó con la suma de las áreas de ambos iones.

La curva de calibración se realizó utilizando un estándar comercial (Sigma-Aldrich, Co.) con una concentración de 832  $\mu$ g/ml AD, a partir del cual se prepararon diluciones para obtener 8 concentraciones que se muestran en la Figura 5. Se obtuvo una curva con una  $R^2=0.997$

**Tabla 4.** Condiciones del LC-MS/MS para la detección de ácido domoico.

Parámetro	Condición										
Volumen de inyección	20 µl										
Flujo	0.25 ml/min										
Columna analítica	ZORBAX Eclipse Plus C18 Resolución rápida HD (2.1x 100 mm 1.8µm)										
Temperatura de la columna	45°C										
Tiempo de corrida	8 minutos										
Gradiente	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 min</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>4 min</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>7.3 min</td> <td>35</td> </tr> <tr> <td>8 min</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo	%B	0 min	10	4 min	35	7.3 min	35	8 min	10
Tiempo	%B										
0 min	10										
4 min	35										
7.3 min	35										
8 min	10										
Fase móvil	Fase móvil A: Agua +Ac. Fórmico (0.2%) Fase móvil B: Acetonitrilo + Ac. Fórmico (0.2%)										
Temperatura del gas	300°C										
Flujo del gas	5 l/min										
Nebulizador	45 psi										
Temperatura del gas en cortina	250 °C										
Flujo del gas en cortina	11 l/min										
Capilaridad (+/-)	3500/3500										
Voltaje de inyector (+/-)	500/500										

**Figura 5.** Curva de calibración de AD para el análisis en LC-MS/MS.



### 2.3 Asociación de abundancia de *Pseudo-nitzschia* y varamientos de mamíferos marinos

Se usaron las bases de datos del monitoreo en la Bahía de Todos Santos, Baja California, de *P. australis* (periodo 2010-2015) y de varamientos (periodo 1998-2016), y del monitoreo de *Pseudo-nitzschia* en San Diego, California (periodo 2010-2015). La primera base de datos fue proporcionada por el laboratorio de FICOTOX de CICESE, la segunda por el grupo de Investigación y Conservación de Mamíferos Marinos de Ensenada, A.C. (ICMME), y la tercera se obtuvo de SCCOOS (2017).

En otros estudios, los datos de series de tiempo de *Pseudo-nitzschia* y varamientos de mamíferos marinos se han promediado quincenal o mensualmente (Torres de la Riva et al., 2009; Bargu et al., 2012). Por el tipo de información con la que se cuenta para la región, con una alta variación de las concentraciones de *Pseudo-nitzschia* entre un registro y otro, se decidió utilizar la información semanalmente (*i. e.*, la menor frecuencia de muestreo) para evitar una subestimación de la presencia de la diatomea.

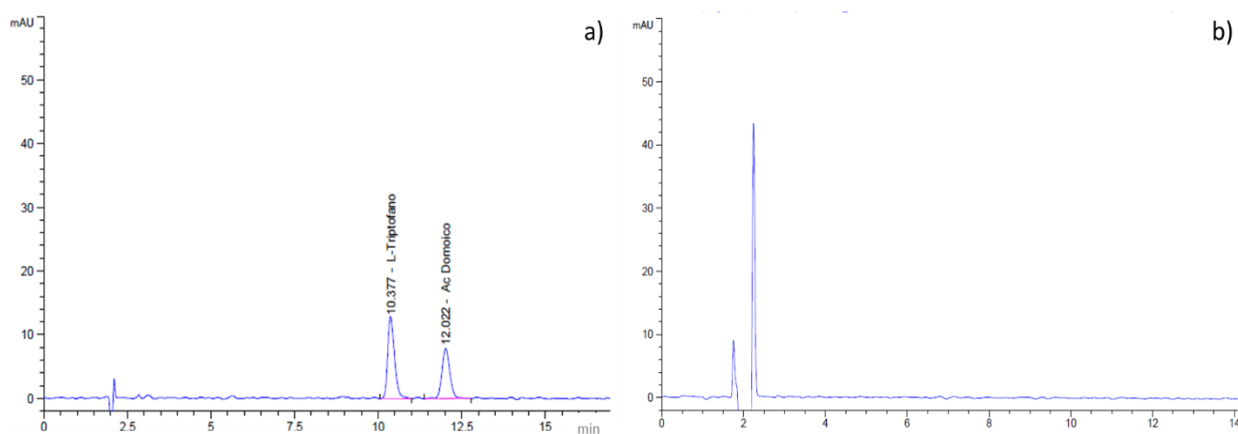
La base de datos de ICMME se depuró descartando aquellos varamientos en los que, de acuerdo a la descripción de las condiciones reportadas, se supuso una causa no natural de muerte (e. g., animales con heridas por arma de fuego o enmallados). Para el análisis también se excluyeron los registros por aviso del público y se utilizaron únicamente los registros obtenidos durante los recorridos realizados por los miembros de ICMME en las playas del área de estudio; es decir, los registros de animales varados por unidad de esfuerzo medido en días de recorrido por semana. El esfuerzo entre estaciones y entre años se comparó utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Esta base también se ordenó semanalmente para la evaluación de la asociación con la abundancia de *Pseudo-nitzschia*.

### 3. Resultados

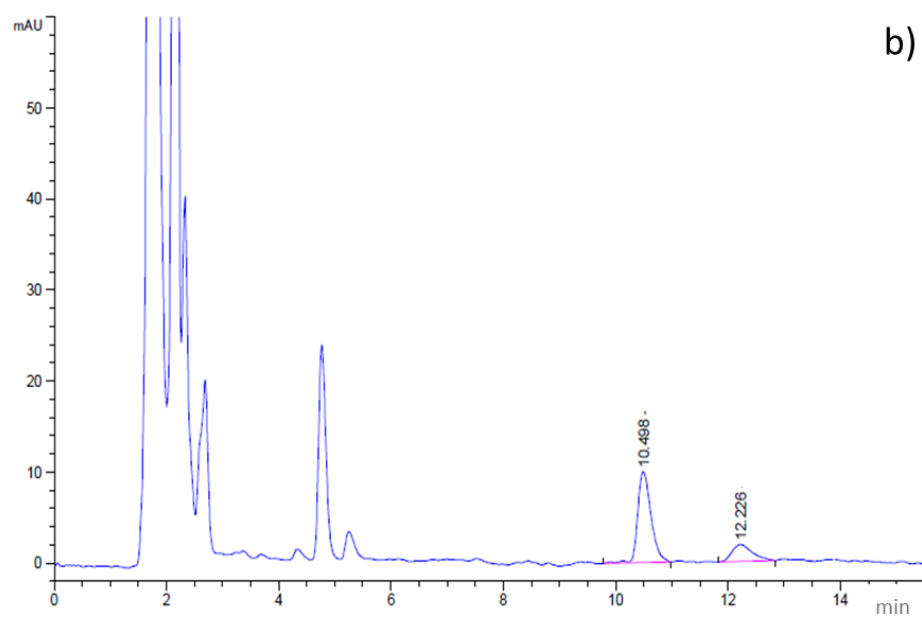
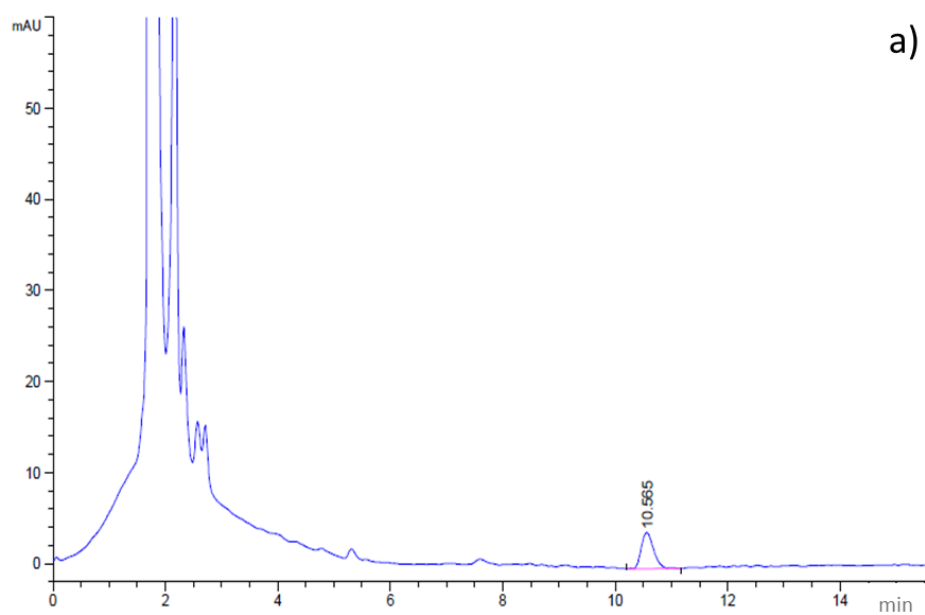
#### 3.1 Análisis de ácido domoico en muestras de mamíferos marinos

##### 3.1.1 Detección y cuantificación de AD en muestras de animales varados

Se analizaron mediante HPLC 19 de las 26 muestras de tejidos y fluidos de mamíferos marinos varados (Tabla 5). El cromatograma, a una longitud de detección de 242 nm de 13 muestras, presentó un pico en el tiempo de retención correspondiente a AD. En la Figura 6a se muestra la separación de la señal de triptófano y del estándar de AD, y en la Figura 6b el cromatograma del blanco de extracción para el análisis por HPLC. En la Figura 7a se presenta el cromatograma de una muestra de cerebro de *D. delphis* que no presenta señal en el tiempo de retención del AD, y en Figura 7b una muestra positiva de hígado del mismo organismo, que presenta un pico en el tiempo de retención de 12.2 min, el cual coincide con el tiempo de retención del AD. Nueve muestras con señal en el tiempo de retención de AD se analizaron a 280 nm (Anexo 1). De éstas, tres se consideraron como probables positivas por no mantener la relación entre la absorbancia a 280 y 242 nm (Tabla 5).



**Figura 6.** Separación de la señal de triptófano y del estándar de AD (a) y cromatograma del blanco de extracción (b) para el análisis por HPLC.

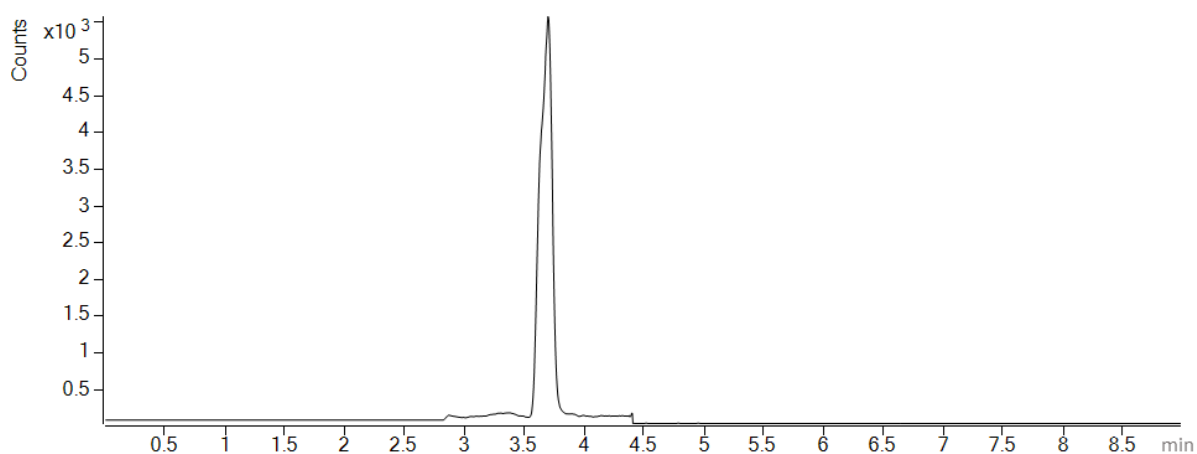


**Figura 7.** Cromatograma de muestras de (a) Cerebro: negativo a AD, (b) hígado: positivo de *Delphinus delphis* analizadas mediante HPLC.

**Tabla 5.** Concentración de ácido domoico (ng/g o ml de muestra) en animales varados detectado por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). ID = individuo, nd = no detectado, na = no analizado. *Globicephala macrorhynchus*, *Balaenoptera edeni*, *Phocoena sinus*, *Delphinus delphis*, *Phocoenoides dalli*, *Zalophus californianus*, *Delphinus capensis*.

Especie	ID	Muestra	HPLC	HPLC	ELISA	LC-MS/MS
			Sin corregir	Corregido		
<i>G. macrorhynchus</i>	Gm1	Hígado	2 791	na	na	na
		Riñón	1 329	na	na	na
<i>G. macrorhynchus</i>	Gm2	Hígado	775	na	na	na
		Riñón	1 721	na	na	na
<i>B. edeni</i>	Be1	Heces	510	nd	na	na
<i>B. edeni</i>	Be2	Heces	nd	na	na	na
<i>P. sinus</i>	Ps1	Heces	2 530	nd	nd	nd
<i>D. delphis</i>	Dd1	Hígado	3 593	2 034	nd	nd
		Riñón	Nd	na	na	nd
		Cerebro	Nd	na	na	na
		C. estomacal	4 133	3 968	na	nd
<i>P. dalli</i>	Pd1	Hígado	3 460	1 324	na	nd
		Riñón	2 032	1 709	na	nd
		Ojo	710	nd	na	na
		C. estomacal	14 225	na	nd	nd
<i>Z. californianus</i>	Zc1	Hígado	1 776	1 564	nd	nd
		Riñón	1 001	947	nd	nd
		Cerebro	nd	na	na	na
		Ojo	nd	na	na	na
<i>Z. californianus</i>	Zc2	Hígado	na	na	nd	nd
		Riñón	na	na	nd	nd
<i>D. capensis</i>	Dc1	Hígado	na	na	19.7	10.3
		Riñón	na	na	77.2	43.8
<i>D. delphis</i>	Dd2	Hígado	na	na	2.5	1.5
		Riñón	na	na	10.5	2.3
		Cerebro	na	na	na	na
		C. estomacal	na	na	nd	nd

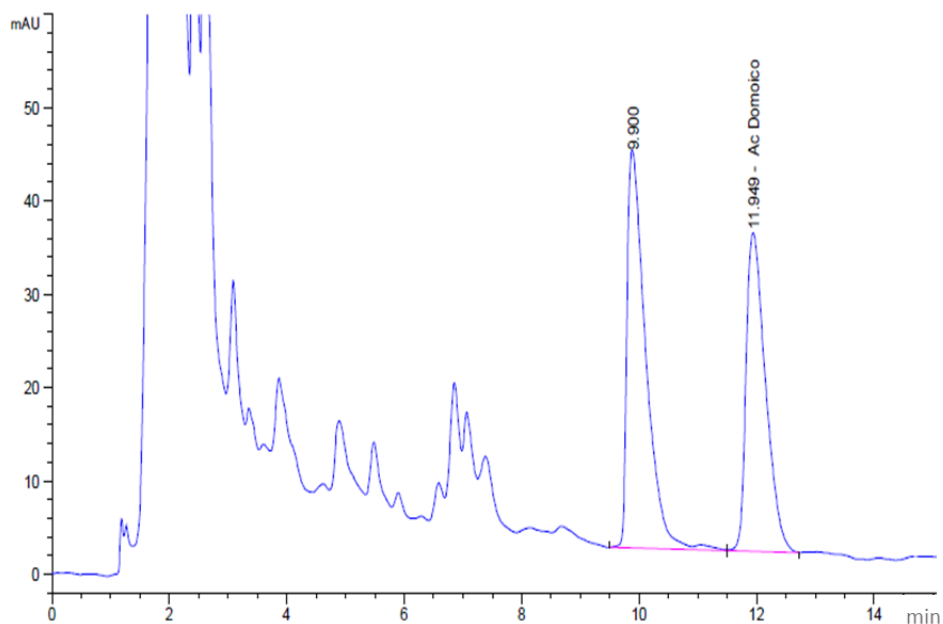
Doce muestras se analizaron por ELISA, de las cuales cuatro fueron positivas (Tabla 5). Por último, 15 muestras fueron analizadas mediante LC-MS/MS, y se confirmó la presencia de AD únicamente en las muestras de hígado y riñón de *D. capensis* (Dc1), e hígado y riñón de *D. delphis* (Dd2; Tabla 5). En la Figura 8 se muestra el cromatograma en LC-MS/MS del riñón de Dc1, donde se aprecia la señal en el tiempo de retención de AD. La relación de abundancia de los iones de cuantificación y de identificación en un mismo tiempo de retención (3.7 min) fue de 14.4 en el estándar y se mantuvo en las muestras que se consideraron positivas, lo que confirma la presencia del AD.



**Figura 8.** Cromatograma de muestra de riñón de *Delphinus capensis* con ácido domoico analizada por LC-MS/MS.

### 3.1.2 Detección y cuantificación de AD en heces de lobo fino de Guadalupe

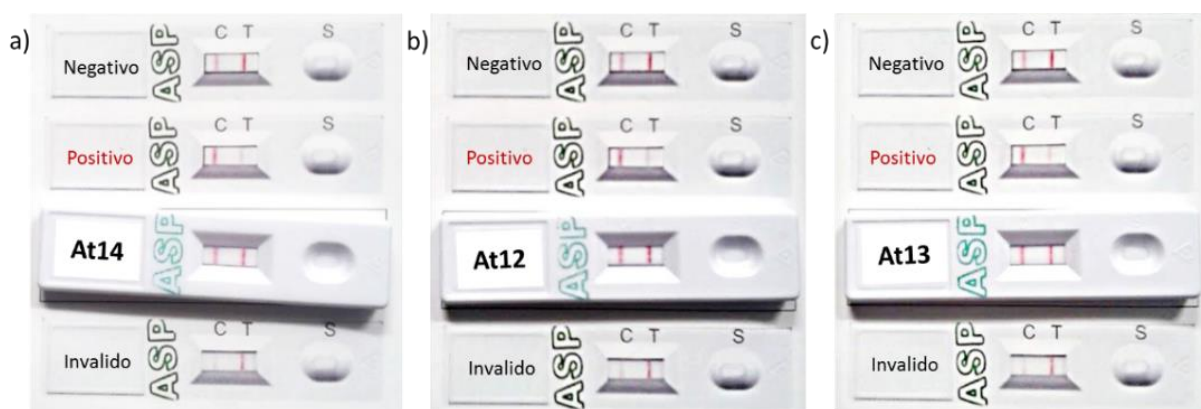
En los cromatogramas del análisis en HPLC de las 37 muestras analizadas a 242 nm se observó un pico en el tiempo de retención que corresponde al AD, lo cual indicó que probablemente contenían la ficotoxina en concentraciones altas (Figura 9). Las concentraciones variaron entre 1 887-60 000 ng de AD/g de muestra (Tabla 6).



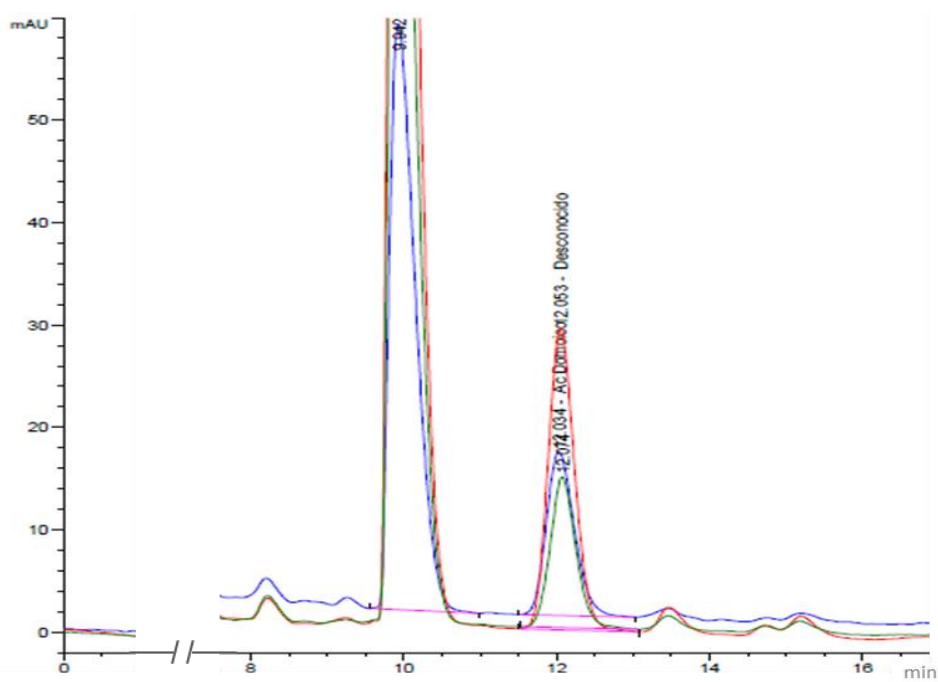
**Figura 9.** Cromatograma de muestra de heces de lobo fino de Guadalupe con señal en el tiempo de retención de ácido domoico.

Se realizó una prueba rápida con tiras cualitativas ASP test strip (Scotia Rapid Testing, Chester Basin, NS, CA) en tres muestras presuntamente positivas con concentraciones de AD por debajo (muestra 14), cerca (muestra 12) y superior (muestra 13) al límite de detección de la prueba (10 000 ng de AD/g). El resultado fue negativo para la presencia de AD en estas muestras (Figura 10).

En 10 muestras se realizaron lecturas a 280 nm (Tabla 6, Figura 11), que incluyeron las concentraciones mínimas y máximas obtenidas en HPLC a 242 nm. Cuatro muestras se consideraron como probables positivas por no mantener la relación entre la absorbancia a 280 y 242 nm, y se reservaron para la posterior confirmación de contenido de AD por ELISA. No se detectó la toxina por este método. Finalmente, dos muestras se analizaron por LC-MS/MS y de igual manera no se detectó AD en este análisis (Tabla 6, Anexo 2).



**Figura 10.** Resultados negativos de la prueba rápida de ASP de tres muestras de heces de lobo fino de Guadalupe. C=control, T= prueba (test), S= ubicación de la muestra.



**Figura 11.** Cromatograma de una muestra de heces de lobo fino de Guadalupe con señal en el tiempo de retención de AD, con mayor absorbancia a 280 nm (línea roja) y menor a 242 nm (línea azul) analizada mediante HPLC.

**Tabla 6.** Concentración de ácido domoico (ng/g de muestra) en heces de lobo fino de Guadalupe por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). na = no analizado, nd = no detectado.

No. de muestra	HPLC	HPLC	ELISA	LC-MS/MS
	Sin corregir	Corregido		
1	41 202	na	na	na
2	1 887	nd	na	na
3	31 680	8 914	nd	nd
4	21 655	320	nd	nd
5	37 758	nd	na	na
6	20 294	na	na	na
7	28 813	nd	na	na
8	4 209	1 776	na	na
9	33 071	nd	na	na
10	24 349	na	na	na
11	4 543	nd	nd	na
12	13 985	6 758	nd	na
13	60 000	nd	na	na
14	6 340	na	na	na
15	6 995	na	na	na
16	21 637	na	na	na
17	6 432	na	na	na
18	6 514	na	na	na
19	10 574	na	na	na
20	14 719	na	na	na
21	4 220	na	na	na
22	8 442	na	na	na
23	5 012	na	na	na
24	12 957	na	na	na
25	9 342	na	na	na
26	15 226	na	na	na
27	18 303	na	na	na
28	6 812	na	na	na
29	7 058	na	na	na
30	11 908	na	na	na
31	8 703	na	na	na
32	8 883	na	na	na



**Tabla 6.** Continuación

No. de muestra	HPLC	HPLC	ELISA	LC-MS/MS
	Sin corregir	Corregido		
33	10 000	na	na	na
34	13 175	na	na	na
35	7 701	na	na	na
36	4 038	na	na	na
37	6 412	na	na	na

### 3.1.3 Detección y cuantificación de AD en suero de lobo marino de California

Ocho de las 33 muestras analizadas con la prueba de ELISA fueron positivas y una se consideró como sospechosa (Tabla 7). Cuatro muestras (tres positivas y una sospechosa) fueron de la región del golfo norte, tres de la región de Ángel de la Guarda y dos del golfo sur. Cinco muestras fueron analizadas mediante LC-MS/MS. En ninguna se confirmó la presencia de AD (Tabla 7).

**Tabla 7.** Concentración de ácido domoico (ng/ml de muestra) en suero de hembras adultas de lobo marino de California por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). nd = no detectado, na = no analizado, ++++ = muestra sospechosa.

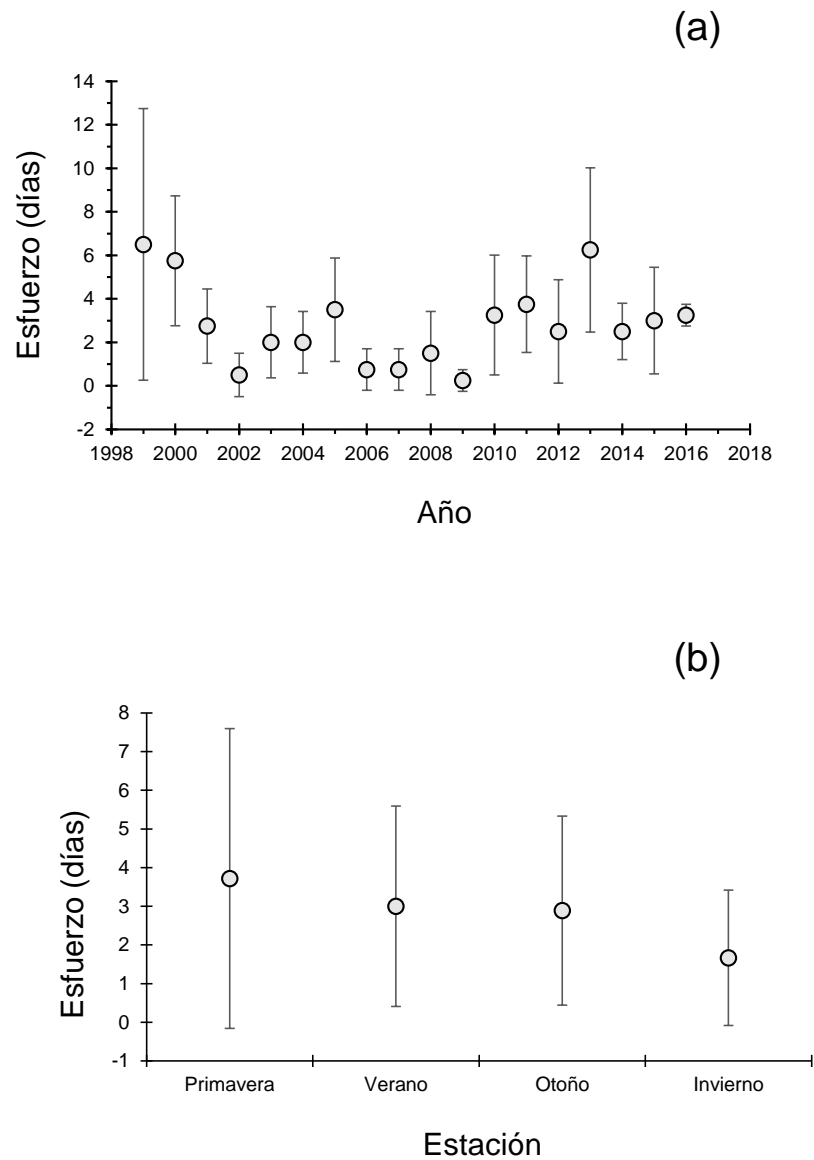
Región	Colonia	No. de muestra	ELISA	LC-MS/MS	
Golfo norte	Roca Consag	Zc3	nd		
	Roca Consag	Zc4	nd		
	Roca Consag	Zc5	nd		
	Roca Consag	Zc6	nd		
	San Jorge	Zc7	nd	nd	
	San Jorge	Zc8	++++	nd	
	San Jorge	Zc9	nd		
	Coloradito	Zc10	0.86		
	Coloradito	Zc11	0.95		
	Coloradito	Zc12	0.52		
	Ángel de la Guarda	Granito	Zc13	0.01	
		Granito	Zc14	nd	
Granito		Zc15	nd		
Cantiles		Zc16	nd		
Cantiles		Zc17	nd		
Cantiles		Zc18	nd		
Machos		Zc19	nd		
Machos		Zc20	nd		
Machos		Zc21	nd		
Partido		Zc22	1.20	nd	
Partido		Zc23	2.39	nd	
Golfo centro	Partido	Zc24	nd		
	San Esteban	Zc25	nd		
	San Esteban	Zc26	nd		
	San Esteban	Zc27	nd		
	San Pedro Nolasco	Zc28	nd		
	San Pedro Mártir	Zc29	nd		
	Rasito	Zc30	nd		
	Rasito	Zc31	nd		
Golfo sur	Rasito	Zc32	nd		
	Islotes	Zc33	nd		
	Islotes	Zc34	4.42	nd	
	Islotes	Zc35	0.06		

### 3.2 Abundancia de *Pseudo-nitzschia* y varamientos de mamíferos marinos

La base de datos de varamientos de ICMME incluye el registro de 384 mamíferos marinos varados muertos por causas aparentemente naturales para el periodo 1998 a 2016: 144 obtenidos a partir de avisos del público y 239 provenientes de 203 días de esfuerzo realizado en el mismo periodo. Se registraron varamientos de 15 especies o géneros, e individuos no identificados, agrupados como misticetos, odontocetos y pinnípedos (Tabla 8). *Z. californianus* es la especie con más registros de varamientos (69%), seguida de *P. vitulina* (9%). En 1998 no se realizó esfuerzo de búsqueda, por lo que este año se eliminó en los análisis posteriores. El esfuerzo promedio anual para el periodo 1999-2016 fue de  $11.28 \pm 7.48$  días, pero no fue constante entre años:  $H(17, n = 72) = 29.16, p = 0.03$  (Figura 12a). Al comparar entre estaciones, aunque el esfuerzo en invierno fue menor, no se encontraron diferencias significativas:  $H(3, n = 72) = 3.78, p = 0.29$  (Figura 12).

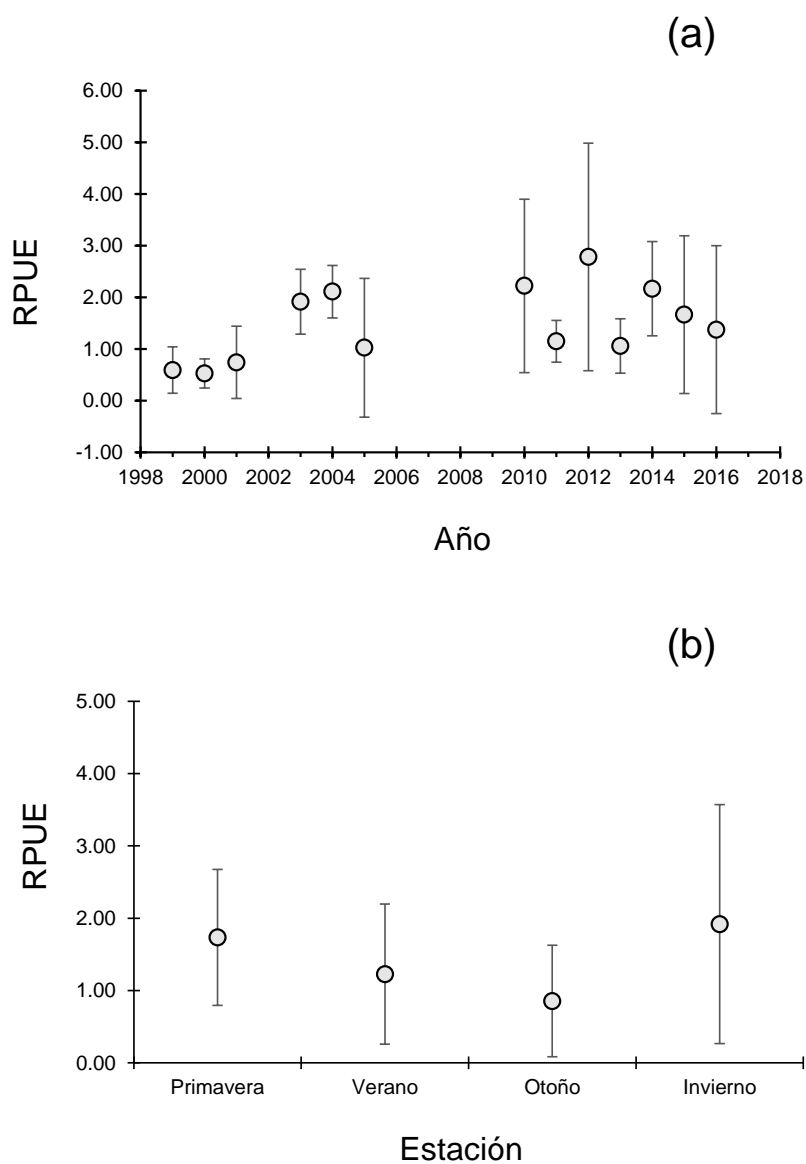
**Tabla 8.** Registro de especies de mamíferos marinos varados en la Bahía de Todos Santos de 1998-2016.

Familia	Especie	# individuos
Balaenopteridae	<i>Balaenoptera musculus</i>	4
	<i>Balaenoptera</i> sp.	2
	<i>Megaptera novaeangliae</i>	1
Eschrichtiidae	<i>Eschrichtius robustus</i>	7
	Misticeto no identificado	1
Physeteridae	<i>Kogia</i> sp.	1
Ziphiidae	<i>Mesoplodon carlhubbsi</i>	1
Phocoenidae	<i>Phocoenoides dalli</i>	1
Delphinidae	<i>Globicephala macrorhynchus</i>	1
	<i>Grampus griseus</i>	1
	<i>Delphinus capensis</i>	2
	<i>Delphinus delphis</i>	8
	<i>Delphinus</i> sp.	19
	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	1
	<i>Steno bredanensis</i>	1
	<i>Tursiops truncatus</i>	11
	Odontoceto no identificado	12
	Phocidae	<i>Phoca vitulina</i>
<i>Mirounga angustirostris</i>		8
Otariidae	<i>Zalophus californianus</i>	263
	Pinnípedo no identificado	4
TOTAL		383



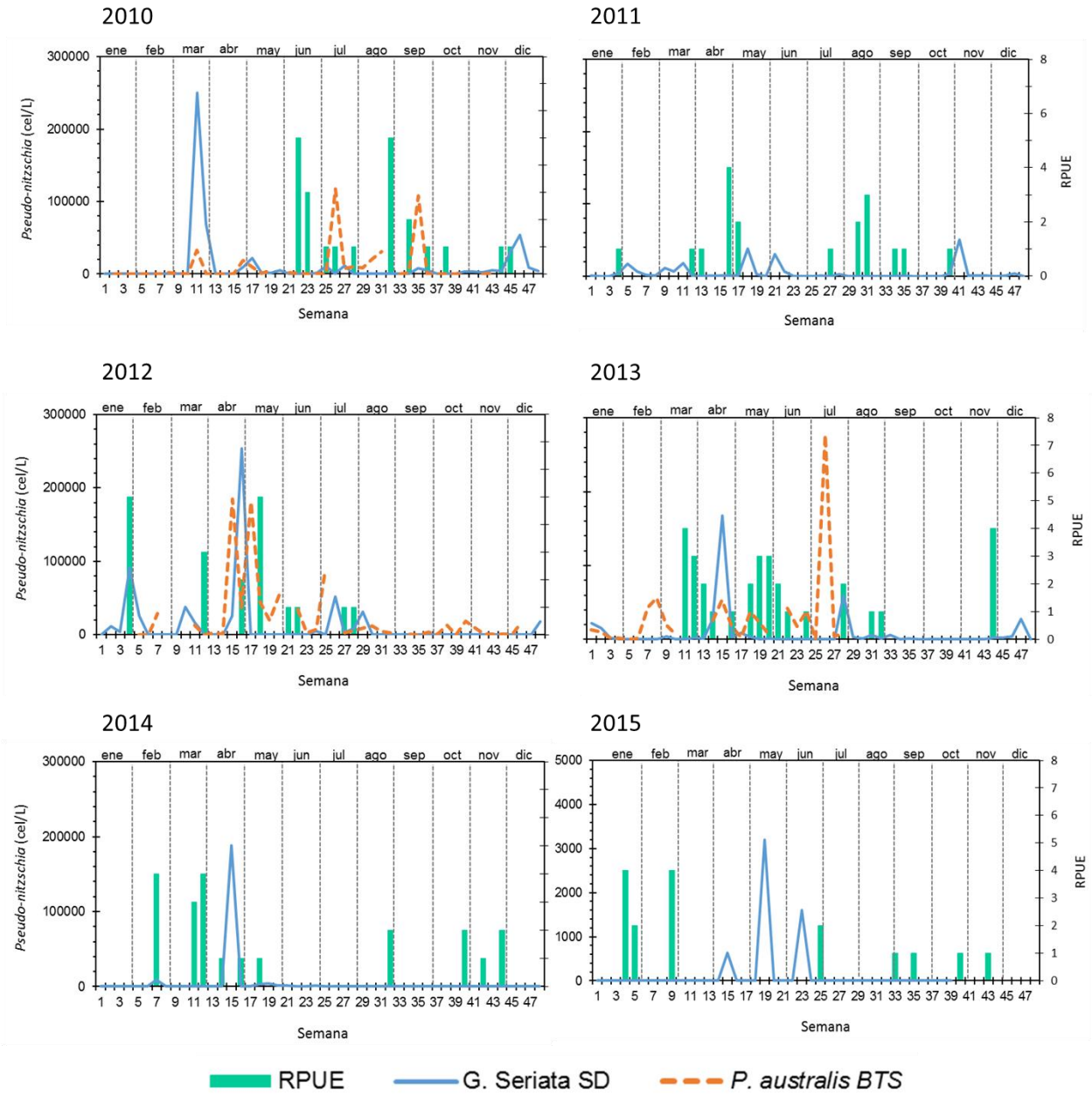
**Figura 12.** Esfuerzo promedio de búsqueda en días ( $\pm$  desviación estándar) anual (a) y estacional (b) de mamíferos marinos varados en la Bahía de Todos de Santos, Baja California, 1999-2016.

Debido a la diferencia en el esfuerzo, se estandarizaron los datos calculando el registro por unidad de esfuerzo (RPUE) como el número de animales varados registrados entre el esfuerzo de búsqueda, medido en días. Dada la poca información disponible para 2002 y de 2006 a 2009, estos años se eliminaron para los análisis posteriores. Al estandarizar los datos no se encontraron diferencias en el registro de animales varados entre años:  $H(12, n = 46) = 16.72, p = 0.16$  (Figura 13a) ni entre estaciones:  $H(3, n = 46) = 6.40, p = 0.09$  (Figura 13b).



**Figura 13.** Registros por unidad de esfuerzo (RPUE)  $\pm$  desviación estándar anual (a) y estacional (b) de mamíferos marinos varados en la Bahía de Todos Santos, Baja California, 1999-2016.

En el análisis para evaluar la posible relación entre la concentración de células de *Pseudo-nitzschia* y los varamientos en la Bahía de Todos Santos se utilizaron los datos disponibles de las tres bases de datos para el periodo 2010-2015. No se observó un patrón entre el incremento o disminución de la abundancia de la diatomea y de los animales varados (Figura 14).



**Figura 14.** Comparación entre los registros por unidad de esfuerzo (RPUE) de varamientos y abundancia de *Pseudo-nitzschia* en Bahía de Todos Santos (BTS) y San Diego (SD).

## 4. Discusión

---

### 4.1 Métodos de cuantificación de AD

Existen varios métodos para la cuantificación del AD, todos con ventajas y desventajas para la detección de la toxina. Aun con los métodos disponibles, la determinación en fluidos biológicos ha resultado complicada ya que no todos cuentan con la sensibilidad o especificidad necesaria para detectar concentraciones bajas de AD. La detección precisa y confiable es esencial para relacionar la muerte de un mamífero marino con la biotoxina (Tor et al., 2003; Lefebvre et al., 2010). Encontrar esta relación ha resultado complicado debido a que las muestras biológicas representan matrices complejas que juegan un papel importante en la eficiencia de los métodos analíticos. Las matrices orgánicas donde se encuentra el AD frecuentemente contienen compuestos interferentes que comprometen la fiabilidad de los resultados y por ello generalmente es necesario utilizar pre-tratamientos de extracción y limpieza como la SPE, para eliminar las interferencias (Gago-Martínez, 2007).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se ha utilizado ampliamente en el análisis de AD en muestras de fluidos de mamíferos marinos, pero es adecuada sólo cuando las concentraciones en la muestra son relativamente altas debido a que el límite de detección reportado de ~10 ng AD/ml (Gulland, 2000; Lefebvre y Robertson, 2010). Otra desventaja de esta metodología es que el AD coeluya con otro compuesto que absorba (si se usa detección por absorción en el UV) en las mismas longitudes de onda que la toxina. Uno de los compuestos con estas características es el triptófano, un aminoácido esencial implicado en varios procesos metabólicos y encontrado en tejidos animales, por lo que los protocolos deben de adecuarse para tener una resolución a nivel de línea base entre el AD y este aminoácido. El protocolo usado en este estudio cumple con este requisito. El análisis de una mezcla de estándares de triptófano y AD demostró que se llevó a cabo una buena separación y la señal del primero aparece alrededor de los 10.5 min y el AD a los 12.2 min. Este protocolo se implementó principalmente para medición de AD en moluscos bivalvos y es adecuado para evitar la interferencia del triptófano en la detección del AD en matrices asociadas. Sin embargo, en diferentes tejidos y especialmente en muestras de heces, se presentaron otros compuestos que interfirieron en la medición del AD. El análisis de AD en las muestras se realizó sin una limpieza previa a la inyección en el sistema de cromatografía. El no realizar limpieza alguna probablemente causó que las muestras analizadas por HPLC presentaran señal alta en el tiempo de retención del AD no asociada a esta toxina.

El compuesto que interfirió presentó un tiempo de retención igual al del AD, por lo que tiene una afinidad similar a esta toxina por la fase sólida usada para la separación. Esto indica que tiene un momento dipolar similar, lo que hace difícil su separación previa por medio de extracción de fase sólida (SPE). La identificación de un compuesto coeluyendo con el AD se realizó mediante la medición espectral de la absorción al tiempo de retención del AD. El monitoreo a una longitud de onda de 280 y 242 nm durante el análisis de HPLC hizo posible determinar que la señal pertenece a otro compuesto y no a AD, debido a que la absorción máxima para AD es a una longitud de onda de 242 nm y no es detectable a 280 nm.

Un compuesto desconocido con las mismas características fue reportado por Lefebvre et al. (1999) en heces de lobo marino de California. De acuerdo a Lefebvre et al. (1999), para evitar la falsa detección y sobreestimación de AD, se debe restar el área a 280 nm del área a 242 nm antes de calcular la concentración. A diferencia de la señal reportada por estos autores, las detectadas en heces de lobo fino de Guadalupe y en tejidos y fluidos de los animales varados fueron bastante altas. Al hacer la corrección propuesta por Lefebvre et al. (1999) en las muestras de heces de lobo fino de Guadalupe, los resultados mostraron concentraciones altas, pero no pudieron ser confirmados ni por ELISA ni por LC-MS/MS. Estos resultados nos dejan concluir que aún con la corrección el método no es confiable para determinar la presencia del AD. Lefebvre et al. (1999) analizaron muestras de anchoveta completa, tejido corporal y vísceras en las que no encontraron interferencias con las mismas condiciones de análisis. En este estudio, el compuesto se encontró en todos los tipos de muestras de animales varados excepto en cerebro y en muestras de todas las especies analizadas, excepto en heces de *B. edeni*. También estuvo ausente en una de las dos muestras de ojo y en la otra en una concentración muy baja, pero en la réplica del análisis no se detectó.

El ELISA tiene la ventaja de ser rápido, permitir el procesamiento de muestras múltiples en corto tiempo y de ser selectivo para AD con poca interferencia. Este método ha sido utilizado para detectar AD en matrices de mamíferos marinos incluyendo suero sanguíneo, contenido estomacal y heces. Sin embargo, el kit utilizado fue validado por el fabricante para el análisis de muestras de mariscos, por lo que el límite de detección de 2 pg/g está por debajo del límite de cuantificación práctico de detección de AD en matrices de mamíferos marinos, reportado en 10 pg/g (Hall y Frame, 2010; Lefebvre et al., 2010). Este no es un método confirmatorio y el intervalo de trabajo es pequeño (0.00001-0.01 µg de AD/ ml). Se requiere un nuevo análisis si las muestras tienen niveles altos de AD (Lefebvre y Robertson, 2010). Un problema con el uso de anticuerpos para la detección de un metabolito es la reactividad cruzada con otros compuestos o interferencia de los mismos para la conjugación entre el anticuerpo y antígeno. Para evitar



el efecto matriz en el ELISA se realizaron las diluciones específicas para cada tipo de muestra recomendadas por Frame y Lefebvre (2013). Estos autores determinaron que las diluciones mínimas requeridas de los extractos metanólicos adecuadas para evitar falsos positivos son de 1:100 en heces, 1:10 en suero y 1:50 en contenido estomacal. Con estas diluciones el límite de detección es de 0.4 ng de AD/ml de suero, 2 ng de AD/ml de contenido estomacal y 4 ng/g de heces. La dilución empleada en este estudio para extractos de hígado y riñón fue la misma que para heces, pero Lefebvre et al. (2007) determinaron que la dilución necesaria para eliminar el efecto matriz de hígado y riñón de salmón es de 1:500, por lo que era posible que el resultado obtenido en este tipo de matrices se sobreestimara o fuera un falso positivo al no utilizar una dilución tan alta. Sin embargo, aunque en el resto de fluidos se emplearon las diluciones sugeridas, se obtuvieron falsos positivos, ya que no se comprobó la presencia del AD por LC-MS/MS, a pesar de que el ELISA indicaba concentraciones similares a las muestras que se confirmaron como positivas, lo que sugiere una reacción cruzada con algún compuesto presente en las muestras.

Otro de los métodos de análisis en este estudio fue LC-MS/MS que se ha utilizado para analizar muestras de suero y orina de mamíferos marinos, en las que se detectó la señal de AD y se distinguió de la del ruido generado por la matriz, se propuso utilizar otras matrices como el riñón (Tor et al., 2003). La detección por espectrometría de masas en tándem tiene la ventaja de ser un método confirmatorio estructuralmente y de alta resolución. La desventaja de este método es la supresión de ionización por la matriz. El límite de detección reportado es de  $\sim 2$  ng AD/ml de extracto (Lefebvre y Robertson, 2010); en el presente trabajo se alcanzó un límite de 0.025 ng AD/ml, considerando éste como la última dilución de las curvas de calibración. Así mismo, este método proporciona una determinación rápida del AD y una confirmación analítica más rigurosa en fluidos biológicos por la alta especificidad y sensibilidad, necesarias para la identificación inequívoca de la biotoxina (Gulland, 2000; Tor et al., 2003; Wang et al., 2012). De las muestras analizadas son consideradas como positivas sólo aquellas en las que se detectó la ficotoxina mediante LC-MS/MS de acuerdo al patrón de fragmentación esperado. Frame y Levevre (2013) determinaron que el límite de cuantificación de heces de lobo marino de California es de aproximadamente 20 ng de AD/g de la muestra original, esto hace más evidente la poca probabilidad de que las muestras de lobo fino de Guadalupe contengan AD, puesto que la concentración indicada por HPLC fue bastante más alta y habría sido detectada por LC-MS/MS.

La diferencia entre el límite de cuantificación y principalmente la especificidad determina los resultados positivos por un método y negativos por otro (Frame y Levevre et al., 2013). Se han realizado otros trabajos en los que se utiliza más de un método para la cuantificación de AD. En muestras de heces,

orina, suero, contenido estomacal, leche y humor acuoso de lobo fino del norte (*Callorhinus ursinus*) se obtuvieron resultados positivos en HPLC y LC-MS/MS cuando los valores de AD por ELISA fueron >46 ng/g (Lefebvre et al., 2010). A diferencia de las muestras que se analizaron en este trabajo, la única que sobrepasó el valor reportado por Lefebvre et al. (2010) en ELISA, fue el riñón de *Delphinus capensis*, con una concentración de 77 ng/g. La concentración medida por LC-MS/MS fue menor (43.8 ng/g); sin embargo, las otras tres muestras positivas por LC-MS/MS presentan concentraciones <46 ng/g por ELISA, aunque en todos los casos fue menor el valor obtenido en LC-MS/MS. La detección de AD por debajo de lo reportado (46 ng/g) en muestra de mamíferos marinos está asociado al nivel de detección que se logró en el protocolo usado en este trabajo y la diferencia probablemente está asociada con la variabilidad en la calibración de cada método, la cual fue mayor con el ELISA.

La presencia de AD en las muestras de heces de lobo marino de California fue confirmada por LC-MS/MS sólo en aquellas con una concentración mayor a 80 ng/g detectado por ELISA, con algunas excepciones (Frame y Levebvre et al., 2013). Esto refleja una variabilidad de los resultados debido a los efectos de matriz. En el caso de heces, depende del tipo de presa y la condición del animal. Esto puede ser similar en otro tipo de muestras, en el mismo estudio sólo el 8% de las muestras de suero fueron confirmadas por LC-MS/MS y fueron las que presentaron concentraciones mayores a 7 ng/g en ELISA. Esto podría explicar por qué las muestras de suero analizadas por LC-MS/MS no resultaron positivas, ya que aunque se eligieron las de mayor concentración de AD en ELISA, ninguna tuvo una concentración por arriba de los 7 ng/g. Aun considerando las diluciones, el límite de detección del ELISA sigue siendo dos órdenes de magnitud más bajo que el límite de cuantificación en HPLC y más de un orden inferior a los de LC-MS/MS (Frame y Levebvre et al., 2013).

## 4.2 Detección de ácido domoico en mamíferos marinos

Las heces representan la mejor matriz para monitorear la exposición aguda a AD, ya que aunque la orina, el suero, el contenido estomacal y otros fluidos también son útiles, el AD se elimina relativamente más rápido en estas matrices (Lefebvre et al., 2010; Frame y Levebvre et al., 2013). La presencia de AD no se confirmó en las muestras de suero de lobos marinos de California ni en las de heces de lobos finos de Guadalupe, de rorcual tropical (*B. edeni*) y vaquita (*P. sinus*). Debido a la rápida depuración del AD, los

niveles hallados en este tipo de muestras o la ausencia de la toxina no son indicativos de los niveles o historia de exposición (Truelove e Iverson, 1994; Lefebvre et al., 2012); la alta velocidad de depuración disminuye la probabilidad de detectar la biotoxina. Sin embargo, en los animales vivos muestreados, lobos marinos de California y lobos finos de Guadalupe, no se reportó ningún signo típico de intoxicación por AD.

La dosis de ingesta de AD asociada a signos clínicos en mamíferos marinos es desconocida (Bargu et al., 2012), pero pueden ser más susceptibles a dosis más bajas que los mamíferos terrestres debido a que durante el buceo, la sangre, y con ella el AD, se dirige mayoritariamente al corazón y cerebro, por lo que tarda más en llegar al hígado y riñones, los órganos involucrados en la eliminación de toxinas (Geraci et al., 1989; Bargu et al., 2002). Además, en los mamíferos marinos la exposición natural suele ser crónica con dosis variables (Zabaglo et al., 2016; Lefebvre et al., 2017). Por esto y aunado a las diferencias individuales, *e.g.*, predisposición genética y el estado de salud, es complicado establecer niveles de exposición que causan intoxicación. Hall y Frame (2010) reportaron niveles de hasta 63 ng en heces y 13 ng/ml en orina de foca común (*Phoca vitulina*) que no presentaron signos de intoxicación, mientras que Goldstein et al. (2008) reportaron intoxicación aguda en lobo marino de California con niveles de 10 ng/ml en orina.

Se analizaron 21 muestras de órganos colectadas de ocho individuos de diferentes especies. El AD detectado en las muestras de hígado y riñón de dos individuos de *Delphinus* spp. (25% del total de animales muestreados) confirma que los mamíferos marinos de la región están expuestos a intoxicación. Ambos delfines eran machos y se encontraron varados en playas de la Bahía de Todos Santos el 20 de abril y el 3 de mayo en la primavera de 2017. El espécimen con mayor concentración de AD fue el que se encontró en abril. Un mes antes se detectó la presencia *P. australis* en muestras de agua de la bahía desde finales de febrero de 2017, con mayor abundancia en la primera semana de marzo hasta cerca de 50 000 células/L. La diatomea también se detectó dentro de bahía en la última semana de abril y la primera de mayo. Debido a los hábitos de estas especies de delfines, también es posible que hayan sufrido exposición a AD fuera de la bahía, antes de que se detectara la presencia de *Pseudo-nitzschia*. Asimismo, se detectaron concentraciones de hasta 7.4 µg de AD/g de tejido de mejillones colectados la primera semana de marzo (García-Mendoza, comunicación personal), lo que muestra que estas células de *P. australis* producían AD como se ha reconocido anteriormente (García-Mendoza et al., 2009). Sin embargo, la ausencia de AD en la muestra de contenido estomacal de uno de los delfines y de comportamientos asociados a intoxicación con AD en uno de los animales que varó vivo, sugieren que la exposición pudo no haber sido reciente o

aguda. No se puede establecer que los organismos murieron por intoxicación a AD, pero sí estuvieron expuestos a esta toxina.

La acumulación en hígado se ha comprobado en anchovetas expuestas por vía oral (Lefebvre et al., 2001) y en roedores (Funk et al., 2014); la acumulación en riñón también se ha observado en roedores (Funk et al., 2014) y en salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Lefebvre et al., 2007). La presencia de AD en hígado y riñón puede explicarse por la presencia de las subunidades de receptores de glutamato en ambos órganos (Gill y Pulido, 2001) y la función de aclaramiento del riñón (Costa et al., 2004). En ratas el consumo de pequeñas dosis de AD, 5-20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal, causa daño renal severo debido a que la ficotoxina se mantiene a niveles bajos en la sangre (Suzuki y Hierlihy, 1993), lo cual favorece la acumulación en otros tejidos como resultado de la disminución en la eficiencia de aclaramiento (Petroff, 2016). Este efecto puede provocar un síndrome crónico en mamíferos marinos incluso en ausencia de FAN (Goldstein et al., 2008). En el individuo de *D. capensis* se encontraron niveles en hígado y riñón de 10.3 ng/g de tejido y 43.8 ng/g de tejido, respectivamente; en el de *D. delphis* fueron de 1.5 ng/g de tejido de hígado y 2.3 ng/g de tejido de riñón. Desafortunadamente no existen referencias del contenido de AD en órganos de mamíferos marinos para contrastar estos resultados. Los reportes de análisis de AD en hígado y riñón de lobos marinos de California varados con signos clínicos de intoxicación fueron negativos (Gulland, 2000), así como en otras especies (Fire et al., 2009). Aunque para el lobo marino de California se ha reportado un efecto crónico a niveles de 2 ng/ml en orina y de 3 ng/ml en suero (Goldstein et al., 2008). Sin embargo, los resultados coinciden con lo reportado para el salmón y roedores (Lefebvre et al., 2007; Funk et al., 2014), el AD se acumuló más en los riñones que en el hígado.

Los resultados obtenidos demuestran la acumulación de AD en órganos de *D. delphis* y *D. capensis*, pero no proporcionan información sobre las posibles áreas geográficas donde ocurrió la exposición; debido a los hábitos alimentarios de estas especies, es posible que sucediera lejos de la costa (Torres de la Riva et al., 2009). Ambas especies se alimentan de gran variedad de peces y cefalópodos pelágicos (Osnes-Erie, 1999) y se han observado a distancias de hasta 30 km de la costa de Baja California (Valles-Jiménez, 1998), pero tienen la capacidad de migrar a grandes distancias en busca de presas (Cockcroft y Peddemors, 1990). Evans (1982) reportó el movimiento hacia el sur en invierno-primavera, de aproximadamente 5000 km de distancia recorrida por un delfín desde California hasta Baja California en menos de 10 días. Estas observaciones sugieren que posiblemente los delfines muestreados se hayan alimentado en áreas lejanas al sitio de varamiento. Aparentemente la incidencia de intoxicación de machos de *Delphinus* sp. es mayor que la de las hembras (Bejarano et al., 2008b). Se desconoce si los machos

tienen una mayor susceptibilidad, pero esta tendencia parece no estar asociada a diferencias en los hábitos alimentarios entre sexos, ya que se alimentan de las mismas presas y no hay segregación de machos y hembras para la alimentación (Osnes-Erie, 1999; Niño-Torres et al., 2006).

### **4.3 Relación entre la presencia de *Pseudo-nitzschia* y varamientos de mamíferos marinos en la Bahía de Todos Santos**

#### **4.3.1 Varamientos de mamíferos marinos**

La baja frecuencia de varamientos en la Bahía de Todos Santos, un promedio de 20 animales/año, podría estar influenciada por varias razones. Primero, el tamaño reducido de las poblaciones de mamíferos marinos en la región. La principal especie de mamíferos marinos varados en la bahía es el lobo marino de California, ca. 70% de los varamientos registrados (Bravo et al., 2005; presente estudio). Su zona de agregación principal se localiza al sur de la bahía, en las rocas de Punta Banda (Arias del Razo et al., 2017). El número de animales que se congrega se desconoce, pero se sabe que es una colonia no reproductiva pequeña (Bravo et al., 2005). La segunda especie con más registros de varamientos fue la foca común (9%), que se localiza en dos sitios de la bahía: el estero de Punta Banda y la Isla Todos Santos (Alamán de Régules, 2014). El mayor número de focas se encuentra en la isla (ca. 500 individuos) (Lubinsky-Jinich et al., 2017), y se distribuyen en la costa este y suroeste (Arias del Razo et al., 2017). No existen grupos residentes en la bahía de otras especies de mamíferos marinos.

La segunda razón se relaciona con la dispersión de los cadáveres. Bravo et al. (2005) sugieren que aunque los mamíferos marinos podrían morir dentro de la bahía, es posible que los cadáveres no encallen en las playas debido a que pueden ser transportados por las corrientes oceánicas a alta mar, ser presa de otros animales o hundirse antes de que se varen. Finalmente, a diferencia de otros lugares, p.ej California, donde el monitoreo para la localización de animales varados se realiza a través de una red de varamientos a cargo de varios centros de investigación y otras organizaciones (NOAA, 2017). En la Bahía de Todos Santos está únicamente a cargo de ICMME, por lo que el esfuerzo es relativamente bajo y muy variable a lo largo del año.

No se observaron diferencias significativas en el número de varamientos entre temporadas, en contraste con el patrón de varamientos de 1998-2001 reportado por Bravo et al. (2005). Durante verano y otoño la frecuencia de varamientos es aparentemente menor que el resto del año. Esto podría deberse a la menor abundancia de los lobos marinos debido a la migración a zonas de reproducción. En invierno se presenta un incremento de varamientos probablemente relacionado con las tormentas de la temporada y al mayor número de animales que se distribuyen en la región durante esta época (Bravo et al., 2005). En primavera el número de varamientos es ligeramente menor que en invierno a diferencia de lo reportado por Bravo et al. (2005) y en California (Greig et al., 2005; Torres de la Riva et al., 2009), en donde la temporada y la región con mayor cantidad de varamientos también corresponden al momento del destete y primeros intentos de forrajeo de los lobos marinos jóvenes provenientes de las Islas Channel, donde se encuentran en altas abundancias (Greig et al., 2005; Bejarano et al., 2008a; Goldstein et al., 2008).

#### **4.3.2 Abundancia de *Pseudo-nitzschia* y varamientos de mamíferos marinos**

Es probable que las condiciones ambientales de los últimos años no hayan favorecido el desarrollo de FAN de *Pseudo-nitzschia* en la Bahía de Todos Santos, ya que la abundancia de la diatomea fue baja en la mayoría de las muestras ( $< 10^3$  cel/L; Bargu et al., 2012); hubo periodos en los que no se detectó, particularmente después del 2012 (García-Mendoza et al., 2016). Los FAN de *Pseudo-nitzschia* en la región se han relacionado con las condiciones de surgencia en la región norte, con temperaturas de alrededor de 14°C y salinidad más alta que en las zonas aledañas (García-Mendoza et al., 2009). En 2007 y 2008 se identificaron FAN en primavera con abundancias de *Pseudo-nitzschia* de hasta  $40 \times 10^3$  cél/L (Cabral-Talavera, 2010; García-Mendoza et al., 2016); en 2008 se detectó AD en vísceras de sardinas y anchovetas durante primavera y verano (Cabral-Talavera, 2010). Durante la última semana de agosto y hasta septiembre de 2010, se detectaron concentraciones de AD de hasta 800 ppm en vísceras de sardinas, y de hasta 6.7 µg/g de mejillón colectadas cerca de la bahía (Lewitus et al., 2012; García-Mendoza et al., 2016). En septiembre del 2011 se detectaron concentraciones superiores a 20 µg de AD/g muestra de moluscos, lo cual llevó a la implementación de la primera veda sanitaria por AD en la región (García-Mendoza et al., 2016).

El no haber encontrado una relación entre la abundancia de *Pseudo-nitzschia* y el número de varamientos puede deberse a que, aunque *Pseudo-nitzschia* forma parte de la comunidad de fitoplancton,

no siempre se presenta en concentraciones nocivas, por lo tanto es probable que los mamíferos marinos estén expuestos a niveles de AD subletales (Bargu et al., 2012). Por otra parte, la presencia de *Pseudo-nitzschia* se utiliza como indicador del potencial de exposición a la toxina a través de la transferencia trófica; la intoxicación puede depender de la magnitud y toxicidad del FAN (Bargu et al., 2012), ya que la abundancia no siempre es proporcional a la producción de AD (Scholin et al., 2000; Anderson, 2009). La abundancia de células de *Pseudo-nitzschia* en la Bahía de Todos Santos en 2007 fue mayor que en California, sin embargo, las concentraciones máximas de AD particulado fueron menores (García-Mendoza et al., 2016). Asimismo, la producción de AD varía entre cepas de células productoras, las etapas de crecimiento y las características ambientales particulares en las que se desarrollan (Bates, 1998; Lelong et al., 2012; Trainer et al., 2012; Teng et al., 2016). Incluso es posible que los florecimientos no se vuelvan nocivos si no existe limitación de silicato y fosfato (Kudela et al., 2003; Du et al., 2016).

Es posible que no se detectara un patrón debido a que existe un retraso entre la aparición de células productoras de AD en la columna de agua y la exposición de los mamíferos marinos. El ambiente bentónico es un reservorio de células de *Pseudo-nitzschia* y AD, siendo una fuente de exposición, aunque la diatomea no sea abundante en la columna de agua (Lefebvre et al., 2010). La probabilidad de que ocurra un evento de intoxicación también depende del flujo y acumulación en diferentes niveles tróficos. La acumulación retardada y la permanencia de AD en organismos de nivel trófico bajo pueden indicar una transferencia lenta que resulta en impactos retardados a niveles tróficos superiores (Bejarano et al., 2008b). Esto influye en la ausencia de una relación inmediata entre varamientos de mamíferos marinos y FAN. En las costas de California se han observado lobos marinos varados con signos de intoxicación aguda cuando la cantidad de *Pseudo-nitzschia* era baja (Bargu et al., 2012); también se han presentado varamientos de mamíferos marinos con síndrome de intoxicación crónica entre dos semanas y cuatro meses después de un FAN (Goldstein et al., 2008; Torres de la Riva et al., 2009).

La falta de relación podría deberse a que es probable que los sitios de muestreo de *Pseudo-nitzschia* no coincidan con las áreas de forrajeo o con la distribución espacial de las presas de los mamíferos marinos en la región. No se conocen estudios sobre los hábitos alimentarios ni áreas de forrajeo de los lobos marinos de California de la Bahía de Todos Santos. En el caso de las focas, suelen alimentarse a 30-50 km de distancia de su colonia (Härkönen, 1987), aunque se desconocen las áreas de alimentación, los animales de las dos colonias de la Bahía de Todos Santos se alimentan en sitios distintos (Alamán de Régules, 2014). Respecto a las presas, la migración de la anchoveta (*Engraulis mordax*), uno de los principales vectores de AD, coincide con la aparición de florecimientos de *Pseudo-nitzschia*; por lo tanto,

pueden conducir a la intoxicación de animales en sitios donde no se presentaron florecimientos (Bejarano et al., 2008a). La acumulación entre especies es diferente y en algunas presas de mamíferos marinos se ha observado un retardo en la acumulación de AD. En el calamar *Sepia officinalis* se detectó una alta concentración de AD dos semanas después de un FAN de *Pseudo-nitzschia* y mantuvo niveles altos hasta casi un año después (Costa et al., 2005). Estos casos son evidencia de la variabilidad temporal de acumulación entre especies de niveles tróficos inferiores, lo que sugiere que la asociación más certera podría ser la comparación directa entre los varamientos y los niveles de la ficotoxina en las presas de mamíferos marinos.



## 5. Conclusiones

---

Se detectó un compuesto que interfiere en el análisis de tejidos y fluidos de mamíferos marinos mediante HPLC, por lo que es necesario el monitoreo de ácido domoico a dos longitudes de onda: 242 y 280 nm.

Las muestras de fluidos y tejidos de mamíferos marinos requieren una limpieza adicional al proceso de extracción para evitar interferencias en HPLC y LC-MS/MS. La determinación estructural del ácido domoico mediante LC-MS/MS lo hace el método más confiable para la identificación de la ficotoxina.

Se confirmó la presencia de ácido domoico en mamíferos marinos de la costa occidental de Baja California. La presencia de AD en delfines encontrados varados en primavera del 2017 evidencia el riesgo potencial para los mamíferos marinos de intoxicación por esta ficotoxina en las costas de la península de Baja California.

El AD no fue detectado en suero de *Zalophus californianus* de las colonias del golfo de California, ni en muestras de heces de *Arctocephalus townsendii*, por lo que suponemos que no hubo exposición a la toxina durante el periodo de muestreo y localidad de toma de muestras.

No se detectó ácido domoico en fluidos de mamíferos marinos varados, pero se demostró que es posible detectar el ácido domoico en muestras de hígado y riñón, lo que indica exposición a la toxina, pero probablemente no cercana al tiempo de toma de muestras.

No fue posible identificar un patrón entre la abundancia de *Pseudo-nitzschia* y los varamientos en Bahía de Todos Santos. El vínculo entre la presencia de la diatomea y los varamientos es complejo debido a los factores múltiples que intervienen en un evento de intoxicación, entre ellos la variabilidad espacial y temporal en el monitoreo de los mamíferos marinos y el fitoplancton.

## Literatura citada

---

- Alamán de Regules, R. 2014. Hábitos Alimentarios de la foca de puerto, *Phoca vitulina richardsi*, en la Bahía Todos Santos, Baja California, México. Tesis de maestría. UABC. 79pp.
- Anderson, C.R., Brzezinski, M.A., Washburn, L., Kudela, R. 2006. Circulation and environmental conditions during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in the Santa Barbara Channel, California. *Marine Ecology Progress Series* 327, 119-133.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J. 2002. Harmful Algal Blooms and Eutrophication: Nutrient Sources, Composition, and Consequences. *Estuaries*, 25(4), 704-726.
- Anderson, D.M., Burkholder, J.M., Cochlan, W.P., Glibert, P.M., Gobler, C.J. Heil, C.A., Kudela, R., Parsons, M.L., Rensel, J.E.J., Townsend, D.W., Trainer, V.L. Vargo, G.A. 2008. Harmful algal blooms and eutrophication: Examining linkages from selected coastal regions of the United States. *Harmful Algae*, 8(1), 39-53.
- Anderson, D.M. 2009. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean coastal management* 52(7), 342-347.
- Arias del Razo, A., Schramm, Y., Heckel, G., Milanés-Salinas, Á., García-Capitanachi, B., Lubinsky-Jinich, D., Franco-Ortiz, Mónica. 2017. Distribution of four pinnipeds (*Zalophus californianus*, *Arctocephalus philippii townsendi*, *Phoca vitulina richardii*, and *Mirounga angustirostris*) on Islands off the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Aquatic Mammals*, 43(1), 40-51-
- Bargu, S. Powell, C., Coale, S., Busman, M., Doucette, G., Silver, M. 2002. Krill: a potential vector in marine food webs. *Marine Ecology. Progress Series*, 237, 209-216.
- Bargu, S. Silver, M., Goldstein, T, Roberts, K., Gulland, F. 2010. Complexity of domoic acid-related sea lion strandings in Monterey Bay, California: Foraging patterns, climate events, and toxic blooms. *Marine Ecology Progress Series*, 418, 213-222.
- Bargu, S., Goldstein, T., Roberts, K., Li. C., Gulland, F. 2012. *Pseudo-nitzschia* blooms, domoic acid, and related California sea lion strandings in Monterey Bay, California. *Marine Mammal Science*, 28(2), 237-253.
- Bates, S.S., Bird, C.J., de Freitas, A.S.W., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L.A., Johnson, G.R., McCulloch, A. W., Odense, P., Pocklington, R., Sim, P.G., Smith, J.C., Subba-Rao, D.V., Todd, E.C.D., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright J.L.C. 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 Aquatic Sciences*, 46, 1203-1215.
- Bates, S.S., Garrison, D.L., Horner, R.A. 1998. Bloom dynamics and physiology producing *Pseudo-nitzschia* species. En: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.). *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag. Heidelberg. (pp. 267-292).
- Bejarano, A.C., Gulland, F.M., Goldstein, T., St Leger, J., Hunter, M., Schwacke, Lori H., VanDolah, F.M., Rowles, T.K. 2008a. Demographics and spatio-temporal signature of the biotoxin domoic acid in California sea lion (*Zalophus californianus*) stranding records. *Marine Mammal Science*, 24(4), 899-912.
- Bejarano, A.C., VanDola F.M., Gulland F.M., Rowles, T.K., Schwacke, L.H. 2008b. Production and toxicity of the marine biotoxin domoic acid and its effects on wildlife: a review. *Human and Ecological Risk Assessment*, 14, 544-567.

- Braña-Magdalena, A., Leão-Martins, J.M., Glauner, T., Gago-Martínez, A. 2014. Intralaboratory validation of a fast and sensitive UHPLC/MS/MS method with fast polarity switching for the analysis of lipophilic shellfish toxins. *Journal of AOAC International*, 97(2), 285-292.
- Bravo, E., Heckel, G., Schramm, Y., Escobar-Fernández, R. 2005. Occurrence and distribution of marine mammal strandings in Todos Santos Bay, Baja California, Mexico, 1998-2001. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 4(1), 15-25.
- Brodie, E.C., Gulland, F.M.D., Greig, D.J., Hunter, M., Jaakola, J., Leger, J.St., Leighfield, T.A., Van Dolah, F.M. 2006. Domoic acid causes reproductive failure in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Marine Mammal Science*, 22(3), 700-707.
- Burns, J.M., Ferry, J.L. 2007. Adsorption of domoic acid to marine sediments and clays. *Journal of Environmental Monitoring*, 9, 1373-1377.
- Cabrales-Talavera, G. 2010. Distribución espacial y temporal de diatomeas del género *Pseudo-nitzschia* spp. y la concentración de ácido domoico en la región de la Bahía de Todos Santos, BC, México. Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. 124 pp.
- Cockcroft, V. G., Peddemors, V. M. 1990. Seasonal distribution and density of common dolphins *Delphinus delphis* off the south-east coast of southern Africa. *South African Journal of Marine Science*, 9(1), 371-377.
- Costa, P.R., Rosa, R., Sampayo, M.A.M. 2004. Tissue distribution of the amnesic shellfish toxin, domoic acid, in *Octopus vulgaris* from the Portuguese coast. *Marine Biology*, 144, 971-976.
- Costa, P.R., Rui, R., Duarte-Silva, A. Brotas, V., Sampayo, M.A.M. 2005. Accumulation, transformation and tissue distribution of domoic acid, the amnesic shellfish poisoning toxin, in the common cuttlefish, *Sepia officinalis*. *Aquatic Toxicology*, 74, 82-91.
- Costa, L.G., Giordano, G., Faustman, E.M., 2010. Domoic acid as a developmental neurotoxin. *Neurotoxicology*, 31(5), 409-423.
- Doucette, T.A., Bernard, P.B., Husum, H., Perry, M.A., Ryan, C.L., Tasker, R.A. 2004. Low doses of domoic acid during postnatal development produce permanent changes in rat behaviour and hippocampal morphology. *Neurotoxicity Research*, 6(7, 8), 555-563.
- Doucette, G. Maneiro, I., Riveiro, I., Svensen, C. 2006. Phycotoxin Pathways in Aquatic Food Webs : Transfer, Accumulation and Degradation. En: Granéli, E., Turner, J.T (Eds.). *Ecology of harmful algae*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. (pp. 283-295).
- Du, X., Peterson, W., Fisher, J., Hunter, M., Peterson, J. 2016. Initiation and Development of a Toxic and Persistent *Pseudo-nitzschia* Bloom off the Oregon Coast in Spring/Summer 2015. *PLoS ONE*, 11(10), e0163977.
- Evans, Q. 1982 Distribution and differentiation of stocks of *Delphinus delphis* Linnaeus in the northeastern Pacific. In *Mammals in the Seas: Small cetaceans, seals, sirenians, and otters*, Volume 5. Rome: FAO, pp. 45-66.
- FAO, 2005. Biotoxinas marinas; Estudio FAO: Alimentación y nutrición. P. 292
- Fire, S.E., Wang, Z., Leighfield, T.A., Morton, S.L., McFee, W.E., McLellan, W.A., Litaker, R.W., Tester, P.A., Hohn, A.A., Lovewell, G., Harms, C., Rotstein, D.S., Barco, S.G., Costidis, A., Sheppard, B., Bossart, G.D., Stolen, M., Durden, W.N., Van Dolah, F.M. 2009. Domoic acid exposure in pygmy and dwarf sperm whales (*Kogia* spp.) from southeastern and mid-Atlantic U.S. waters. *Harmful Algae* 8, 658-664.

- Fire, S.E., Wang, Z., Berman, M., Langlois, G.W., Morton, S.L., Sekula-Wood, E., Benitez-Nelson, C.R. 2010. Trophic transfer of the harmful algal toxin domoic acid as a cause of death in a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) stranding in southern California. *Aquatic Mammals*, 36(4), 342-350.
- Frame, E., Lefebvre, K. 2013. ELISA methods for domoic acid quantification in multiple marine mammal species and sample matrices, NOAA Technical Memorandum NMFS-NWFSC-122, 20p.
- Fritz, L., Quilliam, M.A., Wright, J.L.C., Beale, A.M., Work, T.M. 1992. An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudonitzschia australis*. *Journal of Phycology*, 28, 439-442.
- Funk, J.A., Janech, M.G., Dillon, J.C., Bissler, J.J., Siroky, B.J., Bell, P.D. 2014. Characterization of renal toxicity in mice administered the marine biotoxin domoic acid. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25, 1187-1197.
- Gago-Martínez, A. 2007. Hepatotoxic cyanobacteria. En: Botana, L.M. (Ed.). *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Blackwell publishing. Iowa. (pp. 251-273).
- Gallo-Reynoso, J.P., Licea, S., Egido-Villarreal, J. 2005. Is *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* toxin the principal cause of sardines, dolphins, sea lions and pelicans mortality in 2004 in Mexico? *Harmful Algae News*, 29, 6-8.
- Gárate-Lizárraga, I., Band-Schmidt, C.J., López-Cortés, D.J., Bustillos-Guzmán, J.J., Erler, K. 2007. Bloom of *Pseudo-nitzschia fraudulenta* in Bahía de La Paz, Gulf of California (june-july 2006). *Harmful Algae News*, 33, 6-7.
- García-Mendoza, E., Rivas, D., Olivos-Ortíz, A., Almazán-Becerril, A., Castañeda-Vega, C., Peña-Manjarrez, J.L. 2009. A toxic *Pseudo-nitzschia* bloom in Todos Santos Bay, northwestern Baja California, México. *Harmful Algae*, 8, 493-503.
- García-Mendoza, E., Quijano-Scheggia, S.I., Olivos-Ortiz, A., Núñez-Vázquez, E.J. 2016. Florecimientos algales nocivos en México. CICESE, Ensenada, México.
- Geraci, J.R., Anderson, D.M., Timperi, R.J., St. Aubin, D.J., Early, G.A., Prescott, J.H., Mayo, C.A. 1989. Humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) fatally poisoned by dinoflagellate toxin. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46, 1895-1898.
- Geraci, J.R. y Lounsbury, V.J., 1993. *Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings*. A Texas A&M Sea Grant Publication, Galveston, Texas.
- Gill, S.S., Pulido, O.M. 2001. Glutamate receptors in peripheral tissues: current knowledge, future research, and implications for toxicology. *Toxicologic pathology*, 29(2), pp.208-223.
- Glibert, P.M., Harrison, J., Heil, C., Seitzinger, S. 2006. Escalating worldwide use of urea: a global change contributing to coastal eutrophication. *Biogeochemistry*, 77, 441-463.
- Glibert, P.M., 2015. Algal blooms. En: Kennish, M.J. (Ed.). *Encyclopedia of Estuaries*. Rutgers University. Cambridg. (pp. 7-16).
- Goldstein, T., Mazet, J.A.K., Zabka, T.S., Langlois, G., Colegrove, K.M., Silver, M., Bargu, S., Van Dolah, F., Leighfield, T., Conrad, P.A., Barakos, J., Williams, D.C., Dennison, S., Haulena, M., Gulland, F.M.D. 2008. Novel symptomatology and changing epidemiology of domoic acid toxicosis in California sea lions (*Zalophus californianus*): an increasing risk to marine mammal health. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275, 267-276.

- Gómez-Aguirre, S, Licea, S, Gómez, S. 2004. Proliferaciones de *Pseudo-nitzschia* spp. (Bacillariophyceae) y otras especies del microplancton en la Bahía de Mazatlán, México. *Revista de Biología Tropical*, 52, 69-76.
- Greig, D.J., Gulland, F.M.D., Kreuder, C. 2005. A decade of live California sea lion (*Zalophus californianus*) strandings along the central California coast: causes and trends, 1991-2000.
- Gulland, F., 2000. Domoic acid toxicity in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, May-October 1998: Report to the National Marine Fisheries service working group on unusual marine mammal mortality events. U.S. Department of commerce. NOAA Technical Memorandum. p. 45.
- Gulland, M.D., Hall, A.J. 2007. Is marine mammal health deteriorating? Trends in the global reporting of marine mammal disease. *Ecology and health*, 4, 135-150.
- Hall, A.J. y Frame, E., 2010. Evidence of domoic acid exposure in harbour seals from Scotland: A potential factor in the decline in abundance? *Harmful Algae*, 9, 489-493.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32(2), 79-99.
- Härkönen, T. 1987. Seasonal and regional variations in the feeding habits of the harbour seal, *Phoca vitulina*, in the Skagerrak and the Kattegat. *Journal of Zoology*, 213(3), 535-543.
- Hasle, G.R. 2002. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae* 1(2), 137-146.
- Hernández-Becerril, D.U., Alonso-Rodríguez, R., Álvarez-Góngora, C., Barón-Campis, S.A., Ceballos-Corona, G., Herrera-Silveira, J., Meave del Castillo, M.E., Juárez-Ruiz, N., Merino-Virgilio, F., Morales-Blake, A., Ochoa, J.L., Orellana-Cepeda, E., Ramírez-Camarena, C., Rodríguez-Salvador, R. 2007. Toxic and harmful marine phytoplankton and microalgae (HABs) in Mexican Coasts. *Environmental Science and Health*, 42(10), 1349-1363.
- Howard, M.D.A., Cochlan, W.P., Ladizinsky, N., Kudela, R.M. 2007. Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae* 6, 206-217.
- Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S., Boyle, C. 2004. Amnesic shellfish poison. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 545-557.
- Kreuder, C., Miller, M.A., Jessup, D.A., Lowenstine, L.J., Harris, M.D., Ames, J.A., Carpenter, T.E., Conrad, P.A., Mazet, J.A.K. 2003. Patterns of mortality in southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*) from 1998-2001. *Journal of wildlife diseases*, 39(3), 495-509.
- Kudela, R., Cochlan, W., Roberts, A., 2003. Spatial and temporal patterns of *Pseudo-nitzschia* spp. in central California related regional oceanography. En: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds.), *Harmful Algae 2002*. Florida and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 347-349.
- Kudela, R.M., Berdalet, E., Bernard, S. Burford M., Fernand, L., Lu, S., Roy, S., Tester, P. Usup, G. Magnien, R., Anderson, D.M., Cembella, A., Chinain, M., Hallegraeff, G., Reguera B., Zingone, A., Enevoldsen, H., Urban, E. 2015. *Harmful Algal Blooms: a scientific summary for policy makers*. IOC/UNESCO, p. 20.
- Landsberg, J.H., 2002. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Reviews in Fisheries Science*, 10(2), 113-390.

- Lefebvre, K.A., Powell, C.L., Busman, M., Doucette, G.J., Moeller, P.D.R., Silver, J.B., Miller, P.E., Hughes, M.P., Singaram, S., Silver, M.W., Tjeerdema, R.S. 1999. Detection of domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event. *Natural toxins*, 7, 85-92.
- Lefebvre, K.A., Dovel, S.L., Silver, M.W. 2001. Tissue distribution and neurotoxic effects of domoic acid in a prominent vector species, the northern anchovy *Engraulis mordax*. *Marine Biology*, 138, 693-700.
- Lefebvre, K.A., Noren, D.P., Schultz, I.R., Bogard, S.M., Wilson, J., Eberhart, B.T.L. 2007. Uptake, tissue distribution and excretion of domoic acid after oral exposure in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquatic Toxicology* 81, 266–274.
- Lefebvre, K.A., Robertson, A. 2010. Domoic acid and human exposure risks: A review. *Toxicol*, 56, 218-230.
- Lefebvre, K.A., Robertson, A., Frame, E.R., Colegrove, K.M., Nance, S., Baugh, K.A., Wiedenhoft, H., Gulland, F.M.D. 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.A., Frame, E.R., Gulland, F., Hansen, J.D., Kendrick, P.S., Beyer, R.P., Bammler, T.K., Farin, F.M., Hiolski, E.M., Smith, D.R., Marcinek, D.J. 2012. A novel antibody-based biomarker for chronic algal toxin exposure and sub-acute neurotoxicity. *PLoSone*, 7(5), e36213.
- Lefebvre, K.A., Quakenbush, L., Frame, E., Huntington, K.B., Sheffield, G., Stimmelmayer, R., Bryan, A., Kendrick, P., Ziel, H., Goldstein, T., Snyder, J.A., Gelatt, T., Gulland, F., Dickerson, B., Gill, V. 2016. Prevalence of algal toxins in Alaskan marine mammals foraging in a changing arctic and subarctic environment. *Harmful Algae*, 55, 13-24.
- Lefebvre, K.A., Kendrick, P.S., Ladiges, W., Hiolski, E.M., Ferriss, B.E., Smith, D.R., Marcinek, D.J. 2017. Chronic low-level exposure to the common seafood toxin domoic acid causes cognitive deficits in mice. *Harmful Algae* 64, 20-29.
- Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P., Bates, S.S. 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia*, 51(2), 168-216.
- Levin, E.D., Pang, W.G., Harrison, J., Williams, P., Petro, A., Ramsdell, J.S. 2006. Persistent neurobehavioral effects of early postnatal domoic acid exposure in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 28, 673-680.
- Lewitus, A.J., Horner, R.A., Caron, D.A., García-Mendoza, E., Hickey, B.M., Hunter, M., Huppert, D.D., Kudela R.M., Langlois, G.W., Largier, J.L., Lessard, E.J., RaLonde, R., Rensel J.E.J., Strutton P.G., Trainer, V.L., Tweddle, J.F. 2012. Harmful algal blooms along the North American west coast region: History, trends, causes, and impacts. *Harmful Algae*, 19, 133-159.
- Lubinsky-Jinich, D., Schramm, Y., Heckel, G. 2017. The pacific harbor seal's (*Phoca vitulina richardii*) breeding colonies in Mexico: Abundance and distribution. *Aquatic Mammal*, 43(1), 73-81.
- Lundholm, N., Hasle, G.R., Fryxell, G.A., Hargraves, P.E. 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(5), 480-497.

- Mafra, L.L., Léger, C., Bates, S.S., Quilliam, M.A. 2009. Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without derivatization, using UV or mass spectrometry detection. *Journal of chromatography A*, 1216(32), 6003-6011.
- Marriott, A.L., Ryan, C.L., Doucette, T.A. 2012. Neonatal domoic acid treatment produces alterations to prepulse inhibition and latent inhibition in adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103, 338-344.
- Maucher, J.M., Ramsdell, J.S., 2005. Domoic acid transfer to milk: Evaluation of a potential route of neonatal exposure. *Environmental Health Perspectives*, 113(4), 461-464.
- Maucher, J.M., Ramsdell, J.S., 2007. Maternal-fetal transfer of domoic acid in rats at two gestational time points. *Environmental Health Perspectives*, 115(12), 1743-1746.
- McHuron, E.A., Greig, D.J., Colegrove, K.M., Fleetwood, M., Spraker, T.R., Gulland, F.M.D., Harvey, J.T., Lefebvre, K.A., Frame, E.R. 2013. Domoic acid exposure and associated clinical signs and histopathology in Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardii*). *Harmful Algae*, 23, 28-33.
- Mos, L., 2001. Domoic acid: A fascinating marine toxin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 9, 79-85.
- Niño-Torres, C.A., Gallo-Reynoso, J.P., Galván-Magaña, F., Escobar-Briones, E., Macko, S.A. Isotopic analysis of  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ , and  $\delta^{34}\text{S}$  "a feeding tale" in teeth of the longbeaked common dolphin, *Delphinus capensis*. *Marine Mammal Science*, 22(4), 831-846.
- NOAA, 2017. Consultado el 10 de octubre de 2017 en [http://www.westcoast.fisheries.noaa.gov/protected\\_species/marine\\_mammals/stranding\\_maps\\_and\\_contacts.html](http://www.westcoast.fisheries.noaa.gov/protected_species/marine_mammals/stranding_maps_and_contacts.html)
- Osnes-Erie, L.D. 1999. Food habits of common dolphin (*Delphinus delphis* and *D. capensis*) off California. Tesis de maestría. San Jose State University. 73pp.
- Perl, T.M., Bédard, L., Kosatsky, T., Hockin, J.C., Todd, E.C.D. Remis, R.S. 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *The New England Journal of Medicine*, 322(25), 1775-1780.
- Petroff, R.L. 2016. Toxicokinetics of domoic acid in a nonhuman primate model (*Macaca fascicularis*). Tesis de maestría. University of Washington. 60pp.
- Pulido, O.M., 2008. Domoic acid toxicologic pathology: A review. *Marine Drugs*, 6, 180-219.
- Quijano-Scheggia, S., Olivos-Ortiz, A., Gaviño-Rodríguez, J.H., Castro-Ochoa, F., Rivera-Vilarelle, M., Galicia-Pérez, M., Patiño-Barragan, M. 2011. First report of *Pseudo-nitzschia brasiliensis* and *P. micropora* (Bacillariophyceae) found in Cuyutlan Lagoon, Mexico. *Revista de biología marina y oceanografía*, 46(2), 189-197.
- Ramsdell, J.S. 2007. The molecular and integrative basis to domoic acid toxicity. En: Botana, L.M. (Ed.). *Phycotoxins: chemistry and biochemistry*. Blackwell Publishers. Cambridge. (pp. 223-250).
- Ramsdell, J.S., Gulland, F.M., 2014. Domoic acid epileptic disease. *Marine Drugs*, 12, 1185-1207.
- Rust, L., Gulland, F., Frame, E., Lefebvre, K. 2014. Domoic acid in milk of free living California marine mammals indicates lactational exposure occurs. *Marine Mammal Science*, 30(3), 1272-1278.
- SCCOOS. 2017. Consultado el 3 de marzo de 2017, en <http://sccoos.org/query/?project=Harmful%20Algal%20Blooms>.
- Scholin, C., Gulland, F., Doucette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cordaro, J., DeLong, R., De Vogelaere, A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine,

- L.J., Marin, R., Miller, P.E., McLellan, W., Moeller, P.D., Powell, C.L., Rowles, T., Silvagni, P., Silver, M., Spraker, T., Trainer, V., Van Dolah, F.M. 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, 403, 80-84.
- Sellner, K.G., Doucette, G.J., Kirkpatrick, G.J. 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 383-406.
- SEMARNAP-PROFEPA. 1997. Mortandad de mamíferos marinos cuyos cadáveres arribaron a las costas de Sinaloa. Reporte técnico. SEMARNAP, México. p. 50
- Shumway, S.E., Allen, S.M., Boersma, P.D., 2003. Marine birds and harmful algal blooms: Sporadic victims or under-reported events? *Harmful Algae*, 2, 1-17.
- Sierra-Beltrán, A., Palafox-Urbe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A., Ochoa, J.L. 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon*, 35(3), 447-453.
- Silvagni, P.A., Lowenstine, L.J., Spraker, T., Lipscomb, T.P., Gulland, F.M.D. 2005. Pathology of domoic acid toxicity in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Veterinary pathology*, 42, 184-191.
- Skov, J., Lundholm, N., Moestrup, Ø., Larsen, J. 1999. Potentially toxic phytoplankton. 4. The diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Diatomophyceae/Bacillariophyceae). ICES Identification Leaflets for Plankton, no. 185. Intern. Council for the Exploration of the Sea (ICES). p. 23.
- Suzuki, C.A.M., Hierlihy, S.L., 1993. Renal clearance of domoic acid in the rat. *Food Chemistry and Toxicology*, 31(10), 701-706.
- Teitelbaum, J.S., Zatorre, R.J., Carpenter, S., Gendron, D., Evans, A.C., Gjedde, A., Cashman, N.R. 1990. Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *The New England journal of medicine*, 322(25), 1781-1787.
- Teng, S.T., Tan, S.N., Lim, H.C., Dao, V.H., Bates, S.S., Leaw, C.P. 2016. High diversity of *Pseudo-nitzschia* along the northern coast of Sarawak (Malaysian Borneo), with descriptions of *P. bipertita* sp. nov. and *P. limii* sp. nov. (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 52(6), 973-989.
- Todd, E.C.D. 1993. Domoic acid and amnesic shellfish poisoning: a review. *Journal of Food Protection*, 56(1), 69-83.
- Tor, E.R., Puschner, B., Whitehead, W.E. 2003. Rapid determination of domoic acid in serum and urine by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1791-1796.
- Torres de la Riva, G., Johnson, C.K., Gulland, F.M.D., Langlois, G.W., Heyning, J.E., Rowles, T.K., Mazet, J.A.K. 2009. Association of an unusual marine mammal mortality event with *Pseudo-nitzschia* spp. Blooms along the southern California coastline. *Journal of wildlife diseases*, 45(1), 109-121.
- Trainer, V.L., Bates, S.S., Lundholm, N., Thessen, A.E., Cochlan, W.P., Adams, N.G., Trick, C.G. 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae* 14, 271-300.
- Truelove, J., Iverson, F., 1994. Serum domoic acid clearance and clinical observations in the cynomolgus monkey and Sprague-Dawley rat following a single IV dose. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 52, 479-486.



- Tryphonas, L., Truelove, J., Iverson, F. 1990. Acute parenteral neurotoxicity of domoic acid in cynomolgus monkeys (*M. fascicularis*). *Toxicologic pathology*, 18(2), 297-303.
- Valles-Jiménez, R. 1998. Abundancia y distribución de *Delphinus delphis* y *Delphinus capensis* en la costa occidental de la península de baja california. Tesis de maestría. Centro interdisciplinario de ciencias marinas. 91pp.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine Algal Toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives*, 108, 133-141.
- Wang, Z., Maucher-Fuquay, J., Fire, S.E., Mikulski, C.M., Haynes, B., Doucette, G.J., Ramsdell, J.S. 2012. Optimization of solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of domoic acid in seawater, phytoplankton, and mammalian fluids and tissues. *Analytica Chimica Acta*, 715, 71-79.
- Wekell, J.C., Gauglitz, E. J., Barnett, H.J., Hatfield, C.L., Simons, D., Ayres, D. 1994. Occurrence of domoic acid in Washington State razor clams (*Siliqua patula*) during 1991-1993. *Natural Toxins*, 2, 197-205.
- Wells, M.L., Trainer, V.L., Smayda, T.J., Karlson, B.S.O., Trick, C.G., Kudela, R.M., Ishikawa, A., Bernard, S., Wulffi, A., Anderson, D.M., Cochlan, W.P. 2015. Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future. *Harmful Algae*, 1(49), 68-93.
- Work, T.M., Barr, B., Beale, A.M., Fritz, L., Quilliam, M.A., Wright, J.L. 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(1), 54-62.
- Wright, J.L.C., Falk, M., McInnes A.G., Walter, J.A. 1990. Identification of isodomoic acid D and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels. *Canadian Journal of Chemistry*, 68, 22-25.
- Zabaglo, K., Chrapusta, E., Bober, B., Kaminski, A., Adamski, M., Bialczyk, J. 2016. Environmental roles and biological activity of domoic acid: A review. *Algal Research*, 13, 94-101.

## Anexos

Anexo 1. Concentración de ácido domoico (ng/g o ml de muestra) en animales varados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), y las áreas utilizadas para la corrección de la concentración debido al compuesto interferente. nd = no detectado, na = no analizado. Las muestras con proporción 280/242 menor a 2.08 fueron analizadas por otros métodos.

ID	Tipo de muestra	Área <sub>242 nm</sub> (mAu)	Área <sub>280 nm</sub> (mAu)	Resta 280-242	Concentración de AD (ng/g de muestra)		280/242
					Sin corrección	Con corrección	
Pd1	H	53.78	89.4	35.6	3.46	1 324	1.66
	R	34.15	45.0	10.8	2.03	1 708	1.31
	O	16.15	37.8	37.8	0.71	nd	2.33
Zc1	H	30.68	40.0	9.3	1.77	1 564	1.30
	R	20.13	27.3	7.1	1.00	946	1.35
Be1	H	90.22	264.7	174.4	0.51	nd	2.93
Dc1	H	55.66	83.4	27.7	3.59	2 034	1.49
	CE	62.83	71.5	8.6	4.13	3 968	1.13
Ps1	H	59.44	123.3	63.8	2 539	nd	2.07

Anexo 2. Concentración de ácido domoico (ng/g o ml de muestra) en heces de lobo fino de Guadalupe por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), y las áreas utilizadas para la corrección de la concentración debido al compuesto interferente. nd = no detectado, na = no analizado. Las muestras con proporción 280/242 menor a 2.08 fueron analizadas por otros métodos.

No. de muestra	Área <sub>242 nm</sub> (mAu)	Área <sub>280 nm</sub> (mAu)	Resta 280-242	Concentración de AD (ng/g de muestra)		280/242
				Sin corrección	Con corrección	
2	33.17	70.71	37.5	1 887	nd	2.13
3	407.82	707.83	300	31 680	8 914	1.74
4	276.12	557.57	281.4	21 655	320	2.02
5	495.69	1 076.22	580.5	37 758	nd	2.17
7	375.31	909.64	534.3	28 813	nd	2.42
8	32.27	68.56	36.3	4 209	1 776	2.12
9	433.67	954.23	520.5	33 071	nd	2.20
11	72.21	148.11	75.9	4 543	nd	2.05
12	174.94	273.42	98.4	13 985	6 757	1.56
13	790.38	1 892.08	1 201.7	60 000	nd	2.39